

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

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

COMME EXIGENCE PARTIELLE DU
DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES

PAR
DANNY LÉTOURNEAU

ANESTHÉSQUES GÉNÉRAUX ET MEMBRANES BIOLOGIQUES. ANALYSE
DE LA DISTRIBUTION DE L'HALOTHANE DANS DEUX MODÈLES : LA
MEMBRANE POURPRE ET LES VÉSICULES DE PHOSPHOLIPIDES.

JUIN 2010

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.

Pour Gigi et Claude.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES (Ph. D.)

Programme offert par l'Université du Québec à Trois-Rivières

ANESTHÉSIIQUES GÉNÉRAUX ET MEMBRANES BIOLOGIQUES. ANALYSE DE LA DISTRIBUTION
DE L'HALOTHANE DANS DEUX MODÈLES : LA MEMBRANE POURPRE ET LES VÉSICULES DE
PHOSPHOLIPIDES.

PAR

Danny Létourneau

François Bouche, Ph. D., directeur de recherche	Université du Québec à Trois-Rivières
---	---------------------------------------

Pierre Tancrede, Ph. D., président du jury	Université du Québec à Trois-Rivières
--	---------------------------------------

Sylvain Robert, Ph. D., évaluateur	Université du Québec à Trois-Rivières
------------------------------------	---------------------------------------

Christian Salesse, Ph. D., évaluateur externe	Université Laval
---	------------------

Michel Grandbois, Ph. D., évaluateur externe	Université de Sherbrooke
--	--------------------------

Thèse soutenue le 27 mai 2010

REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus sincères et consacrés vont à mon directeur et mentor, le docteur François Boucher, qui m'a donné la chance de poursuivre des études supérieures. Merci à son enseignement exceptionnel, à sa patience sans borne, à sa curiosité et son enthousiasme scientifique de grande envergure, ainsi qu'à son support financier fort apprécié. J'espère pouvoir transmettre le goût d'apprendre de la même façon que vous l'avez fait pour moi et tous ceux et celles qui vous ont connu.

Merci aussi à tous les collègues et amis (es) que j'ai côtoyés durant ces années académiques et qui m'ont stimulé autant au niveau scientifique, culturel, que social : Dominique Verreault, Marc-André Laurin, Marc-André Martel, Isabelle Cloutier, Marie-Claude Sauvé, Měi Měi Gao, Ege Dundar, Sébastien Dulude, Olivier Mathieu, Charles Vallée et Yann Boissonneault.

Finalement, je remercie ma famille et mes parents qui m'ont appuyé et encouragé tout au long de mes études. Un merci bien particulier à ma conjointe, Karine, et à mes enfants, Isaak et Annabelle, qui m'ont permis de mener à terme ce travail en m'apportant motivation, inspiration, sacrifice et passion. Je vous serai éternellement reconnaissant.

RÉSUMÉ

Phénoménologiquement, les anesthésiques généraux (AG) affectent l'activité des membranes excitables. Cependant, leur cible moléculaire est mal définie. En effet, les connaissances actuelles permettent d'imaginer que l'effet de l'anesthésique soit induit par sa solubilisation dans les lipides membranaires aussi bien que par une interaction directe avec les protéines excitables. Nous avons abordé cette question à l'aide de deux modèles : l'un riche en protéine, la bactériorhodopsine (bR) contenue dans la membrane pourpre d'archéobactéries halophiles, l'autre constitué essentiellement de lipides purs, des vésicules unilamellaires de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC).

Un protocole permettant l'analyse dans des conditions d'équilibre a permis de mesurer l'effet et la distribution des anesthésiques généraux dans ces deux modèles membranaires différents et complémentaires. Dans le cas de la membrane pourpre, l'action de l'anesthésique sur la bR, apparaît d'abord circonscrite à la surface de la protéine et à l'interface lipide-protéine. La simultanéité qui existe entre le quenching de la fluorescence de la bR par un anesthésique porteur d'un atome lourd et l'inhibition de la protéine suggère une action de l'anesthésique au niveau du glycérol des lipides. Dans les mêmes conditions, les changements structuraux observés principalement aux extrémités des hélices de la bR corroborent cette conclusion. Par ailleurs, des mesures avec des échantillons partiellement ou totalement délipidés indiquent clairement que la composition lipidique détermine la réponse de la cible des anesthésiques et elles permettent d'associer l'effet de l'anesthésique à une délipidation transitoire de la protéine.

Dans des vésicules unilamellaires composées essentiellement de lipides purs, l'utilisation de sondes fluorescentes a permis de faire la différence entre l'incorporation de l'anesthésique à l'interface lipide-eau et au cœur hydrophobe de la membrane. La distribution des anesthésiques dans ces membranes

dépend beaucoup de la phase dans laquelle se trouvent les lipides. Ainsi, le cœur hydrophobe de la bicouche apparaît rapidement saturé par l'anesthésique, quelle que soit la phase du lipide mais le xénobiotique n'arrive à pénétrer la région interfaciale que lorsque l'échantillon contient de grandes quantités d'anesthésique ou que le lipide est en phase liquide. De plus, dans tous les cas, l'effet de l'anesthésique est retardé par la présence de lipides chargés comme la dipalmitoylphosphatidylsérine (DPPS). Ce résultat n'était ni prévu par les études théoriques issues de simulations en dynamique moléculaire, ni prévisible à partir de nos mesures sur la bactériorhodopsine. Par ailleurs, ceci laisse à penser que cette protéine demeure la cible la plus sensible, quelle que soit l'état du lipide qui la solvate.

Néanmoins, dans un contexte biomembranaire, dire que les anesthésiques n'agissent strictement que sur les lipides ou exclusivement sur les protéines serait nier que les deux sont intimement reliés. Ainsi, les anesthésiques doivent exercer leur action à la fois sur les lipides et les protéines, sans avoir réellement de spécificité directe pour l'un ou l'autre, mais plutôt pour l'environnement particulier que constitue l'interface protéine-lipide.

Mots clés :

Absorption – Anesthésiques – Bactériorhodopsine – Biophysique – DPPC – DPPS – Fluorescence – FTIR – Laurdan – Lipide – Mécanisme – Membrane pourpre – Protéine – Pyrène – Quenching – Spectroscopie.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	v
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	xv
CHAPITRE I INTRODUCTION	1
1.1 Historique	1
1.2 L'anesthésie générale en chiffres.....	2
1.3 Aspect neurophysiologique de l'anesthésie	3
1.4 Mécanisme moléculaire.....	6
1.4.1 Les anesthésiques et les lipides	6
1.4.2 Les anesthésiques et les protéines.....	10
1.5 Hypothèses et objectifs	12
1.6 Premier modèle : La membrane pourpre.....	13
1.6.1 Justification du modèle	13
1.6.2 Structure et organisation de la membrane pourpre.....	15
1.6.2.1 Généralités.....	15
1.6.2.2 Composition lipidique de la membrane pourpre	17
1.6.3 Le photocycle de la bR	19
1.6.4 Les anesthésiques généraux et la membrane pourpre.....	22
1.6.4.1 Changements spectroscopiques de la bR.....	22
1.6.4.2 Changements fonctionnels de la bR	24
1.6.4.3 Modifications structurales de la MP par les AG.....	24
1.7 Second modèle : les vésicules de DPPC	31
1.7.1 Caractérisation des vésicules	31
1.7.2 Interactions de xénobiotiques avec les vésicules lipidiques.....	32
1.8 Objectifs spécifiques	34

3.2.5.2 Spectroscopie FTIR de films de membrane pourpre native	78
3.2.5.3 Échange isotopique et structure tertiaire	83
3.2.5.4 Spectroscopie FTIR en présence d'halothane	84
3.2.5.5 Modifications structurales des films de MP par l'halothane.....	88
3.2.5.6 Conclusions sur les changements structuraux.....	95
3.3 Second modèle : les vésicules de DPPC	95
3.3.1 Distribution transversale des AG dans les vésicules de DPPC....	96
3.3.2 Vérification de l'insertion des sondes dans la membrane	98
3.3.3 Mesure de la partition de l'halothane dans des membranes de DPPC par le quenching de la fluorescence du Laurdan	98
3.3.4 Conclusions sur le quenching de la fluorescence du Laurdan ...	105
3.3.5 Quenching du Py-DPPC et partition de l'halothane dans la membrane.....	107
3.3.6 Conclusions sur le quenching du Py-DPPC.....	113
3.3.7 Comparaison du comportement des deux sondes.....	116
3.3.8 Conclusions sur la distribution transversale des AG dans les vésicules de DPPC	123
3.3.9 Effet électrostatique sur la distribution de l'AG dans la membrane	123
3.3.10 Conclusions sur l'effet du DPPS sur la distribution de l'AG dans la membrane	127
CHAPITRE IV DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS	129
4.1 Mesures à l'équilibre et modèles	129
4.2 Les anesthésiques généraux et les protéines membranaires	131
4.3 Les anesthésiques généraux et les lipides.....	135
4.4 Le mécanisme d'action	139
BIBLIOGRAPHIE	141

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 3.1: Attribution des bandes IR entre 900-3600 cm^{-1} pour la membrane pourpre native.....	81
TABLEAU 3.2: Position et attribution des bandes IR de la membrane pourpre native dans le D_2O et le H_2O	86
TABLEAU 3.3: Coefficient de partition de l'halothane dans le DPPC (Laurdan)	104
TABLEAU 3.4: Coefficient de partition de l'halothane dans le DPPC (Py-DPPC)	111

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 :	Modèle neurophysiologique de l'anesthésie générale	4
FIGURE 1.2 :	Spectres d'absorption de la bactériorhodopsine	14
FIGURE 1.3 :	Structure et localisation de la membrane pourpre des halobactéries	16
FIGURE 1.4 :	Composition lipidique de la membrane pourpre de <i>H. salinarium</i>	18
FIGURE 1.5 :	Photocycle de la bR adaptée à la lumière (bR568)	21
FIGURE 1.6 :	Transitions spectrales de la bR en présence d'halothane	23
FIGURE 1.7 :	Apparition rapide de l'intermédiaire M et cinétique de sa disparition dans l'intervalle des millisecondes suivant l'excitation.	25
FIGURE 1.8 :	Spectre d'action de l'activité de pompage de la membrane pourpre	26
FIGURE 1.9 :	Microscopie à force atomique (AFM) de membranes pourpres	27
FIGURE 1.10 :	Diffraction des rayons-X de MP en présence d'AG	28
FIGURE 1.11 :	Dichroïsme circulaire de la membrane pourpre	30
FIGURE 1.12 :	Transition de phase du DPPC	33
FIGURE 2.1 :	Structure et formule des différents produits utilisés	37
FIGURE 2.2 :	Préparation des vésicules	42
FIGURE 2.3 :	Porte-échantillon étanche pour la prise des mesures en spectroscopie UV-visible et FTIR	47
FIGURE 3.1 :	Transitions spectrales de la bactériorhodopsine native et effet de l'éthanol sur la MP native	54
FIGURE 3.2 :	Modes de transition de la bR native perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v	55
FIGURE 3.3 :	Spectres d'absorption de la membrane pourpre	57

FIGURE 3.4 :	Transitions spectrales de la bactériorhodopsine délipidée partiellement avec le CHAPS et perfusée à l'halothane /éthanol 5% v/v	58
FIGURE 3.5 :	Types de transition de la bR délipidée partiellement au Chaps ou solubilisée dans le Triton	59
FIGURE 3.6 :	Transitions spectrales de la bactériorhodopsine délipidée totalement.....	60
FIGURE 3.7 :	Taux de changement du maximum d'absorption de la bactériorhodopsine	61
FIGURE 3.8 :	Localisation des tryptophanes dans la bR	63
FIGURE 3.9 :	Quenching de fluorescence de la bactériorhodopsine native perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v	65
FIGURE 3.10 :	Déplacement du maximum d'émission de fluorescence de la bR native lors de la perfusion à l'halothane/éthanol 5% v/v.....	66
FIGURE 3.11 :	Graphique de Stern-Volmer du quenching de la bactériorhodopsine native.....	67
FIGURE 3.12 :	Quenching de fluorescence de la bactériorhodopsine délipidée partiellement et perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v.....	70
FIGURE 3.13 :	Déplacement du maximum d'émission de fluorescence de la bR délipidée partiellement au CHAPS lors de la perfusion à l'halothane/éthanol 5% v/v	71
FIGURE 3.14 :	Graphique de Stern-Volmer du quenching de la bactériorhodopsine délipidée partiellement au CHAPS	72
FIGURE 3.15 :	Quenching de fluorescence de la bactériorhodopsine solubilisée dans le Triton X-100 et perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v.....	73
FIGURE 3.16 :	Quenching de fluorescence de la bactériorhodopsine solubilisée dans le Triton X-100 avec halothane/éthanol 5% v/v	74
FIGURE 3.17 :	Transitions spectrales d'un film de membrane pourpre	79
FIGURE 3.18 :	Spectre FTIR d'un film de membrane pourpre native	80

FIGURE 3.19 : Spectre FTIR de films de membrane pourpre préincubée dans le H ₂ O ou D ₂ O durant 24 heures.....	85
FIGURE 3.20 : Spectre FTIR de vapeur d'halothane.....	87
FIGURE 3.21 : Spectres FTIR d'un film de membrane pourpre (H ₂ O) en présence d'halothane	89
FIGURE 3.22 : Spectres FTIR d'un film de membrane pourpre (D ₂ O) en présence d'halothane	90
FIGURE 3.23 : Changements structuraux lors des transitions spectrales	94
FIGURE 3.24 : Effet de l'éthanol sur les vésicules de DPPC/ Laurdan.....	97
FIGURE 3.25 : Insertion des sondes dans la membrane	99
FIGURE 3.26 : Sensibilité du Laurdan envers la phase lipidique (gel ou cristal liquide).....	100
FIGURE 3.27 : Quenching du Laurdan à 55°C	102
FIGURE 3.28 : Coefficient de partition de l'halothane dans les vésicules de DPPC à 55°C.....	103
FIGURE 3.29 : Quenching du Laurdan à 25°C	106
FIGURE 3.30 : Quenching du Py-DPPC à 25°C	108
FIGURE 3.31 : Quenching du Py-DPPC.....	110
FIGURE 3.32 : Coefficient de partition de l'halothane dans les vésicules de DPPC.....	112
FIGURE 3.33 : Comparaison du quenching du Laurdan et du Py-DPPC	117
FIGURE 3.34 : Distribution de l'halothane dans les vésicules	118
FIGURE 3.35 : Quenching du Py-DPPC et du Laurdan simultanément dans des vésicules de DPPC à 10 mM	120
FIGURE 3.36 : Comparaison du quenching du Py-DPPC et du Laurdan simultanément dans des vésicules de DPPC à 10 mM	122
FIGURE 3.37 : Effet de charges sur le quenching du Laurdan	126
FIGURE 3.38 : Effet de charges sur le quenching du Py-DPPC	128

FIGURE 4.1 :	Bactériorhodopsine : séquence des événements	133
FIGURE 4.2 :	Distribution de l'halothane dans les vésicules	138

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AG :	Anesthésique général/Anesthésiques généraux
bR :	Bactériorhodopsine.
DPPC :	Dipalmitoylphosphatidylcholine.
DPPE :	Dipalmitoylphosphatidylsérine.
FTIR :	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (ou FTIR : Fourier Transformed InfraRed spectroscopy).
MP :	Membrane pourpre
Py-DPPC :	1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (β -py-C ₁₀ -HPC)
T_m :	Température de transition de phase

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Historique

En Mésopotamie, plus de 2000 ans avant J.C, les prêtres babyloniens de Chaldée avaient recours au Yabinhin (mandragore) pour son action narcotique et antalgique lors des rites initiatiques. Théophraste (372-287 av JC), élève d'Aristote, dans son ouvrage "Histoire des plantes", conseille le vinaigre de racine de mandragore comme inducteur de sommeil. Apulée, au 4^e siècle, rédige "De virtutibus herbarum" dans lequel il précise que "si l'on doit couper ou cautériser quelque membre, ou y porter le fer, le patient doit boire une demi-once de mandragore dans du vin, et il dormira jusqu'à ce que le membre soit coupé, sans éprouver aucune douleur". Au moyen âge apparaissent les éponges soporifiques (ou somnifères) ; Saint Benoît, au Mont Cassin décrit en 880, l'inhalation à usage somnifère et antalgique d'un mélange de mandragore jusquiame et d'opium, mode d'utilisation que les moines italiens des 12^{ième} et 13^{ième} siècles tels que P Hugues à Lucca et Théodoric à Cervia, reprirent. Aujourd'hui, la mandragore est tombée dans l'oubli. Il nous en reste un peu de vérité historique en rapport avec les débuts de l'anesthésie, mais surtout beaucoup de fables [1].

