

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE**

**PAR
ISABELLE CLOUTIER, B. Sc. (Biophysique)**

**LA CIBLE MOLÉCULAIRE DES ANESTHÉSQUES GÉNÉRAUX:
PEUT-ON DISTINGUER LA PROIE DE SON OMBRE?**

Avril 2003

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier infiniment le Dr François Boucher pour son encouragement et pour son support éclairé et éclairant. Je remercie également la Dre Maïté Paternostre et ses collègues de l'équipe de Physicochimie des Systèmes Polyphasés de l'Université Paris Sud avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer lors de la réalisation de ce projet. Je voudrais exprimer ma reconnaissance au Dr Christian Salesse pour sa disponibilité lorsque j'ai eu besoin de ses conseils. Aussi, je voudrais souligner l'apport des discussions avec mes collègues dans le développement de cette recherche. Enfin, je remercie le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies pour leur support financier. En terminant, je voudrais exprimer toute ma gratitude à ceux qui de loin ou de près, m'ont soutenu dans la réalisation de ce projet et ont rendu cette étape de ma vie des plus enrichissantes.

RÉSUMÉ

Dans la recherche du mécanisme d'action des anesthésiques généraux, la cible moléculaire de ceux-ci reste encore à déterminer. Sachant que la bactériorhodopsine (bR), une protéine membranaire, en présence d'anesthésiques subit les mêmes modifications structurales, spectroscopiques et d'activité que lorsqu'elle est délipidée, nous l'avons utilisée comme modèle pour vérifier si la présence d'anesthésique à l'interface protéine/lipide était la cause de ces changements. Nous avons utilisé des protéoliposomes pour déterminer si l'effet de l'Enflurane se fait sentir en premier sur la bR ou sur la membrane par spectroscopie de fluorescence et d'absorption. Par les mesures de fluorescence d'une sonde lipidique, le Laurdan, les modifications produites sur la membrane lors de l'ajout d'anesthésique, soit la diminution de la température de transition de phase, ont été suivies. Ces mesures ont montré que la variation de la température de transition de phase (T_m) causée par la présence d'anesthésique est différente lorsque le rapport lipide/bR est modifié. En effet, une concentration plus élevée d'anesthésique doit être ajoutée à un échantillon plus concentré en bR pour avoir la même variation de transition de phase. La présence de bR a donc une influence sur la phase des lipides et/ou sur les modifications que peut y apporter l'Enflurane. Par ailleurs, la transition spectrale du rétinale, le chromophore intrinsèque de la bR, a été analysée en présence d'anesthésique. Celle-ci, comparée aux courbes de fusion des lipides indique que l'effet de l'Enflurane se fait sentir en premier sur la bR et ensuite sur les lipides de la membrane. L'accessibilité du Bromoforme à une région lipidique a aussi été comparée à celle d'une région peptidique par quenching de fluorescence sur des vésicules de phosphatidyl choline contenant un peptide fluorescent et du Laurdan. Cependant, ces mesures de quenching n'ont pas montré une préférence de l'anesthésique pour l'interface protéine/lipide. Néanmoins, un ordre des événements moléculaires a été obtenu, soit pour des concentrations croissantes d'anesthésique : 1) le quenching de la fluorescence de la bR, 2) la transition spectrale du rétinale, 3) la transition dans les lipides, 4) le quenching du peptide. Tous ces résultats suggèrent fortement la présence d'un site de liaison pour les anesthésiques sur la bR.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 THÉORIE	8
2.1 Systèmes étudiés : protéoliposomes	8
2.2 Propriétés de la membrane utilisées comme paramètre d'étude du système	9
2.2.1 Température de transition de phase	9
2.2.2 Effet des anesthésiques sur la membrane.....	9
2.3 Les sondes utilisées.....	11
2.3.1 Le Laurdan.....	11
2.3.2 La bactériorhodopsine et l'effet des anesthésiques sur celle-ci.....	13
2.3.3 Le peptide utilisé.....	18
2.3.3.1 Structure et localisation du peptide dans la membrane.....	18
2.3.3.2 Fluorescence du Tryptophane.....	18
2.4 Le <i>quenching</i> de fluorescence.....	19
2.4.1 Principe général.....	19
2.4.2 L'équation de Stern-Volmer.....	20
2.4.3 Informations obtenues de la courbe de Stern-Volmer (traitement des données).....	20
2.4.4 La nature diffusionnelle du <i>quenching</i>	21
2.4.5 Les mécanismes internes de <i>quenching</i>	22

2.5	Mécanisme de <i>quenching</i> du Bromoforme.....	23
CHAPITRE 3	MÉTHODES EXPÉRIMENTALES.....	27
3.1	Matériel.....	27
3.2	Méthodes.....	27
3.2.1	Les systèmes étudiés : des protéoliposomes.....	27
3.2.1.1	Préparation des suspensions de vésicules.....	28
3.2.1.2	Taille des vésicules.....	29
3.2.1.3	Concentration lipidique.....	29
3.2.2	Mesures de variation de la température de transition de phase....	30
3.2.2.1	Collecte des données.....	30
3.2.2.2	Traitement des données.....	32
3.2.3	Mesure de la transition spectrale du rétinol.....	33
3.2.4	Mesures de <i>quenching</i>	34
CHAPITRE 4	RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION	37
4.1	Fluorescence et absorbance de vésicules de DPPC/bR/Laurdan.....	37
4.1.1	Mesures de fluorescence	37
4.1.1.1	De la courbe de transition de phase des lipides à la courbe dose-réponse... ..	40
4.1.1.2	Différence dans les doses produisant la moitié de l'effet maximal... ..	44
4.1.1.3	Effet du recouvrement partiel des spectres de fluorescence du Laurdan et d'absorbance de la bactérorhodopsine.....	44
4.1.2	Mesures d'absorbance.....	46
4.1.2.1	Spectres de la bactérorhodopsine.....	46
4.2	<i>Quenching</i> de fluorescence dans des vésicules de DPPC /peptide /Laurdan par le Bromoforme.	52
4.2.1	Le quencheur : le Bromoforme.....	52
4.2.2	Effet de l'éthanol.....	52

4.2.3	Diffusion du Bromoforme dans l'échantillon.....	53
4.2.4	Vitesse de <i>quenching</i> et température.....	57
4.2.4.1	Préférence du Laurdan pour une phase ou l'autre.....	63
4.2.4.2	<i>Quenching</i> de la fluorescence du Laurdan vs celle du peptide.....	67
CHAPITRE 5	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	73
ANNEXE	80
BIBLIOGRAPHIE.....		82

LISTE DES FIGURES

2.1	Courbes de transition de phase de vésicules de DPPC sans enflurane ou en présence de concentrations croissantes.....	10
2.2	Structure des sondes utilisées.....	12
2.3	Structure de la bactériorhodopsine et principaux évènements moléculaires lors du transfert de proton donnant lieu au photocycle.....	15
2.4	Photocycle de la bactériorhodopsine.....	16
2.5	Spectre de la bactériorhodopsine	17
3.1	Montage pour les mesures d'absorbance et de fluorescence au cours du temps.....	31
3.2	Température de transition de phase et variation de celle-ci lors de l'ajout d'anesthésique.....	33
4.1	Courbes de calorimétrie différentielle à balayage de vésicules de DPPC multi- et uni-lamellaires avec 0.1% (M/M) Laurdan ou sans.....	38
4.2	Spectres d'émission du Laurdan inséré dans des vésicules de DPPC/bR pour des températures de 25 à 50°C.....	39
4.3	Courbes de transition de phase pour des vésicules contenant des lipides et la bactériorhodopsine dans un rapport molaire lip/bR de A) 350 B) 2800: déplacement de la transition de phase en fonction de la concentration d'AG (Enflurane).	42
4.4	Courbes dose-réponse pour des vésicules contenant des lipides et la bactériorhodopsine pour des rapports molaire lip/bR=2800 et 350.....	43
4.5	Superposition des spectres du Laurdan et de la bactériorhodopsine.....	45
4.6	Spectres d'absorbance des vésicules de DPPC/bactériorhodopsine/Laurdan pour des températures croissantes.....	47
4.7	Désensibilisation (rapport des absorbances A_{480}/A_{570}) de la bactériorhodopsine des vésicules de DPPC/bactériorhodopsine/Laurdan.....	48
4.8	Courbes de désensibilisation de la bactériorhodopsine (rétinal) et de fusion des lipides (Laurdan) à 20° et à 45°C	50

4.9	Spectres normalisé du Laurdan pour un échantillon de vésicules de DPPC/Laurdan 1mM sans et avec l'ajout de différents volumes d'éthanol.....	54
4.10	Variation de l'intensité de fluorescence à λ_{\max} avant et après ajout de 100uL d'éthanol dans un échantillon de vésicules de DPPC/Laurdan (1000 :1) 1mM.....	55
4.11	Diminution de l'intensité de fluorescence en fonction du temps lors de l'ajout de 4uL de bromo/etOH 12% v/v à un échantillon contenant 1mM de DPPC/Laurdan.....	56
4.12	Variation du spectre du Laurdan dans le temps après injection de 0.5uL de Bromo/EtOH 12%v/v dans des vésicules de DPPC/Laurdan de 1 mM, pour des températures de A)20°C, B) 30°C.....	59
4.13	Variation du spectre du Laurdan dans le temps après injection de 0.5uL de Bromo/EtOH 12%v/v dans des vésicules de DPPC/Laurdan de 1 mM, pour des températures de A)40°C et B) 50°C.....	60
4.14	Graphique de $\ln(1-\Delta\phi/\Delta\phi_{\max})$ en fonction du temps dont la pente donne une valeur de la vitesse de quenching pour des échantillons de DPPC/Laurdan, [lipides] = 1 mM, pour lesquels 0,5 uL de bromo/EtOh 12%v/v est ajouté initialement et ce pour différentes températures.....	61
4.15	Vitesses de quenching aux différentes températures mises sous la forme d'une courbe d'Arrhénius ($\ln K$ en fonction de $1/T$) et courbe de transition de phase des lipides correspondante pour les mêmes échantillons.....	62
4.16	Variation du rapport I490/I440 du Laurdan en fonction du temps après injection de 0,2uL de Bromo/Et/OH 12%v/v dans des vésicules de DPPC/Laurdan 1mM à 34,6°C.....	65
4.17	Variation du rapport I49/I435 du Laurdan en fonction du temps après injection de 1uL de Bromo/Et/OH 12%v/v dans des vésicules de DPPC/Laurdan 1mM à 36,5°C.....	66
4.18	Spectre de fluorescence du tryptophane du peptide dans le méthanol (--- : excitation, — : émission) pour des concentrations de 0,5, 0.05 et 0.01 mg/mL.....	68
4.19	Variation du rapport quantique de fluorescence du peptide dans des vésicules de DPPC/ peptide / Laurdan (1000 :10 :1), [lipide] = 3mM, en fonction du temps après injection subséquentes de 0,5 uL et de 10 uL de Bromoforme/EtOH 12%v/v.....	70

- 4.20 Spectres de fluorescence de l'échantillon de vésicules pourvues des deux sondes (A : Laurdan, B : peptide) dans un rapport molaire DPPC : Trp (peptide) : Laurdan 1000 : 10 : 1 de concentration totale en lipide de 3.5mM maintenu à 25°C auquel est ajouté 0.1uL de Bromoforme/EtOH 12%v/v..... 71
- 4.21 Rapport du rendement quantique de fluorescence en fonction du temps pour le Laurdan et le tryptophane du peptide du même échantillon lors d'injections successives de 0,1uL de Bromoforme/EtOH 12%v/v..... 72
- 5.1 Ordre des événements produits lors de l'ajout d'anesthésique..... 74

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

À notre époque, une chirurgie majeure serait impensable sans anesthésie générale. Cependant, le mécanisme par lequel les anesthésiques généraux* induisent l'analgésie et l'inconscience réversible n'est pas encore précisé. De nombreuses recherches ont déjà été effectuées afin de connaître ce mécanisme moléculaire, ce qui donne lieu à un foisonnement de résultats expérimentaux sur de multiples aspects de l'effet des anesthésiques, obtenus avec différents anesthésiques appliqués à un large éventail de systèmes biologiques avec des méthodes tout aussi variées. Il est facile d'imaginer que ces résultats disparates ne convergent pas de façon évidente vers un modèle d'action unifié des anesthésiques. Aussi, l'effet des anesthésiques peut être étudié à divers niveaux, soit physiologique, macromoléculaire ou moléculaire. La corrélation entre les résultats obtenus à ces différents niveaux peut être déterminante pour cibler le ou les aspects de l'action des anesthésiques qui induit l'effet d'anesthésie. La nature elle-même des anesthésiques pose une difficulté dans l'établissement d'un mécanisme moléculaire d'action. En effet, les anesthésiques sont divisés en plusieurs familles et il existe de grandes différences structurales entre celles-ci. Il faut donc trouver un modèle qui convienne à tous les anesthésiques, une cible moléculaire qui puisse interagir avec tous les anesthésiques pour donner une même réponse physiologique. Quelle est la nature de l'interaction qui a alors lieu? Cette cible principale des anesthésiques au niveau moléculaire n'est, à ce jour, pas encore déterminée. Certains prennent les protéines membranaires comme cible principale, alors que d'autres croient que c'est la membrane. Il est possible que ce que l'on suppose être la proie des anesthésiques ne soit en fait que l'ombre de la proie. Tout en reconnaissant l'importance de ces deux composants cellulaires dans la médiation de l'anesthésie, est-il possible d'aller plus loin et de distinguer la proie de son ombre?

* La présente étude portant sur les anesthésiques généraux, le terme « anesthésique » sera utilisé pour « anesthésique général », sauf lorsque spécifié, afin d'alléger le texte.

La première question à poser afin de comprendre leur mécanisme d'action est celle de la localisation de l'anesthésique, i.e. leur(s) cible(s). À la différence des anesthésiques locaux, les anesthésiques généraux agissent sur le système nerveux central. Ne sachant pas au départ quel était la cible primaire des anesthésiques, le potentiel anesthésiant a été évalué sur des animaux entiers, celui-ci étant défini comme la dose responsable de l'anesthésie de 50% des sujets sous étude[1]. Une corrélation entre ce potentiel anesthésiant et la solubilité d'un anesthésique dans l'huile d'olive a été établie par Meyer [2] au tout début du XX^{ème} siècle. Ils en ont conclu que les anesthésiques se dissolvaient dans la membrane des cellules du cerveau, causant une dysfonction de celles-ci, ce qui produirait l'anesthésie. De nombreuses études sur les lipides ont alors été entreprises rapportant des modifications dans la phase[3] et/ou la fluidité des membranes[4]. Considérant que les membranes eucaryotes ont une température de transition de phase (T_m) bien au dessous de la température physiologique et sachant qu'aux concentrations cliniques d'anesthésiques, la mobilisation des lipides membranaires correspond à celle produite par l'augmentation de température d'environ 1°C[5], il semble peu probable que l'anesthésie soit causée uniquement par la modification de ces propriétés.

Les recherches se sont ensuite tournées vers les protéines comme cible des anesthésiques. C'est d'ailleurs probablement le seul point sur lequel s'accordent les différentes théories actuelles, i.e. que les anesthésiques agissent ultimement sur les protéines, que ce soit par une interaction directe ou par l'intermédiaire de modifications des propriétés physico-chimiques de la membrane. L'importance des protéines membranaires (récepteurs, canaux ioniques, ...) dans la transmission de l'influx nerveux est reconnue et on peut facilement imaginer qu'en perturbant leur fonction on puisse induire l'anesthésie. Effectivement, les canaux voltage-dépendant, les récepteurs de neurotransmetteurs montrent tous une sensibilité aux anesthésiques[1]. Cependant, les modèles les plus complets proposant un mécanisme d'action ont été élaborés à partir de protéines solubles telles que la luciférase, la myoglobine ou l'albumine sérique bovine, malgré que celles-ci ne soient pas reconnues comme ayant un rôle direct dans la médiation de l'anesthésie. Les recherches faites sur de tels systèmes suggèrent que la

liaison des anesthésiques aux protéines est impliquée dans le mécanisme d'action des anesthésiques. Elles tentent de définir le type de liaison et les changements énergétiques qui lui sont associés, ainsi que les conséquences locales et globales sur la conformation de la protéine.

La luciférase, une enzyme de la luciole, a été largement étudiée car la diminution de son activité par différents anesthésiques peut être corrélée au potentiel anesthésiant observé chez les mammifères. De plus, il a été observé que l'inhibition par les anesthésiques est compétitive avec la luciférine, suggérant ainsi que l'anesthésique se fixe dans le site de liaison de son substrat[6]. Les études sur la myoglobine et sur l'albumine sérique bovine ont suggéré comme mécanisme la stabilisation de la protéine et la liaison saturable de l'anesthésique à celle-ci [7]. Tanner et al.[8] ont trouvé que cette altération de la stabilité conformationnelle est dépendante de la protéine et produit soit une stabilisation ou une déstabilisation. Parmi les efforts pour déterminer le type de liaison, certains auteurs font une distinction entre une liaison spécifique et non spécifique et tentent de déterminer leur constante de dissociation (K_d) [9]. La première est généralement attribuée à une liaison forte et saturable tandis que la seconde est attribuée à une liaison à de multiples sites à faible affinité. Johanson et al. [10-12] ont tenté de déterminer les caractéristiques d'un site de liaison aux anesthésiques à partir d'un carré d'hélices qui forme une cavité hydrophobe. En remplaçant les résidus qui forment la cavité, ils ont composé une cavité qui lierait les anesthésiques avec une plus grande affinité pour ensuite en déterminer les caractéristiques structurales. Cependant, par simulation moléculaire, Davies et al. [13] ont trouvé que ce même carré d'hélices ne formait pas de cavité permettant d'accueillir l'halothane et que l'affinité accrue de l'halothane pour le mutant serait un effet indirect de la mutation.

Cependant, il y a pour l'instant peu d'informations concernant la structure des protéines membranaires et les modifications structurales engendrées par les anesthésiques sur celles-ci et une évidence probante appuyant soit le mécanisme d'interaction directe des anesthésiques sur la protéine ou soit une interaction médiée par la membrane n'a pas encore été trouvée. Les membranes biologiques, pour leur part,

sont des systèmes complexes du fait de leur hétérogénéité et des nombreuses forces intermoléculaires faibles qui en font une structure liquide-cristalline. Cela rend la détermination de leur rôle dans les fonctions biologiques difficile. Néanmoins, de nombreuses études se sont penchées sur les différentes propriétés physico-chimiques des membranes afin de déterminer l'influence des anesthésiques sur celles-ci, et d'autres études, moins nombreuses, ont pour sujet la façon dont ces modifications se répercutent sur la protéine. Dans cet effort, une des clés du problème semble être de déterminer la localisation des anesthésiques dans la membrane. Or, malgré l'apparente simplicité de la question, la réponse semble difficile à trouver puisque plusieurs études ont donné des résultats contradictoires. Certaines ont trouvé que les anesthésiques se logent à l'interface membrane/eau [14-18], alors que d'autres ont suggéré que les anesthésiques se logent plus profondément dans la région des chaînes aliphatiques. D'autres résultats permettent de pencher en faveur d'une localisation des anesthésiques à l'interface. Les anesthésiques ont comme caractéristique commune d'avoir une polarisabilité élevée et/ou un fort moment dipolaire. On rapporte également que les anesthésiques diminuent le potentiel dipolaire de la membrane alors que les non-anesthésiques ne l'altèrent pas[19]. La polarité des anesthésiques par rapport aux non-anesthésiques explique ce phénomène car, ils peuvent ainsi aligner leur moment dipolaire à l'interface de la membrane de façon à diminuer l'effet du moment dipolaire intrinsèque de la membrane. Ces études indiquent donc une nette préférence des anesthésiques pour l'interface de la membrane.

Aussi, la loi de Meyer-Overton a été reprise en substituant la solubilité des anesthésiques dans le corps d'une phase non-polaire pour la solubilité à l'interface[20]. Cette dernière relation donne une meilleure corrélation entre le potentiel anesthésique et la solubilité à l'interface. Ceci s'applique, entre autres, aux composés non-polaires qui présentent un potentiel anesthésiant moins élevé que celui prédit par la relation traditionnelle de Meyer-Overton, ainsi qu'aux alcools dont le potentiel anesthésiant est plus élevé que celui prédit par la même relation. La particularité de l'environnement interfacial est que les solutés polaires et amphiphiles, à la différence des composés non-polaires, y ont une solubilité accrue[21]. L'exactitude de cette relation pour une gamme

étendue d'anesthésiques implique que ces composés agissent dans un environnement qui a les caractéristique d'une interface, qu'elle soit entre la membrane et l'eau, une région particulière de la protéine et la membrane ou l'eau, selon les particularités de cette dite région.

Il a été suggéré que cette localisation préférentielle des anesthésiques à l'interface perturbe la pression latérale sur les protéines membranaires sur le plan de la normale de la membrane. De ce fait, la courbure spontanée de la membrane est affectée et la modification de celle-ci a été suggérée comme pouvant moduler l'activité des protéines membranaires[22]. Cette modification de la courbure spontanée de la membrane est analogue au changement du profil de pression latérale de la membrane qui est exercée sur la protéine produite par les anesthésiques, un mécanisme d'action des anesthésiques proposé par R. Cantor [23]. Son modèle théorique tient compte du fait que la membrane possède une pression latérale locale qui varie selon la profondeur dans la membrane. Celle-ci peut être grandement perturbée localement par la présence de composés qui ont une localisation hétérogène dans la membrane, tels que les anesthésiques, pour ne pas les nommer, qui se logent à l'interface. Aussi, il soutient que le changement conformationnel entre la forme active et inactive d'une protéine, tel qu'un récepteur, est accompagné d'une modification de son aire de section selon la profondeur de la membrane. La perturbation dans le profil de pression latérale exercée sur la protéine, causée par les anesthésiques, serait assez importante pour faire basculer l'équilibre conformationnel de celle-ci.

Bien sûr, il est possible que cette dualité qui existe entre les hypothèses d'un mécanisme direct ou indirect de l'action des anesthésiques sur la protéine se présente dans les faits comme étant deux mécanismes complémentaires.

Tel que mentionné plus haut, l'interface membrane/eau est un environnement de prédilection pour les anesthésiques et ceci peut s'appliquer à d'autres interfaces possédant les mêmes caractéristiques. Aussi, l'hypothèse que nous avons essayé de vérifier par ce travail, est que le mécanisme d'action des anesthésiques passerait par

l'altération des interactions protéines-lipides due à une présence des anesthésiques à l'interface protéine/lipide. Cette hypothèse s'appuie sur une étude précédente qui indique que la délipidation complète de la bactériorhodopsine (bR) conduit au même état de désensibilisation que lorsque celle-ci est en présence d'anesthésiques[24]. Il est donc possible que les anesthésiques modifient considérablement les interactions protéine/lipide, ce qui suppose une affinité particulière pour l'interface protéine/lipide.

Dans le cadre de ce travail, nous avons exploré cette hypothèse en mesurant l'effet d'anesthésiques sur des protéoliposomes servant à modéliser une cellule avec les deux composants essentiels soupçonnés de jouer un rôle de première importance : la membrane lipidique et une protéine membranaire. Les analyses ont été effectuées d'abord sur des vésicules de phosphatidyl choline (DPPC) contenant de la bactériorhodopsine, une protéine possédant une structure tertiaire (7 hélices transmembranaires) , puis dans le but de simplifier le modèle au maximum, sur des vésicules de DPPC contenant un peptide transmembranaire (sans structure tertiaire). L'objectif de cette étude est de déterminer si l'effet de l'Enflurane et du Bromoforme, des anesthésiques généraux, sur ces vésicules se fait sentir en premier (pour des concentrations plus faibles d'anesthésiques) sur la membrane ou sur la protéine et d'obtenir un nouvel éclairage sur la cible moléculaire des anesthésiques généraux. Pour ce faire, des courbes de désensibilisation de la bR et de fusion des lipides selon la concentration d'Enflurane sont comparées. Aussi, des courbes dose-réponse vont permettre de suivre la variation de la température de transition de phase des lipides selon la concentration d'Enflurane pour des préparations contenant différents rapports lipides/bR. Le rétinol contenu dans la bR sert de sonde pour suivre l'effet de l'enflurane sur la protéine, tandis qu'une sonde fluorescente insérée dans les vésicules permet de suivre la fusion de celles-ci en présence d'anesthésiques. Une approche par *quenching** de fluorescence est utilisée dans le cas des vésicules contenant le peptide, le *quencheur* étant un anesthésique (Bromoforme). Ceci permet de comparer l'accessibilité de

* Le terme anglais « quenching » a été francisé et utilisé tout au long du texte à la place du terme français « atténuation de fluorescence » afin d'alléger le texte.

l'anesthésique à une région lipidique par rapport à la région peptidique du protéoliposome.

CHAPITRE 2

THÉORIE

2.1 Systèmes étudiés : protéoliposomes

Mis en présence d'eau et au-delà d'une certaine concentration, les phospholipides ont naturellement tendance à s'auto-associer du fait de leur nature amphiphile. Ils peuvent ainsi former de façon coopérative différents types de structure selon les conditions (température, force ionique, pH). Les forces responsables de l'agrégation sont à la fois la l'effet hydrophobe, qui conduit les chaînes hydrophobes à s'assembler, et les interactions de type polaire entre les têtes polaires et l'eau. La structure géométrique du phospholipide (surface de la tête, le rapport du volume sur la longueur maximale des chaînes, présence d'insaturations) est déterminante dans le type de structure formée spontanément. Dans le cas du dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), ce sont des bicouches flexibles ou des vésicules qui seront formées[25].

Le système sur lequel les effets de l'Enflurane et du Bromoforme ont été étudiés est une préparation de vésicules de DPPC dans lesquelles a été inséré la bactériorhodopsine (bR) ou le peptide. Les vésicules sont formées par la méthode d'évaporation en phase inverse[26] légèrement modifiée qui est décrite en détail dans la section *Méthode expérimentale*. Ce protocole permet d'obtenir de façon reproductible une population de vésicules unilamellaires, homogène en taille et dans la composition en protéine. Les objets obtenus par cette méthode sont des LUVs (« large unilamellar vesicles ») dont le diamètre est ~100 nm, valeur qui dépend du diamètre des pores du filtre utilisé. Celles-ci sont plus appropriées comme modèle de membrane biologique que les SUVs (small unilamellar vesicles) à cause de leur rayon de courbure important qui permet une insertion du peptide ou de la protéine à l'intérieur de la membrane. Elles ont aussi la caractéristique d'être des structures à l'équilibre, une condition préalable aux

mesures thermodynamiques, et donc stables dans le temps. Il faut noter qu'avec ce protocole, la bR est insérée avec une partie de ses lipides endogènes.

2.2 Propriétés de la membrane utilisées comme paramètre d'étude du système

2.2.1 Température de transition de phase

Dans un milieu contenant une forte teneur en eau, tel que dans les conditions physiologiques, les phospholipides s'assemblent pour former des structures lamellaires hydratées correspondant à une phase liquide cristalline. Cette phase est un intermédiaire entre les phases solide (cristalline) et liquide des lipides. La phase liquide cristalline peut passer sous différentes sous-phases dépendamment du contenu en eau et de la température. Les principales sont les phases non-fluides ou gel ($L_{\beta'}$ et $P_{\beta'}$) qui sont suivies, lorsque la température est élevée, de la phase fluide cristal-liquide (L_{α}). La phase gel est formée à des températures inférieures à la température critique de transition de phase (T_m) correspondant à la fusion des chaînes aliphatiques, au-dessus de laquelle les lipides se trouvent dans la phase cristal-liquide. Dans la phase gel, les chaînes sont ordonnées, la diffusion latérale et le taux de flip-flop est faible, mais les têtes polaires restent très mobiles même si les chaînes ne le sont pas. La phase cristal-liquide possède des chaînes désordonnées, l'épaisseur de la bicouche diminue et l'eau a accès plus facilement aux têtes polaires. La membrane de DPPC possède une prétransition ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) à 35°C et une transition principale ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$) à 41.5°C[27]. Les anesthésiques ont comme caractéristique de modifier ces propriétés de la membrane.