Avant 1846, n'importe quelle opération chirurgicale était agonisante, douloureuse, voire même terrifiante, jusqu'à ce que William Thomas Green Morton, un dentiste de Boston, effectue la première démonstration publique d'une anesthésie à l'éther. Quelques semaines plus tard Oliver Wendell Holmes proposa à Morton d'appeler le phénomène "anaesthesia" qui signifie *perte de sensation* en grec ancien.

Depuis cette découverte, les anesthésiques proprement dits, sont utilisés chaque jour dans les salles opératoires. Mais, malgré des siècles d'utilisation et

d'innovations, le mécanisme par lequel ceux-ci provoquent l'anesthésie reste vaporeux et le sujet d'intenses recherches dont les résultats commencent à peine à nous donner des informations sur les cibles potentielles des anesthésiques. Le schéma d'un mode d'action commence à se tracer vers un mécanisme qui pourrait non seulement expliquer le fonctionnement de l'anesthésie, mais aussi d'autres phénomènes reliés aux interactions moléculaires dans les membranes excitables.

1.2 L'anesthésie générale en chiffres

Des études épidémiologiques récentes, faites en Grande-Bretagne et en Finlande, permettent d'affirmer que la part de l'anesthésie dans la mortalité péri-opératoire peut être estimée entre 0,1 et 0,9 % des décès. Dans les années 50, la mortalité liée à l'anesthésie était estimée à 1 pour 3 000 anesthésies. Au début des années 80, les études épidémiologiques, conduites aussi bien en France qu'en Grande-Bretagne, permettaient d'évaluer cette fréquence à 1 pour 10 000. Il est probable que l'amélioration des techniques de monitoring et l'apparition de standards de surveillance ont permis de réduire encore cette fréquence. Elle est estimée actuellement entre 1 pour 100 000 à 1 pour 250 000. La morbidité majeure liée à l'anesthésie semble également en diminution. Ainsi, l'incidence de l'arrêt cardiaque provoqué par l'anesthésie a été réduite de moitié entre la décennie 70 et la décennie 80. Les causes des accidents d'anesthésie ont varié au cours du temps. Ainsi, le surdosage anesthésique ou l'administration accidentelle d'un mélange gazeux hypoxique ont vu leur fréquence diminuer. En revanche, l'évaluation incomplète du patient avant l'intervention et la préparation inappropriée étaient, dans une enquête australienne, les erreurs les plus fréquemment retrouvées. Incidemment, c'est probablement ce genre d'erreur qui a causé le décès prématuré de la *pop star* Michael Jackson dont on traitait l'insomnie chronique au moyen d'un anesthésique général, le di-isopropyl phénol, connu dans le commerce sous le nom de Propofol. Dans l'enquête française, la dépression respiratoire post-anesthésique

était la complication la plus fréquente et la plus grave liée à l'anesthésie. C'était la première cause de décès lié à l'anesthésie chez les patients à risque anesthésique a priori faible. Ainsi, les études épidémiologiques dont nous disposons à ce jour sont difficiles à interpréter et les résultats qu'elles apportent difficiles à comparer. La plupart d'entre elles, cependant, laissent à penser que la morbidité grave et la mortalité liées à l'anesthésie ont diminué dans les 30 dernières années [2].

Le risque léthal se définit comme le nombre de décès attribuables par 100 millions d'heures d'exposition. Or, en transport aérien, en considérant que le risque léthal est de 1 par 10 millions pour des vols d'une durée moyenne de 2 heures, on obtient une valeur de 5 décès par 100 millions d'heures d'exposition à un aéronef [3]. Similairement, avec un taux de mortalité de 1/200 000 pour une anesthésie durant en moyenne 2 heures, le risque de décès est de 250 par 100 millions d'heures d'exposition [4]. Ainsi, subir une anesthésie est moins sécuritaire que de prendre l'avion. Qui plus est, les risques de complications augmentent avec différents facteurs tels l'obésité, l'âge, la consommation de tabac et même la couleur des cheveux [5, 6].

1.3 Aspect neurophysiologique de l'anesthésie

Il existe trois types d'anesthésie : l'anesthésie locale ou régionale, la sédation et l'anesthésie générale. Plus spécifiquement, l'anesthésie générale se traduit par une perte de conscience, une perte de mouvements réflexes et volontaires (akinésie) et une perte de perception de la douleur (analgésie). De toute évidence, à partir des symptômes décrits précédemment, les anesthésiques agissent sur les neurones du système nerveux central (SNC). Même après plus d'un siècle et demi d'utilisation depuis la première anesthésie chirurgicale effectuée par Crawford Long, on en connaît toujours très peu sur le mécanisme neurologique derrière ce "coma artificiel" qu'est l'anesthésie

générale. Ce manque de connaissance se manifeste à tous les niveaux organisationnels du cerveau.

À une échelle macroscopique, nous sommes capable d'identifier les structures neuro-cérébrales qui sont affectées par les anesthésiques généraux, mais ne pouvons cibler avec certitude quelles structures sont critiques à l'établissement de cette narcose. Les récentes recherches effectuées par imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) [7], tomographie par émission de positrons (TEP) [8] et l'électro-encéphalographie (EEG) [9] permettent l'élaboration d'un modèle minimal des structures sollicitées (Figure 1.1) : la composante clé est un réseau triangulaire de noyaux neuronaux comprenant des boucles de rétrocontrôles positives et négatives [10].

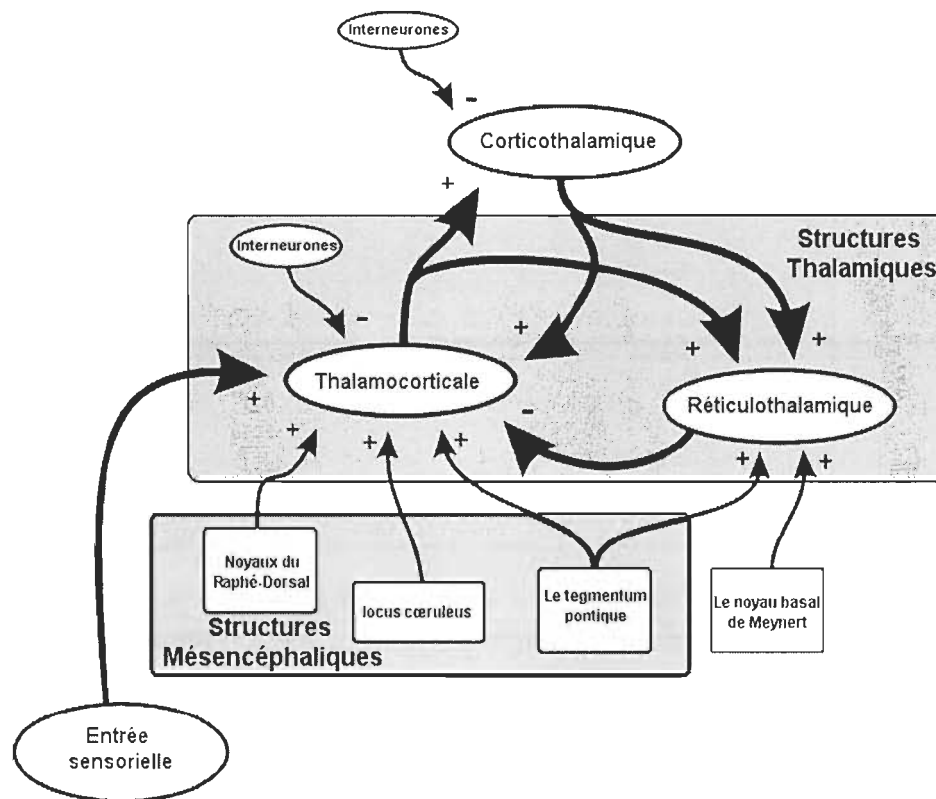


FIGURE 1.1 : Modèle neurophysiologique de l'anesthésie générale. Les stimulations entre neurones et les régions impliquées sont schématisées par les flèches. Les symboles + et – signifient la stimulation et l'inhibition, respectivement [10].

Est-ce que les anesthésiques agissent sur un groupe limité de neurones spécifiques ou requièrent-ils une action simultanée sur plusieurs structures à la fois ? L'effet peut-il être indépendant de neurones spécifiques et dépendre primordialement de processus neuronaux caractéristiques ? L'explication la plus probable serait que les modifications induites par les anesthésiques s'exercent sur une activité cohérente spécifique à l'intérieur d'un réseau de neurones spécifiques ; différents anesthésiques pour différents neurones [10]. La grande diversité des substances chimiques utilisées par les anesthésistes dans leurs "cocktails" (NO_2 , éther diéthylique, hydrocarbures halogénés, alcools, barbiturates, kétamines, thiopental et propofol), renforce cette hypothèse [11].

D'un point de vue mésoscopique, les anesthésiques n'agissent pas nécessairement et de manière prédominante que sur les cellules du système nerveux central (SNC) ou sur les neurones. Au début du 20^{ème} siècle, Overton (1901) démontrait qu'ils agissaient aussi bien sur les cellules de type musculaire que végétal. Depuis, il a été démontré que les cellules gliales, les myocytes squelettiques et cardiaques, les cellules endocriniennes et les cellules du système immunitaire sont aussi la cible des anesthésiques. Tous les types de cellules nerveuses étudiées jusqu'à maintenant semblent être sensibles aux anesthésiques, incluant les neurones moteurs, les cellules pyramidales, les cellules mitrales, les cellules granulaires et les cellules de Purkinje. L'action des anesthésiques sur des coupes tissulaires de ganglions spinaux, de moelle épinière, du thalamus, de l'hippocampe, du cortex, du cervelet et même de réseau neuronaux provenant de cultures cellulaires, a aussi été documentée [12].

À un niveau subcellulaire, les anesthésiques agissent sur les dendrites, les axones, les membranes pré-synaptiques, post-synaptiques et somatiques des neurones et de la glie [13]. Ils modulent aussi de nombreuses structures intracellulaires comme le système de relargage de neurotransmetteurs et de calcium, les cascades de seconds messagers et les mitochondries [14].

Comme on peut le constater, à une échelle macroscopique, plusieurs types tissulaires et cellulaires sont affectés par les anesthésiques et, d'un point de vue physiologique, il est difficile de tracer un mécanisme général d'action. Cependant, il ne fait aucun doute que les symptômes provoqués par les anesthésiques soient attribuables à leur effet sur le cerveau et le système nerveux. Malgré tout, à une échelle moléculaire, il doit y avoir un mécanisme général qui permette d'expliquer l'action des anesthésiques, peu importe que la cible moléculaire soit dans le thalamus ou le mésencéphale.

1.4 Mécanisme moléculaire

L'examen des propriétés physicochimiques des anesthésiques ne permet pas de prévoir quelles composantes du SNC peuvent être des cibles cliniquement pertinentes. À l'échelle moléculaire, une protéine fonctionnant comme un canal ionique produit un effet notable lorsque celui-ci est intégré à d'autres protéines membranaires sous forme de fragments membranaires fonctionnels. De tels "patches" sont parties intégrantes des cellules nerveuses qui à leur tour forment un réseau neuronal tributaire d'arrangements fonctionnels encore plus complexes. Ainsi, de petits changements à l'échelle moléculaire pourraient être responsables d'une modulation ascendante très importante vers le SNC.

1.4.1 Les anesthésiques et les lipides

Il y a plus d'un siècle de cela, Meyer (1899, 1901) et Overton (1901) découvrirent séparément que pour beaucoup de composés possédant une activité anesthésiante, il existait une corrélation entre la puissance d'un anesthésique et sa solubilité dans l'huile d'olive. Cette théorie fut corroborée par des observations de l'altération de la structure ou de la phase membranaire à grande concentration d'anesthésiques [15]. Ce caractère liposoluble devint la base de la théorie lipidique de l'anesthésie générale. Cependant, même si

l'hypothèse de Meyer-Overton fut testée pour de nombreux anesthésiques différents, la corrélation entre leur potentiel anesthésiant et leur caractère lipophile reste peu convaincante. Notamment, à cause de la coupure (cutoff) observée en ce qui a trait aux alcools et alcanes à longue chaîne dont la liposolubilité est bonne, mais dont le potentiel anesthésiant est très faible [16, 17]. À cet argument, s'ajoute la stéréosélectivité; c'est-à-dire qu'au niveau physiologique, deux énantiomères d'un même anesthésique n'ont pas le même pouvoir anesthésiant mais possèdent la même liposolubilité [18, 19].

La plus ancienne observation faite concernant l'effet des anesthésiques généraux (AG) sur les lipides est l'abaissement de la température de transition de phase (T_m) d'une bicouche lipidique, correspondant à une augmentation de la fluidité membranaire [20]. Cependant, il a été démontré qu'à concentration clinique causant l'anesthésie, l'augmentation de fluidité membranaire correspond à celle qu'on peut attendre d'une élévation de température de 1°C [21-24]; ainsi, s'il s'agissait là du seul effet des anesthésiques, une simple fièvre aurait l'effet d'une anesthésie générale.

Qui plus est, des études de diffraction des rayons X et des neutrons par des bicouches de dimyristoyl lécithine/cholestérol ont démontré que les AG ne provoquaient aucun changement significatif de la structure de la bicouche [25]. D'autres expériences basées sur l'insensibilité du coefficient de partition en fonction de la longueur des chaînes acyles conclurent que les AG ne pénétraient pas le cœur de la membrane. Brièvement, ces auteurs ont évalué à l'aide d'halothane radiomarqué, le coefficient de partition de celui-ci entre une solution saline et des bicouches de lipides. Les conclusions majeures de cet étude sont que : 1) le coefficient de partition en fonction de la température est similaire pour la dilauroylphosphatidylcholine (DLPC), la dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et le DPPC sur une échelle de 10°C à 60°C, 2) que le coefficient de partition augmente près de la température de transition de phase des lipides et 3) que l'addition de cholestérol aux bicouches diminue le

coefficient de partition [26]. Plusieurs expériences montrent qu'à concentration clinique causant l'anesthésie, les AG n'ont aucun effet sur la conformation des chaînes acyles, suggérant que ceux-ci se logent au niveau des têtes polaires des lipides [21, 27]. D'autres, par contre, ont démontré par spectroscopie RMN que dans la phase fluide (liquide cristallin) des lipides, la bicouche subissait une diminution de son épaisseur et que les AG se distribuaient autant dans la région hydrocarbonée qu'au niveau des têtes polaires, mais avec une faible préférence pour la région interfaciale [28]. De plus, à grande concentration, l'AG induit des changements significatifs au niveau des têtes polaires [29]. Par ailleurs, Trudell et Hubbell ont démontré que les AG s'échangeaient rapidement entre la phase aqueuse et la phase lipidique, et que ceux-ci avaient un accès égal à la région hydrocarbonée et à l'interface [30].

Dans le même ordre d'idées, certains auteurs ont proposé que la localisation des AG soit au niveau de l'interface membrane/eau [16, 31-34]. De plus, l'hypothèse de Meyer-Overton fut reprise avec comme paramètre de corrélation, la solubilité à l'interface membrane/eau ; celle-ci affiche une meilleure corrélation qu'avec une phase lipidique seulement [35]. On sait aussi que les AG diminuent le potentiel dipolaire de la membrane en orientant leur dipôle moléculaire de façon antiparallèle au dipôle intrinsèque de la membrane [36]. Ainsi, ces changements au niveau du potentiel interfacial pourraient moduler l'équilibre conformationnel des protéines membranaires présentant des transitions dépendantes du potentiel membranaire, suggérant ainsi une association indirecte entre la solubilité lipidique et l'effet d'un anesthésique sur une membrane excitable.

Plus récemment, notre laboratoire a participé à l'élaboration d'un pseudo diagramme de phase de l'interaction de l'enflurane avec des bicouches de dipalmitoylphosphatidylcholine à l'aide de mesures calorimétriques, de diffraction des rayons X et de fluorescence de marqueurs membranaires [37]. Il en ressort que l'anesthésique interagit peu avec la phase L_{β} du lipide à faible

concentration (0 – 10 mM). À des concentrations supérieures, l'anesthésique s'incorpore progressivement en faisant apparaître une phase L_β intermédiaire dont le T_m est inférieur, puis, à des concentrations élevées, c'est une phase interdigitée du lipide qui apparaît. Quand on fait interagir l'anesthésique avec la phase L_α du lipide, il s'y incorpore facilement et provoque l'apparition d'une phase L_α modifiée. Dans les deux cas, les résultats peuvent s'expliquer par la localisation de l'anesthésique au niveau de la tête polaire des lipides.

Enfin, une autre hypothèse apportée récemment soulève la possibilité que les AG agissent indirectement sur les protéines membranaires en augmentant la pression latérale de manière sélective au niveau de l'interface aqueuse de la membrane [17, 38]. Ainsi, lors du changement de la pression latérale au niveau de la bicouche, l'équilibre conformationnel de la protéine (ex. : canaux ioniques, récepteur...) basculerait et son activité en serait changée.

On peut aussi considérer que la distribution hétérogène des AG puisse résulter de l'interaction de ceux-ci avec un site spécifique à l'interface protéine/lipide. Il est connu que l'interaction de certains lipides avec les protéines membranaires joue un rôle important pour leur stabilité structurale et fonctionnelle [39, 40]. On peut ainsi facilement imaginer que la présence d'AG distribués de façon non-homogène dans une membrane excitable puisse affecter les interactions au niveau de l'interface protéine/lipide.

À la vue de ces résultats dont certains sont contradictoires, il demeure difficile de préciser dans quelle mesure les lipides des membranes excitables participent au mécanisme d'action des anesthésiques et des mesures supplémentaires s'imposent si on veut arriver à décrire correctement cette interaction.

1.4.2 Les anesthésiques et les protéines

En 1875, Claude Bernard fut le premier à suggérer une interaction entre les AG et les protéines lorsqu'il remarqua qu'il y avait une coagulation réversible du contenu "albuminoïde" des cellules en présence d'AG. De la même manière, Östergren (1944) proposa que les AG exercent leur effet sur des portions hydrophobes des protéines, réconciliant ainsi les observations faites par Meyer et Overton avec la possibilité que la cible des AG soit les protéines membranaires.

Il n'existe certainement pas une cible spécifique pour les anesthésiques généraux. À titre d'exemple, l'halothane se lie plus ou moins spécifiquement à une grande variété de protéines dans le cerveau. Ainsi, à partir du cortex temporal humain, l'isolement et l'électrophorèse en deux dimensions permettent la séparation de plus de 300 protéines de membrane et de plus de 400 protéines solubles. Le photomarquage des protéines par l'halothane révèle que 23 de ces protéines de membrane et 34 de ces protéines solubles sont capables de lier l'halothane [41]. Ce groupe de protéines devrait représenter celles qui sont responsables de l'anesthésie et de ses effets secondaires.

Toujours dans des cellules du système nerveux, des expériences où les mesures électrophysiologiques sont principalement mises à profit démontrent des effets importants sur les canaux sodiques des membranes d'axones, sur les canaux calciques des terminaisons nerveuses, sur les canaux ioniques des membranes post-synaptiques et sur des systèmes de second messager aussi bien que sur des enzymes métaboliquement importants comme le cytochrome P450 [42].

Plus spécifiquement, depuis quelques années, les chercheurs ont commencé à étudier la liaison directe des AG sur les protéines en utilisant la spectroscopie RMN du fluor [43-45], le marquage par photoaffinité [46-49] et la

spectroscopie de fluorescence [50-52]. Ces études concluent pour la plupart qu'il y a des sites présents sur les protéines solubles sur lesquelles les AG peuvent se lier. Les cas les plus documentés concernant l'interaction des AG avec les protéines solubles sont ceux de la luciférase, de l'albumine sérique et de la myoglobine.

La première observation faite concernant la sensibilité de la luciférase aux AG remonte à plus de quatre décennies [53]. Expérimentalement, l'inhibition compétitive d'AG avec la luciférine suggère que celui-ci se loge dans le site de liaison du substrat [54, 55]. Dans le cas de protéines solubles comme la myoglobine et de l'albumine sérique (bovine et humaine), les AG semblent se fixer de manière saturable. En analysant l'échange isotopique des protons du lien peptidique afin d'évaluer leur stabilité conformationnelle et leur degré de compaction, on a pu déterminer que les AG ont un effet stabilisant sur l'albumine sérique et déstabilisant sur la myoglobine [47, 56].

Parallèlement, le caractère structural du site de liaison des AG fut exploré par des simulations de dynamique moléculaire et par spectroscopie de fluorescence en utilisant un système modèle de carrés d'hélices formant une cavité hydrophobe; en remplaçant les acides aminés contenus dans le cœur hydrophobe, on a constaté que, dépendamment des modifications apportées, l'affinité de l'AG pour la protéine pouvait être augmentée [50, 51, 57, 58]. Malgré tout, les types d'interactions et les motifs structuraux requis pour la liaison des AG à des canaux transmembranaires restent inconnus. Cependant, des expériences réalisées sur la liaison des AG à la gramicidine A dans des vésicules de DMPC démontrent que l'arrangement spatial des résidus tryptophanes combinés avec la région amphiphilique des lipides crée un environnement favorable pour la liaison des AG [59].

De récentes recherches effectuées sur le récepteur de l'acétylcholine et sur l'ATPase- Ca^{+2} du réticulum sarcoplasmique suggèrent également que de

tels sites existent aussi sur les protéines membranaires [48, 60]. Pour supporter cette idée, il a été démontré que l'activité des canaux voltage dépendants, des récepteurs membranaires et des protéines de transport peut être modulée à différents degrés et de manière variable par les AG [48, 61-64]. Par ailleurs, la liaison de l'halothane à la rhodopsine (un récepteur couplé aux protéines G provenant de membrane discale des bâtonnets rétinien) a été démontrée par photomarquage à l'halothane radioactif. La liaison de l'halothane aux lipides membranaires et à l'opsine était dominante tandis que les sous-unités des protéines G ne présentaient aucun marquage [49].

C'est d'ailleurs le seul consensus concernant la cible moléculaire des anesthésiques; ceux-ci doivent agir finalement sur la propagation de l'influx nerveux du système nerveux central (SNC) en modulant la réponse des protéines responsables de la transmission d'un stimulus [65, 66]. Par ailleurs, le débat concernant la cible des AG continue encore. Vu la complexité des systèmes étudiés et les nombreux résultats contradictoires, personne n'ose s'avancer quant à la proposition d'un mécanisme moléculaire unifié pour le mode d'action des AG.

1.5 Hypothèses et objectifs

En considérant la dualité et l'opposition des théories sur le mécanisme des AG, qu'ils agissent directement sur les protéines ou indirectement via les lipides, on doit considérer que ces mécanismes puissent être complémentaires, voire même parallèles, surtout si on envisage l'interface protéine/lipide comme une cible potentielle. Les interactions entre protéines et lipides sont particulièrement importantes pour la stabilité et la fonction des protéines membranaires [67-70], la présence d'AG à ce niveau doit affecter ces interactions. Afin de préciser ce point, nous proposons d'étudier les modèles les plus simples possible où nous tenterons de déterminer la distribution spatiale des AG ainsi que la nature des interactions qui régissent la modulation de l'activité d'une membrane excitable

par les AG. À cette fin, nous utiliserons deux modèles bien caractérisés et fort étudiés dans le domaine de la biophysique et de la biochimie des membranes : la bactériorhodopsine provenant de la membrane pourpre d'archéobactéries halophiles et des membranes artificielles de lipides constituées de vésicules unilamellaires de phospholipide.

1.6 Premier modèle : La membrane pourpre

1.6.1 Justification du modèle

La membrane pourpre (MP) est une membrane bactérienne qui fonctionne comme une pompe à proton. L'unique protéine de la membrane pourpre, la bactériorhodopsine (bR), présente beaucoup d'homologie structurale avec les récepteurs membranaires que l'on retrouve dans les membranes excitables, notamment ceux qui sont couplés aux protéines G. La bR est la protéine de transport d'ions la plus étudiée et elle est devenue un système modèle des protéines membranaires et plus spécifiquement des récepteurs membranaires du type GPCR (G-protein coupled receptor). La bR fonctionne d'ailleurs comme un canal ionique : en absorbant un photon elle provoque le déplacement d'un proton au travers de la membrane. Par ailleurs, son faible ratio protéine/lipide (1:10) ainsi que sa sensibilité face à la modulation de son environnement lipidique en font un modèle de choix pour observer les interactions possibles au niveau de l'interface protéine/lipide. De plus, la sensibilité du chromophore contenu dans la bR et les diverses formes spectroscopiques résultantes font de la MP un système simple et facile à étudier par diverses méthodes spectroscopiques.

À première vue, une protéine transmembranaire issue d'un organisme de la famille des archéobactéries n'apparaît pas comme un modèle très pertinent pour l'étude de l'effet des anesthésiques généraux. L'intérêt de notre laboratoire pour cette question a toutefois une origine plus circonstanciée. En effet, dans le

cadre de travaux sur la modulation structurale et fonctionnelle de la bactériorhodopsine par les lipides qui la solvatent, on a observé que la bactériorhodopsine complètement délipidée, en l'absence de détergent, avait un spectre d'absorption centré à 480 nm (voir figure 1.2) [71].

Or, on le verra plus loin, l'ajout d'anesthésique général à une suspension aqueuse de membranes pourpres produit l'apparition d'une espèce dont le maximum d'absorption se situe à 480 nm, soit, la même position que celui de la bactériorhodopsine sans lipide et sans détergent. Cette simple observation suggérait déjà que l'interface lipide/protéine ou détergent/protéine devait avoir un rôle à jouer dans l'effet de l'anesthésique sur cette protéine, suscitant ainsi l'intérêt et la pertinence de l'utilisation de ce modèle pour l'étude des interactions anesthésique/membrane excitable.

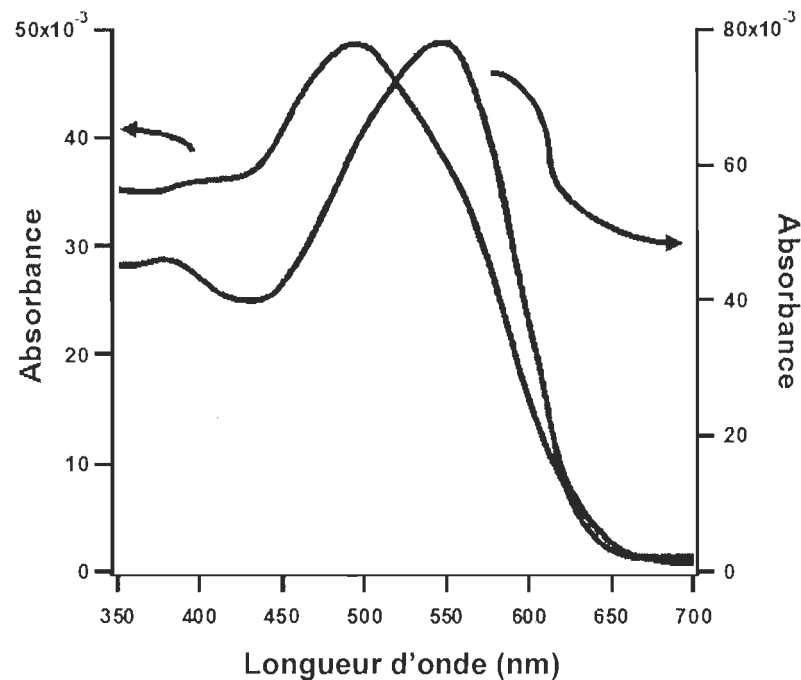


FIGURE 1.2 : Spectres d'absorption de la bactériorhodopsine. Spectre de droite : bactériorhodopsine purifiée, exempte de lipides et suspendue dans 0,5% de Triton X-100; $\lambda_{\text{max}} = 555$ nm. Spectre de gauche, échantillon comparable obtenu après retrait complet du détergent; $\lambda_{\text{max}} = 480$ nm [71].