2.2.2 Effet des anesthésiques sur la membrane

Il a été démontré que la plupart des anesthésiques ont pour effet de diminuer de façon significative la température de la transition gel à cristal-liquide dans des systèmes de lipides purs[3]. À des concentrations cliniques, cet effet est comparable à celui obtenu par l'augmentation de la température de 1°C. Cependant, à des concentrations plus

élevées, pour un système composé uniquement de DPPC (des vésicules unilamellaires), on observe une diminution du T_m de presque 10°C (figure 2.1).

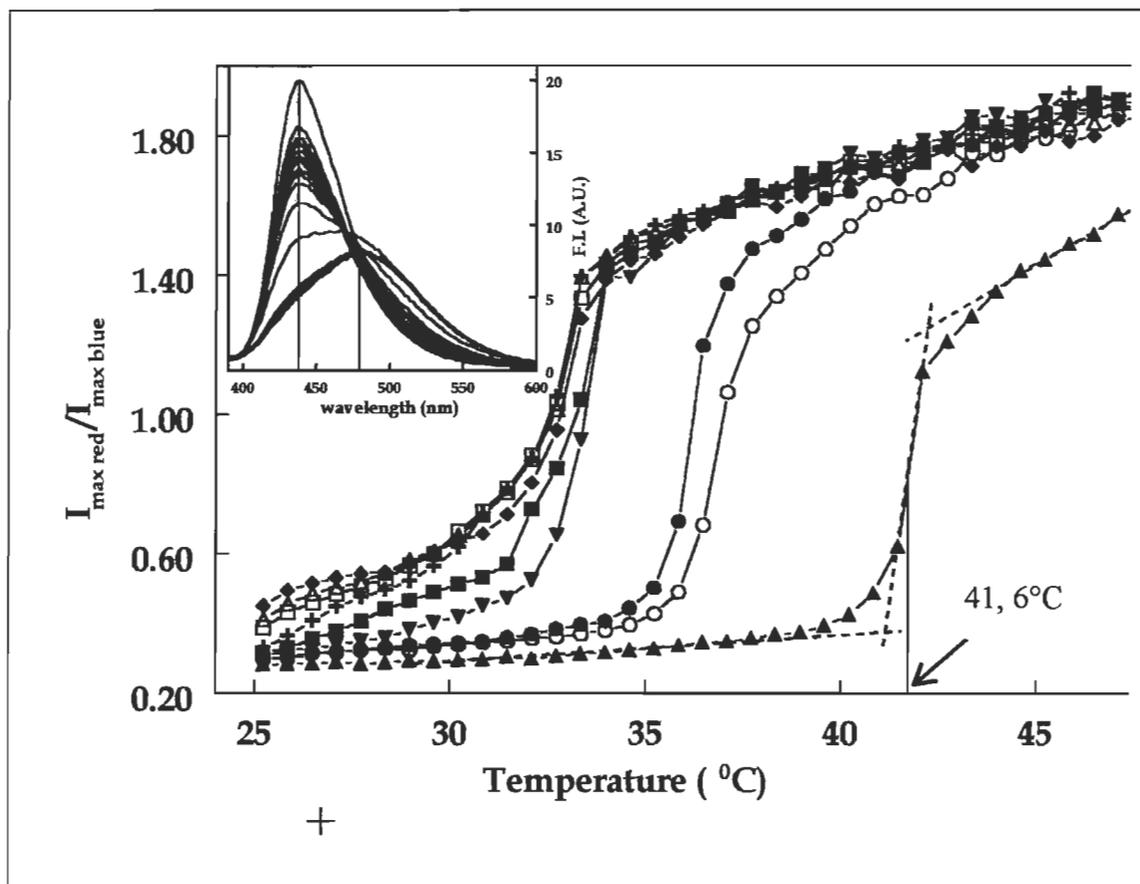


FIGURE 2.1 Courbes de transition de phase de vésicules de DPPC sans enflurane (courbe de droite), ou en présence de concentrations croissantes (8 à 95 mM, courbes suivantes de droite à gauche) d'enflurane, mesurée par le rapport de l'intensité de fluorescence du Laurdan. Encadré : spectres de fluorescence du Laurdan. Lorsque la membrane est en phase gel, l'intensité maximale de fluorescence est près de 435 nm et elle se déplace vers 490 nm lorsque la membrane est en phase cristal-liquide. Le rapport des deux intensités donne les courbes de transition de phase. Le graphique a été gracieusement fourni par Nathalie Hauet, U. Paris Sud.

2.3 Les sondes utilisées

2.3.1 Le Laurdan

Le Laurdan (6-propionyl-2-diméthylaminonaphtalène) (figure 2.2) est une sonde fluorescente lipophile qui a été utilisée pour suivre la transition de phase des lipides et pour étudier par *quenching* de fluorescence l'accessibilité du Bromoforme à la région de la membrane où est logé le Laurdan. Il possède à la fois un donneur et un accepteur d'électron, ce qui lui donne un fort moment dipolaire à l'état excité et une grande sensibilité à la polarité du solvant qui se traduit par un déplacement de sa longueur d'onde maximale d'émission [28]. Lorsqu'il est incorporé à des vésicules, il se place à l'interface membrane-eau au niveau de la partie glycérol des phospholipides, la chaîne aliphatique étant ancrée dans la région des chaînes hydrophobes des lipides[29]. De par sa chaîne de carbones, le laurdan est très stable dans la membrane. Le groupement naphthalène est situé au niveau des groupements phosphates des phospholipides et la chaîne s'enfonce aux côtés des chaînes hydrophobes des lipides. Il reste dans la membrane, même si la pression est augmentée [30]. S'il est chargé (lorsque le pH < 3.0), il s'approche un peu de l'interface lipide/eau. Il reste à l'intérieur de la membrane même s'il est chargé et soumis à une pression élevée.

La relaxation du Laurdan à partir de l'état excité est indépendante de la nature des têtes polaires des phospholipides, et est plutôt déterminée par le degré de pénétration de l'eau dans la bicouche [31]. Du fait que dans la phase cristal-liquide l'eau pénètre plus facilement dans la membrane que dans la phase gel, le Laurdan est sensible à l'état physique des lipides qui l'entourent. Il se produit alors un déplacement des longueurs d'ondes maximales d'émission de 434 nm à 490 nm lors de la transition gel → cristal liquide (voir l'encadré de la figure 2.1). Plusieurs hypothèses [32] ont été proposées quand à la nature du mécanisme responsable de cette variation spectrale (relaxation non-radiative précédant la relaxation radiative) soit:

- la relaxation dipolaire d'environnement par réorientation des dipôles de la cage de solvant due à l'augmentation dipolaire du fluorophore à l'état excité ;
- l'existence probable d'un phénomène de transfert de charge intramoléculaire de rotation (TITC) ;

- la formation d'exciplexes sonde-solvant à l'état excité, due à de fortes liaisons hydrogène intermoléculaires dans le cas d'environnement protique.

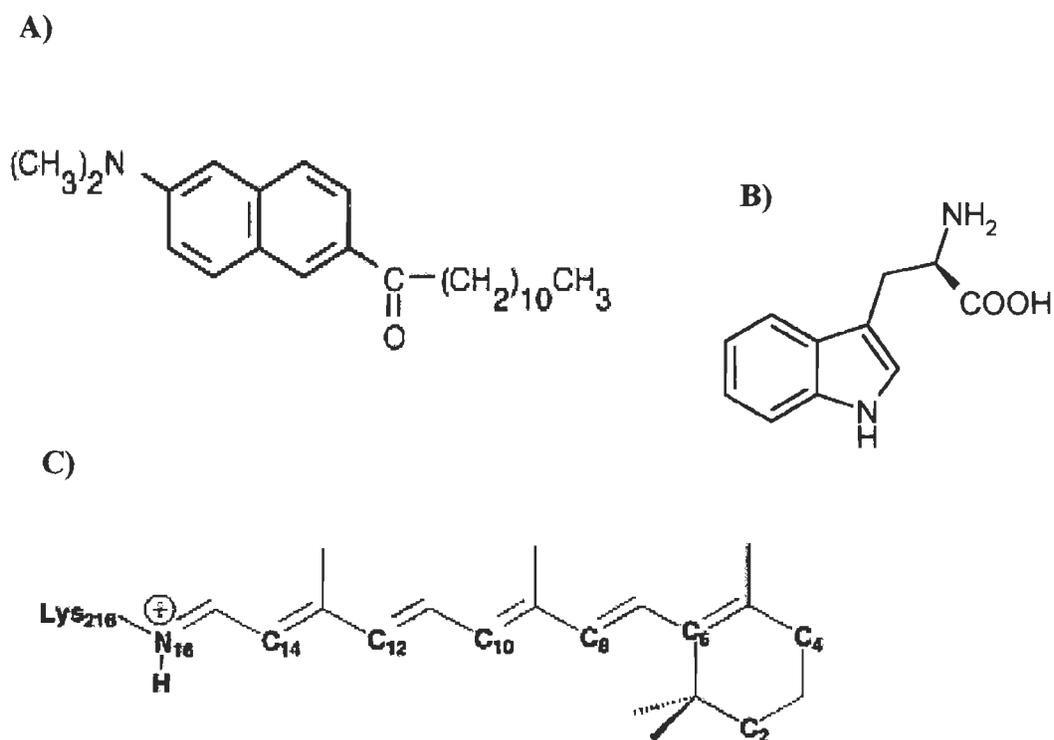


FIGURE 2.2 Structure des sondes utilisées A) le 6-propionyl-2-diméthylaminonaphthalène, vendu sous le nom commercial Laurdan; B) le tryptophane et C) le rétinol.

2.3.2 La bactériorhodopsine et l'effet des anesthésiques sur celle-ci.

La bactériorhodopsine est une protéine photoréceptrice contenue dans une partie de la membrane de la bactérie *Halobacterium halobium*[33]. Elle forme alors une structure cristalline hexagonale de trimères de protéines[34] qui contient moins de 25% de lipides[35] en poids sec de membrane, i.e. ce qu'il faut pour combler les espaces entre les trimères de protéines. Cette partie de la membrane possédant une structure rigide et ordonnée est appelée membrane pourpre. La structure tertiaire de la bR (figure 2.3) consiste en sept hélices- α transmembranaire formant un canal autour d'un chromophore, le rétinol (figure 2.2). Celui-ci est lié de façon covalente à la bR par le résidu Lysine-216 via une liaison de type base de Schiff. Le rétinol s'isomérisé lorsqu'il absorbe un photon, passant ainsi de la configuration tout-*trans* à 13-*cis* à l'intérieur d'un cycle appelé photocycle. Plusieurs intermédiaires optiques apparaissent lors de ce cycle (figure 2.4) à la fin duquel un proton a été pompé du côté cytoplasmique vers le côté extracellulaire. Les intermédiaires sont connus sous les noms bR₅₇₀, K₆₁₀, L₅₅₀, M₄₁₂, N₅₅₀ et O₆₄₀ et caractérisés par longueur d'onde maximale d'absorption (en indice). La fonction de la bR est donc de transporter des protons contre un gradient électrochimique ce qui permet ensuite à la cellule de synthétiser de l'ATP.

Lors de l'ajout d'anesthésiques généraux tel que l'Enflurane, il se produit un changement de couleur, de pourpre à rouge, engendré par l'établissement d'un équilibre acido-basique entre les formes bR₅₇₀ (native) et bR₄₈₀ (désensibilisée) de la bactériorhodopsine (figure 2.5). Un léger changement de sa structure tertiaire est observé: les 7 hélices- α présentent alors une inclinaison plus prononcée[36]. Aussi, la bR perd son activité de pompage de proton, ce qui indique un découplage entre l'activité photochimique et le pompage de proton.

Ce découplage peut être expliqué par une modification du trajet emprunté et/ou une diminution significative de distances parcourues par le proton à l'intérieur de la bR[37]. Tout comme le pigment natif, le pigment modifié bR₄₈₀ possède une activité photochimique complète qui est essentiellement caractérisée par une déprotonation très rapide suivie par une reprotonation extrêmement lente du rétinol. D'un point de vue

spectroscopique, les principaux facteurs déterminant la position du λ_{max} d'absorption du rétinale sont l'état de protonation de la base de Schiff et la distribution des charges ou des dipôles autour du rétinale[38]. Une étude ayant déjà montré que le rétinale n'est pas la cible primaire des anesthésiques[39], c'est plutôt la subtile variation dans la structure tertiaire de la protéine produite par la présence d'anesthésique qui conduirait à une modification de l'environnement chimique du rétinale et ainsi au déplacement spectral observé[37].

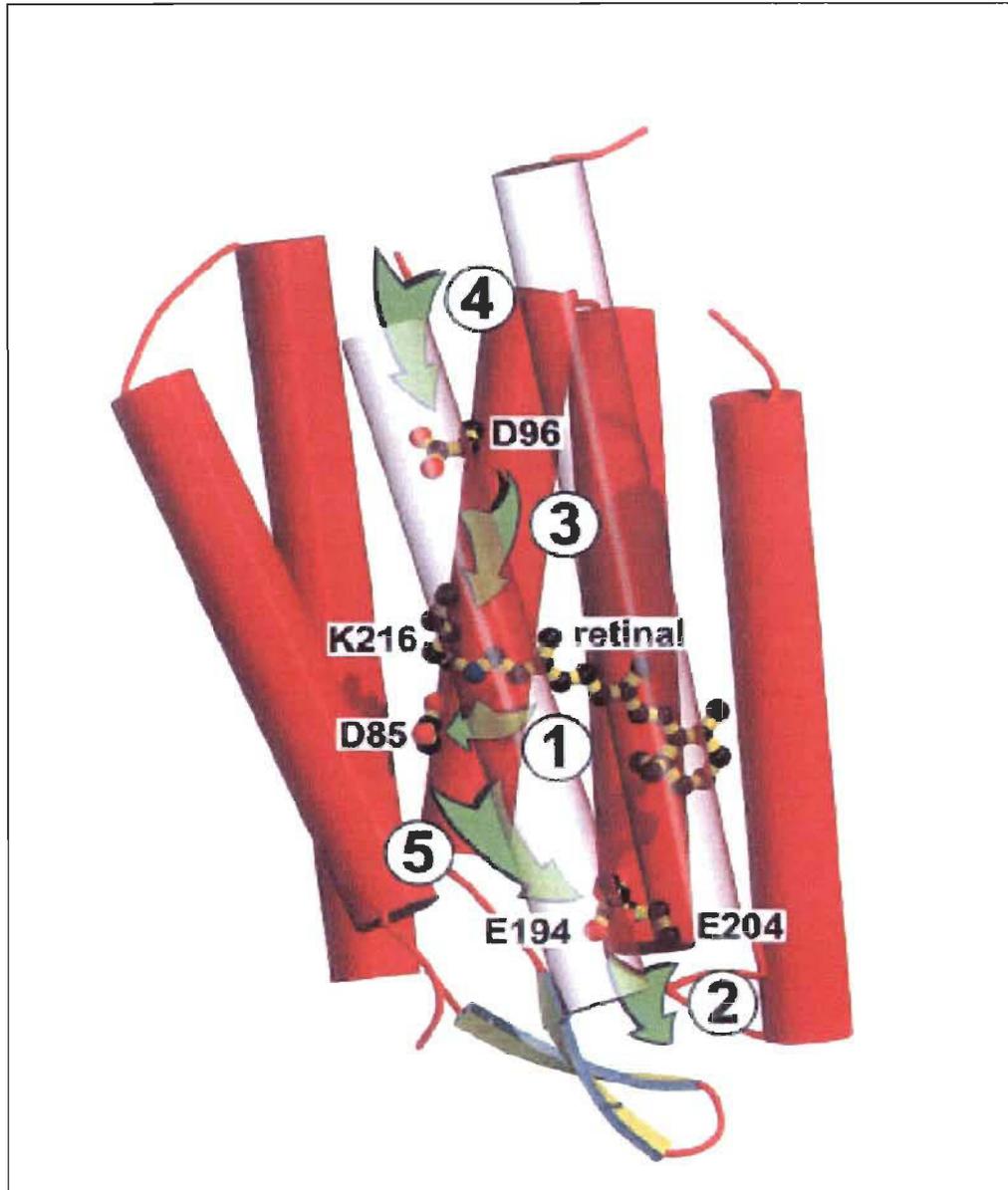


FIGURE 2.3 Structure de la bactériorhodopsine et principaux événements moléculaires lors du transfert de proton donnant lieu au photocycle. Suite à l'isomérisation du rétinal par l'absorption d'un photon, il se produit 1) la déprotonation de la base de Schiff et la protonation de l'Asp 85; 2) la libération d'un proton à la surface extracellulaire ; 3) la déprotonation de l'Asp 96 et la reprotonation de la base de Schiff; 4) la reprotonation de l'Asp 96 à partir de la surface cytoplasmique et la réisomérisation thermique du rétinal; 5) la déprotonation de l'Asp 85 et la reprotonation du groupe ayant cédé un proton du côté extracellulaire.

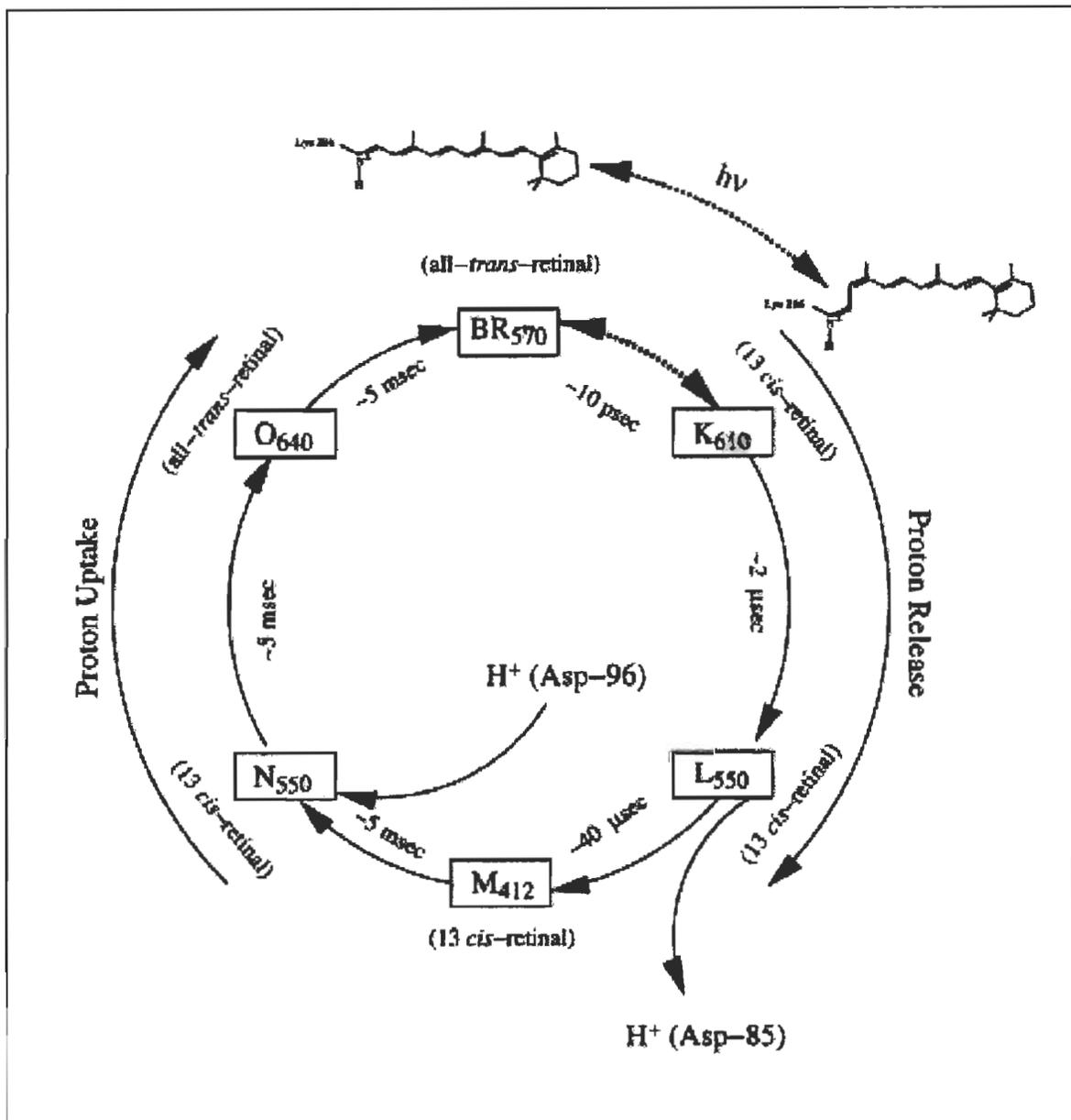


FIGURE 2.4 Photocycle de la bactériorhodopsine.

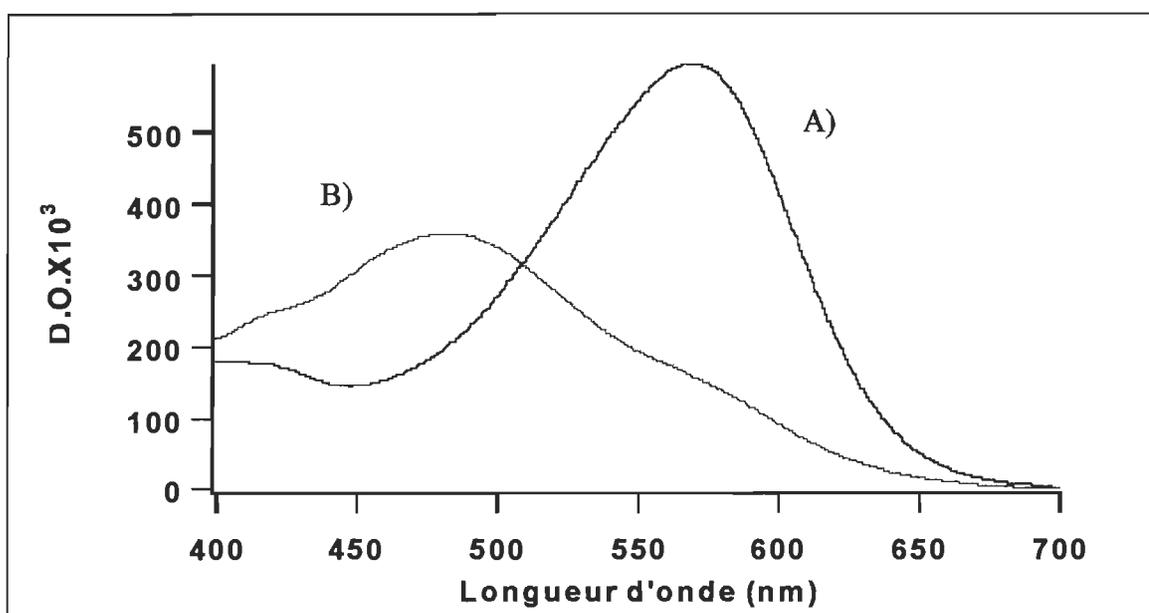


FIGURE 2.5 Spectre d'absorption de la bactériorhodopsine : A) sous la forme native, $\lambda_{\max} = 570$ nm; B) sous la forme désensibilisée, $\lambda_{\max} = 480$ nm

2.3.3 Le peptide utilisé

2.3.3.1 Structure et localisation du peptide dans la membrane

Le peptide utilisé dans la présente étude possède la séquence d'acides aminés suivante : Lys₂-Gly-Leu₈-Trp-Leu₈-Lys-Ala-amine. Les propriétés de ses acides aminés en font un peptide membranaire hélicoïdal. La position du peptide dans la membrane a été étudiée[40] dans des vésicules de POPC par marquage au TNBS et par *quenching* de fluorescence du tryptophane par des lipides analogues contenant deux bromes placés à des positions variables sur la chaîne carbonée. Dans ce système, il a été trouvé que lorsque les vésicules sont sous forme de LUV (« large unilamellar vesicles »), tel que dans la présente étude, le peptide est orienté de façon transmembranaire. Lorsque la taille des vésicules diminue, augmentant la courbure de la membrane comme c'est le cas pour les SUVs (« small unilamellar vesicles »), un pourcentage du peptide se lie à la surface de la membrane. À partir des mesures de *quenching* de fluorescence du peptide inséré dans des vésicules de lipides di-bromés et ayant déterminé préalablement par diffraction des rayons-X la position des bromes dans ces membranes, les auteurs concluent que le tryptophane du peptide se trouve au centre de la membrane.

2.3.3.2 Fluorescence du tryptophane

Le tryptophane (figure 2.2) est l'un des acides aminés (tryptophane, tyrosine, phénylalanine) qui servent de chromophores intrinsèques aux protéines et qui est d'une grande utilité dans l'étude de celles-ci. Le spectre d'excitation du tryptophane s'étend de 250 à 350 nm et son maximum se trouve à 280 nm. Ce spectre est dû principalement aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ de l'hétérocycle indole. En solution aqueuse, le tryptophane présente un spectre de fluorescence large et sans structure dont le maximum est à 350 nm. Il possède une absorptivité élevée et un rendement quantique de fluorescence relativement important (*ca* 5%) qui en font une sonde sensible. L'intensité, la longueur d'onde maximale et le rendement quantique de fluorescence sont dépendants du solvant dans lequel le tryptophane se trouve. En effet, l'excitation conduit à une augmentation

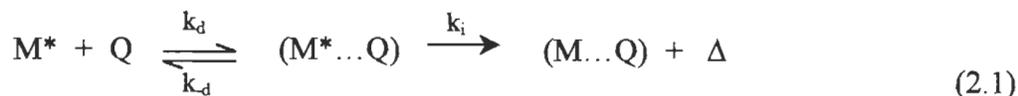
substantielle du moment dipolaire (autour de 4D) [41], qui peut amener le solvant à se réorienter de façon à neutraliser le dipôle du fluorophore avant que la fluorescence ne soit émise (relaxation par le solvant). Ainsi, le spectre de fluorescence se déplace vers des longueurs d'ondes plus courtes et l'intensité augmente lorsque la polarité du solvant entourant le résidu du tryptophane diminue. Les spectres d'excitation et d'émission du tryptophane du peptide sont présentés à la figure 4.18. Le peptide étant dans du méthanol, on constate un léger déplacement du maximum vers 344nm., ce qui est en accord avec des résultats rapportés. (Les informations contenues dans cette section sont tirées de deux sources principales : [41] et [42])

2.4 Le quenching de fluorescence

Le *quenching* de fluorescence permet de suivre les changements d'accessibilité du *quencheur* au fluorophore. Les réactions avec le *quencheur* donnent des informations topographiques et dans certains cas, il a été possible d'obtenir des informations sur la dynamique conformationnelle de protéines globulaires. Il est utilisé dans cette étude pour comparer l'accessibilité d'un anesthésique (ayant des propriétés de *quencheur*) à une région lipidique par rapport à une région peptidique de protéoliposomes.

2.4.1 Principe général

Le traitement des mesures de fluorescence et de son quenching est décrit en détail dans la plupart des ouvrages consacrés au sujet. Celui que nous avons utilisé est l'ouvrage de Nicholas Turro [43]. L'expression générale de la cinétique d'une réaction de *quenching* dans une phase isotrope est la suivante :



où Q représente le quencher, M* est un fluorophore à l'état excité, (M*...Q) est le complexe formé lors de la collision, et (M...Q) est le complexe résultant lorsque l'excès d'énergie a été dissipé en chaleur. La première étape est limitée par la diffusion des molécules et les constantes de vitesse k_d et k_{-d} sont des constantes diffusionnelles

d'association et de dissociation du complexe ($M^* \dots Q$). La deuxième étape est régie par le mécanisme interne de *quenching* dont la constante de vitesse est k_i .

2.4.2 L'équation de Stern-Volmer

L'équation de Stern-Volmer décrit la relation suivante afin de décrire le *quenching* collisionnel (ou dynamique) dans des conditions d'illumination constante:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = \frac{\tau_0}{\tau} \quad (2.2)$$

où F_0 et F , τ_0 et τ sont respectivement le rendement quantique et le temps de vie de fluorescence en absence et présence de *quencheur*, Q . K_{sv} est la constante de *quenching* dynamique de Stern-Volmer qui est égale à $k_q\tau_0$. k_q est la constante apparente de *quenching* dynamique de la réaction donné par l'équation 2.1, et est égale à k_d quand l'efficacité de la réaction, γ , tend vers l'unité (i.e. $k_q = \gamma k_d$). k_d est la constante de diffusion donnée par l'équation de Smoluchowski (en négligeant le terme transitoire) :

$$k_d = 4\pi DR_0N' \quad (2.3)$$

où D et R_0 sont la somme des coefficients de diffusion et des rayons moléculaires respectivement, du *quencheur* et du fluorophore, et N' est le nombre d'Avogadro divisé par 1000. Dans les cas où l'efficacité de la réaction est plus petite que 1, tous les complexes formés entre Q et M^* ne produisent pas de *quenching* et k_q est approximativement égal à $k_d k_i / k_d$.

2.4.3 Informations obtenues de la courbe de Stern-Volmer (traitement des données)

Les informations que l'on peut tirer de l'équation de Stern-Volmer telle que présentée ci-haut sont obtenues de la diminution de la fluorescence en fonction de la concentration de *quencheur* dans des conditions d'illumination constante. Cette équation est adéquate si le mécanisme de *quenching* diffusionnel est uniquement dynamique. Dans ce cas, la diminution de l'intensité de fluorescence, F/F_0 , est proportionnelle à la diminution du temps de vie de fluorescence, τ/τ_0 . L'accessibilité est définie par k_q et dépend généralement de « l'exposition stérique » du fluorophore au

quencheur. Elle peut être obtenue de la courbe de Stern-Volmer à partir du rapport de K_{SV} sur τ_0 ($k_d = K_{SV}/\tau_0$). Le traitement de données par l'équation de Stern-Volmer obtenues d'un système où il y a présence de plusieurs populations de fluorophores peut donner une courbe non-linéaire. En effet, il est possible que les différentes populations de fluorophore ne soient pas également accessibles au *quencheur*. Une équation de Stern-Volmer modifiée a été dérivée, laquelle est applicable à de tels systèmes hétérogènes et qui permet d'obtenir la fraction de fluorophore accessible et la constante de *quenching* associée à chaque population de *quencheur* :

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \sum \frac{f_i K_i [Q]}{1 + K_i [Q]} \quad (2.4.)$$

où $f_i = F_i/F_0$ est la fraction initiale de la contribution à la fluorescence, K_i est la constante de *quenching* du $i^{\text{ème}}$ fluorophore ($\sum f_i = 1$), et F_0 est l'intensité totale de fluorescence à une longueur d'onde donnée.

Une déviation positive de la courbe de Stern-Volmer peut aussi être obtenue si le mécanisme de *quenching* diffusionnel n'est pas uniquement dynamique, mais qu'il comporte une composante statique. Ce cas est traité dans la section suivante.

2.4.4 La nature diffusionnelle du *quenching*

L'étape qui sert à la formation du complexe ($M^* \dots Q$) de la relation 2.1 est de nature diffusionnelle et dépend des collisions entre le *quencheur* et le fluorophore à l'état excité. Si la courbe obtenue de l'équation de Stern-Volmer telle que présentée par la relation 2.2 est linéaire, on croit alors que le mécanisme est uniquement collisionnel et on parle de *quenching* dynamique. Cependant, elle peut présenter une déviation positive indiquant qu'une fraction du fluorophore à l'état excité est *quenchée* de façon statique. En effet, la présence aléatoire d'une molécule de *quencheur* à proximité d'un fluorophore au moment où ce dernier passe à l'état excité peut conduire à sa désactivation presque instantanée.

Plusieurs modèles ont été employés afin de donner une description du *quenching* qui tienne compte de ce mécanisme statique, tous conduisant à la modification suivante de l'équation de Stern-Volmer :

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{sv}) \exp(V[Q]) \quad (2.5.)$$

où V est la constante de *quenching* statique, dont la signification est interprétée différemment selon le modèle utilisé. Une des représentations utilisées est celle qui présente la constante de *quenching* statique V comme étant un élément de volume pour lequel la probabilité de *quenching* est l'unité si le *quencheur* se trouve à l'intérieur de ce volume au moment de l'excitation. Expérimentalement, le *quenching* statique se distingue du *quenching* dynamique du fait qu'il ne conduit pas à la diminution du temps de vie de fluorescence: les fluorophores non-complexés ne sont pas affectés et émettent avec la même cinétique. Des mesures de temps de vie de fluorescence effectuées en parallèle avec des mesures d'intensité peuvent permettre de différencier les contributions respectives du *quenching* statique et dynamique.

2.4.5 Les mécanismes internes de *quenching*

Le mécanisme interne de *quenching* ainsi que la constante de vitesse k_i sont différents pour différents *quencheurs*. Il existe quatre principaux mécanismes de *quenching*, soit le *quenching* par :

- a) l'oxygène moléculaire et les espèces paramagnétiques : ils sont connus pour *quencher* les fluorophores aromatiques par un processus d'échange de spin électronique conduisant à l'apparition d' « intersystem crossing ». Ceci conduit la molécule excitée à l'état triplet pour revenir à l'état fondamental sans émission de fluorescence;
- b) par transfert d'électron : un électron d'un fluorophore à l'état excité singulet peut être transféré au *quencheur* sous la forme d'un complexe transitoire ($M^+ \dots Q^-$), comme pour l'acrylamide, les amides et amines. Pour d'autres *quencheurs*, le *quencheur* peut être le donneur d'électron et le fluorophore, l'accepteur;

- c) par présence d'atome lourd : les molécules possédant un halogène ou tout autre atome lourd semble *quencher* en augmentant l' « intersystem crossing » par un mécanisme de couplage spin-orbital;
- d) transfert d'énergie : lorsqu'il existe un recouvrement spectral de telle sorte que la fluorescence émise est absorbée par un chromophore.

À l'exception du transfert d'énergie, le *quenching* semble être un processus qui requiert le contact entre le fluorophore à l'état excité et le *quencheur*.

2.5 Mécanisme de *quenching* du Bromoforme

La nature du mécanisme diffusionnel de *quenching* dépend du couple *quencheur* – fluorophore utilisé, ainsi que de l'environnement dans lequel il se trouve. Dans la présente étude, le *quencheur* utilisé est du Bromoforme, lequel sert à *quencher* deux fluorophores, le Laurdan et le Tryptophane du peptide. Les deux fluorophores sont insérés dans la membrane et le Bromoforme qui les *quenche* est celui qui est solubilisé dans la membrane. Une telle étude est donc contrôlée par le degré de partition du *quencheur* dans la membrane et par le coefficient de diffusion que ce dernier peut avoir dans cette phase. Les *quencheurs* apolaires se partitionnent favorablement dans les micelles ou membranes, ce qui augmente leur concentration dans cette phase et leur efficacité comme *quencheur*. C'est le cas du Bromoforme dont la structure moléculaire est CHBr_3 et le coefficient de partition octanol/eau égale 2,38.

Dans un cas comme celui-ci où le *quencheur* et le fluorophore sont associés à la membrane, l'équation de Stern-Volmer peut être utilisée en prenant comme concentration de *quencheur*, la concentration efficace, i.e. celle qui est présente dans les lipides ($[Q_L]$). Blatt, Sawyer et d'autres auteurs ont proposé que l'interaction du *quencheur* avec la membrane serait mieux décrite par un modèle selon lequel le *quencheur* entrerait dans la membrane à la façon d'un processus de liaison saturable. L'expression de $[Q_L]$ serait alors :

$$[Q_L] = \frac{nK_b[Q_S]}{1+K_b[Q_S]} \quad (2.6.)$$

où K_b est la constante d'association, n est le nombre de sites de liaisons saturables et $[Q_S]$ est la concentration de *quencheur* dans la phase aqueuse. Ces chercheurs ont amené la possibilité qu'il y ait à la fois un phénomène de partition et de liaison.

L'examen de la structure chimique du Bromoforme (CHBr_3) peut donner un indice du mécanisme interne de *quenching* de celui-ci. En effet, la présence des trois atomes de brome, qui sont des atomes lourds, permettent de déterminer que le mécanisme de *quenching* interne a lieu principalement à cause de ceux-ci en augmentant le couplage spin-orbital. De ce fait, les électrons à l'état excité peuvent passer plus facilement à l'état triplet (augmentation de l'« intersystem crossing ») et le retour au niveau fondamental se fait alors sans émission de fluorescence.

Une étude réalisée par Lee *et al.*[39] apporte aussi des informations sur le mécanisme de *quenching* par des anesthésiques halogénés tels que l'Enflurane et l'Halothane. Le système qui est étudié, la membrane pourpre (PM), est semblable à celui utilisé dans la présente recherche i.e. protéine entourée de lipides. Ces anesthésiques ayant des propriétés communes avec le Bromoforme (hydrocarbure halogéné), cette étude donne un indice de ce que peut être le mécanisme de *quenching* des vésicules DPPC/peptide par du Bromoforme

Tout d'abord, la différence d'efficacité de *quenching* entre l'Enflurane ($\text{CHF}_2\text{OCF}_2\text{CHFCI}$) et le diéthyl éther permet de mettre en relief l'importance des atomes halogénés dans la promotion de l'« intersystem crossing ». Ceci est confirmé en comparant l'efficacité de *quenching* par l'Enflurane et l'Halothane (CF_3CHClBr) qui est augmentée lorsque le nombre d'atomes halogénés présents dans la molécule augmente. Malgré que les valeurs de K_M obtenues (9,1 et 163,8 M^{-1} respectivement) semblent trop grandes pour refléter seulement du *quenching* collisionnel, il est proposé que la présence de *quenching* statique n'en soit pas forcément la cause [39]. En effet, ce sont des

molécules qui se partitionnent dans la membrane et le volume dans lequel elles sont dissoutes est celui de la membrane et non pas du milieu aqueux. Les auteurs portent à notre attention qu'avec les coefficients de partition octanol/eau qui sont de 126 et 199 respectivement pour l'Enflurane et l'Halothane, on peut s'attendre à ce que l'efficacité de *quenching* soit grandement augmentée. Ceci pourrait être le cas pour le Bromoforme.

Bolen et Holloway[40], dans une étude sur le *quenching* de la fluorescence du tryptophane du même peptide que celui utilisé ici (Lys₂-Gly-Leu₈-Trp-Leu₈-Lys-Ala-amine) par des lipides di-bromés, ont tenté d'élucider le mécanisme de *quenching* qui a alors lieu. Pour ce faire, ils ont examiné le *quenching* de l'hétérocycle indole par une série de bromures d'hydrocarbure. Ils ont déterminé que l'efficacité de la réaction de *quenching* est augmentée 1) lorsque l'on passe d'un composé mono- à di-bromé et 2) lorsque les bromures se rapprochent à l'intérieur du composé di-bromé. On observe alors une augmentation de la constante de *quenching* de Stern-Volmer (K_{SV}) qui est attribuable non-seulement à l'augmentation du nombre de bromures présents dans le composé, mais qui suggère aussi un couplage entre ces derniers. Il est possible d'extrapoler cette tendance pour expliquer l'efficacité élevée de la réaction de *quenching* du Bromoforme, lequel comporte trois bromures sur le même carbone.

De plus, les composés di-bromés sous forme *trans*- présentent non seulement une constante de *quenching* de Stern-Volmer, K_{SV} , élevée ($30M^{-1}$), mais aussi une constante de *quenching* statique, V , significative ($4M^{-1}$). Le Bromoforme (tri-bromo-méthane), par la présence de trois bromures qui sont très rapprochés, devrait donc avoir une constante K_{SV} très élevée et une constante de *quenching* statique, V , significative. Le *quenching* du peptide, comparé à celui de l'indole, par du 2,3-dibromobutane, montre que même si la constante K_{SV} est plus faible (les collisions sont limitées par la chaîne du peptide qui fait une protection), la constante de *quenching* statique reste inchangée. Ce qui est vrai aussi lorsque la viscosité est augmentée. Ces phénomènes devraient s'avérer aussi dans le cas du Bromoforme.

Tel que mentionné plus haut, la constante de *quenching* statique, V , peut être interprétée comme étant un élément de volume entourant le fluorophore. Il est possible de calculer le rayon de cette sphère hypothétique, r , par la relation $V = 4\pi N' r^3/3$ où $N' = 6.023 \times 10^{20}$. Ces mêmes auteurs ont déterminée une valeur de r égale à 9.25Å pour le *quenching* statique du peptide par les différents bromolipides. On peut raisonnablement s'attendre à ce que la valeur de r pour le *quenching* du peptide par le Bromoforme soit du même ordre de grandeur.

Bien sûr, le mécanisme de *quenching* du Bromoforme ne pourra être décrit avec certitude que si les tests nécessaires sont effectués sur celui-ci pour déterminer la valeur des constantes de *quenching* dynamique, statique etc...

CHAPITRE 3

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

3.1 Matériel

Le DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) provenait de Avanti Polar Lipids Inc., le Laurdan de Molecular Probes. L'Enflurane (2-chloro-1,1,2-trifluoroethyl difluoromethyl ether, vendu sous le nom commercial Ethrane) était de la compagnie Anaquest et le Bromoforme (tribromométhane) de Sigma. Le reste des produits, lesquels étant de la meilleure qualité disponible, ont été obtenus de nos fournisseurs habituels (Sigma-Aldrich, Fisher). La bactériorhopsine était sous forme de membrane pourpre (PM) préparée et purifiée selon la méthode standard[35] couramment utilisée dans ce laboratoire. En résumé, les bactéries sont fractionnées par choc osmotique. Puis la membrane pourpre est purifiée par sédimentation sur des gradients de saccharose. Après centrifugation, elle est resuspendue dans le tampon utilisé. Le peptide de 22 acides aminés contenant un tryptophane en son centre (H-K₂GL₈WL₈KA-amine) utilisé dans les mesures de *quenching* provenait de Research Genetics inc.

3.2 Méthodes

3.2.1 Les systèmes étudiés : des protéoliposomes

Cette étude a été effectuée sur des suspensions aqueuses de vésicules contenant un peptide ou une protéine (protéoliposomes). Ces vésicules sont composées de trois éléments : de DPPC, de Laurdan, une sonde fluorescente qui permet de suivre la phase des lipides et, selon le cas, du peptide ou de bactériorhodopsine (bR). Les vésicules ont été formées selon la méthode de réversion de phase [26] légèrement modifiée. Ce protocole permet d'obtenir une population de vésicules unilamellaires homogène en taille et en composition. Elles ont été préparées pour obtenir une concentration finale en DPPC de 10 mM et un rapport molaire DPPC :Laurdan de 1 :1000. Les vésicules

contenant la bactériorhodopsine ont été préparées pour deux rapports molaires DPPC/bR soit de 350 et 2800 et celles qui contenaient le peptide pour un rapport molaire DPPC/peptide de 100. Le tampon utilisé est une solution aqueuse Tris 10mM, KCl 50 mM, pH = 8. La solution mère de membrane pourpre est préparée dans l'éther et celle du peptide dans l'éthanol.

3.2.1.1 Préparation des suspensions de vésicules

1- Le DPPC solide ou en solution chloroformique est introduit dans un ballon de 25 mL en quantité permettant d'obtenir un échantillon de 6 ml à une concentration finale de lipide d'environ 10 mM, et une quantité de la solution éthanolique de Laurdan (1mM) est ajoutée afin d'avoir un rapport final DPPC/Laurdan de 1 :1000. Un volume (2 mL) de chloroforme est ajouté au DPPC et au Laurdan afin de les dissoudre et rendre le mélange homogène.

2- Le chloroforme est évaporé sous jet d'azote à l'aide d'un évaporateur rotatif dont le bain est à température ambiante jusqu'à l'obtention d'un film lipidique homogène adsorbé à la surface interne du ballon.

3- Le mélange est resuspendu dans 1 volume (6 ml) de tampon à 50°C (au dessus de la température de transition de phase des lipides) par agitation mécanique.

4- Lorsque la suspension est homogène on ajoute 2 volumes d'éther éthylique et une quantité de solution mère de bR ou de peptide telle que la suspension finale de vésicules contienne le rapport DPPC/bR ou peptide voulu. L'ensemble est ensuite soniqué jusqu'à la formation d'une émulsion relativement stable. À ce stade, des micelles inverses se forment.

5- Le solvant est ensuite évaporé sous flux d'azote sous une pression de 20 cm de Hg au rotoévaporateur dont le bain a préalablement été chauffé à 50°C. Le ballon est maintenu au-dessus du bain afin de ne jamais atteindre une température de 50°C mais simplement de maintenir le ballon dans une atmosphère chaude. La vitesse de rotation du ballon doit être lente et le vide faible afin que l'évaporation de l'éther se fasse lentement. Au cours de cette évaporation, un gel se forme transitoirement. L'évaporation se poursuit jusqu'à

ce que le gel se liquéfie, faisant place à une solution opalescente. À ce stade, les bicouches sont déjà formées.

6- Deux volumes de tampon chaud (50 °C) sont alors ajoutés et l'évaporation est poursuivie sous une pression croissante allant de 40 à 70 cm de Hg, jusqu'à ce que toute trace d'éther ait disparue.

7- La préparation est filtrée (extrudée) successivement sur des filtres de polycarbonate (Nucléopore) de diamètre de pore 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 et 0.05 μm placés dans un extrudeur thermostaté à 50°C. La préparation est filtrée deux fois sur chacun des filtres.

8- Enfin, la préparation est centrifugée à 12 000 g pendant dix minutes afin d'éliminer les structures multilamellaires qui pourraient rester et les particules de titane détachées de la sonde lors de la sonication. Les petites vésicules unilamellaires ne sédimentent pas en dessous de 100 000 g.

3.2.1.2 Taille des vésicules

Les échantillons sont analysés par diffraction quasi-élastique de la lumière avec un Nanosizer (Coulter Counter). Le principe de la mesure[44] est le suivant : l'échantillon est illuminé par un faisceau laser et la lumière diffusée est détectée par un photomultiplicateur. Les particules, animées d'un mouvement brownien, créent des variations dans l'intensité de lumière diffusée qui peuvent être reliées à la constante de diffusion (D) des particules, laquelle est inversement proportionnelle au rayon hydraté. La taille des particules est ainsi obtenue et leur distribution est analysée par un auto-corrélateur. Ces mesures montrent que les préparations obtenues sont homogènes en taille et de 130 nm de diamètre.

3.2.1.3 Concentration lipidique

La concentration finale en lipide des échantillons est évaluée selon un protocole de dosage des lipides par hydrolyse acide du PO_4^- , basé sur la méthode de Chen *et al.* [45]. La concentration est ensuite ajustée par dilution avec le tampon selon l'expérience effectuée.

3.2.2 Mesures de variation de la température de transition de phase.

La variation de la température de transition de phase est mesurée à partir de l'intensité de fluorescence du Laurdan dans les vésicules de DPPC/bR sous l'influence de l'Enflurane. Les mesures de fluorescence des vésicules DPPC/Laurdan/bR ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre Spex équipé de 4 photomultiplicateurs (un à la référence, deux à l'émission, un à la transmission) et connecté à un microordinateur permettant son pilotage et l'enregistrement des données (logiciel DM3000f, SPEX). La source excitatrice lumineuse provenait d'une lampe au Xenon de 450 W. Ce système a permis de suivre simultanément deux longueurs d'onde d'émission.

3.2.2.1 Collecte des données

Tout d'abord, la longueur d'onde maximale d'excitation et celles d'émission du Laurdan correspondant aux phases gel et cristal liquide de la membrane ont été déterminées à partir de spectres d'excitation et d'émission enregistrés en fonction de la température. Pendant les mesures, l'échantillon était agité et la température était contrôlée par un bain thermostaté et mesurée par un thermocouple inséré dans la cuvette de quartz (1 cm de parcours optique) (figure 3.1).

Ensuite, l'intensité d'émission a été enregistrée en fonction du temps à $\lambda_{em} = 390$ nm et $\lambda_{em} = 600$ nm pour des températures allant de 16°C à 55°C avec un taux de variation de température de 0.42 °C/min. Ce dernier paramètre a été déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage de la température interne de la cuvette (donnée par le thermocouple) en fonction du temps, la température retenue pour un spectre donné étant celle du début du balayage.

Enfin, pour obtenir les courbes de transition de phase, les mêmes conditions expérimentales ont été gardées, mais seul les deux longueurs d'onde d'intérêt ont été enregistrées ($\lambda_{max. \text{ém}} = 490$ nm et $\lambda_{max. \text{ém}} = 434$ nm). Les mesures étaient prises

automatiquement en fonction du temps à un intervalle correspondant à un cycle de balayage du spectre. Ces mêmes mesures ont été enregistrées à différentes concentrations d'Enflurane soit 10, 20, 30, 40 et 50mM. Il s'agit là d'un gamme de concentrations supérieur d'un ordre de grandeur aux concentrations cliniques. L'anesthésique était ajouté dans la cuvette contenant la suspension de vésicules pour obtenir la concentration finale voulue avec une seringue de précision Hamilton. Afin d'éviter l'évaporation de l'Enflurane, la cuvette était immédiatement refermée avec un bouchon en téflon imperméable à l'Enflurane.

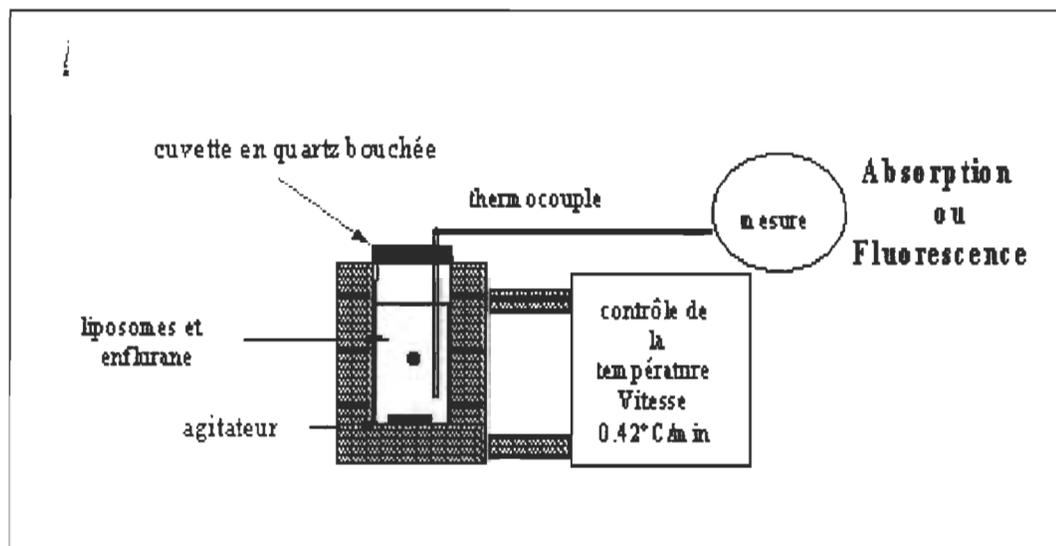


FIGURE 3.1 : Montage pour les mesures de fluorescence et d'absorbance en fonction du temps

3.2.2.2 Traitement des données

Les données brutes donnaient deux courbes : l'intensité à 490 nm et à 435 nm en fonction du temps. À partir du taux de variation de la température obtenu de la courbe d'étalonnage de la température en fonction du temps, les courbes ont été converties en fonction de la température. Le rapport de ces deux courbes permettait d'obtenir une courbe de transition de phase, I_{490}/I_{434} en fonction de la température et ce pour des concentrations croissantes d'Enflurane. La température de transition de phase a été obtenue par méthode graphique et correspond au point où se croisent les droites se superposant à la pré-transition et à la transition (figure 3.2). C'est une méthode parmi d'autres (point d'inflexion, etc.) et ce choix se justifie par le fait que la transition est fortement coopérative et lorsqu'on atteint la température où la transition débute, les lipides changent de phase en bloc et on peut considérer que cette température est celle où la transition a lieu.

Des courbes dose-réponse ont été obtenues pour chacun des rapports DPPC/bR en portant en graphique la variation du T_m (ΔT_m) normalisé en pourcentage (ΔT_m (%)) en fonction de la concentration d'Enflurane où

$$\Delta T_m = T_{m_0} - T_{m_{[enfl]}}$$

$$\Delta T_m (\%) = \Delta T_m \text{ normalisé} = \left(\frac{\Delta T_m}{\Delta T_{m_{\max}}} \right) \times 100$$

T_{m_0} = Température de transition de phase initiale (sans Enflurane)

$T_{m_{[enfl]}}$ = Température de transition de phase pour une concentration donnée d'Enflurane

$$\Delta T_{m_{\max}} = T_m \text{ lorsque la membrane est saturée d'Enflurane} - T_{m_0}$$

Des courbes de fusion des lipides sont aussi obtenues en portant le rapport I_{490}/I_{435} en fonction de la concentration d'Enflurane et ce pour différentes températures.