1.6.2 Structure et organisation de la membrane pourpre

1.6.2.1 Généralités

Les archéobactéries halophiles prospèrent dans les marais salants qui sont exposés fortement au rayonnement du soleil. Afin d'extraire l'énergie et l'information que véhicule la lumière, les halobactéries possèdent quatre protéines sensibles à la lumière: la bactériorhodopsine (bR), l'halorhodopsine (hR) et deux rhodopsines sensorielles (SRI et SRII). La bR convertit la lumière verte (500-650 nm) en gradient électrochimique de protons qui est ensuite utilisé par l'ATPsynthétase pour produire de l'ATP. L'halorhodopsine est impliquée dans le transport des ions chlorures (Cl⁻) et les deux rhodopsines sensorielles sont responsables du phototactisme de la bactérie. La synthèse de bR est induite dans des conditions d'anaérobiose et s'accumule en grande concentration dans la membrane cytoplasmique [72]. Dans ces conditions, la bR s'assemble sous forme d'un réseau cristallin en deux dimensions, connu sous le nom de membrane pourpre (MP).

La membrane pourpre contenue dans la membrane cytoplasmique d'halobactéries est un complexe protéines-lipides de composition bien définie. L'unique protéine entrant dans la composition de la MP est la bR. La bR est composé de 248 acides aminés constituant la bactériopsine (bO), son chromophore, le rétinol, s'y lie de façon covalente par formation d'un lien imine (base de Schiff) avec la fonction ϵ -aminée de la lysine 216 [73, 74]. La structure de la bR fut obtenue pour la première fois par le patron de densité électronique de fragments de MP isolés [75]. La bR est composée de sept hélices α transmembranaires entourant le chromophore (rétinol) et s'organise de manière à former une structure cristalline hexagonale de trimères protéiques (figure 1.3) [76]. Les lipides ne constituant que 25% de la membrane se logent entre les trimères et dans l'espace interstitiel du trimère.

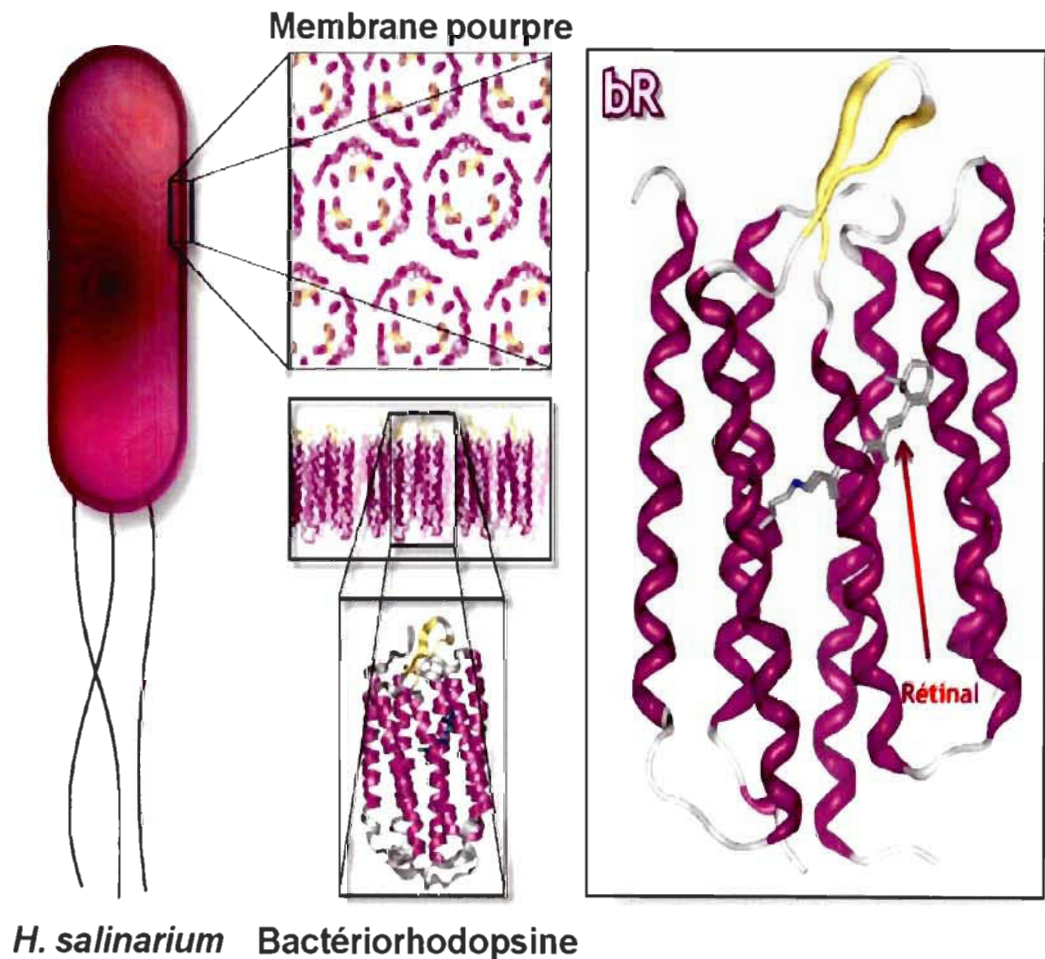


FIGURE 1.3 : Structure et localisation de la membrane pourpre des halobactéries. Le réseau cristallin de la membrane pourpre se compose essentiellement de bactériorhodopsines (bR) s'oligomérisant sous forme de trimères. La bR est composée de sept hélices transmembranaires entourant le chromophore (rétinal). Celui-ci est lié à la protéine via une base de Schiff avec la lysine-216. La structure présentée provient du fichier PDB : 1QHJ [77].

1.6.2.2 Composition lipidique de la membrane pourpre

Les interactions lipides-bR sont d'une importance capitale pour le maintien et la formation de la membrane pourpre, ainsi que pour l'activité catalytique de la bR [78]. Les études de composition et de structure de la MP suggèrent une forte association de la bR à ses lipides endogènes. La localisation des lipides de la MP a été déterminée par diffraction des électrons [79-81] et par diffraction des rayons X [77, 82]. Dans la plupart des cas, les chaînes acyles des lipides sont hautement ordonnées et occupent des cavités hydrophobes délimitées par les résidus non-polaires à la surface de la bR [82]. Une de ces cavités, profondément caché dans la membrane, semble accommoder une molécule en forme de « S » qui fut identifiée comme étant le squalène [82].

La composition lipidique de la MP diffère sensiblement de celle du reste de la membrane cytoplasmique; le lipide prédominant étant le phosphatidylglycerophosphate (PGP), constituant majeur de la membrane cellulaire des halobactéries (figure 1.4) [83]. Les autres constituants lipidiques sont : deux phospholipides (phosphatidylglycerol, PG et le phosphatidylglycerolsulfate, PGS), un sulfoglycolipide (S-TGA-1) et un lipide neutre (squalène) [80]. Tous ces lipides ne comportent qu'un type de chaîne acyle, le phytanyl ou archéol (figure 1.4).

Le S-TGA-1 et le PGS sont présents seulement dans la MP et, plus particulièrement, le S-TGA-1 se retrouve uniquement du côté extracellulaire de la MP [77]. Le marquage spécifique du S-TGA-1 par des sucres deutériés a permis la localisation de deux molécules par bR [84]. Selon les plus récents modèles structuraux, une des molécules de S-TGA-1 se situe à l'intérieur du trimère de bR [85]. Plus spécifiquement, une des chaînes phytanyls épouserait une crevasse hydrophobe de l'hélice D, ce qui pourrait expliquer que les mutations au niveau de l'hélice D inhibent complètement la formation de membrane pourpre [86]. L'autre chaîne hydrophobe du S-TGA-1 est en contact étroit

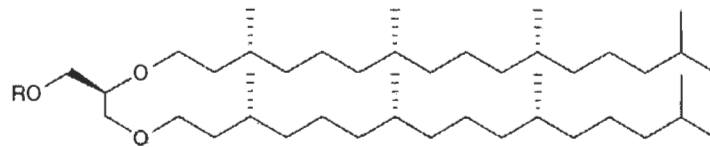
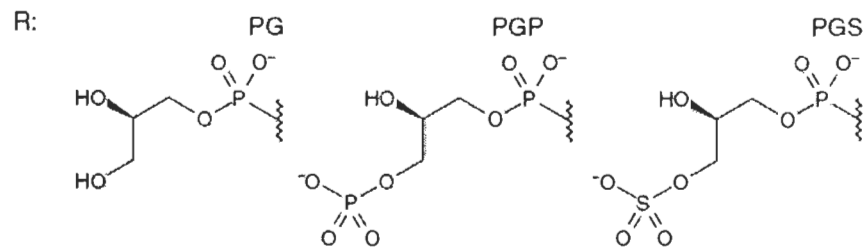
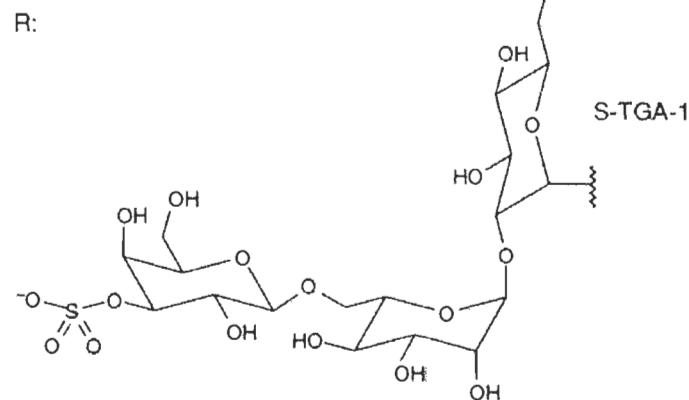
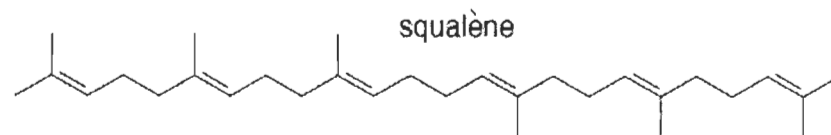
Archéol**Phospholipides****Sulfoglycolipides****Lipides neutres**

FIGURE 1.4 : Composition lipidique de la membrane pourpre de *H. salinarium*. La partie hydrophobe est constituée de deux chaînes dihydrophytanyl connectées via un lien éther à un glycérol (Archéol). Les phospholipides comprennent le PG (phosphatidylglycérol), le PGP (phosphatidylglycérolphosphate) et le PGS (phosphatidylglycérolsulfate). Le sulfoglycolipide est un galactosyl-3-sulfate-mannosyl-glucosyl-archaeol (S-TGA-1). Le squalène constitue le seul lipide neutre de la membrane pourpre.

avec le Trp-80 de l'hélice C et doit fournir une force motrice pour la trimérisation de la bR puisque la substitution du Trp-80 par des acides aminés plus petits empêche la formation de MP [87]. La seconde molécule de S-TGA-1 semble impliquée dans les interactions entre trimères en liant les hélices A, G et E de deux monomères de bR [84]. À ce niveau, les Trp-10 et Trp-12 sont de bons candidats pour des interactions avec des lipides puisque des mutations de ceux-ci induisent une diminution de la formation de MP [87]. Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que le groupement hydroxyle (OH) de certaines tyrosines (Tyr-64) pouvait former des ponts hydrogène avec l'oxygène du lien éther des archéolipides. Notamment, plusieurs autres tyrosines (Tyr-26, Tyr-31, Tyr-133 et Tyr-147) se situent à proximité du lien éther ou des têtes polaires des lipides [85].

Les études fonctionnelles suggèrent aussi que les archéolipides interagissent intimement avec la bR contenue dans la MP car le traitement de MP par de petites quantités de détergent (Triton X-100) affecte considérablement l'activité de la bR [88-90]. L'incubation subséquente de MP traitée au Triton X-100 avec du PGP et du squalène, rétablit complètement et de manière synergique les propriétés cinétiques de l'activité de la bR [91]. Cependant, la reconstitution avec des lipides exogènes ne possédant pas de chaînes phytanyles est inefficace pour restaurer les propriétés natives de la MP [92]. En spectroscopie FTIR, il fut démontré que la MP traitée avec du Triton X-100 présentait une perte de lien hydrogène au niveau des têtes polaires des lipides, ainsi qu'une perte de boucles β et d'hélices α [93]. Par ailleurs, le seul lipide subsistant après des solubilisations successives dans le détergent est le S-TGA-1. Curieusement, celui-ci n'est pas indispensable pour rétablir la structure et la fonctionnalité de la MP [84].

1.6.3 Le photocycle de la bR

Du point de vue cinétique, l'activité de la bR apparaît comme une séquence cyclique d'espèces spectroscopiques intermédiaires et dénotées bR,

K, L, M, N et O. En premier lieu, l'énergie lumineuse est d'abord absorbée par la bR provoquant l'isomérisation du rétinale. L'éclatement stérique, résultant de l'isomérisation à l'intérieur de la poche contenant le rétinale, induit la réorganisation structurale subséquente de la protéine. Cette réorganisation correspond à une séquence de changements spectroscopiques qui caractérisent le photocycle de la bR (figure 1.5) [94].

L'intermédiaire K se caractérise par une configuration distordue 13-*cis*/15-*anti* du rétinale et des changements du réseau de liens hydrogènes de l'eau contenue dans son voisinage [95, 96]. Le rétinale est partiellement relaxé dans l'état L et des changements des ponts hydrogène de la protéine et de l'eau liée s'amorcent [97]. Selon les plus récents modèles, l'intermédiaire M se compose d'au moins trois sous-états (M_1 , M_2 et M_2') dans lesquels il s'établit un équilibre de protonation entre la base de Schiff du rétinale et l'Asp-85 (premier accepteur de proton) situé du côté extracellulaire et ce, jusqu'à la déprotonation complète de la base de Schiff [98]. La transition $M_1 \rightarrow M_2$ est une étape réversible définie généralement comme un « commutateur de protonation » et M_2' est associé à la libération du côté extracellulaire du proton [99]. Le relargage extracellulaire du proton semble nécessiter l'intervention de l'Arg-82, du Glu-194 et du Glu-204 et des molécules d'eau dans le réseau interne de ponts hydrogène de la bR [100]. L'intermédiaire N apparaît lorsque la base de Schiff se reprotone alors que l'Asp-96 (premier donneur de proton) du côté cytoplasmique se déprotone. La disparition de l'état N succède à l'apparition de l'intermédiaire O, au cours duquel l'Asp-96 se reprotone et le rétinale se ré-isomériser [101]. L'état initial (bR) réapparaît avec le retour de la forme *tout-trans* du rétinale.