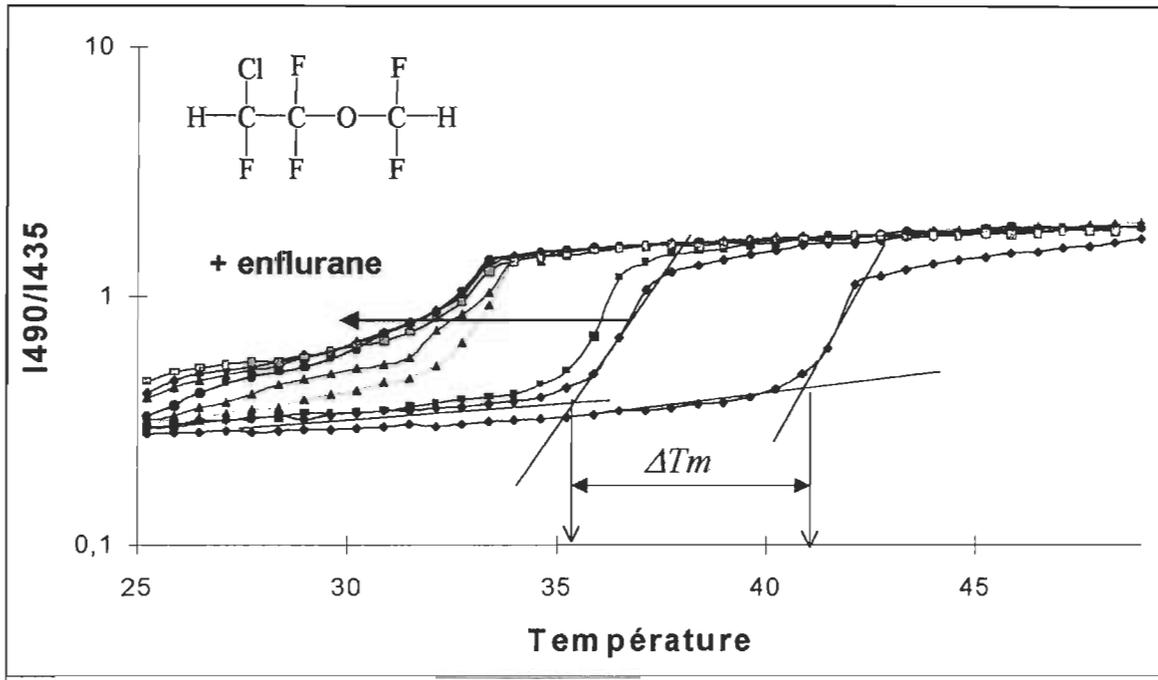


FIGURE 3.2 Température de transition de phase et variation de celle-ci lors de l'ajout d'anesthésique, ici, de l'Enflurane.

3.2.3 Mesure de la transition spectrale du rétinol

Le spectre d'absorption de la bR est enregistré pour des longueurs d'ondes comprises entre 350 et 700 nm et correspond au spectre du rétinol. Le même montage et les mêmes conditions expérimentales ont été utilisées pour les mesures d'absorbance que pour celles de fluorescence, mis à part, bien sûr, l'appareil, un spectrophotomètre à

double faisceau lambda 2 (Perkin Elmer). L'échantillon est relié à un bain thermostaté qui augmente régulièrement la température de 16°C à 55 °C. Les spectres sont enregistrés à un intervalle de temps donné relié à la température par une courbe d'étalonnage de la température en fonction du temps. Les intensités à $\lambda = 480$ nm et $\lambda = 570$ nm sont extraites et leur rapport permet de suivre la transition spectrale du rétinol indiquant la désensibilisation de la bR selon la concentration d'Enflurane à différentes températures. Les mesures de fluorescence et d'absorbance sont effectuées pour un rapport DPPC/bR avec des vésicules provenant d'un même échantillon afin de pouvoir établir une comparaison entre les résultats.

3.2.4 Mesures de *quenching*

Des mesures de *quenching* ont été effectuées avec des vésicules contenant deux sondes fluorescentes, le Laurdan qui se loge dans la membrane proche de l'interface et le peptide contenant un tryptophane qui est situé au centre de la membrane. Le *quencheur*, du Bromoforme, est choisi pour ses propriétés d'anesthésique général. Les mesures ont été effectuées sur un fluorimètre Spex (Jobin Yvon) relié à un ordinateur permettant son pilotage et l'enregistrement des données (logiciel DM3000f, SPEX). Les mesures effectuées avec cet appareil n'ont pas eu la correction permettant de tenir compte de la réponse du détecteur à l'intensité incidente de la lampe. Ceci explique les variations obtenues dans les longueurs d'ondes maximales d'émission du Laurdan dans cette partie de l'expérience par rapport aux mesures précédentes et celles rapportées dans la littérature. La cuvette de quartz de 1 cm de parcours optique qui contenait l'échantillon était déposée dans un support dans lequel passait un liquide réfrigérant. La température de celui-ci était maintenue par un bain thermostaté Lauda RC3, modèle T-2 (Brinkman) et la température de l'échantillon était suivie par un thermocouple Thermistor (Omega) apposé sur la cuvette. L'échantillon était doucement agité par un agitateur magnétique afin que les vésicules ne sédimentent pas et pour favoriser le mélange de l'anesthésique et de la préparation. La cuvette était fermée par un bouchon en Téflon afin d'éviter toute perte de Bromoforme par évaporation.

Les mesures de *quenching* consistaient, à l'origine, à injecter le Bromoforme dans l'échantillon et à mesurer la diminution de la fluorescence selon la concentration de *quencheur* pour ensuite porter les données sous la forme d'une courbe de Stern-Volmer (F_0/F en fonction de $[Q]$). L'injection se faisait à l'aide d'un perfuseur, un appareil qui permet de contrôler le débit d'injection d'une seringue de précision. Le débit de Bromoforme injecté était de $2.5\mu\text{L/h}$. Les informations qui auraient été obtenues des courbes de Stern-Volmer sont la constante apparente de vitesse de Stern-Volmer, K_{SV} , donnée pour la réaction de *quenching* d'un système à l'équilibre et la fraction de chromophore *quenché*.

Malheureusement, cette procédure n'a pu être utilisée. Les mesures obtenues de cette façon n'étaient pas celles d'un système à l'équilibre. La diffusion trop lente du Bromoforme dans la phase aqueuse de l'échantillon en est la cause. En effet, l'équilibre n'était atteint qu'après plusieurs heures, tel que déterminé par la variation d'intensité de la fluorescence. Cette lenteur dans la diffusion du Bromoforme causait plusieurs problèmes expérimentaux pour obtenir des courbes de Stern-Volmer, difficultés qui sont présentées dans la section *Résultats et interprétation*.

Une autre procédure a été élaborée afin d'obtenir les renseignements voulus, soit d'avoir une évidence directe de la localisation préférentielle de l'anesthésique autour du peptide. Au lieu d'examiner le comportement du spectre de fluorescence de la sonde pour des concentrations données de Bromoforme, celui-ci a été examiné en cours d'atteinte de l'état d'équilibre. Le spectre de fluorescence de la sonde est enregistré, puis un certain volume de Bromoforme est injecté et les spectres sont enregistrés en fonction du temps. On mesure ainsi la diminution de la fluorescence dans le temps. Les préparations de vésicules pour lesquelles ces mesures sont effectuées contiennent deux sondes fluorescentes, soit le Laurdan et le tryptophane du peptide. Les spectres sont enregistrés alternativement pour chacune des sondes du même échantillon. Ceci permet de suivre les modifications dans le spectre de fluorescence pour une concentration de bromoforme indéterminée, mais qui est la même pour les deux sondes des vésicules. On peut ainsi établir une comparaison entre les modifications qui ont lieu dans chacun des

spectres et obtenir des informations tel que l'ordre des évènements, i.e. si une sonde est *quenched* plus rapidement que l'autre. À cette fin, ce qui est comparé est le rapport des rendements quantiques de fluorescence ϕ/ϕ_0 , où l'indice 0 indique l'état initial, sans anesthésique; on obtient ainsi un rendement quantique relatif. La « vitesse de *quenching* » (diminution de l'intensité de fluorescence dans le temps) dans ces conditions pourra être un élément de comparaison. D'autres informations peuvent être obtenues à partir de l'évolution temporelle du rapport des intensités de fluorescence du Laurdan au voisinage de 490 et 435 nm. Celles-ci peuvent donner une idée sur la préférence du Bromoforme pour une phase des lipides plutôt qu'une autre. Le rendement quantique relatif de fluorescence est obtenu à partir de l'aire sous la courbe du spectre de fluorescence. Ces informations ne seront certes pas tant quantitatives que qualitatives. Comme ce qui nous intéresse est de déterminer la cible des anesthésiques généraux et leur mécanisme d'action, ces informations, mêmes qualitatives, peuvent s'avérer pertinentes.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

4.1 Fluorescence et absorbance de vésicules de DPPC/bR/Laurdan

4.1.1 Mesures de fluorescence

La transition de phase (gel \rightarrow cristal-liquide) causée par la solubilisation de l'Enflurane dans la membrane des vésicules a été suivie grâce à la fluorescence du Laurdan. La sonde est ajoutée aux lipides dans un rapport molaire le plus faible possible (1 :1000) afin de limiter au maximum les perturbations que celle-ci pourrait engendrer dans les propriétés physico-chimiques de la membrane. L'effet du Laurdan sur la transition de phase de vésicules unilamellaires a été vérifié par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) (figure 4.1). Les endothermes montrent que la transition est presque inchangée. On y observe néanmoins des différences entre les vésicules uni et multilamellaires, notamment en ce qui concerne la prétransition; ce phénomène a probablement son origine dans l'absence de phase ondulée (P_{β} vers 36 °C) ou dans l'inhomogénéité de l'échantillon [46].

Les longueurs d'ondes d'émission caractéristiques du Laurdan dans chacune des phases, soit 434 et 490 nm respectivement, ont été obtenues à partir des spectres d'émission de fluorescence (figure 4.2) enregistrés pour des températures allant de 25 à 50°C à un taux d'augmentation de 0.42°C/min dont la linéarité a été vérifiée par régression linéaire ($R^2 = 0.9999$). La température enregistrée est celle de l'intérieur de la cuvette plutôt que celle donnée par le bain thermostaté afin d'éviter le décalage dû au temps de réponse de la cuvette à une élévation de température qui aurait faussé les résultats.

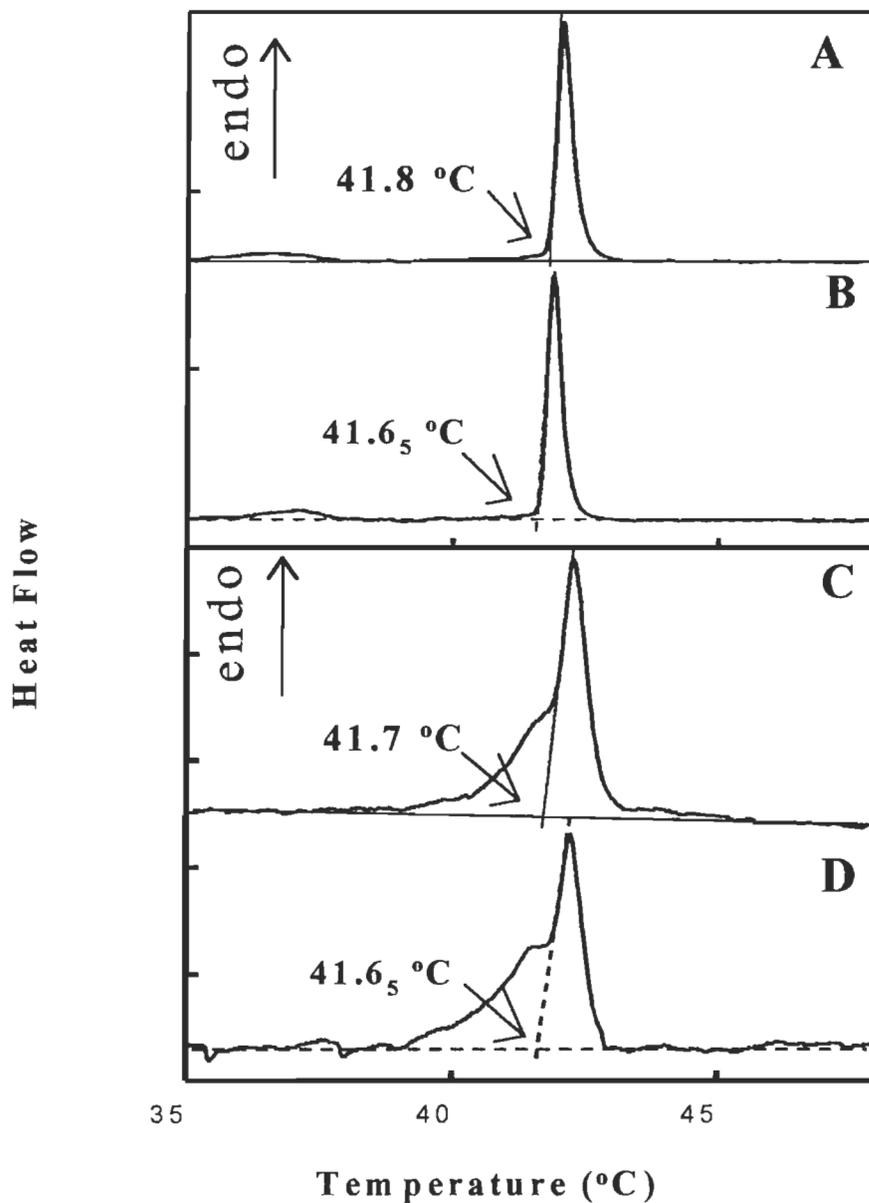


FIGURE 4.1 Courbes de calorimétrie différentielle à balayage de vésicules de DPPC multi- (A, B) et unilamellaires (C, D) contenant (A, C) ou non (B, D) 0.1% (M/M) de Laurdan La concentration en DPPC est de 18 mM et le taux de chauffage de 2°C/min. La température de transition de phase pour chaque échantillon est indiqué sur la figure. Cette figure est gracieusement fournie par N. Hauet, Université Paris Sud.

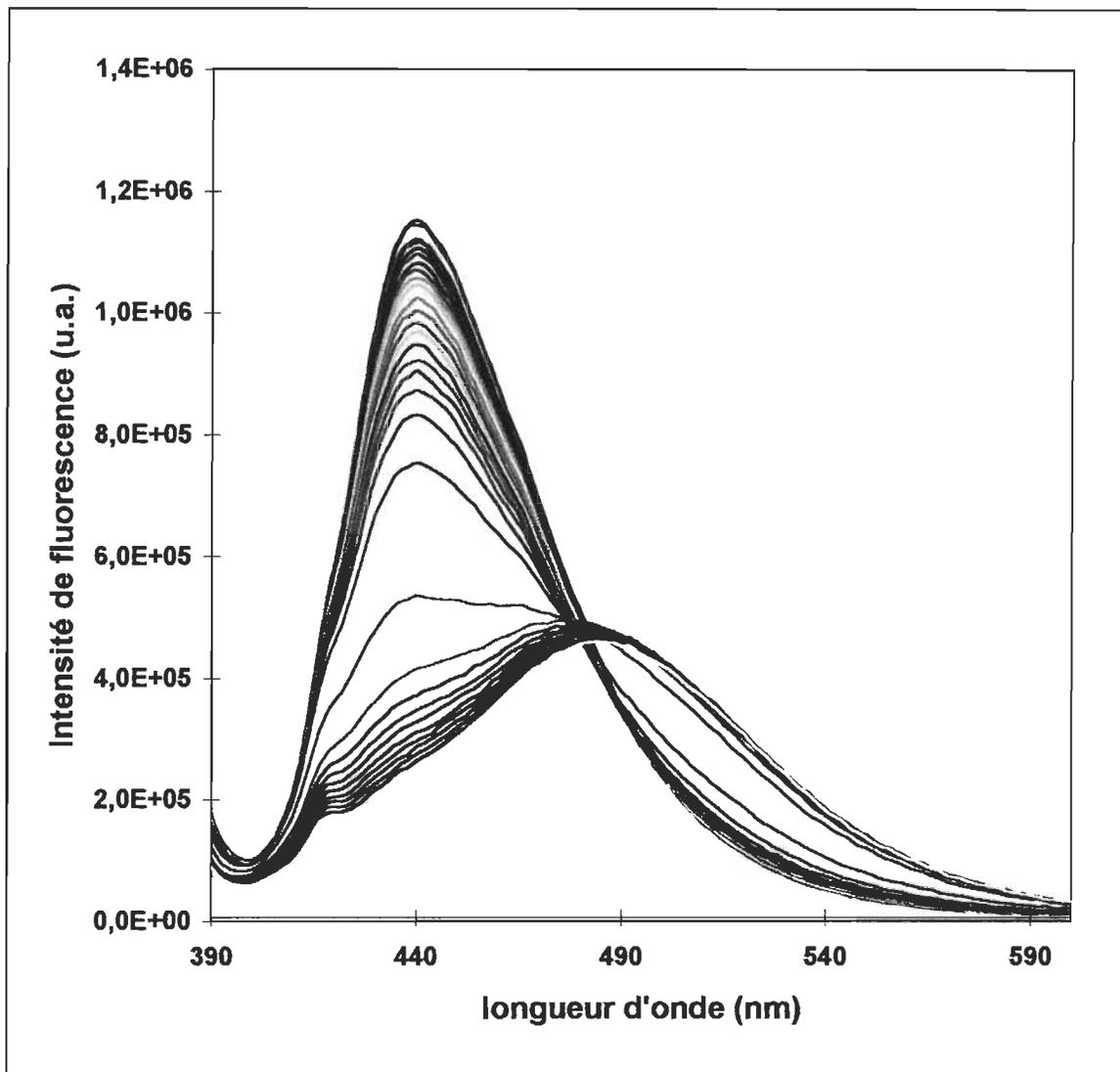


FIGURE 4.2 Évolution du spectre d'émission du Laurdan inséré dans des vésicules de DPPC/bR dans l'intervalle de températures de 25 à 50°C. La transition gel \rightarrow cristal -liquide s'accompagne du déplacement de l'émission du Laurdan de 434 à 490 nm.

4.1.1.1 De la courbe de transition de phase des lipides à la courbe dose-réponse...

Les courbes de transition de phase ont été obtenues pour chacune des préparations (rapport molaire Lip/bR= 2800 et 350) à partir du rapport des deux intensités I_{490}/I_{434} , représentant le rapport des phases cristal-liquide/gel. La partie de la courbe où le rapport est faible correspond donc à la phase gel et celle où le rapport est élevé, à la phase cristal-liquide. La transition est coopérative et la température à laquelle elle s'effectue est obtenue pour chacune des courbes par la façon décrite dans la section *Méthodes expérimentales*. Les courbes de transition de phase obtenues pour les deux échantillons à des concentrations croissantes d'Enflurane (10, 20, 30, 40 et 50 mM) (figures 4.3 A et B) présentent la même tendance que pour une préparation de vésicules de DPPC/Laurdan (voir figure 2.1), c'est-à-dire un abaissement du T_m en présence d'Enflurane. Cette variation du T_m en présence d'une concentration donnée d'Enflurane est portée en graphique afin de comparer cet effet sur les préparations contenant des rapports Lip/bR différents (figure 4.4). Ces courbes, appelées courbes dose-réponse ont été normalisées afin de pouvoir les comparer.

Deux observations doivent retenir notre attention. La première est que les deux courbes obtenues ne se superposent pas ; la deuxième, que la courbe pour le rapport Lip/bR= 350 présente un déplacement vers des concentrations plus élevées d'Enflurane pour avoir la même variation de T_m . La seule différence entre les deux échantillons est leur concentration en bR (3.53 et 28.24 μM respectivement pour les rapports Lip/bR = 2800 et 350). En effet, la concentration totale en lipide (7mM) est identique et la taille des vésicules est très semblable (~130 nm).

L' hypothèse suivante fournit une première interprétation de cette différence. Une variation identique du T_m indique qu'une même concentration d'Enflurane est solubilisée dans la membrane. Ainsi, une plus grande concentration d'Enflurane pour avoir la même modification de la phase de la membrane indique qu'une partie de l'Enflurane n'est pas disponible pour être dissoute dans les lipides. Comme la concentration en bR est le seul paramètre qui est différent entre les deux échantillons, on

peut logiquement conclure que c'est la présence accrue de bR qui produit ce déplacement de la courbe. Ceci peut signifier que la bR accapare de l'Enflurane dans son entourage, Enflurane qui n'est pas disponible pour provoquer la fusion des lipides.

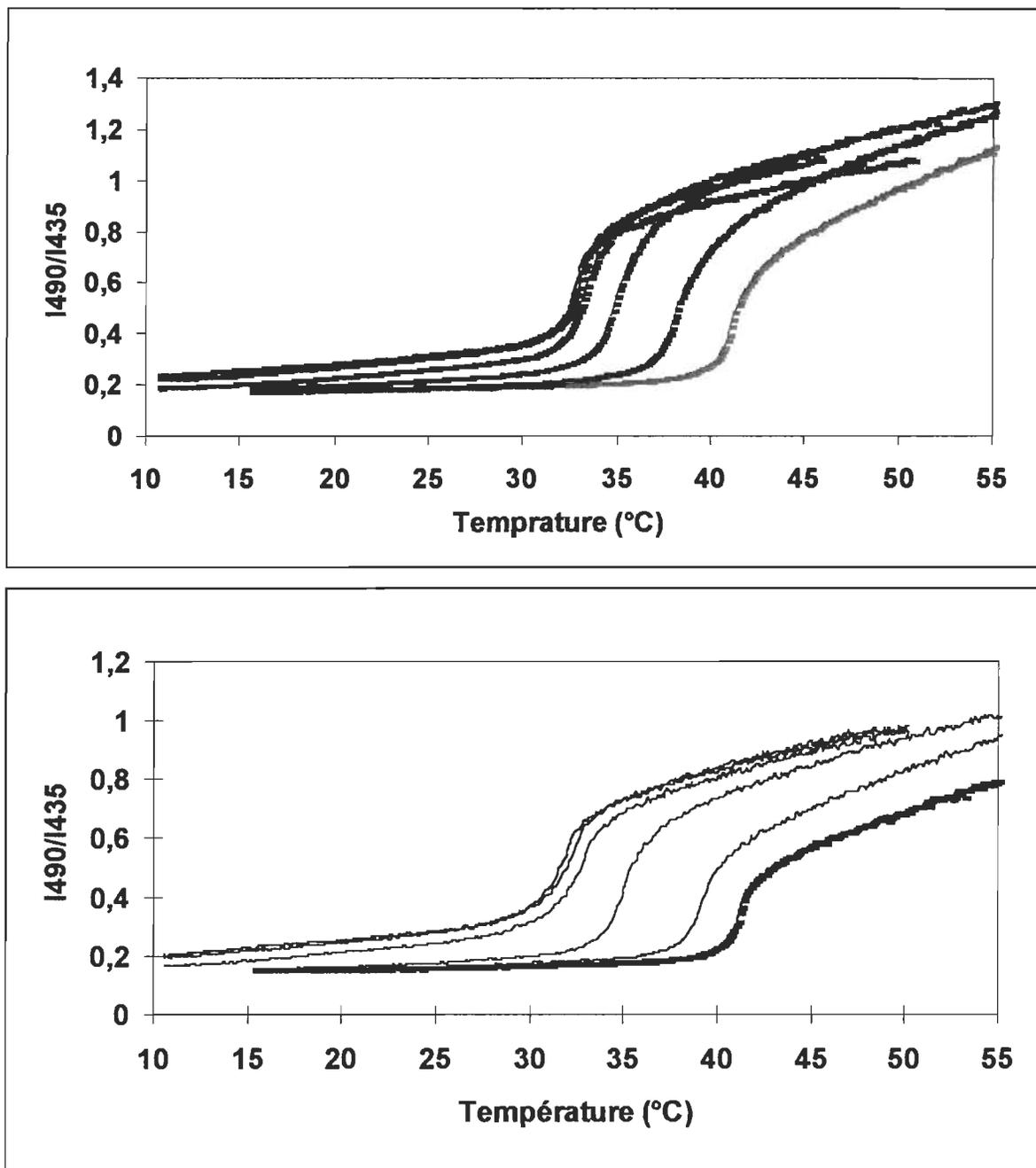


FIGURE 4.3 Courbes de transition de phase pour des vésicules contenant des lipides et la bactériorhodopsine dans un rapport molaire lip/bR de 2800 (partie supérieure) et 350 (partie inférieure): déplacement de la transition de phase en fonction de la concentration d'AG (Enflurane). Les concentrations d'enflurane sont de droite à gauche : 0, 10, 20, 30, 40, 50 mM, respectivement.

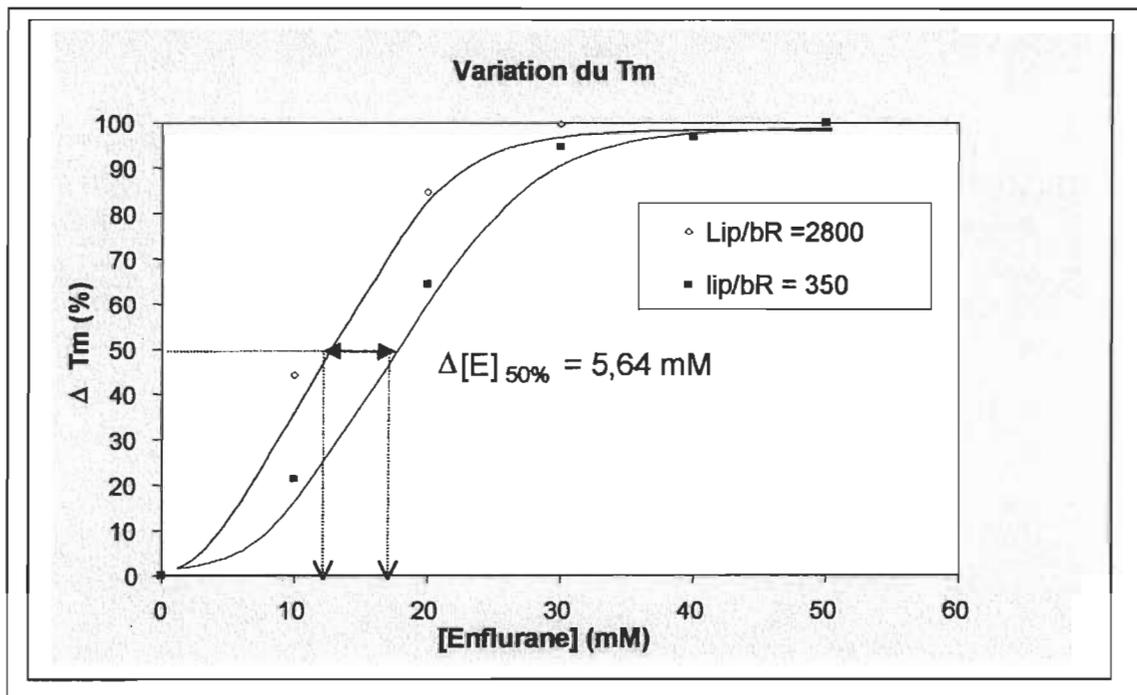


FIGURE 4.4 Courbes dose-réponse pour des vésicules contenant des lipides et la bactériorhodopsine pour des rapports molaire lip/bR=2800 et 350: déplacement de la transition de phase en fonction de la concentration d'AG (Enflurane). La différence de concentration d'Enflurane obtenue à 50% de l'effet maximal, $[E]_{50\%}$, est de 5.64mM.

4.1.1.2 Différence dans les doses produisant la moitié de l'effet maximal...

Cet effet est évalué à 50% du déplacement maximal du T_m i.e. dans une région de la courbe où la variation du T_m est proportionnelle à la concentration d'Enflurane (autour de 15 mM d'Enflurane), avant qu'il y ait saturation de la membrane. Le déplacement de la courbe $Lip/bR = 350$, correspondant dans cette interprétation à la concentration d'Enflurane non-dissoute dans la membrane, est alors de 5.64 mM, tandis que la différence de concentration en bR entre les deux échantillons est de 24.71 μM , ce qui donne $\Delta [Enfl] / \Delta [bR] = 228$. Cette dernière valeur représente le nombre de molécules d'Enflurane qui doivent être ajoutées dans l'échantillon par molécule de bR ajoutée pour avoir la même variation de T_m . Ce résultat pourrait être vérifié par la constance de sa valeur pour d'autres rapports Lip/bR . Les concentrations d'Enflurane à 50% du déplacement maximal du T_m ont été obtenues à partir des courbes doses-réponse de forme sigmoïdales de chacune des préparations.

La deuxième interprétation possible est la suivante. Les valeurs du rapport I_{490}/I_{434} qu'on observe après la transition de phase (voir figure 4.3) sont plus faibles pour les vésicules plus concentrées en bR, indiquant que la transition de phase de la membrane est moins complétée, ce qui traduit un effet structurant de la protéine sur les lipides. De la même façon, les 228 molécules d'Enflurane nécessaires pour avoir le même changement dans la membrane lorsqu'on ajoute une molécule de bR pourraient être celles qui sont nécessaires pour faire disparaître cet effet structurant.

4.1.1.3 Effet du recouvrement partiel des spectres de fluorescence du Laurdan et d'absorbance de la bactériorhodopsine

Il faut noter que le spectre d'absorbance de la bR recouvre partiellement celui de fluorescence du Laurdan sous sa forme native et totalement sous sa forme désensibilisée (figure 4.5), ce qui conduit à l'absorption partielle de la fluorescence émise par le Laurdan. Ceci cause une diminution du rapport I_{490}/I_{434} qui reste constante en absence d'Enflurane, le spectre de la bR n'étant pas modifié dans l'intervalle de température

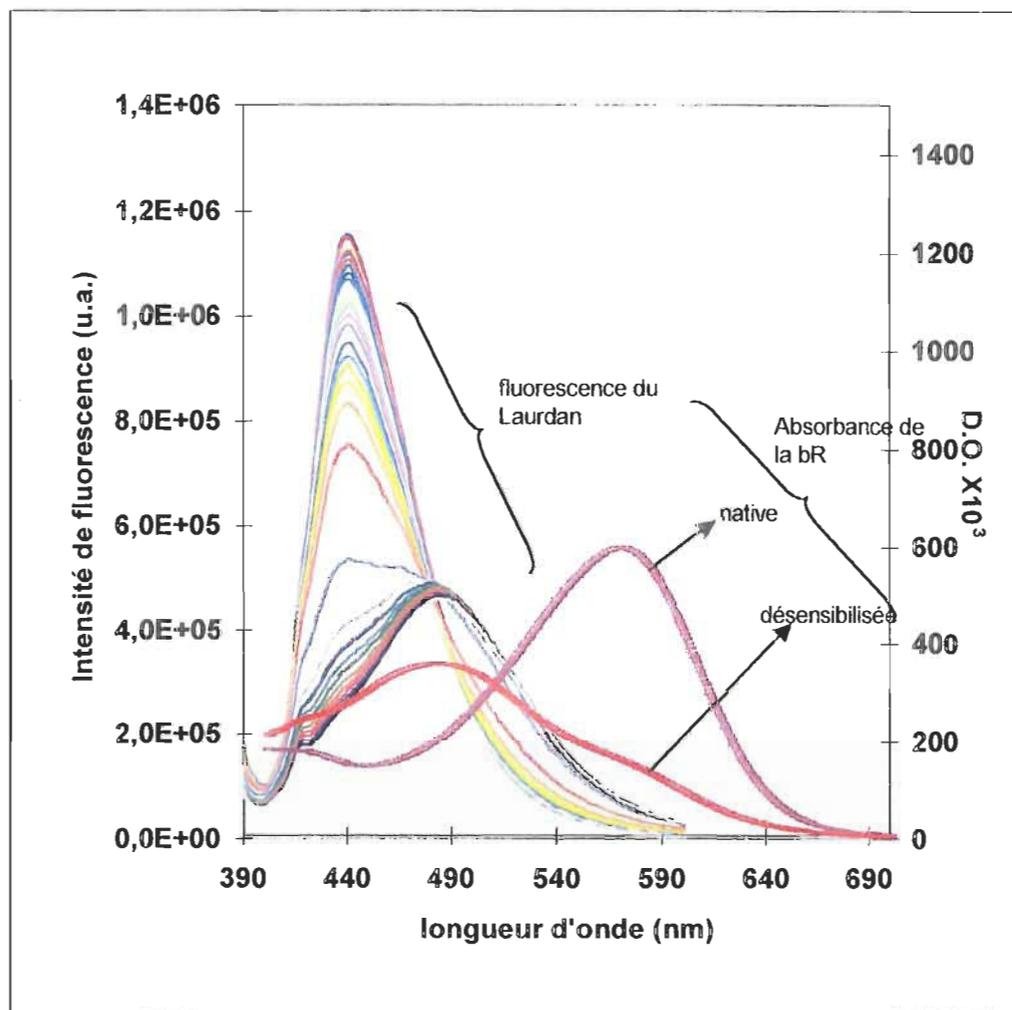


FIGURE 4.5 Superposition des spectres du Laurdan et de la bactériorhodopsine.

utilisé. En présence d'Enflurane, le spectre de la bactériorhodopsine se déplace vers la forme désensibilisée en fonction de la température et cet effet est plus rapide aux concentrations plus élevées d'Enflurane. Il en résulte une absorption progressive de la fluorescence du Laurdan émise dans la région 480 et une diminution de la pente dans la région de post-transition des courbes de transition de phase des lipides (I_{490}/I_{434}) lorsque la concentration en Enflurane est plus élevée. Le T_m mesuré aux concentrations élevées d'Enflurane serait alors déplacé légèrement vers les températures plus hautes par rapport au T_m réel et le déplacement maximal de T_m en serait diminué. Le recouvrement du spectre de la bR sur celui du Laurdan, malgré cet effet, n'affecterait pas de façon significative les résultats et l'interprétation des événements moléculaires que l'on en tire.

4.1.2 Mesures d'absorbance

4.1.2.1 Spectres de la bactériorhodopsine

La bactériorhodopsine comporte la particularité intéressante d'avoir une sonde intrinsèque, le rétinol, qui permet de suivre la désensibilisation de la protéine en présence d'anesthésique. En effet, lorsque la bR est sous forme native, la longueur d'onde maximale d'absorption du rétinol est à 570 nm et se déplace vers 480 nm à mesure que l'équilibre entre les deux formes se déplace vers la forme désensibilisée de la bR (figure 2.5). Cette particularité a été exploitée afin de pouvoir comparer l'effet de l'Enflurane sur la protéine à celui sur la membrane. Les spectres d'absorbance présentent une forte turbidité due à la nature même des échantillons (des vésicules) (figure 4.6). La turbidité varie avec l'indice de réfraction des objets, lequel dépend de la température. Il est néanmoins possible de minimiser son effet en prenant le rapport des intensités d'absorbance A_{480}/A_{570} pour chaque température à des concentrations variables d'Enflurane. Ainsi, ces valeurs peuvent être comparées et portées en graphique en fonction de la concentration d'Enflurane (figure 4.7). Le rapport signal/bruit de l'échantillon Lip/bR = 2800 étant trop faible pour avoir des mesures fiables d'absorbance de la bR, seules les mesures obtenues pour l'échantillon Lip/bR = 350 sont considérées (la figure 4.6 sert d'exemple des spectres obtenus). On constate que la bR est complètement désensibilisée

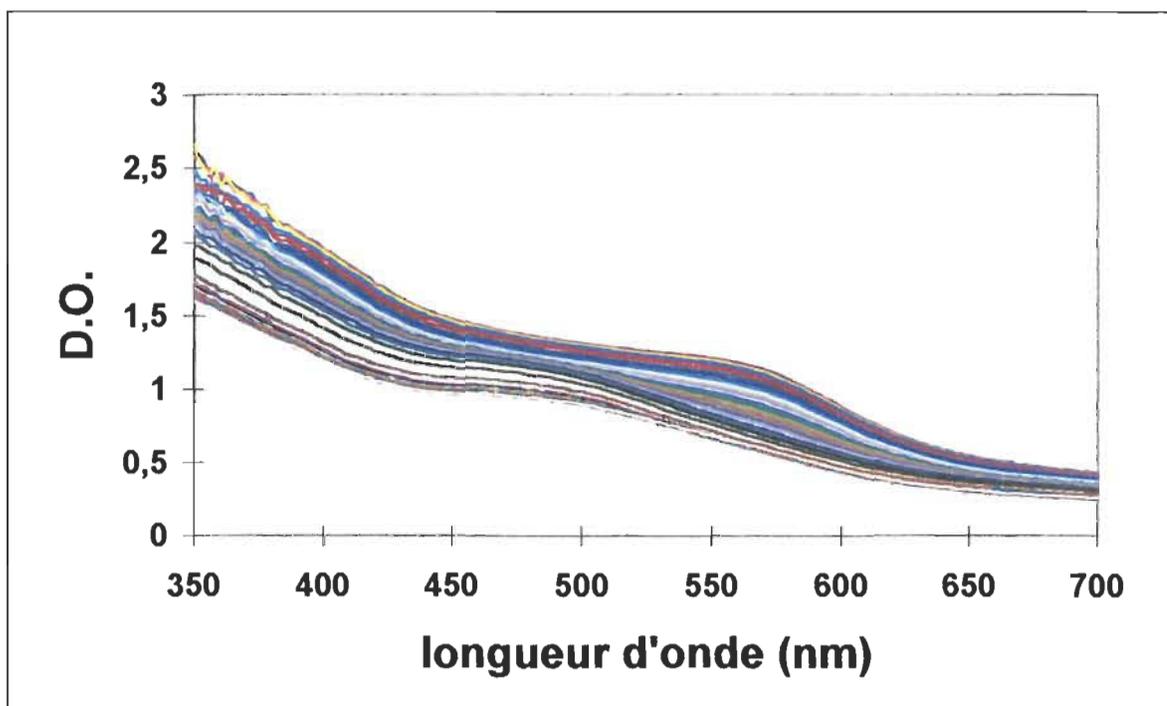


FIGURE 4.6 Spectres d'absorbance des vésicules de DPPC / bactériorhodopsine / Laurdan pour des températures croissantes (augmentation régulière de 16° à 55°C), $[\text{lipide}]_{\text{tot}}=7\text{mM}$, rapport molaire DPPC/bR=350, $[\text{enflurane}]=2,8\text{mM}$

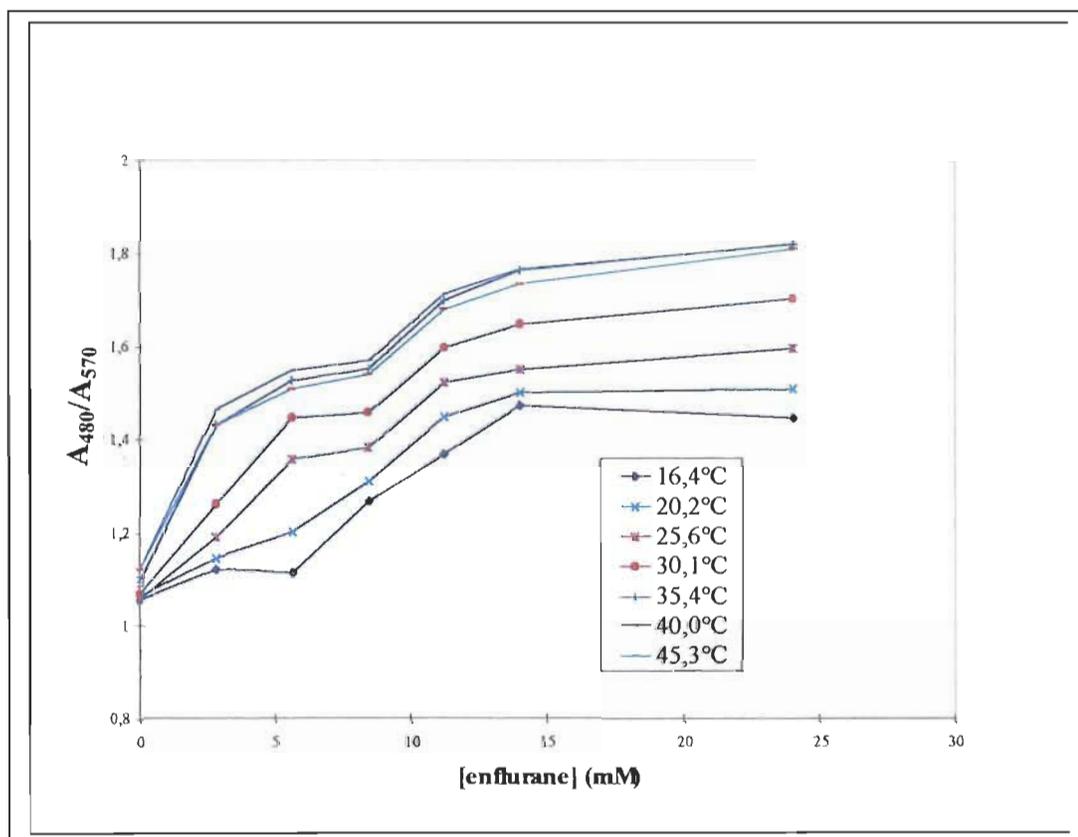


FIGURE 4.7 Désensibilisation (rapport des absorbances A_{480}/A_{570}) de la bactériorhodopsine dans des vésicules de DPPC / bactériorhodopsine / Laurdan à différentes températures par des concentrations croissantes d'Enflurane (0, 2.8, 5.6, 8.4 et 11.2mM); rapport molaire Lip/bR = 350, $[\text{Lipides}]_{\text{tot}} = 7\text{mM}$.

à 15 mM d'Enflurane. On remarque que le caractère sigmoïdal de la courbe dose-réponse s'atténue lorsque la température augmente. Ceci pourrait s'expliquer par la modification de la fluidité de la membrane, effet qui s'ajoute à celui de l'Enflurane mais aussi, on le verra plus tard, par une partition plus rapide de l'anesthésique dans la phase fluide de la membrane. Ainsi, en dépit de l'incertitude générée par la turbidité élevée des échantillons, on obtient quand même des résultats vraisemblables pour l'incorporation de l'anesthésique dans des protéoliposomes.

Les courbes de transition de la bR A₄₈₀/A₅₇₀ (native → désensibilisée) et de la membrane I₄₉₀/I₄₃₄ (gel → cristal-liquide) portées en pourcentage selon la concentration d'Enflurane donnent respectivement des courbes de désensibilisation de la bR et de fusion des lipides qui pourront être comparées (figure 4.8). Ces graphiques obtenus pour différentes températures ne sont présentés ici que pour 20 et 45°C, les plus représentatifs. Ces graphiques indiquent clairement que l'effet de l'Enflurane se fait sentir en premier sur la bactériorhodopsine et ensuite sur la membrane. Lorsque la bR a pratiquement terminé sa transition, celle dans la membrane est à peine commencée à 20°C et en est à peu près à la moitié à 45°C.

La comparaison des courbes de désensibilisation de la bR et de fusion des lipides indique que l'effet de l'Enflurane se fait sentir d'abord sur la protéine et ensuite sur la membrane. Ce résultat semble montrer que la cible primaire de l'Enflurane n'est pas la membrane mais bien la protéine ou son entourage (interface protéine-lipide).

Ce nouvel élément, ajouté aux informations données par les courbes dose-réponse (variation du T_m selon la concentration d'Enflurane) permet de poursuivre la première interprétation pour donner une image tout à fait séduisante de ce qui se produit. La bR accapare l'Enflurane dans son entourage proche, l'Enflurane montrant une plus grande affinité pour cet environnement que pour le reste de la membrane. Ceci signifie que la concentration locale d'Enflurane autour de la bR devient rapidement très élevée. Encore mieux, la valeur du $\Delta [\text{enfl}] / \Delta [\text{bR}] = 228$ est dans le même ordre de grandeur que le nombre de molécules d'Enflurane requis pour couvrir la surface de la bR exposée aux

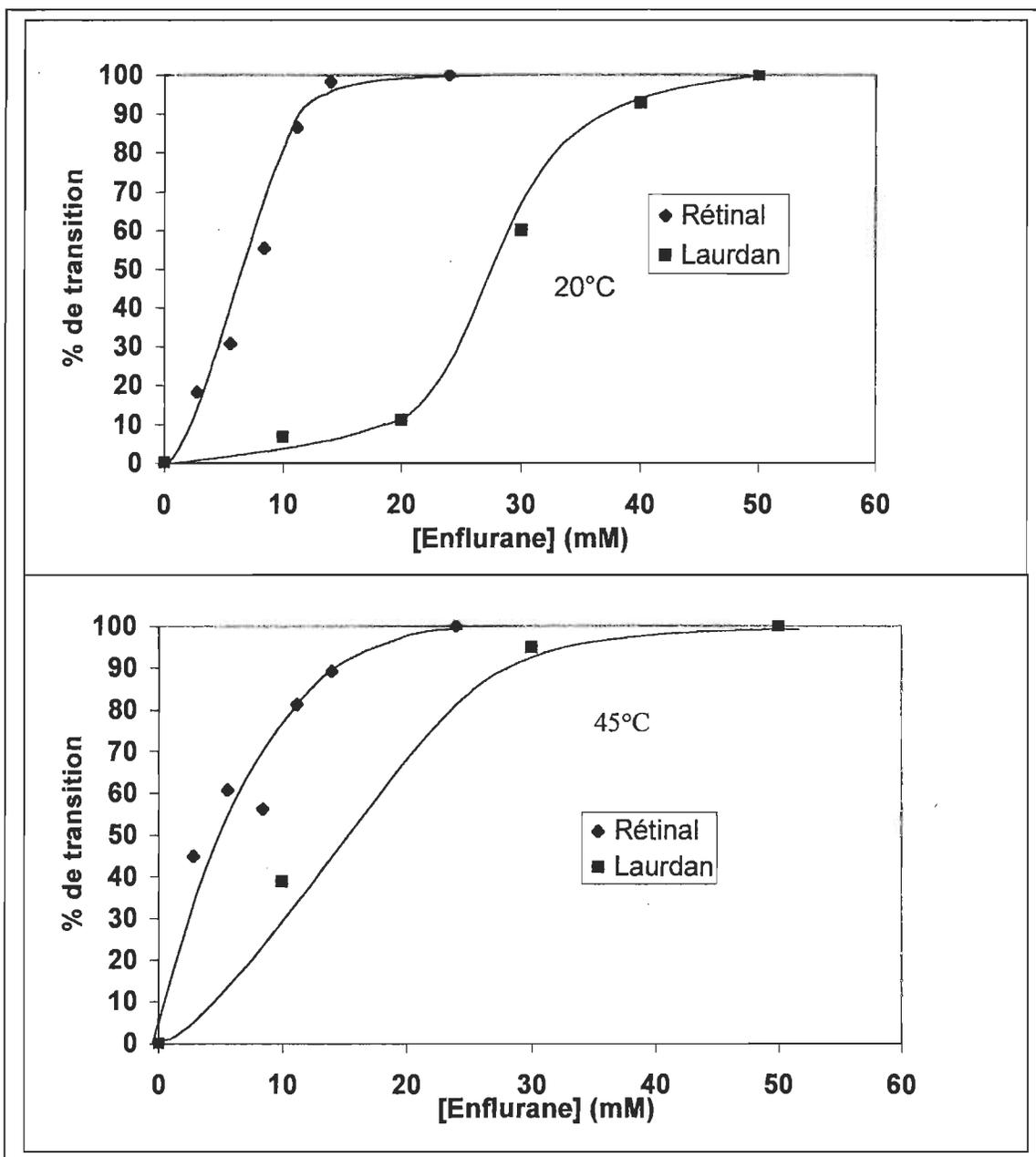


FIGURE 4.8 Courbes de désensibilisation de la bactériorhodopsine (rétinal) et de fusion des lipides (Laurdan) à 20° et à 45°C ; Lip/bR = 350, [lipides]_{tot} = 7mM

lipides (obtenu de calculs géométriques à partir des dimensions de la bR et de l'Enflurane). Cependant, cette valeur est obtenue à partir de la concentration aqueuse d'Enflurane. Or, celle qu'il faudrait considérer est la concentration que l'on retrouve dans les lipides. L'Enflurane, dans un système tel que des vésicules en milieu aqueux

enfermées dans une cuvette, peut se partager entre quatre phases, soit les phases aqueuse, lipidique, gazeuse (dans l'espace de la cuvette qui n'est pas rempli) et sous forme d'anesthésique pur (liquide à cette température). La concentration lipidique d'Enflurane pour une concentration donnée tenant compte du volume total de l'échantillon est présentée à l'annexe 1. Le calcul est une approximation puisqu'il ne tient compte que de trois phases (aqueuse, lipidique et gazeuse), négligeant la présence possible d'anesthésique sous forme pure dans le système. Ce nombre élevé de molécules d'Enflurane prisonnières de l'entourage de la bR ne pourrait vraisemblablement entrer dans la protéine sans la dénaturer complètement. Il pourrait cependant correspondre au nombre de molécules d'Enflurane nécessaire pour déstabiliser les interactions protéines-lipides, expliquant ainsi que la bR présente les mêmes modifications structurales, spectroscopiques et d'activité en présence d'anesthésiques que lorsqu'elle est délipidée. Cette interprétation concorde avec l'hypothèse de l'affaiblissement des interactions protéines-lipides dû à la présence d'Enflurane à l'interface.

Cependant, il ne faut pas oublier la deuxième interprétation de la différence de concentration d'Enflurane dans un échantillon plus concentré en bR. En effet, cette différence pourrait simplement refléter le nombre de molécules d'anesthésiques nécessaire pour neutraliser l'effet structurant sur les lipides que produit une plus grande concentration de protéine membranaire dans les vésicules. L'affinité accrue que montre l'Enflurane pour l'environnement de la bR plutôt que celui de la membrane pourrait alors s'expliquer autrement que par son affinité pour l'interface protéine-lipide, et pourrait être le résultat de la présence d'un site de liaison pour l'Enflurane sur la bR. Cette voie reste à explorer et il faut d'abord départager laquelle des deux hypothèses est juste.

À cette fin, nous avons entrepris des mesures de *quenching* de fluorescence par un anesthésique général dans des vésicules contenant à la fois une sonde fluorescente dans les lipides, le Laurdan, et une autre sonde portée par un peptide, soit un tryptophane placé au milieu de sa séquence. Chacune de ces sondes indiquera la présence du *quencheur* dans son entourage par la diminution de l'intensité de fluorescence de celle-ci. Les deux sondes étant dans le même échantillon, l'influence de l'anesthésique sur chacune d'elles sera comparée et le comportement de l'anesthésique pourra être suivi.

4.2 *Quenching* de la fluorescence dans des vésicules de DPPC/peptide/Laurdan par le Bromoforme.

4.2.1 *Le quencheur* : le Bromoforme

Le Bromoforme s'est révélé être un *quencheur* très efficace. Aux concentrations et volume de suspension de DPPC utilisés (0-5mM, 2mL), lesquels évitent les problèmes reliés aux concentrations élevées de vésicules, une quantité aussi faible que 3 μ L *quenche* complètement la fluorescence de l'échantillon. Pour augmenter le nombre de mesures ainsi que la précision des volumes injectés, il est dilué dans un produit qui à la fois solubilise le Bromoforme et est soluble dans une phase aqueuse. L'éthanol, qui possède ces caractéristiques, a été retenu car l'effet qu'il produit sur la membrane et sur la sonde est caractérisé dans la littérature et les contrôles effectués sur notre système nous permettent de conclure que les quantités utilisées n'interfèrent pas avec nos mesures.

4.2.2 Effet de l'éthanol

L'éthanol est reconnu pour modifier les propriétés de la membrane. Il est soluble dans une phase lipidique et son coefficient de partition pour une bicouche de phosphatidylcholine/eau est de 0,48 à 30°C. Il se localise principalement à l'interface

lipide/eau. Entre autre, il diminue l'ordre des lipides dans les membranes biologiques et les bicouches lipidiques. Il suit la loi de Meyer-Overton et possède un faible potentiel anesthésiant [47]. Il diminue la température de transition de phase et, à concentration élevée, induit l'interdigitation de la bicouche. Cependant, le rapport des intensités F435/F510 de la fluorescence du Laurdan n'est pas affecté pour des concentrations d'éthanol inférieures à 1,2 M [48] et le DPPC ne forme un état complètement interdigité que pour des concentrations plus élevées. L'éthanol n'a pas d'effet sur la transition de phase du DPPC pour des concentrations < 5 mole % [49].

Les résultats préliminaires, obtenus avec des vésicules contenant le Laurdan, indiquent que la forme de son spectre n'est pas affecté et que la position du λ_{\max} ne change pas jusqu'à l'addition de 100 μL d'éthanol dans 2 mL de DPPC 1mM (figure 4.9). L'ajout de ce volume d'éthanol fait diminuer l'intensité du pic de 3%, laquelle reste stable par la suite dans le temps (figure 4.10). L'ajout plus important d'éthanol (300 μL et plus) permet d'observer les modifications dans le spectre du Laurdan indiquant une modification des propriétés de la membrane.

4.2.3 Diffusion du Bromoforme dans l'échantillon

La diffusion du Bromoforme à travers l'échantillon, malgré qu'il soit mélangé à de l'éthanol, se fait très lentement. Comme en témoigne la figure 4.11, l'ajout de 4 μL de bromoforme/EtOH 12% v/v à un échantillon contenant 1mM de DPPC fait diminuer l'intensité de fluorescence en partie instantanément, mais aussi sur une période de temps qui dépasse 3h. Ceci indique que l'état d'équilibre prend plusieurs heures à être atteint, ce qui rend la prise de mesures conduisant à l'élaboration de graphiques de Stern-Volmer problématique. Les premières mesures effectuées en injectant l'anesthésique avec un perfuseur ont conduit à l'élaboration de courbes de Stern-Volmer qui se sont révélées erronées puisque l'injection effectuée avec le perfuseur ne permettait pas au système d'atteindre l'état d'équilibre. Considérant cette difficulté, une autre méthode a été élaborée dans laquelle les informations sont tirées de graphiques du *quenching* du Laurdan par le mélange Bromoforme/éthanol en fonction du temps.

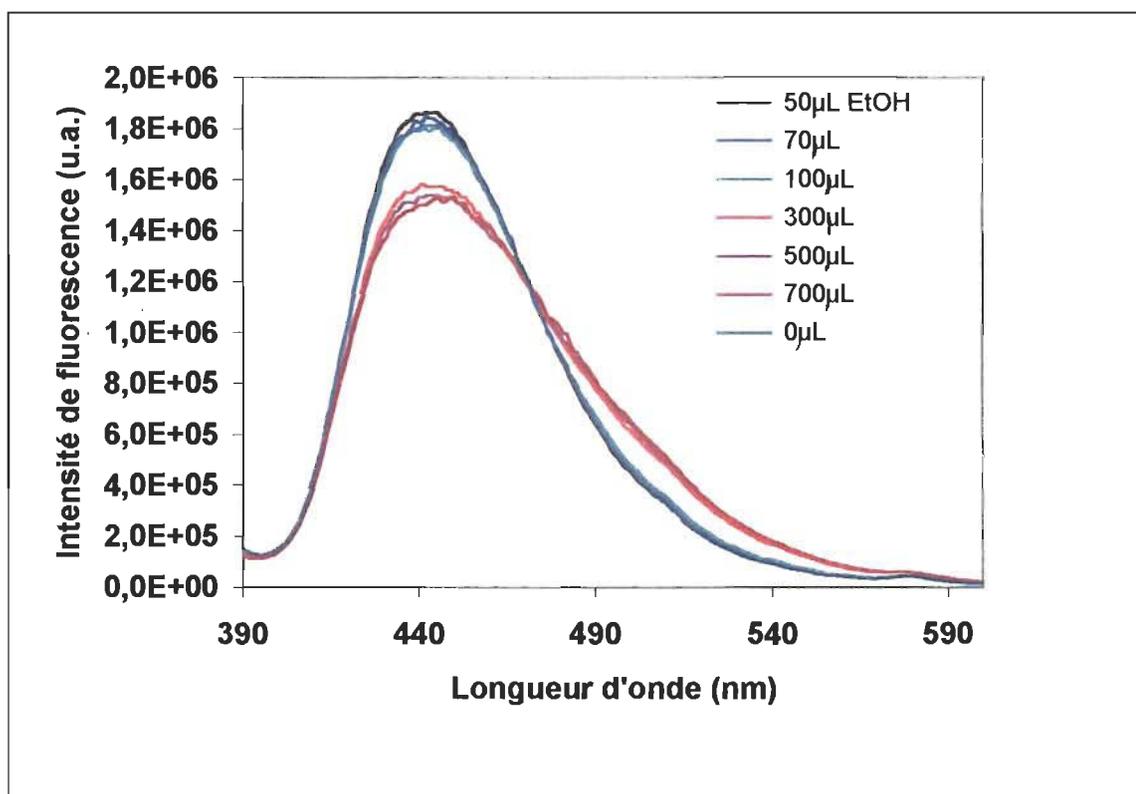


FIGURE 4.9 Spectres normalisés du Laurdan pour un échantillon de vésicules de DPPC/Laurdan 1mM sans et avec l'ajout de différents volumes d'éthanol.