D'un point de vue fonctionnel, il est évident que l'activité catalytique de la bR est sensible aux changements physiques et chimiques de son environnement. De ce fait, les changements de pH, de température, la solubilisation dans les détergents ainsi que la présence de solvant organique affectent tous de manière relative la structure et l'activité de la bR.

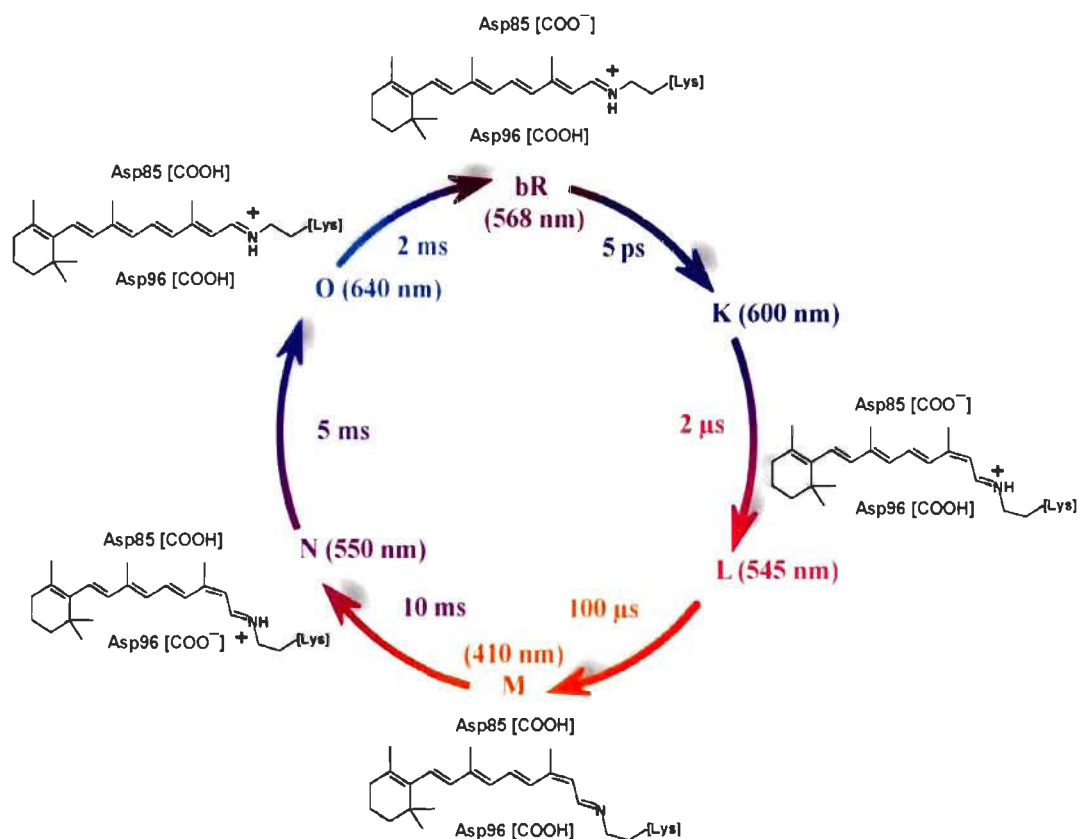


FIGURE 1.5 : Photocycle de la bR adaptée à la lumière (bR568). Les indices indiquent le λ_{max} des intermédiaires et le temps de vie de chaque transition spectrale est indiqué. Lors de l'absorption de la lumière verte, le rétinal tout-trans s'isomérise en 13-cis/15-anti provoquant le pompage d'un proton du côté cytoplasmique vers le côté extracellulaire. L'état de protonation de Asp85 (1er accepteur de protons) et Asp96 (1er donneur de protons) est indiqué pour chaque intermédiaire.

1.6.4 Les anesthésiques généraux et la membrane pourpre

1.6.4.1 Changements spectroscopiques de la bR

Le maximum d'absorption de la bR dépend de l'état de protonation de sa base de Schiff et de la distribution de charges autour du chromophore, lesquels sont maintenus par l'interaction de l'apoprotéine (bO) avec le rétinol. Ainsi, les changements spectraux du rétinol sont un bon indicateur des changements conformationnels de la protéine.

Dans sa forme adaptée à la lumière, la bR possède un maximum d'absorption centré à 568 nm (bR_{568}). Des changements spectroscopiques se produisent lorsque la structure de la bR est affectée par des détergents ou encore par l'ajout d'anesthésiques [102, 103]. Notamment, la bR délipidée présente un déplacement hypsochrome de 90 nm, tributaire d'une forme spectrale différente (bR_{480}) [104]. Par ailleurs, la réaction de l'hydroxylamine sur la bR provoque l'hydrolyse de la base de Schiff et la libération du rétinol, amenant la formation d'une forme spectrale dite « blanchie » à 380 nm (bR_{380}) [105].

En présence d'anesthésiques généraux halogénés, il existe un équilibre entre différentes formes spectrales (figure 1.6). Cet équilibre est régi selon trois modes d'action dépendant de la concentration d'AG : à faible concentration d'AG (mode I), le maximum d'absorption (λ_{max}) à 568 nm se déplace à 565 nm. Le temps de vie de l'intermédiaire M diminue et l'efficacité de pompage de proton est augmentée. À concentration plus élevée (mode II) le λ_{max} se déplace à 480 nm. Enfin, à saturation avec un anesthésique faible (mode III) ou avec un AG plus puissant, il est possible de déplacer le λ_{max} à 380 nm [106-108]. Par ailleurs, bR_{380} qui possède le même λ_{max} que le rétinol *tout-trans* libre en solution, ne présente aucune activité photochimique et est formée de façon irréversible. En fait, si la préparation est maintenue plus d'une quinzaine de minutes dans sa forme 380 nm, elle ne peut pas recouvrer son spectre original.

Dans les autres cas, la forme absorbant à 568 nm peut toujours être retrouvée en évaporant l'anesthésique sous un vide partiel [109].

Les études d'activité photochimique ainsi que de quenching de fluorescence ont démontré que le chromophore (rétinal) n'était pas la cible première des AG et que leurs effets étaient similaires à ceux causés par la délipidation et la solubilisation de la bR [102, 103, 106, 110]. Cependant, il est à noter que la transition $bR_{480} \rightarrow bR_{380}$ se produit à des concentrations d'AG supérieures à celles causant l'anesthésie clinique tandis que les transitions du mode 1 et 2 ($bR_{568} \rightarrow bR_{565}$; $bR_{568} \rightarrow bR_{480}$) se produisent dans l'intervalle pharmacologique causant l'anesthésie générale [107].

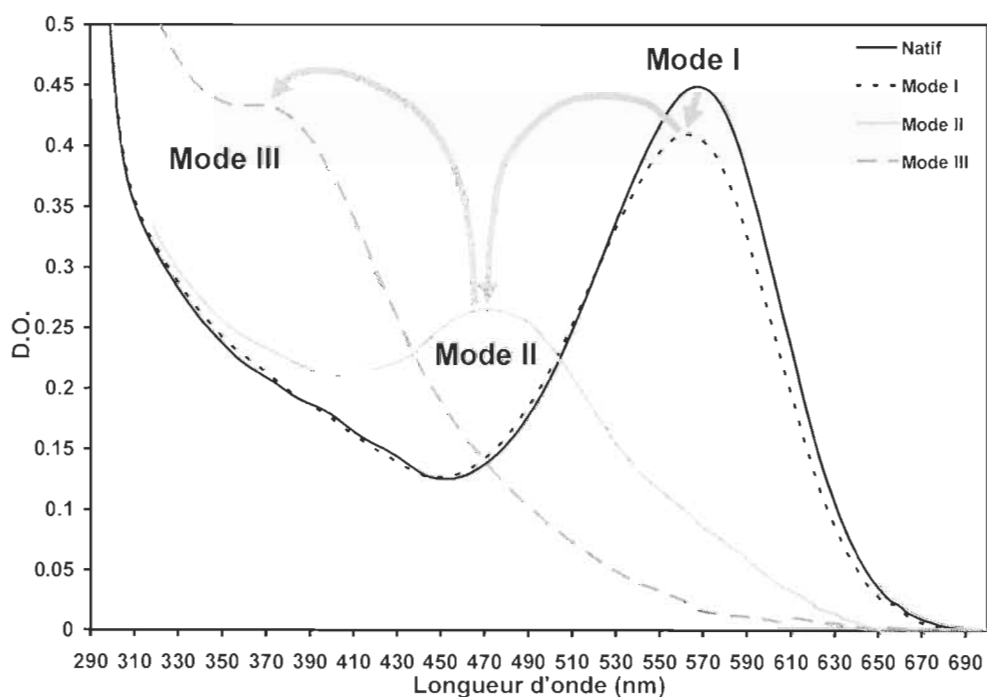


FIGURE 1.6 : Transitions spectrales de la bR en présence d'halothane. À faible concentration d'halothane la bR subit une première transition (mode I) de 568 nm à 565 nm. Par la suite, la forme native bR_{568} disparaît réversiblement au profit d'une forme absorbant à 480 nm (mode II). Le mode III se caractérise par l'apparition irréversible d'une espèce absorbant à 380 nm.

1.6.4.2 Changements fonctionnels de la bR

Mentionner que la forme bR₃₈₀ ne possède aucune activité photochimique signifie presque implicitement que les autres formes spectrales générées en présence d'anesthésique ont une activité photochimique. C'est effectivement le cas. Aux très faibles concentrations d'anesthésique, la protéine demeure pourpre et l'analyse cinétique de son cycle photochimique révèle une diminution du temps de vie de l'intermédiaire M, tel qu'indiqué sur la figure 1.7. Dans ces conditions, le cycle de la bR est plus rapide et il a été démontré que cela correspondait à une activité de pompage de protons augmentée par rapport à la forme intacte de la bR [107]. À de plus grandes concentrations d'anesthésique, le spectre de la bR se déplace à 480 nm et la cinétique du cycle est plus lente. Boucher et al. ont montré que dans sa forme 480 nm, la bR avait un rendement quantique de formation de M comparable à celui de la forme native mais que cette forme 480 nm, en dépit d'une activité photochimique complète ne pompait aucun proton comme en fait foi le spectre d'action de la figure 1.8 [111].

Cette étude de la fonction de la bR en présence d'anesthésique ajoute un élément de pertinence au modèle expérimental. En effet, certaines structures biologiques sont déstabilisées ou inhibées en présence d'anesthésique; c'est notamment le cas de l'albumine ou de la luciférase. D'autres, comme le récepteur de l'acétylcholine voient leur activité augmentée en présence d'anesthésique. Dans le cas de la bR, dépendamment de la dose à laquelle elle est soumise, on voit son activité d'abord augmentée puis être inhibée. Cette protéine regroupe ainsi à elle seule les propriétés de plus d'un modèle et justifie ainsi l'intérêt qu'on lui porte.

1.6.4.3 Modifications structurales de la MP par les AG

D'un point de vue purement structural, la MP subit des modifications coïncidentes à celles observées spectroscopiquement. Ainsi, les différentes

techniques physiques utilisées pour caractériser l'effet des AG sur la MP procurent des informations complémentaires quant à la nature et à la dynamique des interactions en jeu.

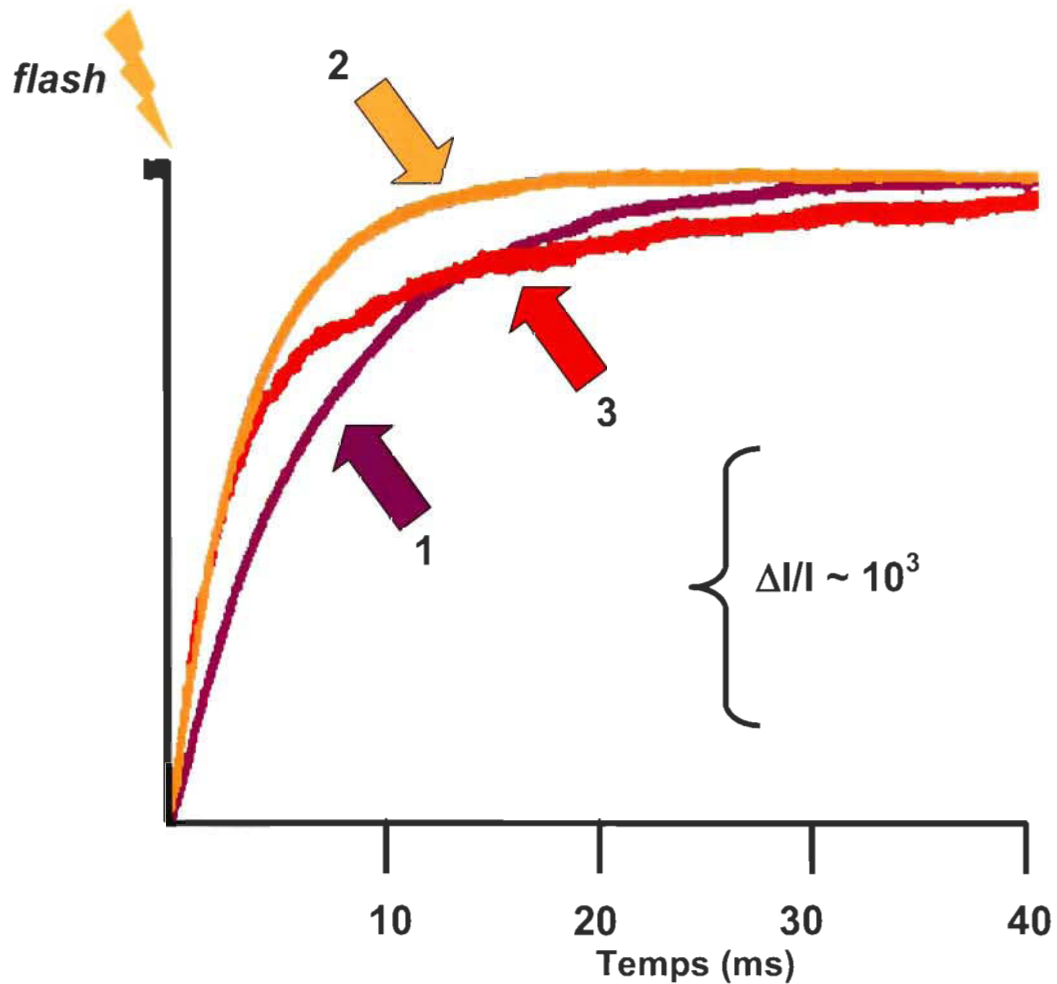


FIGURE 1.7 : Apparition rapide de l'intermédiaire M et cinétique de sa disparition dans l'intervalle des millisecondes suivant l'excitation. Les trois courbes correspondent à la bR native (1), additionnée d'une quantité d'enflurane (0.05% v/v) insuffisante pour générer la forme rouge (bR₅₆₅) (2), puis, transformée en bR₄₈₀ en présence d'une plus grande quantité d'enflurane (0.08% v/v) (3) [111].

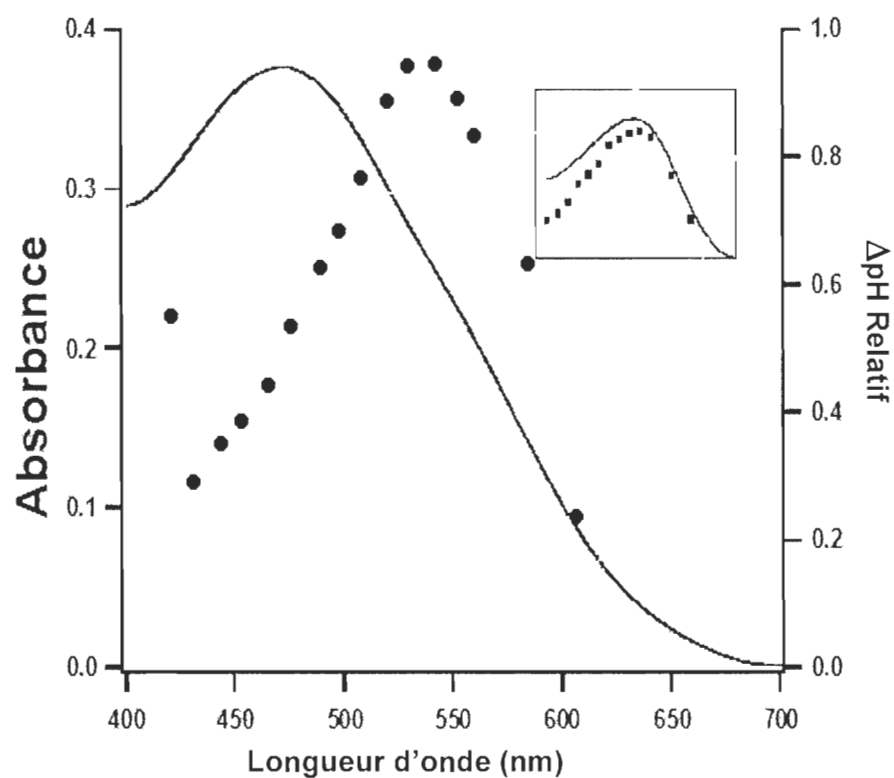


FIGURE 1.8 : Spectre d'action de l'activité de pompage de la membrane pourpre. En noir, l'absorbance de la bR en présence de 0.3 % v/v d'enflurane. Les points affichent le changement relatif de pH en fonction de la longueur d'onde d'excitation dans les mêmes conditions. En encart, les mêmes mesures que précédemment mais après évaporation de l'enflurane sous vide [111].

Des images obtenues en microscopie à force atomique (AFM) démontrent que les échantillons de MP traités aux AG subissent une perte de structure cristalline et apparaissent sous forme d'agrégats de dimension réduite (figure 1.9). Cette perte de cristallinité, ou du moins la diminution de la taille des cristaux explique, du moins en partie, la perte d'intensité des pics de diffraction des rayons X de MP en présence d'AG (figure 1.10). En effet, le patron de diffraction de la forme bR_{480} ne montre aucun pic dans la région où le réseau hexagonal de trimères devrait en montrer. Il apparaît évident que la formation de bR_{480} est accompagnée d'une décristallisation importante de la MP. Par ailleurs, le caractère cristallin natif est difficilement recouvré car l'évaporation de l'anesthésique qui permet de retrouver la couleur pourpre de l'échantillon ne fait pas réapparaître les pics de diffraction (figure 1.10) [109]. En fait, dans notre cas, le caractère cristallin natif n'a pu réapparaître qu'après lyophilisation et réhydratation des échantillons.

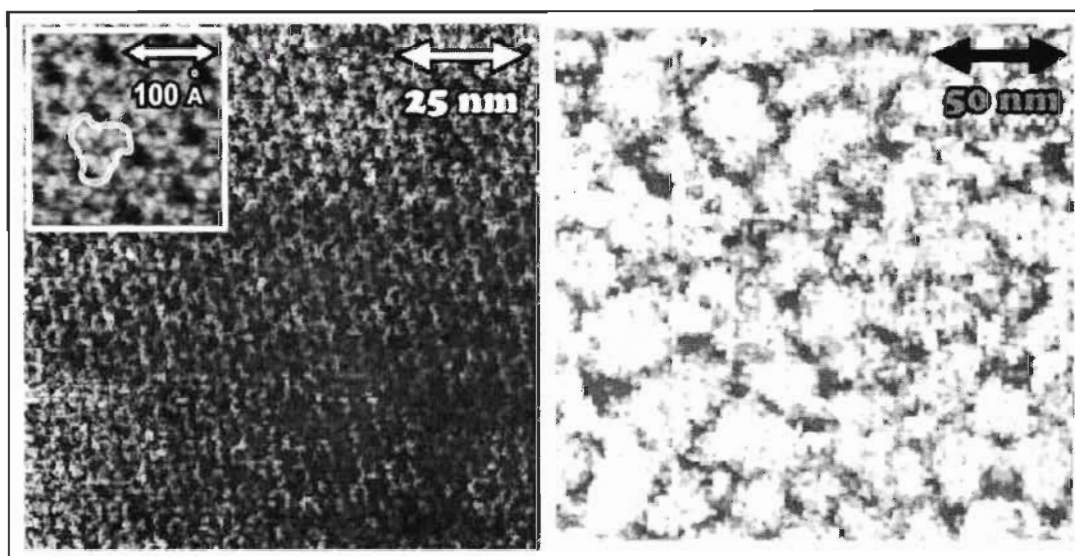


FIGURE 1.9 : Microscopie à force atomique (AFM) de membranes pourpres. La structure trimérique de la MP est facilement observable en AFM [112] (en encart à gauche). En AFM, la MP apparaît comme un réseau cristallin bidimensionnel uniforme (à gauche). Après traitement avec l'AG, la MP apparaît sous forme de fragments de grandeurs réduites [109]. (gracieuseté de M. Grandbois, Université L. Maximilians de Munich).

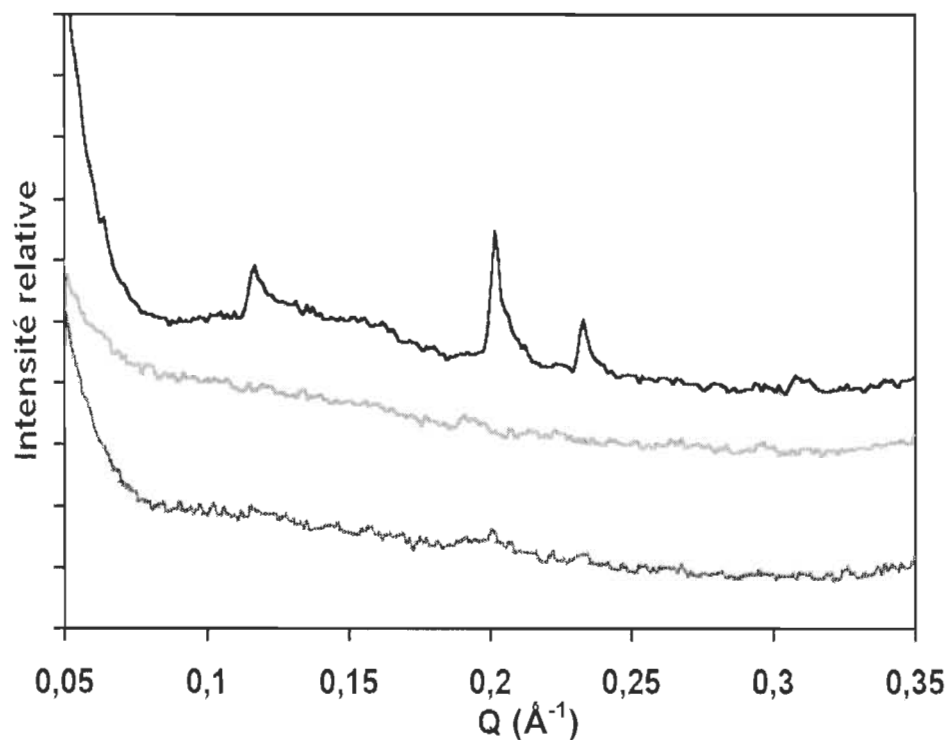


FIGURE 1.10 : Diffraction des rayons-X de MP en présence d'AG. Dans sa forme native, la MP affiche un patron de diffraction caractéristique de sa structure cristalline (courbe du haut). La forme bR₄₈₀ n'affiche plus aucune structure organisationnelle (courbe du milieu). Après évaporation sous un vide partiel, la couleur pourpre est régénérée, mais le caractère cristallin de la MP semble perdu irréversiblement (courbe du bas) [109].

Par ailleurs, Nakagawa et ses collaborateurs semblent avoir réussi à incorporer un anesthésique (le diiodométhane) dans la membrane pourpre sans qu'elle ne perde son caractère cristallin [113]. Dans leur cas, la localisation des AG au niveau de l'interface protéine-lipide fut démontrée par diffraction des rayons X : puisque la cristallinité est conservée à faible concentration d'AG (mode 1), il est possible d'obtenir un patron de diffraction. Donc, lors de la transition $bR_{568} \rightarrow bR_{565}$, les AG (diiodométhane) se localisent de façon spécifique en surface et au centre d'un trimère de bR [113]. Il fut aussi démontré que lors de la transition à 480 nm, les AG pénétreraient profondément dans le domaine hydrophobe de la membrane [114]. Signalons cependant que ces mesures ont été faites à un pH acide. Nous ne pouvons nous prononcer dans le cas du diiodométhane mais nous avons observé que dans le cas de l'enflurane, de tels pH retardaient considérablement l'apparition du mode II et nécessitaient l'utilisation d'une plus grande quantité d'anesthésique pour observer un effet. Il est vraisemblable que ces auteurs aient utilisé un tel pH pour prévenir la dislocation des cristaux de bR et la disparition du signal de diffraction.

D'autre part, la structure trimérique de la bR confère à la MP native un spectre de dichroïsme circulaire particulier ; le couplage excitonique de trois molécules de rétinol procure un aspect bilobé au spectre. Ainsi, cette propriété spectrale est associée à l'organisation trimérique de la bR, puisque la forme monomérique de la bR ne présente qu'une seule bande positive près de son maximum d'absorption [115]. Le spectre de dichroïsme circulaire de MP native est constitué d'une bande positive centrée à 530 nm et une bande négative à 605 nm (figure 1.11a). À faible concentration d'Enflurane (AG), la bande négative diminue rapidement et la bande positive se déplace vers 470 nm à mesure que la concentration augmente et, finalement, elle disparaît complètement à grande concentration [116]. Il est important de mentionner ici qu'à cette concentration d'enflurane (16 mM), le maximum d'absorption de la bR est à 380 nm et que ce maximum d'absorption (λ_{max}) est associé au rétinol *trans* libre en solution. De plus, la transition $bR_{568} \rightarrow bR_{480}$ est dotée d'une

certaine réversibilité. En effet, lorsqu'on évapore l'AG, l'aspect bilobé du spectre CD réapparaît instantanément, indiquant une reconstruction des trimères de bR. Cependant, cette réversibilité n'est pas totale car l'intensité du spectre régénéré est moindre que celle du spectre natif (figure 1.11b) [109, 116].

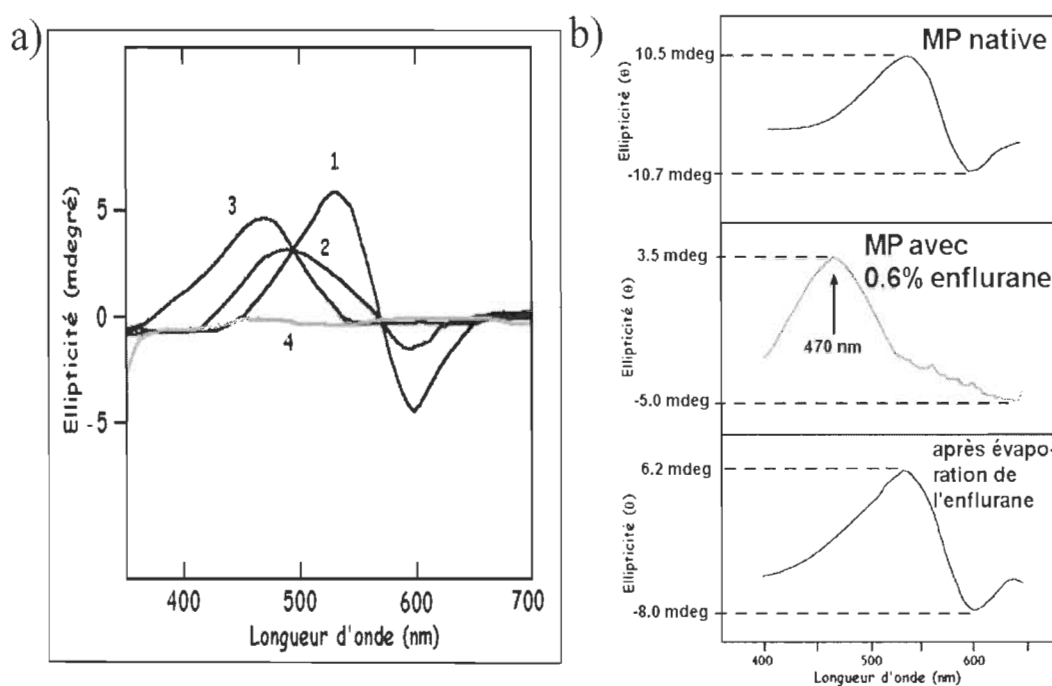


FIGURE 1.11 : Dichroïsme circulaire de la membrane pourpre. a) La MP native possède un spectre CD bilobé caractéristique de son organisation trimérique (courbe 1). En présence d'AG, l'aspect bilobé du spectre disparaît et laisse place à une forme monomérique près de son maximum d'absorption à 480 nm (courbes 2 et 3). La forme bR₃₈₀ n'affiche plus aucune structure (courbe 4) [116]. b) La transition bR₅₆₈ → bR₄₈₀ présente une réversibilité partielle lors de l'évaporation de l'AG [109].