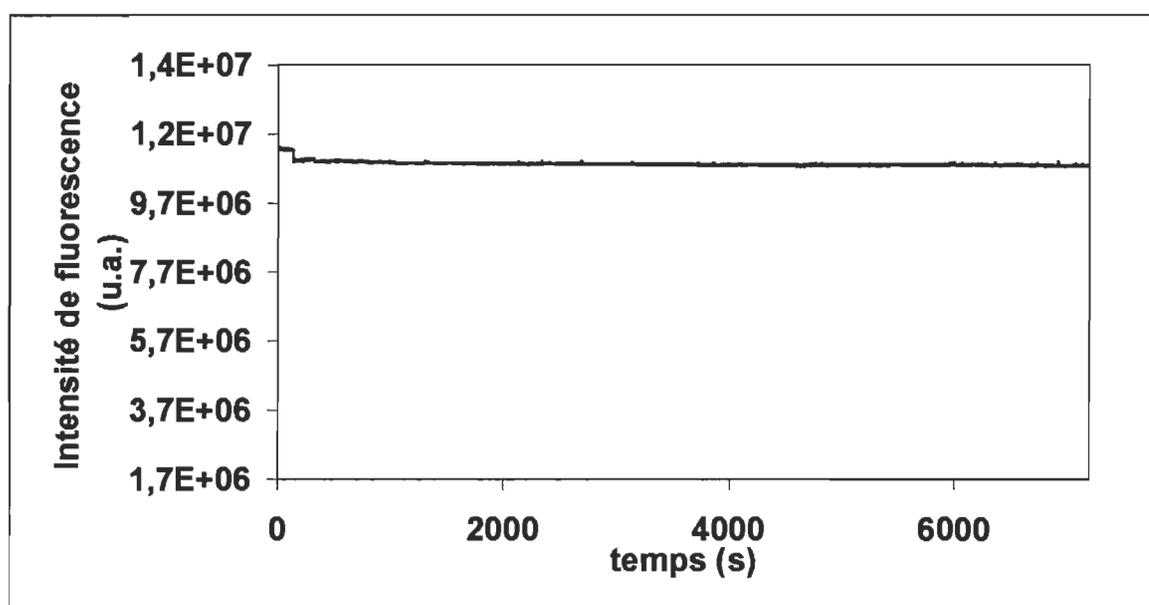


FIGURE 4.10 Variation de l'intensité de fluorescence à λ_{\max} avant et après ajout de 100 μL d'éthanol dans un échantillon de vésicules de DPPC/Laurdan (1000 :1) 1mM.

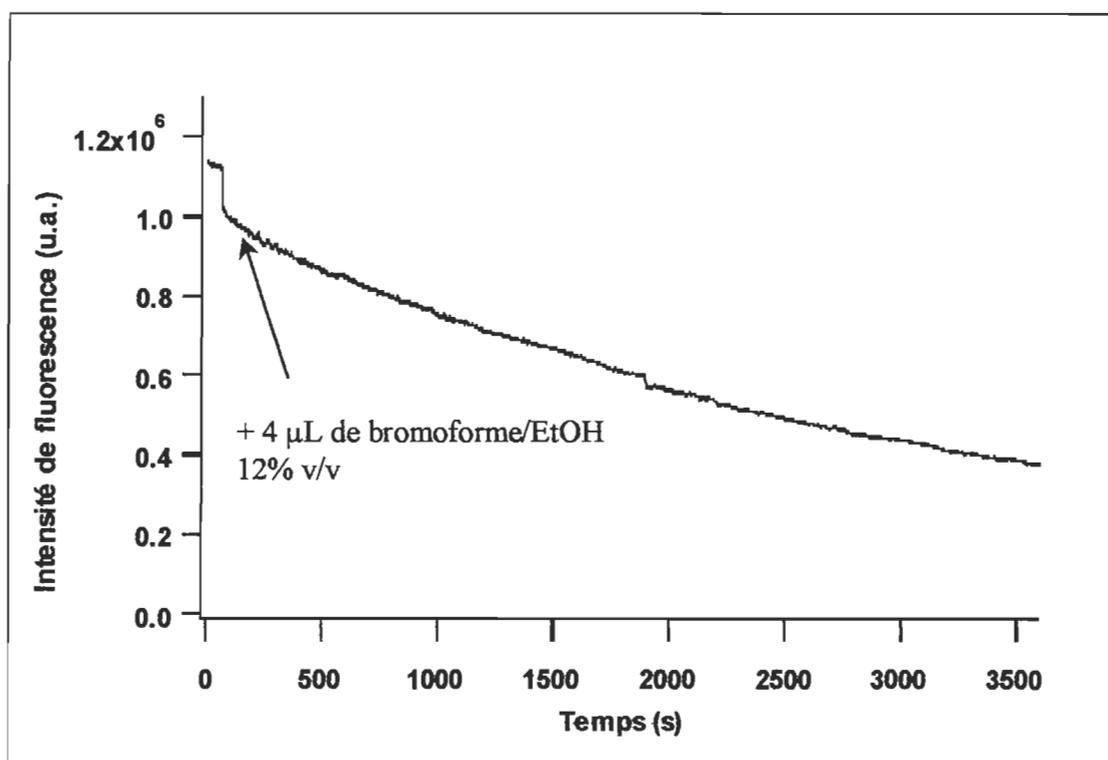


FIGURE 4.11 Diminution de l'intensité de fluorescence du Laurdan en fonction du temps lors de l'ajout de 4 µL de bromoforme/EtOH 12% v/v à un échantillon contenant 1mM de DPPC.

4.2.4 Vitesse de *quenching* et température

Le *quenching* donne une mesure de l'accessibilité d'une molécule (le *quencheur*) à une autre (la sonde) et la vitesse de *quenching* nous donne de l'information sur la facilité avec laquelle le *quencheur* a accès à la sonde. Différentes informations peuvent être obtenues en comparant les vitesses de *quenching* à différentes températures, c'est à dire en procédant à l'injection d'un volume de bromoforme/EtOH puis en observant les modifications du spectre en fonction du temps. Le paramètre considéré comme étant la vitesse de *quenching* est obtenu du graphique $\ln(1-\Delta\phi/\Delta\phi_{\max})$ en fonction du temps. Le *quenching* est porté sous cette forme afin d'avoir une section de la courbe, jusqu'à 90% de *quenching*, qui soit linéaire de sorte que la pente de cette courbe soit posée comme étant l'indicatif de la vitesse de *quenching*.

Les premières mesures de ce type ont été effectuées sur un échantillon de vésicules de DPPC/Laurdan à une concentration de 1 mM, en injectant 0.5 μ L de Bromo/EtOH 12%v/v. Cette procédure a été répétée pour des températures de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 et 56°C (les principaux spectres sont présentés aux figures 4.12 et 4.13). Ces courbes montrent que le *quenching* est plus rapide aux températures élevées qu'aux températures basses. Cette série de mesures met en évidence l'influence de la température sur la vitesse de *quenching*. En effet, à température élevée, la cinétique de réaction est forcément plus rapide, ne permettant pas de conclure sur l'influence de la phase des lipides sur la vitesse de *quenching*., i.e. si l'insertion du *quencheur* est facilité par une phase ou l'autre des lipides.

Les vitesses de *quenching* obtenues aux différentes températures (figure 4.14) sont respectivement de 1,5, 1,6, 2,0, 2,5, 4,0, 3,7, 3,5, 3,2 x 10⁻² s⁻¹. Ces vitesses sont mises en graphique sous la forme d'une courbe d'Arrhénius, c'est à dire $\ln k$ en fonction de l'inverse de la température (1/T), où k est la constante de vitesse de la réaction (figure 4.15). Cette courbe est utilisée afin de vérifier si les variations observées sont dues de façon prédominante à une propriété de la membrane ou plutôt du Bromoforme. À cette fin, la courbe du rapport des intensités I477/I440 en fonction de la température, qui reflète la transition de phase induite par la température (avant ajout d'anesthésique), lui

est superposée. La pseudo-courbe d'Arrhénius n'est pas linéaire, mais présente plutôt deux plateaux séparés par une région de transition, laquelle a lieu à la même température que celle pour la transition de phase des lipides. Ceci indique clairement que la vitesse de *quenching* est liée à la transition de phase des lipides (en phase gel, le *quenching* est plus lent qu'en phase cristal-liquide.) Une courbe linéaire aurait été obtenue dans le cas où une propriété du Bromoforme (ex :diffusion) aurait été prépondérante pour déterminer la vitesse de *quenching* indépendamment de toute propriété de la membrane.

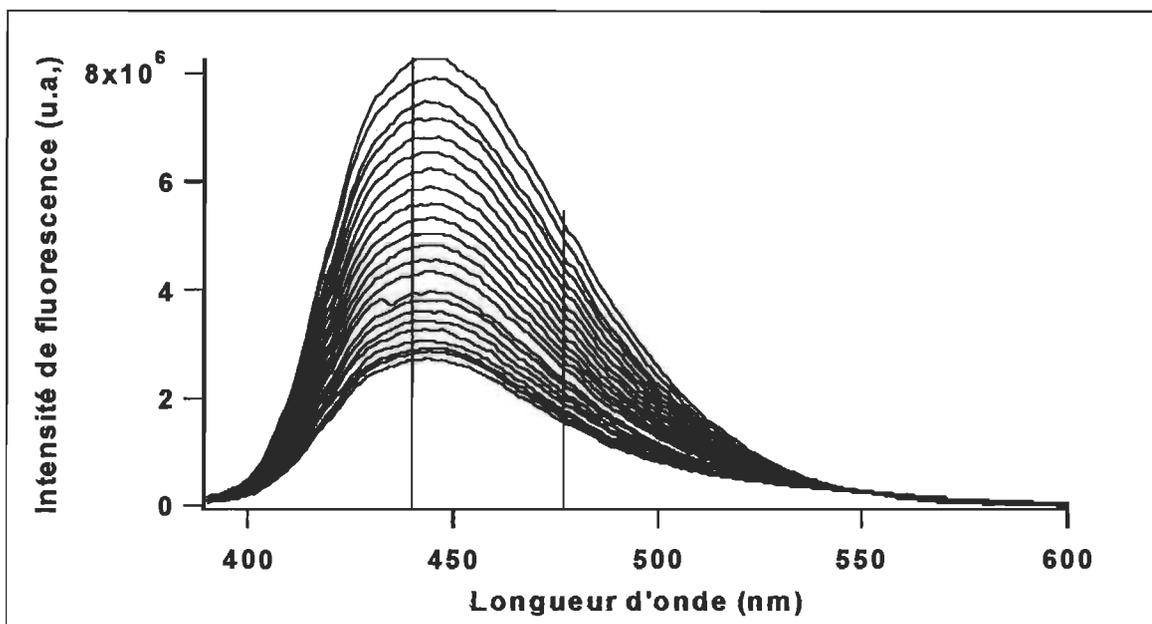
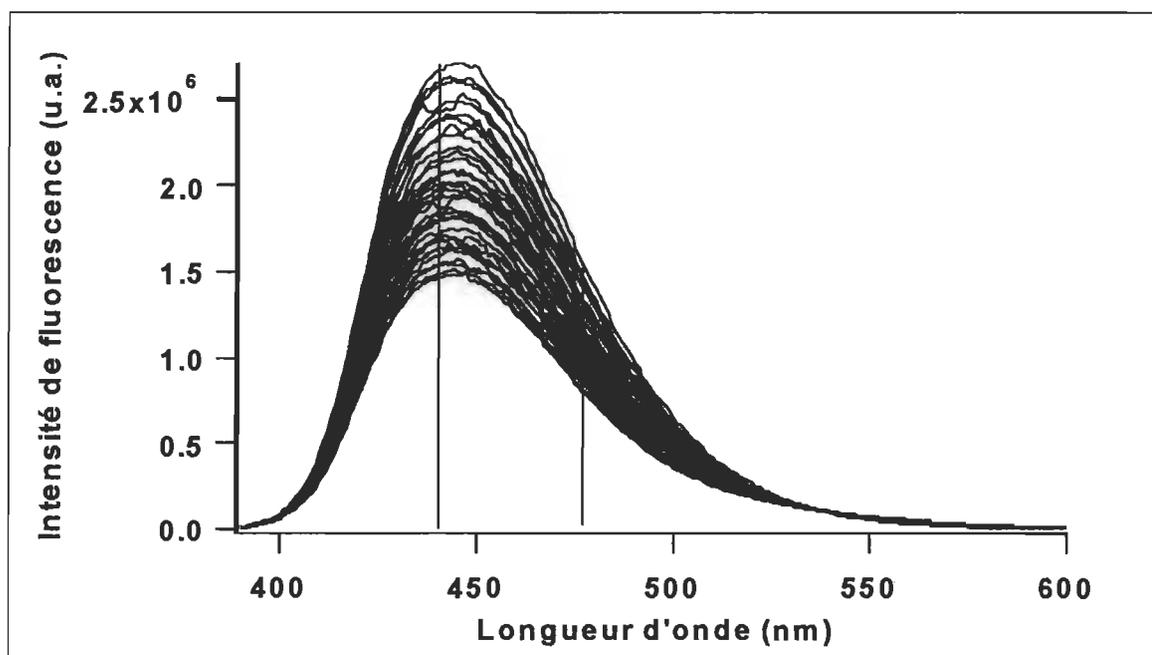


FIGURE 4.12 Variation du spectre du Laurdan dans le temps après injection de $0.5\mu\text{L}$ de Bromo/EtOH 12%v/v dans des vésicules de DPPC/Laurdan de 1 mM, pour des températures de 20°C (haut) et 30°C (bas). (Intervalle de 5 minutes entre chaque spectre)

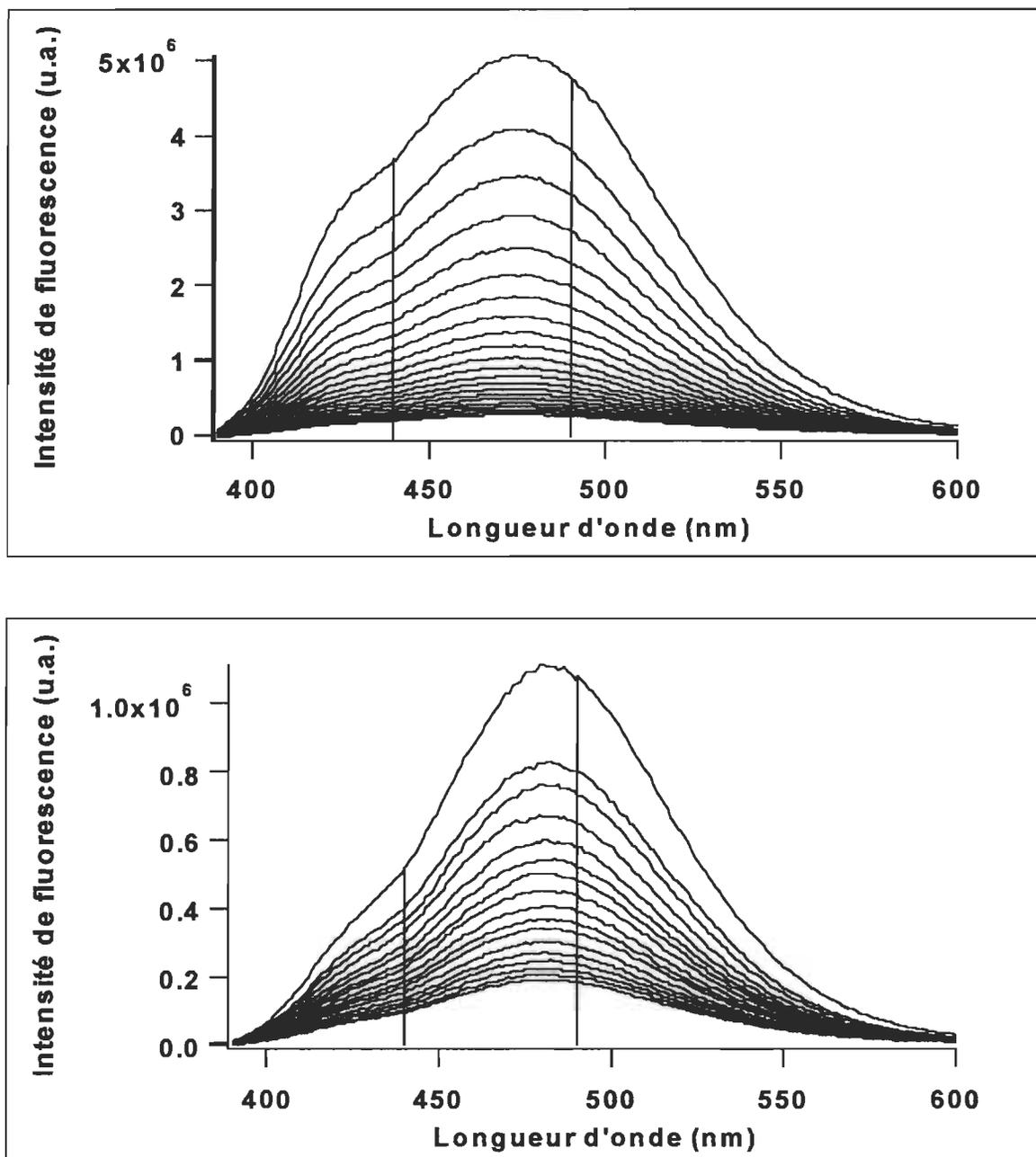


FIGURE 4.13 Variation du spectre du Laurdan dans le temps après injection de $0.5\mu\text{L}$ de Bromo/EtOH 12%v/v dans des vésicules de DPPC/Laurdan de 1 mM, pour des températures de 40°C (haut) et 50°C (bas). (Intervalle de 5 minutes entre chaque spectre)

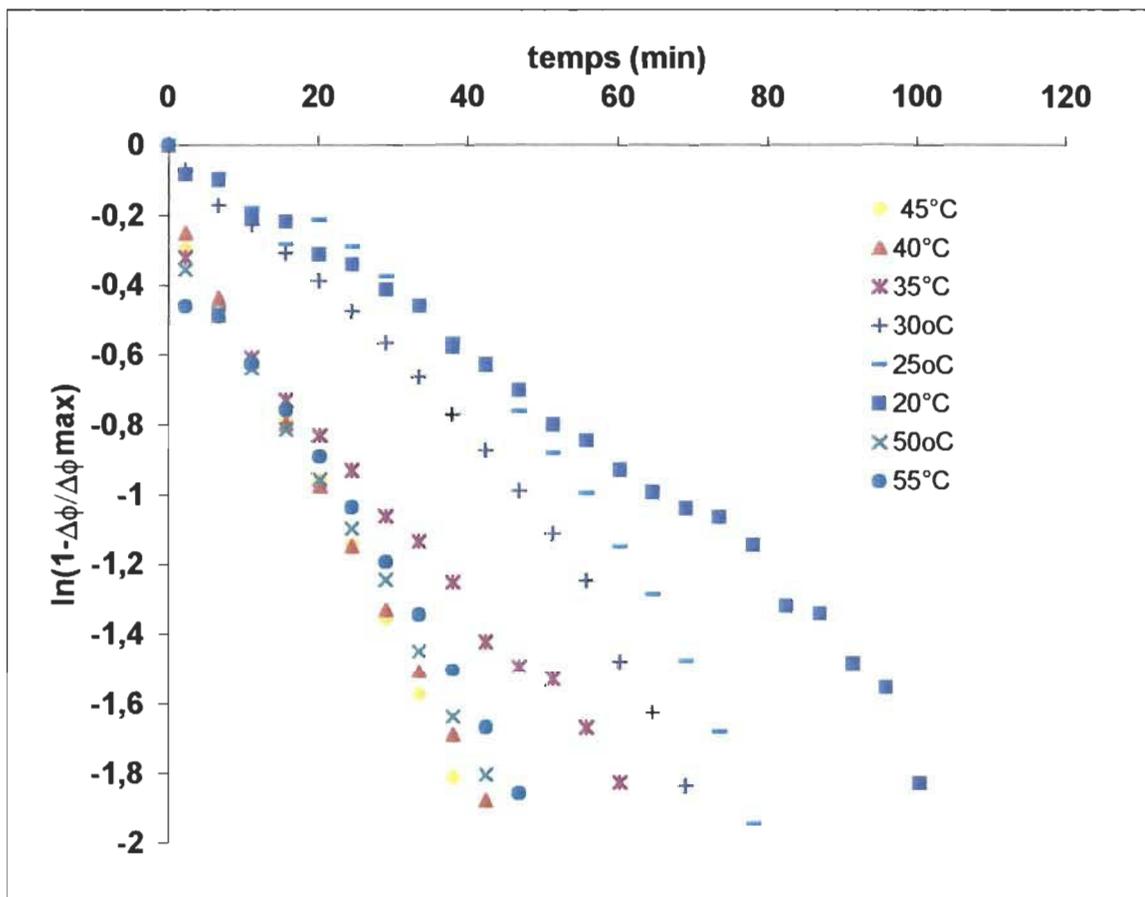


FIGURE 4.14 Graphique de $\ln(1-\Delta\phi/\Delta\phi_{max})$ en fonction du temps dont la pente donne une valeur de la vitesse de quenching pour des échantillons de DPPC/Laurdan, $[\text{lipides}] = 1 \text{ mM}$, pour lesquels $0,5 \mu\text{L}$ de bromo/EtOh 12%v/v est ajouté initialement et ce pour différentes températures.

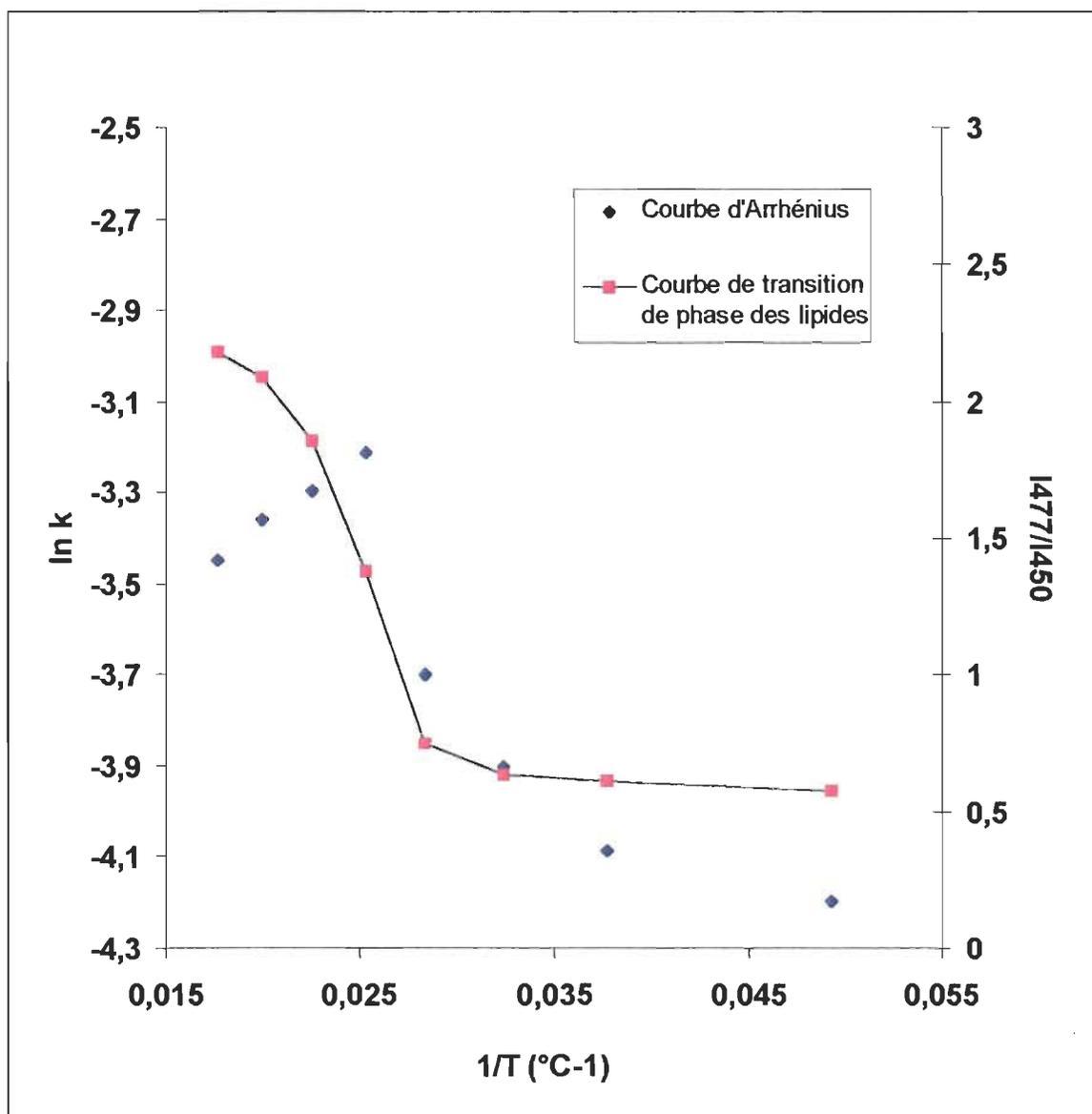


FIGURE 4.15 Vitesses de quenching aux différentes températures mises sous la forme d'une courbe d'Arrhénius ($\ln K$ en fonction de $1/T$) et courbe de transition de phase des lipides correspondante pour les mêmes échantillons dont les spectres sont présentés aux figures 4.11 et 4.12.

4.2.4.1 Préférence du Laurdan pour une phase ou l'autre...

En ajustant la température de sorte que des domaines de lipides en phase gel et cristal-liquide soient présents en même temps, on peut comparer les vitesses de *quenching* aux longueurs d'onde correspondant à chacune de ces phases, indépendamment de l'effet de la température sur la vitesse de *quenching*. À cet effet, la température du système a été placée d'abord à 36,5°C, puis à 34,6°C, températures pour lesquelles le spectre du Laurdan présente des intensités comparables à 477 nm et à 440 nm. Ainsi, toute variation de l'intensité à ces longueurs d'onde devrait être un indice sensible de ce qui se passe dans chaque phase. De cette façon, des informations sont obtenues sur l'insertion relative du mélange Bromofome/Éthanol dans chacune des deux phases lipidiques présentes. En effet, il est vraisemblable que toute la fluorescence diminue en présence du bromoforme; dans ce cas, seul le rapport des intensités dans des spectres normalisés peut nous renseigner.