1.7 Second modèle : les vésicules de DPPC

Les propriétés structurales, thermodynamiques et dynamiques des bicou-ches lipidiques affectent le fonctionnement des protéines membranaires [117]. Pris individuellement, les propriétés physiques et le rôle fonctionnel de chaque type lipidique sont difficiles à évaluer dû à la composition complexe des membranes biologiques. Qui plus est, la composition lipidique asymétrique des biomembranes ajoute un niveau de complexité additionnel. Afin d'avoir un aperçu du rôle de chaque composante membranaire, il est nécessaire de recourir à des modèles. Les connaissances actuelles sur les fonctions des membranes biologiques dérivent, pour la plupart, d'études réalisées à partir de systèmes artificiels lipide-eau menant à la formation de structures lamellaires.

Les liposomes, ou vésicules lipidiques, permettent de mimer la complexité des biomembranes puisque leurs structures lamellaires fermées et leurs propriétés physicochimiques sont similaires à celle des membranes de cellules eucaryotes. Depuis que Bangham et ses collaborateurs ont démontré, dans les années 1960, que les phospholipides formaient spontanément des membranes fermées, l'usage de vésicules (liposomes) est devenu le système modèle des biomembranes [118]. Les propriétés telles la fluidité, les transitions de phase, le polymorphisme, la fusion membranaire et la perméabilité n'ont cessé d'être caractérisées et une revue extensive sur le sujet serait difficile à réaliser. La quantité de connaissances amassées sur le sujet a fait des vésicules de lipides un outil fondamental et essentiel en biochimie, biophysique et biologie.

1.7.1 Caractérisation des vésicules

Les vésicules de lipides ou liposomes se regroupent en trois catégories : les vésicules multilamellaires constituées de plusieurs bicouches lipidiques (MLV), les petites vésicules unilamellaires composées d'une seule lamelle et de

taille inférieure à 100 nm (SUV) et les grosses vésicules unilamellaires de taille supérieure à 100 nm (LUV).

Les bicouches de phospholipides ont la propriété de subir une grande variété de transitions thermotropiques et lyotropiques. Ces transitions sont sensibles à la composition de la phase aqueuse et peuvent être induites isothermiquement par les interactions avec les ions et autres molécules en solution. Cette propriété est particulièrement intéressante du point de vue du rôle régulateur possible dans les systèmes biologiques. L'état physique de la bicouche lipidique représente une propriété importante des vésicules. Les vésicules composées de phospholipides sont considérées solides (L_β état gel, dans lequel les chaînes acyles affichent un aspect rigide) lorsqu'elles sont maintenues à une température inférieure à leur température de transition de phase (T_m). À l'inverse, si la température du milieu est supérieure à T_m , ces lipides seront dits fluides (L_α état cristal liquide, où les chaînes acyles ont beaucoup plus de liberté de mouvement) [119] (figure 1.12). La température de transition (T_m) est dépendante de plusieurs facteurs intrinsèques (longueur des chaînes acyles, insaturations, types de têtes polaires, adsorption d'ions) et extrinsèques comme la présence de protéines, de cholestérol, de molécules en solution ou encore la présence de lipides chargés dans le cas de mélanges lipidiques. Les phospholipides acides comme la phosphatidylsérine (PS), le phosphatidylglycérol (PG) ou les acides phosphatidiques (PA) qui confèrent une charge négative aux vésicules, modifiant ainsi la surface électrostatique de la membrane, peuvent avoir une influence considérable sur le T_m [120].

1.7.2 Interactions de xénobiotiques avec les vésicules lipidiques

Les vésicules de lipide sont depuis longtemps utilisées comme modèle membranaire pour étudier la toxicité de plusieurs xénobiotiques et l'interaction de molécules avec les membranes. La quantité de molécules interagissant avec les membranes est imposante et d'une grande variabilité chimique et structurale :

antibiotiques, alcools, peptides, détergents, etc. Les anesthésiques ont été parmi les premières molécules à être testées sur les liposomes [121] et ont fait l'objet d'une quantité impressionnante de publications. Outre les effets sur la fluidité membranaire, sur les transitions de phase, et sur la possible localisation à l'interface membranaire discutés au point 1.4.1, les propriétés physico-chimiques qui gouvernent l'interaction des AG avec les membranes restent nébuleuses.

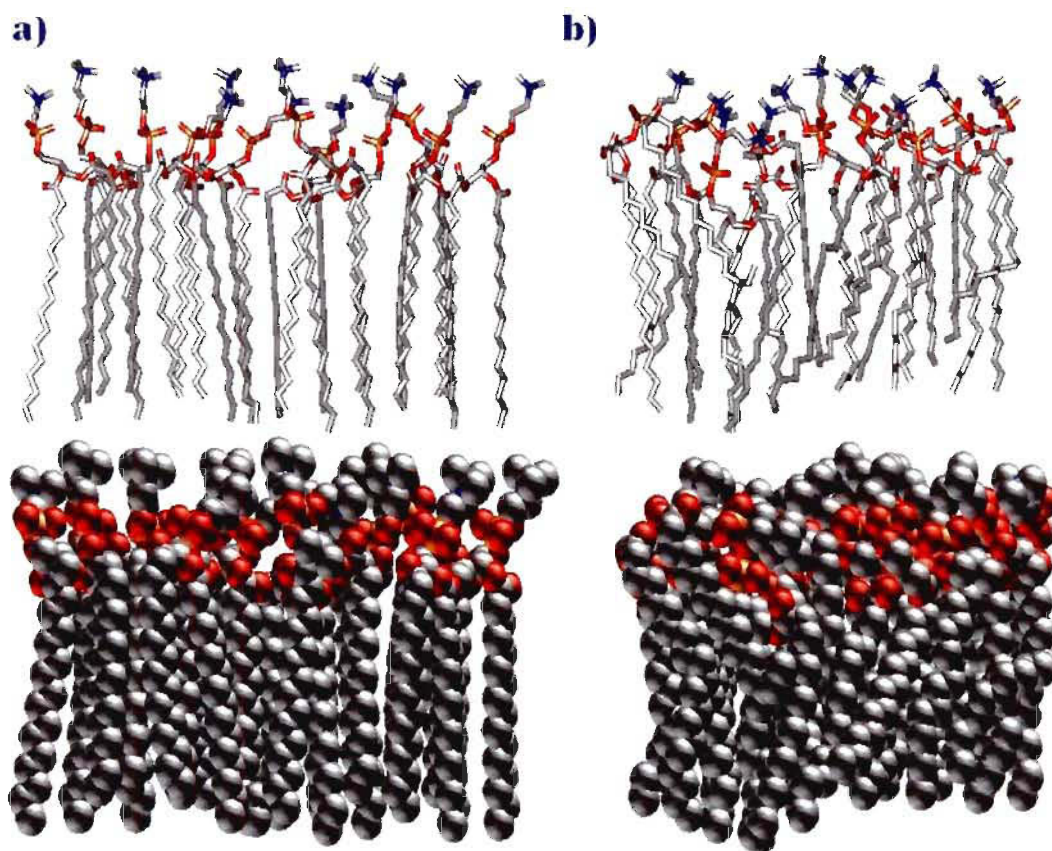


FIGURE 1.12 : Transition de phase du DPPC. a) Les molécules de DPPC sont en phase L_{β} ou état gel. b) Au-dessus de la T_m , les molécules de DPPC sont dans état cristallin liquide, L_{α} .

Rappelons toutefois que nous avons participé à l'élaboration d'un pseudo-diagramme de phase de l'incorporation d'un anesthésique général, l'enflurane, dans des vésicules de DPPC [37]. Des mesures effectuées avec des vésicules multilamellaires, à l'aide du dispositif Microcalix, permettant l'analyse simultanée en calorimétrie différentielle et en diffraction des rayons X, ont permis d'établir les changements structuraux induits par l'anesthésique dans ces objets. Dans l'intervalle entre 0 et 40 mM d'enflurane, la structure de la bicouche passe de la phase L_β pure, par des phases intermédiaires, à une phase interdigitée. Simultanément, la température de transition entre les phases L_β et L_α pures est diminuée. Le modèle d'interactions construit à partir de ce diagramme de phase localise l'anesthésique près de l'interface lipide/eau. Parallèlement, des mesures avec des vésicules unilamellaires ont confirmé l'abaissement du T_m du lipide par l'anesthésique, tel que mesuré par la fluorescence d'une sonde (Laurdan), tout en indiquant que l'effet maximal de l'anesthésique est atteint plus facilement quand le lipide est en phase L_α [37].

Par ailleurs, il existe des travaux en dynamique moléculaire qui ont tenté de prédire les sites d'interaction d'anesthésiques généraux avec des bicouches lipidiques [31, 32, 34, 35, 122-125]. Les résultats indiquent que ces derniers se partitionnent principalement au niveau des liens esters des lipides mais il demeure néanmoins toujours des molécules d'anesthésique au centre de la membrane.

1.8 Objectifs spécifiques

Il est clair que la cible ultime d'un anesthésique qui se distribue dans une membrane excitable doit être une protéine importante du point de vue fonctionnel. Toutefois, compte tenu des éléments mentionnés précédemment, notamment, la possibilité que les lipides soient des acteurs importants dans la modulation des protéines membranaires par les anesthésiques généraux, il

devient pertinent de comparer la réponse de l'une et des autres dans les mêmes conditions expérimentales.

À cette fin, nous avons d'abord établi un protocole de perfusion lente qui permet de prendre des mesures à l'équilibre sur plus de douze heures. Ce protocole sera utilisé pour établir des courbes dose-réponse précises aussi bien dans le cas de la bactériorhodopsine que dans le cas de vésicules lipidiques.

Dans le cas de la bactériorhodopsine, l'effet de la délipidation partielle ou totale de la protéine sera considéré afin de préciser l'importance du petit nombre de lipides associés à la protéine dans la médiation de sa réponse. Nous tenterons également d'établir la séquence des événements ou des interactions qui surviennent en présence de doses croissantes d'anesthésique par l'analyse des indicateurs de sa fonction, de sa fluorescence intrinsèque ainsi que de sa structure, telle que révélée par spectroscopie vibrationnelle.

Dans le cas des vésicules lipidiques, leur réponse aux anesthésiques, dans les mêmes conditions, sera évaluée par l'utilisation de sondes fluorescentes localisées à la surface membranaire ou dans le cœur hydrophobe de cette dernière pour des membranes constituées de phosphatidylcholine pure et d'un mélange incluant de la phosphatidylsérine. Ces mesures devraient nous renseigner sur la distribution de l'anesthésique et sur l'effet de la densité des charges de surface sur leur partition.

À l'aide de ces mesures, nous tenterons de reconstituer la voie la plus vraisemblable qui permette aux anesthésiques de moduler réversiblement l'activité de protéines membranaires.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Matériel

Tous les produits utilisés sont de la meilleure qualité disponible et proviennent des fournisseurs habituels (Sigma-Aldrich, Fisher). De l'eau distillée nanopure est utilisée en toutes circonstances.

2.1.1 Lipides, sondes fluorescentes et anesthésiques

Le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) ($PM = 734.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-(phospho-L-sérine) (DPPS) ($PM = 758.0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) proviennent de chez Avanti Polar lipids Inc. (figure 2.1a et b). Le 6-dodécanoyl-2-diméthylaminonaphthalène (Laurdan) ($PM = 353.6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et le 1-hexadécanoyl-2-(1-pyrènedécanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (β -py-C₁₀-HPC ou Py-DPPC) ($PM = 850.1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) sont des sondes fluorescentes membranaire provenant de chez Molecular Probes Inc. (figure 2.1c et d). L'anesthésique général utilisé, le (R, S) 2-Bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroéthane (halothane) (figure 2.1e) ($PM = 197.4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) ainsi que le détergent Triton X-100 réduit proviennent de Sigma-Aldrich.

2.1.2 Préparation et purification des membranes pourpres

Les membranes pourpres utilisées ont été isolées à partir d'halobactéries (*H. salinarium*). Deux souches différentes sélectionnées pour leur facilité d'induction de membranes pourpres ont été utilisées, soit S9 et L33, gracieuseté du Dr. Ebrey (University of Washington, Seattle) et du Dr. Lanyi (University of California, Irvine), respectivement. Les membranes pourpres sont purifiées selon la méthode standard que l'on retrouve dans la littérature [126, 127].

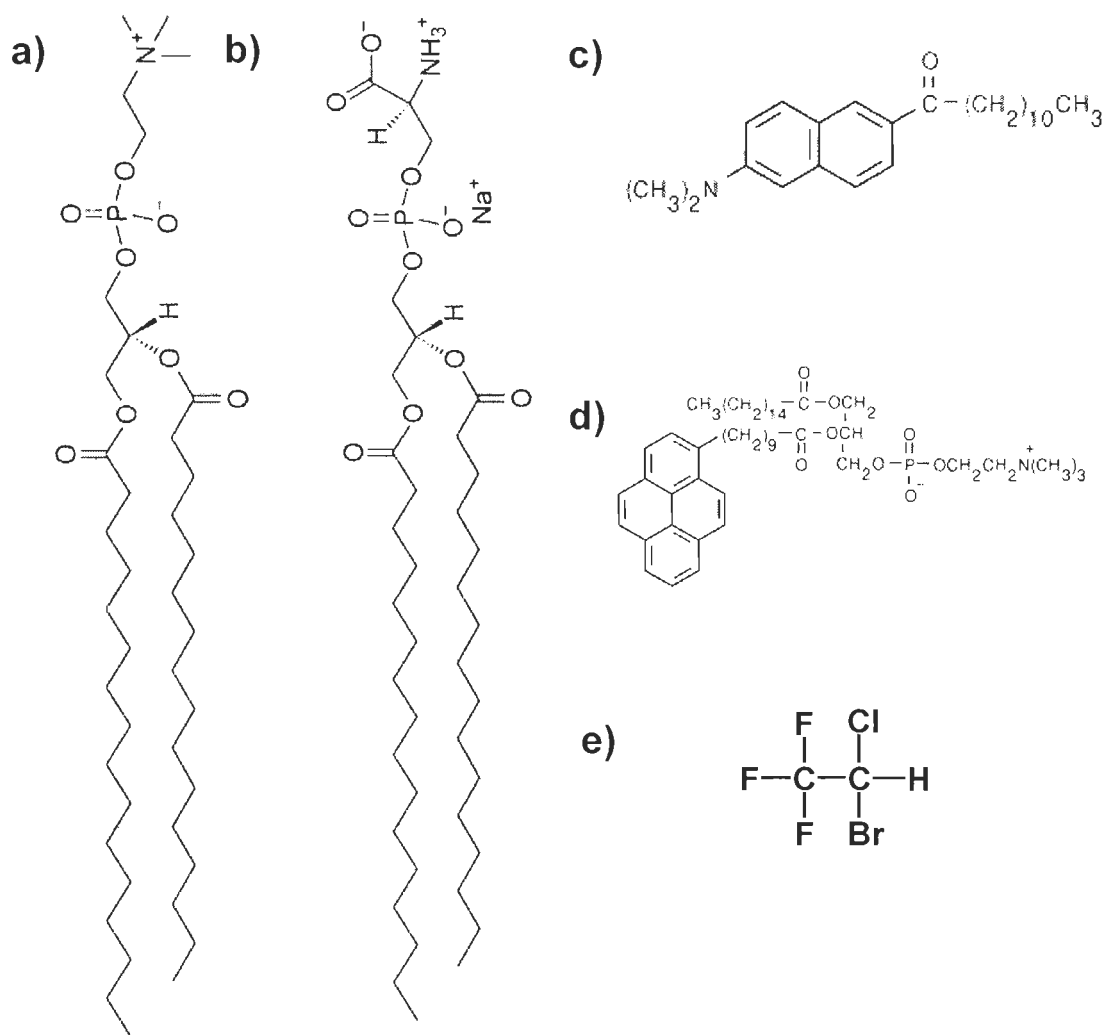


FIGURE 2.1 : Structure et formule des différents produits utilisés. a) DPPC b) DPPS. c) Laurdan. d) Py-DPPC e) (R, S) 2-Bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroethane (halothane)