À 36,5°C, le rapport des intensités de fluorescence I_{477}/I_{440} (figure 4.16) avant l'ajout de bromo/etOH est de 0,89, ce qui indique qu'il y a plus de lipides en phase gel qu'en phase cristal-liquide. Un volume 1µL de Bromo/EtOH 12%(v/v) est alors injecté dans l'échantillon de vésicules de DPPC/Laurdan 1mM et le rapport augmente de façon nette à l'intérieur des 15 premières minutes pour ensuite se stabiliser en continuant à augmenter légèrement. Une augmentation de ce rapport signifie qu'il y a une augmentation de l'intensité de fluorescence centrée à 490 nm (phase cristal-liquide des lipides) ou une diminution de celle centrée à 435nm (phase gel des lipides). Ce phénomène peut être dû soit à une présence accrue de *quencheur* dans la phase gel indiquant une préférence pour cette dernière, soit à une transition des lipides de la phase gel à la phase cristal-liquide.

À 34,6°C, le rapport initial des intensités de fluorescence I_{477}/I_{440} (figure 4.17) est de 0.65, ce qui indique qu'il y a encore plus de lipides en phase gel qu'en phase cristal-liquide. À la suite de l'ajout de 0,2µL de Bromoforme/EtOH, ce rapport diminue

faiblement au cours du temps, témoignant de la diminution plus rapide de la fluorescence à 477 que de celle à 440nm, soit une diminution de la fluorescence de la sonde dans les lipides en phase cristal-liquide. ou son augmentation dans les lipides en phase gel. Voici comment ce changement peut être interprété. À cette température, l'ajout de Bromo/EtOH ne modifie pas la phase des lipides. Le changement dans le rapport n'est pas assez important pour indiquer une transition de phase des lipides provoquée par l'addition de Bromoforme/EtOH. Ce qui est observé est le *quenching* progressif de la fluorescence de la sonde dans une phase plutôt qu'une autre, soit le *quenching* dans la phase cristal liquide plutôt que dans la phase gel. Le *quencheur* aurait donc une préférence pour la phase cristal-liquide puisque celle-ci est quenchée plus rapidement que la phase gel.

Le phénomène observé à 36.5°C témoignerait pour sa part plutôt d'un phénomène de transition de phase dans les lipides causé par l'ajout de bromo/EtOH. Malgré la préférence du Bromoforme pour la phase cristal-liquide qui devrait de ce fait voir sa fluorescence diminuer comme expliqué ci-dessus, il y a une augmentation du rapport indiquant le passage de certains lipides de la phase gel à la phase cristal-liquide. La température plus élevée qui de ce fait approche l'échantillon de l'état de transition ainsi que le volume de Bromo/EtOH plus élevé permettent ce phénomène.

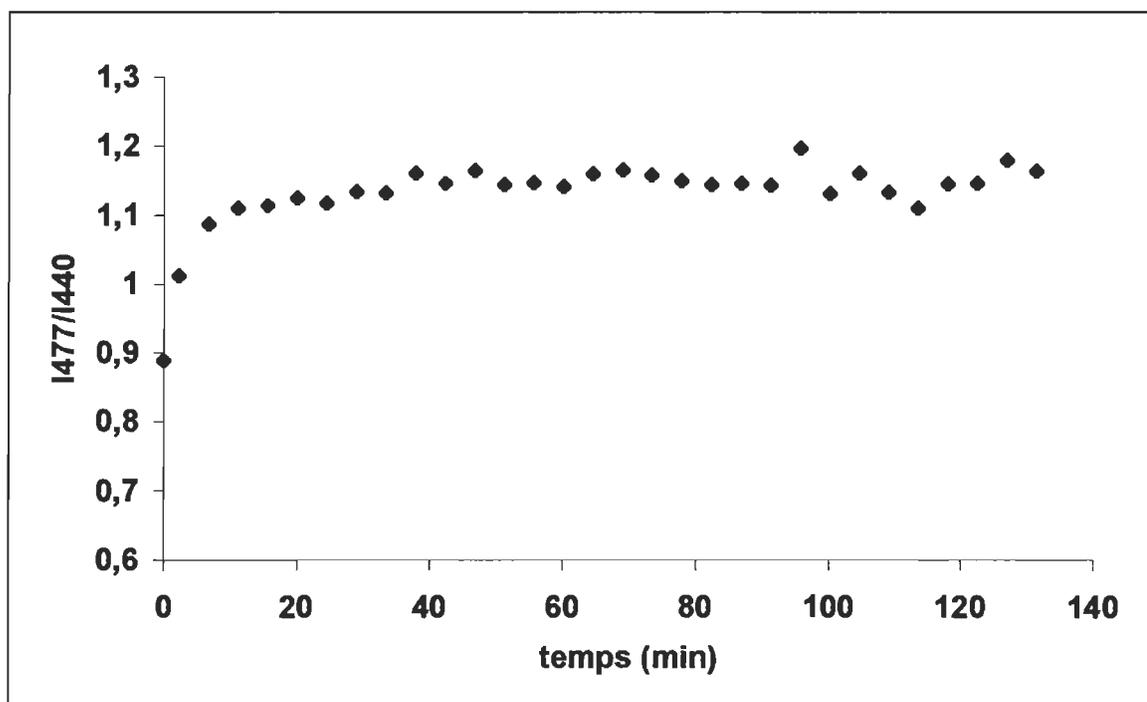


FIGURE 4.16 Variation du rapport I477/I440 du Laurdan en fonction du temps après injection de 0,2 μ L de Bromoforme/EtOH 12% (v/v) dans des vésicules de DPPC/Laurdan 1mM à 36,5°C.

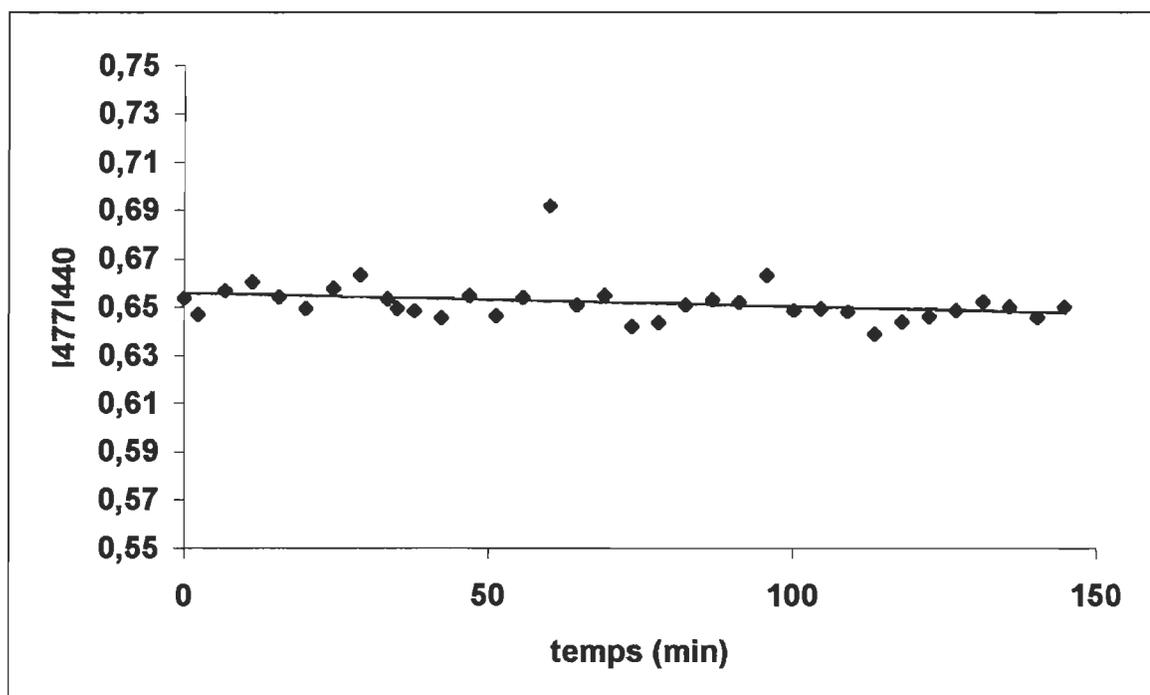


FIGURE 4.17 Variation du rapport I477/I440 du Laurdan en fonction du temps après injection de 1 μL de Bromoforme/EtOH 12% (v/v) dans des vésicules de DPPC/Laurdan 1mM à 34,6°C.

4.2.4.2 *Quenching* de la fluorescence du Laurdan vs celle du peptide

L'objectif principal de cette partie du travail était de voir comment se comporte le même système, mais dans lequel une sonde supplémentaire, un peptide fluorescent, a été inséré dans un rapport molaire DPPC/peptide 100:1. Pour permettre la comparaison des vitesses de *quenching* de fluorescence de la sonde et du peptide, celles-ci ont été mesurées en prenant alternativement un spectre du Laurdan et un spectre du peptide sur le même échantillon, dans la même expérience.

Les conditions expérimentales permettant d'avoir un spectre de fluorescence du tryptophane décent ont été déterminées préalablement. Tout d'abord, le spectre du peptide dans le méthanol a été obtenu pour différentes concentrations de celui-ci. Ainsi, l'intervalle de concentrations de 0.05mg/mL à 0.5mg/mL de peptide présente une intensité de fluorescence permettant des mesures de *quenching* (figure 4.18). Aussi, lorsque le peptide est inséré dans les vésicules de DPPC, la diffusion de la lumière devient beaucoup plus importante. La fluorescence du tryptophane étant relativement faible par rapport à celle du Laurdan, des filtres ont été utilisés tant à l'excitation qu'à l'émission afin d'obtenir un spectre du tryptophane mieux défini. Un filtre interférentiel à 289 nm à l'excitation et un filtre passe-haut à 305 nm à l'émission ont permis de réduire la contribution de la lumière diffusée. Pour vérifier le comportement du spectre du tryptophane en présence de *quencheur*, une première expérience est effectuée sur des vésicules de DPPC contenant le peptide à raison de 100 DPPC par peptide et à une concentration de 3 mM de DPPC. Le *quenching* de fluorescence est suivi dans le temps après l'ajout de 0,5 μ L de bromoforme/EtOH 12%v/v (figure 4.19). Celle-ci diminue de 65% lors de l'ajout du *quencheur*, puis continue à diminuer faiblement par la suite. Ceci indique qu'il faut choisir un volume plus faible de bromo/EtOh 12%v/v pour que l'atténuation de la fluorescence se fasse de façon progressive et qu'elle soit mesurable dans le temps.

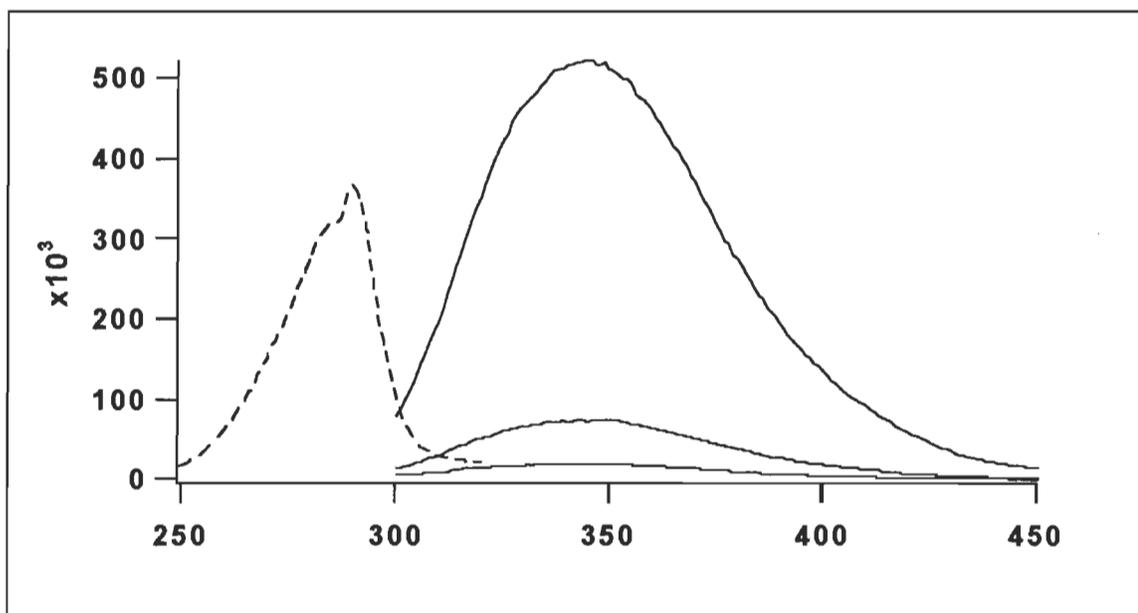


FIGURE 4.18 Spectre de fluorescence du tryptophane du peptide dans le méthanol. Excitation (---) mesurée à 0,5 mg/ml de peptide et émission (—).mesurée à trois concentrations de peptide, 0,01 , 0,05 et 0,5 mg/ml (de bas en haut).

Ainsi, des courbes de *quenching* présentées sur les figures 4.20 A et B sont obtenues à partir d'un échantillon de vésicules pourvues des deux sondes dans un rapport molaire DPPC :Trp (peptide) :Laurdan 1000 :10 :1 de concentration totale en lipide de 3.5mM maintenu à 25°C auquel est ajouté 0.1 μ L de Bromo/EtOH 12%v/v. Tel que prévu, la fluorescence du peptide est beaucoup plus faible que celle du Laurdan, soit des intensités maximales de l'ordre de 10^4 et de 10^6 respectivement. Les spectres sont enregistrés pendant une certaine période de temps après la première injection de *quencheur* afin de suivre la vitesse à laquelle est affectée chacune des sondes par le *quencheur*. Puis le même volume est injecté successivement à différents intervalles de temps, ce qui permet encore une fois de comparer la réaction de chacune des sondes à une concentration croissante d'anesthésique. Le rapport des rendements quantiques de fluorescence est présenté en fonction du temps (figure 4.21) et permet de comparer l'effet du *quencheur* sur chacune des sondes. Ces résultats montrent clairement que la fluorescence du Laurdan est atténuée plus rapidement que celle du peptide. Ainsi, le *quencheur* se retrouve plus rapidement en contact avec la sonde qui se trouve dans les lipides que celle portée par le peptide.

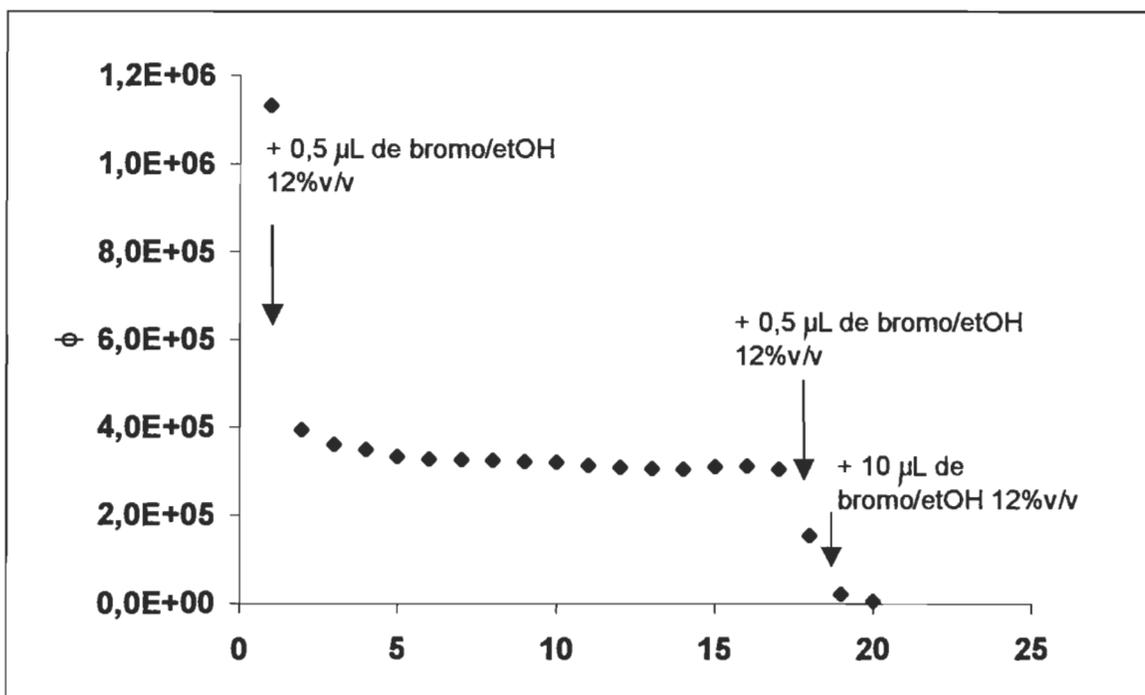


FIGURE 4.19 Variation du rendement relatif de fluorescence du peptide dans des vésicules de DPPC/ peptide / Laurdan (1000 :10 :1), [lipide] = 3mM, en fonction du temps après injection subséquentes de 0,5 µL et de 10 µL de Bromo/EtOH 12% (v/v).

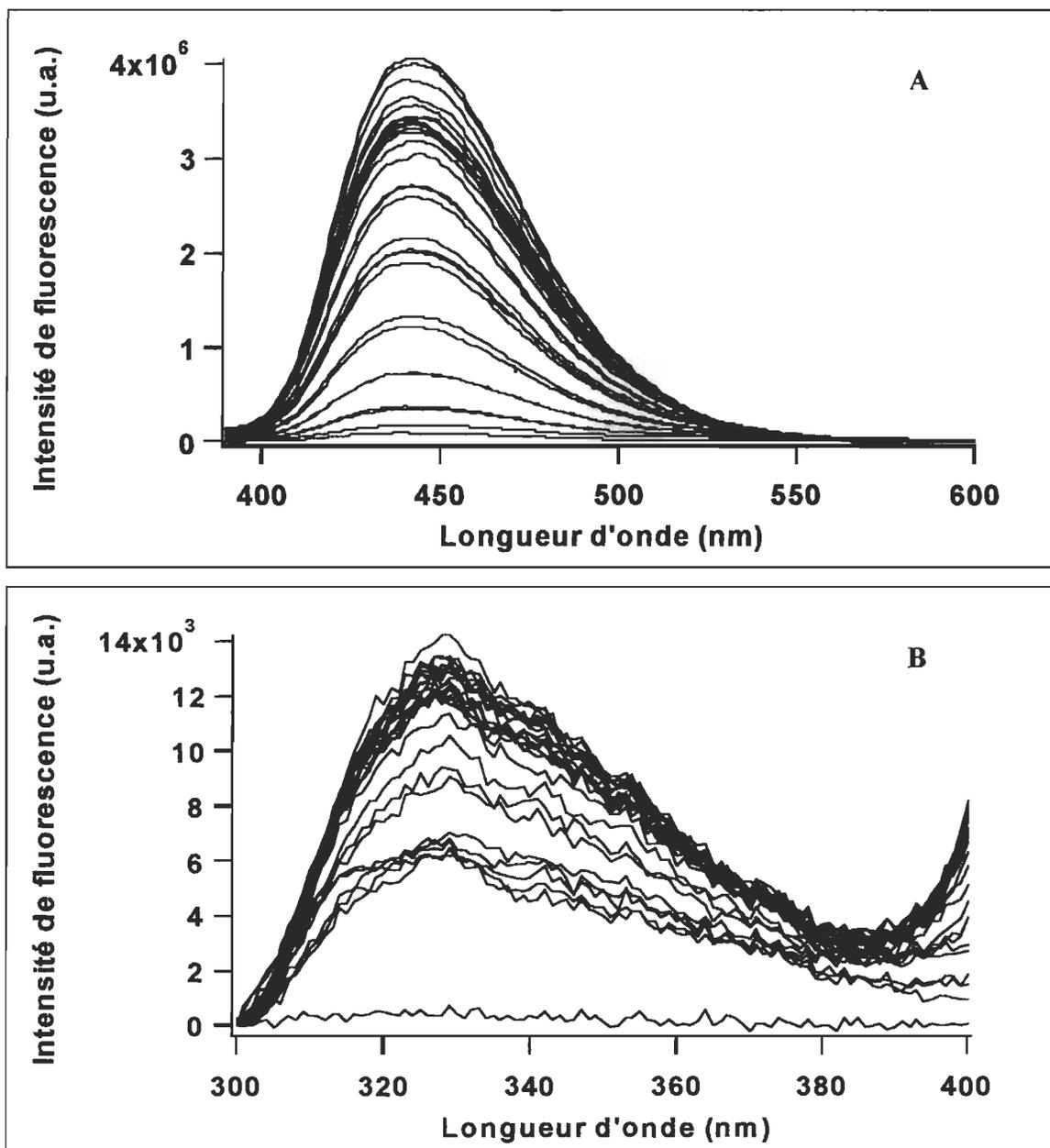


FIGURE 4.20 Spectres de fluorescence de l'échantillon de vésicules pourvues des deux sondes (A : Laurdan, B : peptide) dans un rapport molaire DPPC :Trp (peptide) :Laurdan 1000 :10 :1 de concentration totale en lipide de 3.5mM maintenu à 25°C auquel est ajouté 0.1 μ L de Bromoforme/EtOH 12%v/v. La fluorescence est suivie en fonction du temps.

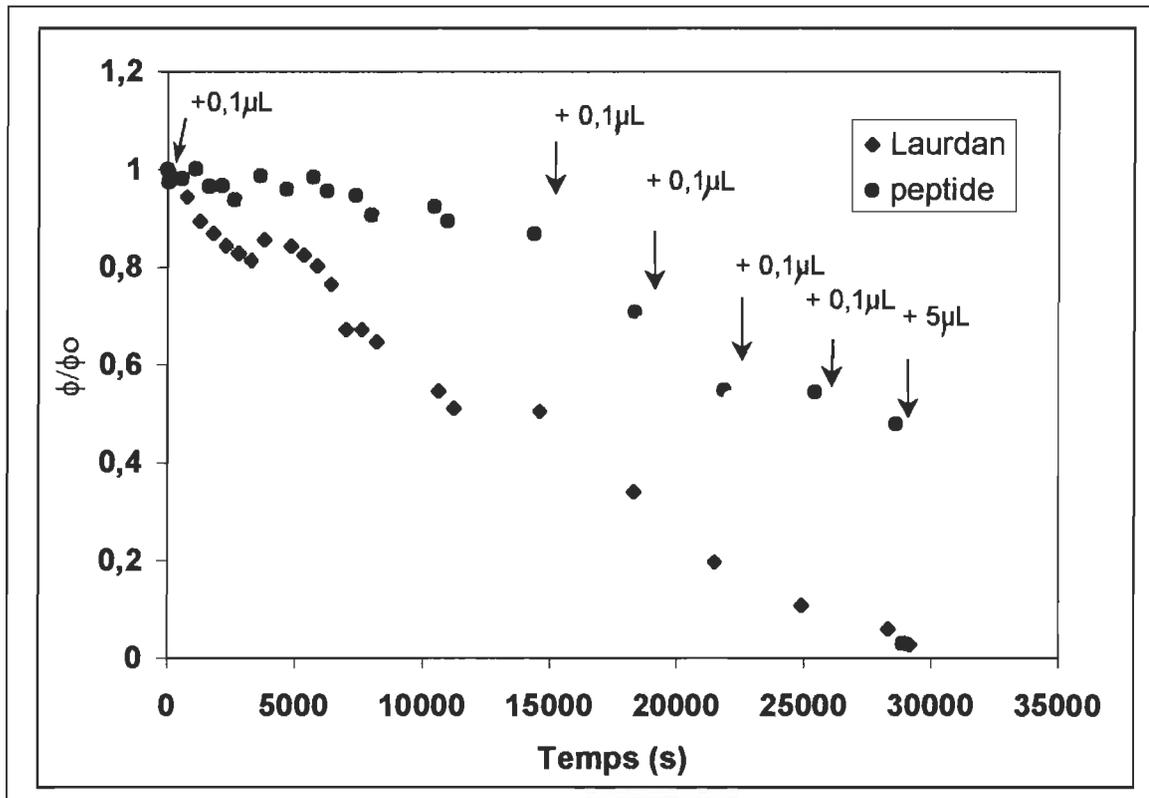


FIGURE 4.21 Rapport du rendement quantique de fluorescence en fonction du temps pour le Laurdan et le tryptophane du peptide du même échantillon lors d'injections successives de 0,1 μL de Bromoforme/EtOH 12%v/v.

CHAPITRE 5

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces résultats peuvent se comparer à ceux d'une autre étude[39] qui avait pour but d'évaluer par spectroscopie de fluorescence les modifications structurales de la bactériorhodopsine qui accompagnent l'importante transition spectrale du rétinol de la bR causée par des anesthésiques généraux. Le *quenching* de la fluorescence intrinsèque de la protéine par différents anesthésiques généraux tels que l'Halothane et l'Enflurane y est effectué et le taux de *quenching* est comparé à la transition spectrale du rétinol. À concentration égale d'Halothane, les résultats montraient que la transition spectrale du rétinol est à peine commencée lorsque la fluorescence intrinsèque a diminué de moitié. Ceci suggère que l'anesthésique est rapidement à proximité de la protéine, mais que la cible première des anesthésiques n'est pas le rétinol. En effet, les mesures de fluorescence montraient que l'exposition au solvant et le transfert d'énergie restaient invariants lors de la transition spectrale du rétinol. Il y est conclu que le phénomène n'est pas accompagné de larges changements de conformation, mais reflète des perturbations subtiles de l'interaction chromophore-protéine.

Tous ces résultats sont rassemblés dans la figure 5.1 afin de suivre l'ordre des événements moléculaires dans chacun des cas et de faire les liens entre ceux-ci. Trois échelles sont présentées qui correspondent respectivement, de haut en bas, à l'étude de Lee et al. rapportée ci-haut, aux résultats obtenus dans la présente étude, soit le *quenching* des vésicules de DPPC/Laurdan/peptide par du Bromoforme et enfin les transitions causées par l'Enflurane dans des vésicules de DPPC/Laurdan/bR (transition spectrale du rétinol et fusion des lipides). Pour ce qui est du *quenching* de la membrane pourpre par de l'Halothane, la fluorescence intrinsèque de la bR est *quenchée* à des concentrations bien plus faibles que celles qui induisent la transition spectrale du rétinol. Le *quenching* par le Bromoforme des vésicules de DPPC/Laurdan/peptide nous montre tout d'abord que les lipides en phase cristal-liquide sont quenchés plus rapidement que

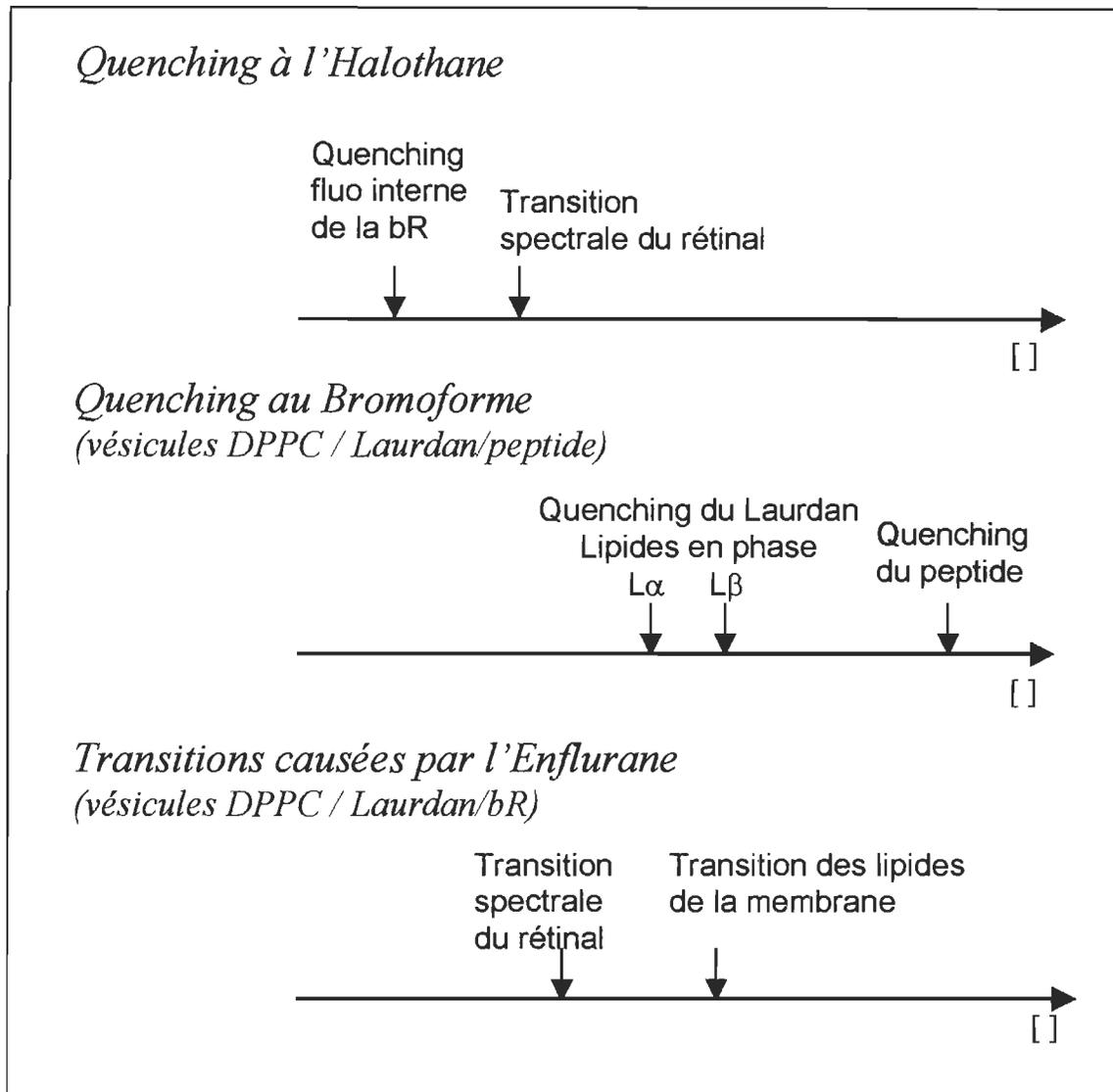


FIGURE 5.1 Ordre des événements produits lors de l'ajout d'anesthésique, obtenu à partir des expériences de *quenching* à l'Halothane de la bR (sous forme de membrane pourpre, PM) de Lee et al., des expériences de *quenching* au Bromoforme sur des vésicules de DPPC/Laurdan/peptide et de transitions causées par l'Enflurane sur des vésicules de DPPC/Laurdan/bR tirées de la présente étude.

ceux en phase gel et surtout que le peptide est *quenché* bien après les lipides. Dans ce cas, les mesures ont été prises en fonction du temps mais, le système étant en cours d'atteinte de l'équilibre, elles sont aussi en fonction de la concentration même si celle-ci n'est pas connue. Enfin, la transition spectrale du rétinol a lieu dans des vésicules de DPPC/Laurdan/bR pour des concentrations plus faibles d'Enflurane que celles qui provoquent la transition dans les lipides (fusion des lipides).

Les événements sont placés de façon arbitraire sur l'échelle mais respectent l'ordre dans lequel ils arrivent. Du fait que ces études ont été effectuées sur des systèmes différents et soumis à des anesthésiques différents, la position des différents événements d'une échelle à l'autre est aussi arbitraire. Cependant, les événements identiques ont été superposés en vertu du fait qu'ils doivent avoir lieu à une échelle de concentration semblable. De cette façon, l'ordre suivant des événements est obtenu (pour des concentrations croissantes d'anesthésique) : *quenching* de la fluorescence interne de la bR, transition spectrale du rétinol, transition dans les lipides de la membrane, *quenching* du peptide. Bien sûr, il serait intéressant de quantifier chacun des effets produits par les différents anesthésiques afin de les placer plus précisément sur l'échelle et de déterminer une méthode de comparaison entre eux.

Il est surprenant, a priori, de constater que le *quenching* de la fluorescence intrinsèque de la bR et celui du peptide se trouvent aux extrêmes dans la séquence des événements déterminée par rapport à la concentration d'anesthésique. Le peptide et la protéine étant de même nature, on aurait pu s'attendre à ce que le *quenching* de leur fluorescence par des anesthésiques se trouve à la même position dans la séquence des événements. Cependant, à l'inverse du peptide, la bR possède une structure tertiaire qui rend possible la présence de cavités qui pourraient constituer un site de liaison. Un site de liaison aux anesthésiques sur la bR permettrait de donner une explication à l'ensemble de ces résultats. La présence d'un tel site implique une affinité particulière de la protéine pour les anesthésiques et il serait normal qu'à faible concentration, la fluorescence interne de la bR soit *quenchée* alors que ce phénomène ne se produit qu'à concentration élevée pour le peptide. Cette proposition est certes hasardeuse; elle n'est

pas soutenue fortement par notre expérimentation et elle ne peut être suffisante pour expliquer le phénomène d'anesthésie, mais elle peut néanmoins s'ajouter à un autre phénomène impliquant une interaction moins spécifique.

L'influence de l'augmentation de la concentration de l'Enflurane sur des vésicules de DPPC étant déjà connue[18] (soit une diminution du T_m), la première série de mesures visait à déterminer l'impact de la présence de protéines membranaires dans un système identique soumis aux mêmes conditions. La variation de la température de transition de phase alors observée et causée par la présence d'Enflurane est différente si le rapport lipides/bR est plus ou moins élevé. En présence accrue de bR, la membrane nécessite une plus grande concentration d'Enflurane pour avoir la même variation de la température de transition de phase. Ou d'un autre point de vue, la bR a une influence sur la phase des lipides et/ou sur les modifications que peut y apporter l'Enflurane. Cette différence peut être interprétée de deux façons, soit que l'Enflurane est accaparé par la bR et n'est donc pas disponible pour provoquer la fusion des lipides, soit que cette plus grande concentration d'Enflurane est nécessaire pour annuler l'effet structurant que produit la protéine sur la membrane et obtenir la même variation du T_m . Puisque le rétinol n'est pas la cible première des anesthésiques dans la bR[39] et donc que les anesthésiques ne se logent pas à l'intérieur de la bR, le premier phénomène implique l'existence d'une affinité particulière de l'anesthésique pour l'interface protéine/lipide. Cependant, un effet structurant de la protéine sur les lipides est presque inévitable[50] et une combinaison des deux phénomènes est possible, le deuxième pouvant bien masquer le premier.

Aussi, plusieurs questions se posent. Tout d'abord, l'étude qui compare le *quenching* de fluorescence interne de la bR et sa transition spectrale par l'Halothane a été effectuée sur de la membrane pourpre laquelle contient un rapport lipide/bR très faible (~10 lipides/ bR). Si l'on considère le coefficient de partition octanol/eau de l'Halothane, il y a forcément une très grande concentration d'anesthésique dans la membrane et l'Halothane doit rapidement être en contact avec la bR. Ceci pourrait expliquer que le *quenching* de la fluorescence intrinsèque de la bR se produise à une

concentration apparente très faible (puisque c'est la concentration totale de l'échantillon qui est considérée et non pas la concentration lipidique). Cela ne change pas le fait que le *quenching* de la fluorescence intrinsèque de la bR a lieu bien avant la transition spectrale, argument en faveur de la présence d'un site de liaison.

Il est important de savoir où se loge l'anesthésique général dans la membrane et quelle est sa sphère d'action pour pouvoir interpréter correctement les résultats de *quenching*. La membrane de DPPC a récemment été étudiée parallèlement par DSC et par diffraction des rayons-X pour connaître l'influence de l'Enflurane sur l'organisation de la membrane[18]. Les résultats ont mis en évidence la formation d'une nouvelle organisation de la structure des lipides à partir d'un certain rapport lipide/Enflurane. Celle-ci est principalement caractérisée par *i*) une nette diminution de la grande distance smectique (*i.e.* la distance de répétition des faces lamellaires), *ii*) une interdigitation des chaînes et *iii*) par le fait que les chaînes aliphatiques sont perpendiculaires au plan de la membrane. La température de transition de la nouvelle phase est de 33°C et elle est très énergétique. Tel que proposé, la distribution inhomogène de l'Enflurane dans la membrane permet d'expliquer ces résultats. Celui-ci se localiserait à l'interface de la membrane et causerait à une certaine concentration la formation d'une phase interdigitée. Cette étude ajoute un élément important dans la controverse qui existe sur la localisation des anesthésiques en faveur de la répartition inhomogène de ceux-ci à l'interface de la membrane et l'on peut supposer que le Bromoforme et l'Halothane se répartissent de la même façon dans la membrane. En ce qui concerne la sphère d'action de ces anesthésiques, à partir des études présentées dans la section 2.6 on peut considérer de la même façon que ces anesthésiques doivent être proches de leur cible pour pouvoir la quencher sans forcément être en contact avec ($r \sim 10 \text{ \AA}$). En supposant que le Bromoforme se loge à l'interface et peut quencher les molécules qui l'entourent à l'intérieur d'un rayon de 10 \AA , peut-être est-il normal que le peptide soit *quenché* à des concentrations élevées, le tryptophane du peptide qui est placé au centre de la membrane se trouvant difficilement en contact avec ou dans la sphère de *quenching* du Bromoforme. Cependant, il est tout de même *quenché*, mais moins rapidement que la

sonde de la membrane. Est-ce là le signe d'une présence du bromoforme à l'interface peptide/lipide?

Le modèle membranaire que nous avons utilisé dans la présente étude représente une simplification maximale d'une cellule afin de diminuer le nombre de paramètres à contrôler et ne garder que les acteurs dont l'interaction entre eux et l'anesthésique est supposée primordiale dans la médiation de l'anesthésie générale. Bien sûr, un tel modèle n'est pas très représentatif d'une membrane biologique surtout par l'absence de la diversité de lipides et du cholestérol qui modulent de façon importante les propriétés de la membrane.

Ce qui permet de donner un sens aux diverses observations faites dans le cadre de cette étude est de postuler la présence d'un site de liaison aux anesthésiques sur la bactériorhodopsine, tout en admettant que la présence de celui-ci n'est pas suffisante pour expliquer le mécanisme moléculaire de l'anesthésie générale. Un mécanisme non-spécifique de modulation de la conformation de la protéine par l'altération de certaines propriétés de la membrane reste une hypothèse qu'il faut continuer d'explorer. L'altération de l'interaction protéine/lipide par la présence d'anesthésique à l'interface protéine/lipide n'a pu être ni vérifiée, ni rejetée ici.

Aussi, on peut se tourner vers une hypothèse amenée par Robert S. Cantor [51] qui propose un modèle thermodynamique pour expliquer comment la présence d'anesthésique dans la membrane peut affecter indirectement la fonction des protéines. Dans son modèle, la molécule qui agit comme anesthésique doit avoir une distribution inhomogène dans la membrane. De cette façon, elle provoque une modification inhomogène de la pression latérale exercée sur la protéine. Cette modification de la pression latérale affecterait l'activité de la protéine membranaire si celle-ci doit effectuer un changement de conformation, pour passer de l'état inactif à actif, dans lequel la variation de son aire de section est différente selon la profondeur dans la membrane. Par exemple, un anesthésique se logeant à l'interface aurait pour effet d'augmenter la pression latérale près de la phase aqueuse, compensé par la diminution de la pression

latérale dans le centre de la bicouche. Considérons une protéine qui pour passer dans sa conformation active doit augmenter son aire de section de façon plus importante à l'interface qu'au centre de la membrane. La présence d'un tel anesthésique, en augmentant la pression latérale à l'interface augmente la quantité de travail que doit fournir la protéine pour passer à l'état actif et l'équilibre conformationnel est alors déplacé vers la conformation inactive. Cette théorie permet d'expliquer, entre autre, le phénomène de « cut-off » que l'on retrouve dans certaines familles d'anesthésiques (par exemple, les alcools obéissent à la loi de Meyer-Overton, mais ne produisent plus d'anesthésie lorsqu'on augmente la chaîne carbonée au-delà de 14 carbones.) Les résultats qu'il a obtenus jusqu'à maintenant sont des prédictions par calcul théorique. Il serait donc intéressant de comparer des prédictions de la variation de la pression latérale obtenues pour différentes concentrations d'anesthésique et de les comparer avec des courbes doses-réponses semblables à celles obtenues ici. Peut-être que la théorie et l'expérience s'unifieront enfin.

En terminant, on constate que distinguer la proie de son ombre dépend du système étudié. En effet, dans la première partie de cette étude, le système étudié, soit des vésicules de DPPC contenant la bactériorhodopsine, nous laissait croire que la cible principale est la protéine membranaire ou son interface avec les lipides. Ensuite, en substituant un peptide à la protéine, la cible principale nous apparaît comme étant la membrane. L'existence d'un site de liaison pour les anesthésiques sur la bR ne peut expliquer dans son ensemble le phénomène d'anesthésie. Cette réalité se cache sous plusieurs facettes et on pourrait parler d'un phénomène « multidimensionnel », dans lequel plusieurs mécanismes se côtoient. Enfin, la seule chose qui est hors de tout doute, c'est que dans tous les cas, la proie est indissociable de son ombre.

ANNEXE

PARTITION DANS UN SYSTÈME TRIPHASIQUE

La définition et la dérivation d'équations décrivant le phénomène de partition dans un système triphasique sont analogues à celles pour un système biphasique. Ces dernières sont tirées d'un article de Omann et Glaser[52]. Les coefficients de partition sont donnés par:

$$P_l = [Q]_l / [Q]_a \quad P_g = [Q]_g / [Q]_a$$

(1)

où $[Q]$ représente la concentration de quencheur pour chacune des phases aqueuse (a), lipidique (l) et gazeuse(g). Il s'ensuit que

$$P_l/P_g = [Q]_l / [Q]_g \quad \text{ou} \quad [Q]_g = [Q]_l P_g / P_l \quad \text{et} \quad [Q]_a = [Q]_l / P_l$$

(2)

À partir du principe de conservation de la matière, on a que

$$[Q]_{\text{ajouté}} V_T = [Q]_l V_l + [Q]_g V_g + [Q]_a V_a,$$

(3)

où V fait référence au volume de chacune des phases et V_T au volume total. $[Q]_{\text{ajouté}}$ est la concentration dans le volume total de l'échantillon de la molécule qui doit se partitionner. En définissant la fraction volumique de chacune des phases de la façon suivante :

$$\alpha_l = V_l/V_T, \quad \alpha_g = V_g/V_T, \quad \alpha_a = V_a/V_T \quad \text{et} \quad \alpha_l + \alpha_g + \alpha_a = 1 .$$

(4)

En substituant les relations (2) et (4) dans (3), on obtient que

$$[Q]_{\text{ajouté}} = [Q]_l \alpha_l + [Q]_g P_g \alpha_g / P_1 + [Q]_l (1 - \alpha_l + \alpha_g) / P_1$$

(5)

et après réarrangement :

$$[Q]_l = [Q]_{\text{ajouté}} / [\alpha_l + (P_g \alpha_g + 1 - \alpha_l + \alpha_g) / P_1]$$

(6)

Cette relation qui permet de déterminer la concentration d'anesthésique général dans la membrane (phase lipidique) à partir de données accessibles, soit la concentration d'anesthésique générale ajoutée, la fraction volumique des phases lipidique et gazeuse ainsi que les coefficients de partition lipide-eau (P_l) et gaz-eau (P_g).

Le calcul peut être effectué pour un des cas qui nous intéresse en considérant les données suivantes : 2 mL d'une suspension aqueuse de vésicules de DPPC (concentration 7 mM) étaient placés dans une cuvette hermétiquement fermée de volume total de 3 mL. Une concentration d'Enflurane ajoutée de 10 mM, tel qu'indiqué tout au long de ce travail, correspond à la concentration dans les phases « aqueuse + lipidique » (la suspension de vésicules), ce qui fait, lorsque le volume totale des trois phases est considéré (3mL), une concentration d'Enflurane ajoutée de 6.67mM. Considérant que le volume moléculaire pour une suspension membranaire hydratée de DPPC est de 1146 \AA^3 [53] et que les coefficients de partition octanol/eau et gaz/eau pour l'enflurane égalent respectivement 126 (24°C) de 1.28 (37°C) [54], ont obtient :

$$\begin{array}{lll} V_l = 0.0097\text{mL} & \alpha_l = 0.003 & P_l = 126 \\ V_a = 1.99 & \alpha_g = 0.333 & P_g = 1.28 \\ V_g = 1\text{mL} & & \\ V_T = 3\text{mL} & & \end{array}$$

Ces valeurs, insérées dans l'équation (6), permet de déterminer que dans ces conditions, la concentration lipidique d'enflurane est de 562.8 mM.

BIBLIOGRAPHIE

1. Franks, N. P., Lieb, W. R., "Molecular mechanisms of general anaesthesia", *Nature* 300: 487-493 (1982).
2. Meyer, H. H., "Theorie der alkoholnarkose", *Arch. Exp. Patol. Pharmacol.* 42: 109-118 (1899).
3. Kamaya, H., Ueda, I., Moore, P. S., Eyring, H., "Antagonism between high pressure and anesthetics in the thermal phase-transition of dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer", *Biochim Biophys Acta* 550: 131-137 (1979).
4. Franks, N. P., Lieb, W. R., "Where do general anaesthetics act?", *Nature* 274: 339-342 (1978).
5. Franks, N. P., Lieb, W. R., "Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia", *Nature* 367: 607-614. (1994).
6. Franks, N. P., Lieb, W. R., "Do General Anesthetics Act by Competitive Binding to Specific Receptors?", *Nature* 310: 599-601 (1984).
7. Eckenhoff, R. G., "Do specific or nonspecific interactions with proteins underlie inhalational anesthetic action?", *Mol Pharmacol* 54: 610-615 (1998).
8. Tanner, J. W., Liebmann, P. A., Eckenhoff, R. G., "Volatile anesthetics alter protein stability", *Toxicology Letters* 100-101: 387-391 (1998).
9. Eckenhoff, R. G., Johansson, J. S., "Molecular interactions between inhaled anesthetics and proteins", *Pharmacol Rev* 49: 343-367 (1997).
10. Johansson, J. S., Scharf, D., Davies, L. A., Reddy, K. S., Eckenhoff, R. G., "A designed four-alpha-helix bundle that binds the volatile general anesthetic halothane with high affinity", *Biophys J* 78: 982-993 (2000).
11. Johansson, J. S., Gibney, B. R., Rabanal, F., Reddy, K. S., Dutton, P. L., "A designed cavity in the hydrophobic core of a four-alpha-helix bundle improves volatile anesthetic binding affinity", *Biochemistry* 37: 1421-1429 (1998).
12. Johansson, J. S., "Binding of the volatile anesthetic chloroform to albumin demonstrated using tryptophan fluorescence quenching", *J Biol Chem* 272: 17961-17965. (1997).

13. Davies, L. A., Zhong, Q., Klein, M. L., Scharf, D., "Molecular dynamics simulation of four-alpha-helix bundles that bind the anesthetic halothane", *FEBS Lett* 478: 61-66 (2000).
14. North, C., Cafiso, D. S., "Contrasting membrane localization and behavior of halogenated cyclobutanes that follow or violate the Meyer-Overton hypothesis of general anesthetic potency", *Biophys J* 72: 1754-1761 (1997).
15. Koubi, L., Tarek, M., Klein, M. L., Scharf, D., "Distribution of halothane in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer from molecular dynamics calculations", *Biophys J* 78: 800-811. (2000).
16. Tu, K., Tarek, M., Klein, M. L., Scharf, D., "Effects of anesthetics on the structure of a phospholipid bilayer: molecular dynamics investigation of halothane in the hydrated liquid crystal phase of dipalmitoylphosphatidylcholine", *Biophys J* 75: 2123-2134. (1998).
17. Tang, P., Yan, B., Xu, Y., "Different distribution of fluorinated anesthetics and nonanesthetics in model membrane: a ^{19}F NMR study", *Biophys J* 72: 1676-1682 (1997).
18. Hauet, N., Artzner, F., Cloutier, I., Boucher, F., Keller, G., Lesieur, P., Durand, D., Grabielle-Madellmont, C., Paternostre, M., "Interaction between artificial membranes and Enflurane, a general anesthetic: -1- DPPC-Enflurane interaction", *Biophys J*, 2003, sous presse.
19. Qin, Z., Szabo, G., Cafiso, D. S., "Anesthetics reduce the magnitude of the membrane dipole potential. Measurements in lipid vesicles using voltage-sensitive spin probes", *Biochemistry* 34: 5536-5543 (1995).
20. Pohorille, A., Wilson, M. A., New, M. H., Chipot, C., "Concentrations of anesthetics across the water-membrane interface; the Meyer-Overton hypothesis revisited", *Toxicol Lett* 100-101: 421-430 (1998).
21. Chipot, C., Wilson, M. A., Pohorille, A., "Interactions of anesthetics with the water-hexane interface. A molecular dynamics study", *J Phys Chem B* 101: 782-791 (1997).
22. Cafiso, D. S., "Dipole potentials and spontaneous curvature: membrane properties that could mediate anesthesia", *Toxicol Lett* 100-101: 431-439 (1998).
23. Cantor, R. S., "The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia", *Biochemistry* 36: 2339-2344 (1997).

24. Baribeau, J., Boucher, F., "Is the purple color of bacteriorhodopsin maintained by lipid-protein interactions?", *BBA* 890: 275-278 (1987).
25. Israelachvili, J., "in " Intermolecular and Surface Forces"", Academic Press (1997).
26. Rigaud, J. L., Bluzat, A., Buschlen, S., "Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation", *Biochem Biophys Res Commun* 111: 373-382. (1983).
27. Marsh, D., "CRC handbook of lipid bilayers", 387 p. (1990).
28. Bunker, C. E., Bowen, T. L., Sun, Y.-P., "A Photophysical Study of Solvatochromic Probe 6-Propionyl-2-(N,N-Dimethylamino)Naphthalene (Prodan) in Solution", *Photochem Photobiol* 58: 499 (1993).
29. Parasassi, T., De Stasio, G., d'Ubaldo, A., Gratton, E., "Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence", *Biophys J* 57: 1179-1186 (1990).
30. Chong, P. L., Wong, P. T., "Interactions of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study", *Biochim Biophys Acta* 1149: 260-266. (1993).
31. Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., Gratton, E., "Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence", *Biophys J* 60: 179-189 (1991).
32. Meyer, O., "Aspects moléculaires et supramoléculaires de la solubilisation de membranes biologiques naturelles et artificielles par des détergents non-ioniques", Thèse de doctorat, Université Paris-Sud (1995).
33. Stoeckenius, W., Bogomolni, R. A., "Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria", *Annu Rev Biochem* 51: 587-616 (1982).
34. Henderson, R., "The purple membrane from *Halobacterium halobium*", *Annu Rev Biophys Bioeng* 6: 87-109 (1977).
35. Kates, M., Kushwaha, S. C., and Sprott, G. D., in "Methods in Enzymology" 88: 98-111 (1982).

36. Messaoudi, S., Daigle, I., Boucher, F., "Structural features underlying the anesthetic induced equilibrium between spectral species of bacteriorhodopsin: bR570, bR480 and bR380", *Journal of Molecular Structure* 297: 19-27 (1993).
37. Elouatik, S., "Modulation réversible de l'activité de la bactériorhodopsine : aspects optique et électrocinétiques de la conversion énergétique par ses états couplés et découplés", Thèse de doctorat, Université du Québec à Trois-Rivières (1996).
38. Messaoudi, S., Lee, K. H., Beaulieu, D., Baribeau, J., Boucher, F., "Equilibria between multiple spectral forms of bacteriorhodopsin effect of delipidation, anesthetics and solvents on their pH dependance", *Biochim. Biophys. Acta* 1140: 45-52 (1992).
39. Lee, K.-H., McIntosh, A. R., Boucher, F., "The interaction between halogenated anaesthetics and bacteriorhodopsin in purple membranes as examined by intrinsic ultraviolet fluorescent", *Biochem Cell Biol* 69: 178-184 (1991).
40. Bolen, E. J., Holloway, P. W., "Quenching of tryptophan fluorescence by brominated phospholipid", *Biochemistry* 29: 9638-9643. (1990).
41. Ladokhin, A. S., "Peptides and Proteins", *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications of Instrumental Methods* 5762-5779 (2000).
42. Ladokhin, A. S., Jayasinghe, S., White, S. H., "How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother?", *Anal Biochem* 285: 235-245. (2000).
43. Turro, N. J., "Modern Molecular Photochemistry", University Science Books, Mill Valley, Ca. 1978 (1978).
44. Nicoli, D. F., McKenzie, D. C., Wu, J.-S., "Application of dynamic light scattering to particle size analysis of macromolecules", *American Laboratory* 32-40 (1991).
45. Chen, P. S., Toribara, T. Y., Warner, H., "Microdetermination of Phosphorus", *Anal Chem* 28: 1756 (1956).
46. Biltonen, R. L., Lichtenberg, D., "The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterise liposomes preparations.", *Chem. and Phys. of Lipids* 64: 128-142 (1993).

47. Chin, J. H., Goldstein, D. B., "Drug tolerance in biomembranes: a spin label study of the effects of ethanol", *Science* 196: 684-685 (1977).
48. Zeng, J., Chong, P. L., "Effect of ethanol-induced lipid interdigitation on the membrane solubility of Prodan, Acdan, and Laurdan", *Biophys J* 68: 567-573. (1995).
49. Engelke, M., Jessel, R., Wiechmann, A., Diehl, H. A., "Effect of inhalation anaesthetics on the phase behaviour, permeability and order of phosphatidylcholine bilayers", *Biophys Chem* 67: 127-138. (1997).
50. Morrow, M. R., Huschilt, J. C., Davis, J. H., "Simultaneous modeling of phase and calorimetric behavior in an amphiphilic peptide/phospholipid model membrane.", *Biochemistry* 24: 5394-5406 (1985).
51. Cantor, R. S., "Breaking the Meyer-Overton rule: predicted effects of varying stiffness and interfacial activity on the intrinsic potency of anesthetics", *Biophys J* 80: 2284-2297 (2001).
52. Omann, G. M., Glaser, M., "Dynamic quenchers in fluorescently labeled membranes. Theory for quenching in a three-phase system", *Biophys J* 47: 623-627. (1985).
53. Wiener, M. C., Tristram-Nagle, S., Wilkinson, D. A., Campbell, L. E., Nagle, J. F., "Specific volumes of lipids in fully hydrated bilayer dispersions", *Biochim Biophys Acta* 938: 135-142 (1988).
54. Roth, R. S., Miller, K. W., "in "Molecular and Cellular Mechanisms of Anesthetics", Plenum Pub. Corp. (1986).