2.2 Méthodes

2.2.1 Préparation des membranes pourpres

Les souches d'halobactérium sont inoculées dans un milieu de culture à haute teneur en chlorure de sodium (NaCl). Ce milieu se compose d'une solution basale de sels (Kushner) à laquelle on ajoute le citrate, le sulfate ferreux et les peptones :

☛ Solution basale de sels (Kushner)

- | | | |
|---|------|-----|
| • NaCl | 25% | p/v |
| • KCl | 0.2% | p/v |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 2% | p/v |

☛ Milieu de culture (préparé dans la solution basale)

- | | | |
|--|------|-----|
| • Na•Citrate• $2\text{H}_2\text{O}$ | 0.3% | p/v |
| • Sulfate ferreux
(0.5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 10 mL H_2O avec 2-3 HCl 1N) | 0.1% | v/v |
| • Oxoid peptone (bacteriological peptone) | 1% | p/v |
| • Le pH est ajusté entre 6.5 et 7 avec du NaOH ou du HCl | | |

2.2.1.1 Culture des bactéries

Un erlenmeyer de 4000 mL contenant 1200 mL de milieu de culture est inoculé avec une colonie pourpre présélectionnée sur géloses ensemencées à 39°C. La croissance s'effectue pendant 3-4 jours, ou jusqu'à l'obtention d'une quantité appréciable de bactéries, dans un incubateur (New Brunswick Scientific Co. Inc., modèle Psycrotemp) muni d'une agitation mécanique réglé à 180 rpm et une température de 37°C. Par la suite, les bactéries sont réensemencées

dans 6 erlenmeyers de 4000 mL contenant 1600 mL de milieu de culture à 37°C. La croissance se poursuit pendant 4-6 jours, jusqu'à la fin de la phase de croissance exponentielle. À ce moment, les conditions de culture sont modifiées afin d'induire la synthèse de membrane pourpre par les bactéries. L'agitation est réduite à 90 rpm afin de réduire l'oxygénation du milieu, et les cultures sont exposées à 256 watts d'éclairage fluorescent pendant 3-4 jours. Lorsqu'à l'analyse visuelle, la quantité de membrane pourpre semble suffisante, on récolte les bactéries.

2.2.1.2 Récolte des bactéries

Les suspensions bactériennes obtenues précédemment sont centrifugées (10 000 g) pendant 10 minutes à 4°C et lavées plusieurs fois dans la solution basale de sels afin d'éliminer le milieu de culture restant. Les bactéries fraîches sont ensuite pesées, resuspendues mécaniquement avec 400 mL de solution basale, et 10 mg d'ADNase sont ajoutés. L'agitation se poursuit à l'obscurité pendant 1 heure et la suspension est alors dialysée pendant 16 heures à 4°C contre de l'eau distillée. La lyse cellulaire s'effectue, libérant ainsi des fragments de membranes de grandeurs variables.

2.2.1.3 Purification des membranes pourpres

Afin d'isoler les fragments de membrane pourpre, le dialysat obtenu précédemment est centrifugé à 10 000 g pendant 30 minutes. Le culot contient les débris cellulaires et le surnageant est constitué de la fraction membranaire des cellules. Le surnageant est ensuite centrifugé à 50 000 g pendant 90 minutes. Ceci permet de séparer la membrane pourpre des autres fragments, notamment ceux dits de membrane rouge, contenant une quantité importante de caroténoïdes. Le culot obtenu est constitué principalement de membrane pourpre et la membrane rouge se retrouve dans le surnageant. Le culot de membrane pourpre est resuspendu dans l'eau distillée et recentrifugé à

50 000 g durant 90 minutes. Cette dernière étape est répétée plusieurs fois, jusqu'à obtention d'un surnageant incolore.

Toutefois, à la membrane pourpre obtenue précédemment est accolée de la membrane rouge contaminante. Pour séparer la membrane pourpre de la membrane rouge, le culot est déposé sur un gradient discontinu de sucrose : 21 mL à 1,3 M et 7 mL à 1,5 M de sucrose. On effectue ensuite une ultracentrifugation de 48 heures à 260 000 g. La membrane pourpre se concentre à l'interface du gradient, entre 1.3 M et 1.5 M, tandis que la membrane rouge se retrouve dans la couche contenant 1,3 M de sucrose. La membrane pourpre est recueillie et dialysée pendant 16 heures contre de l'eau distillée. Le dialysat est centrifugé à 500 000 g durant 90 minutes et la membrane pourpre est resuspendue dans la solution basale de sel pour la conservation (0-2 ans), ou dans le tampon approprié pour l'expérimentation. La concentration de bR est évaluée en utilisant un coefficient d'extinction de $63\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 568 nm [128].

2.2.1.4 Délipidation partielle et totale de la membrane pourpre

La délipidation partielle de la bR est effectuée selon la méthode décrite par Szundi et Stoeckenius [129]. Cette méthode enlève 75 % des lipides natifs phosphatés de la bR et, selon les mesures de dichroïsme circulaire et les résultats de sédimentation, la membrane pourpre conserve son intégrité. Dans ces conditions, la bR partiellement délipidée affiche un déplacement du spectre vers le bleu de 6 nm ($\epsilon_{562} = 60\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [130]. Brièvement, 50 mM de CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate) sont ajoutés à un échantillon de membrane pourpre native et la réaction se poursuit pendant 12 heures à l'obscurité. Par la suite, l'excès de détergent est éliminé par triple centrifugation et lavage dans le tampon approprié et la concentration est ajustée pour la prise de mesures.

La solubilisation complète (monomérisation) de la bR est réalisée à l'aide de Triton X-100 réduit. La forme réduite du Triton X-100 est choisie car l'anneau benzénique du Triton X-100 possède des propriétés d'absorption et de fluorescence UV qui chevauchent celles des protéines (260-280 nm), alors que dans sa forme réduite, le cycle benzénique du Triton X-100 est réduit en un cyclohexane, rendant ce détergent utilisable dans l'étude de la fluorescence UV des protéines en solution [131]. La solubilisation est réalisée en ajoutant 10 mM de Triton X-100 réduit à la membrane pourpre native. On laisse l'échantillon s'équilibrer à la noirceur durant la nuit. La monomérisation est jugée complète lorsque la bactériorhodopsine adaptée à la lumière absorbant à 568 nm ($\epsilon_{568} = 63\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) est transformée en une espèce dont le λ_{max} se déplace vers 555 nm ($\epsilon_{555} = 58\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [132]. L'excès de détergent est éliminé par une dialyse de 24 heures avec le tampon approprié et la concentration est ajustée pour la prise de mesures.

2.2.2 Préparation des vésicules lipidiques

Les vésicules peuvent être préparées à partir d'une grande variété de lipides; les phospholipides sont les plus couramment employés. Pour la préparation des vésicules, il est nécessaire de tenir compte de la température de transition de phase des lipides utilisés. Dans le cas qui nous intéresse, le DPPC possède une température de transition de gel à fluide de 41°C [133, 134]. Pour ce qui est du mélange DPPC/DPPS, la température de transition principale est à environ 47°C pour un mélange 1:1 à pH neutre [120, 135].

Les vésicules unilamellaires de lipides sont préparées par la méthode d'extrusion à l'aide d'un Mini-ExtruderTM couplé à un bloc chauffant de chez Avanti. Des filtres de polycarbonate (Nucléopore) de 0,1 μm (100 nm) de diamètre de pores ont été utilisés. Les solutions de lipides hydratés forment initialement des vésicules multilamellaires (MLV) (figure 2.2a). Après quelques extrusions à 55°C, la distribution des particules affiche une distribution

bimodale. Un minimum de onze passages est recommandé pour obtenir une distribution uniforme pour la plupart des lipides [136] (figure 2.2b). Plus de treize passages sur les filtres ont été effectués, afin de s'assurer d'avoir une population de vésicules homogène en taille et d'environ 100 nm de diamètre.

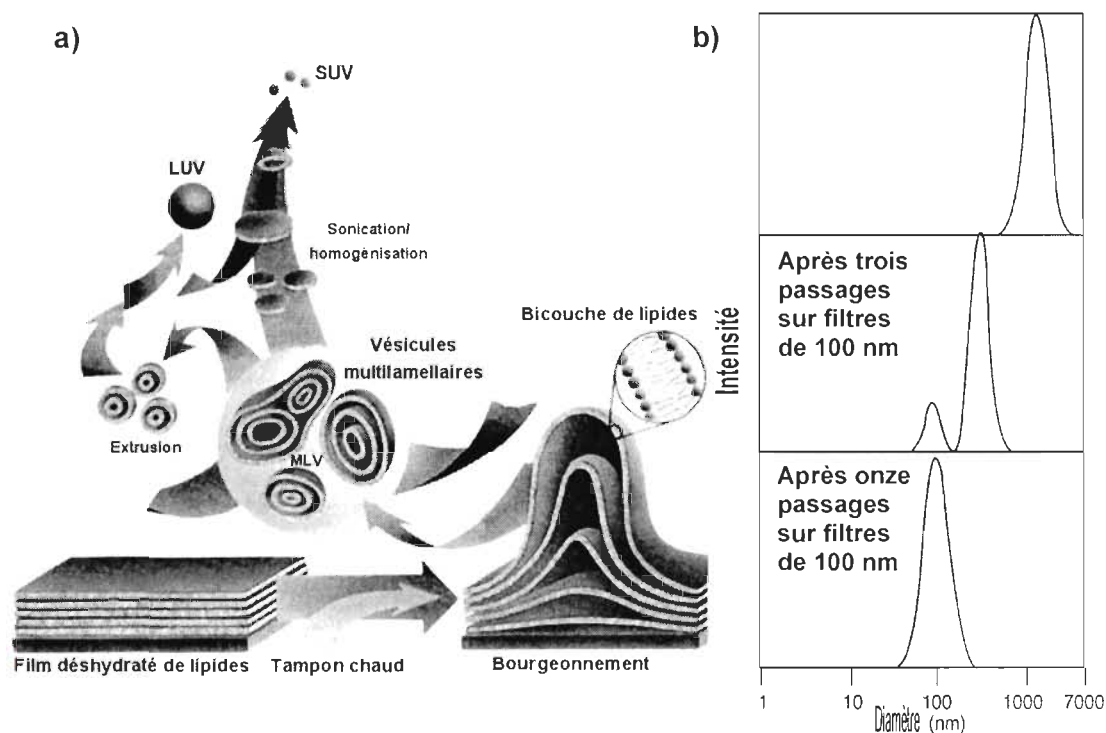


FIGURE 2.2 : Préparation des vésicules. a) Mécanisme de formation des vésicules. b) Distribution de la taille des LUVs obtenues par extrusion sur filtre de 100 nm. Les données sont obtenues par diffusion quasi-élastique de la lumière à l'aide d'un appareil Coulter N4 Plus et d'une solution de DPPC (25 mg.mL^{-1}) dans l'eau distillée.

Les vésicules ont été préparées afin d'obtenir une concentration finale de lipides de 10 mM, avec un rapport molaire lipides/sondes fluorescentes de 1:1000. Leur préparation a été faite à partir de solutions mères de lipides dissous dans le chloroforme; soit $73,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ pour le DPPC et 2 mg.mL^{-1} pour le DPPS. De la même manière, les sondes fluorescentes étaient ajoutées à partir de solutions mères de Laurdan dans l'éthanol ($5,66 \times 10^{-4} \text{ M}$) et de Py-DPPC dans le chloroforme (1 mg/5mL). Un tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique)) 10 mM, contenant 50 mM de KCl et ajusté à un pH de 7.4 a été utilisé lors de toutes les expériences.

Préparation des suspensions de vésicules :

1. Le volume de lipides (DPPC et/ou DPPS) nécessaire est introduit dans un ballon de 50 mL, de manière à obtenir 10 mL de suspension de vésicules à une concentration totale de lipides de 10 mM. Les sondes fluorescentes (Laurdan, Py-DPPC) sont ajoutées dans une proportion lipides : sondes de 1000:1. Ensuite, 4 mL de chloroforme sont ajoutés et la solution est agitée.
2. Le chloroforme est évaporé à température ambiante dans un évaporateur rotatif sous jet d'azote, jusqu'à l'obtention d'un film lipidique au fond du ballon.
3. Le film est resuspendu dans 10 mL de tampon à 55°C (ou au dessus de la température de transition de phase des lipides) par agitation mécanique. On obtient ainsi une suspension lipidique opaque et blanchâtre qui contient de grosses vésicules multilamellaires (MLV). (figure 2.2a)

4. La suspension obtenue précédemment est extrudée successivement sur des filtres de polycarbonate de diamètre de pores égal à 1, 0,4 et 0,1 μm . L'extrusion est effectuée sur un bloc chauffant maintenu à 55°C.
5. Cette méthode donne 10 mL de vésicules à une concentration moyenne de 9,65 mM, tel que vérifié par dosage par hydrolyse acide du PO_4^{3-} [137]. La concentration finale en lipide est ajustée par dilution dans le tampon approprié selon l'expérience.

2.3 Techniques et montages

L'utilisation de molécules très volatiles comme l'halothane, nécessite la mise au point de montages et d'équipements hermétiques. Afin de minimiser l'évaporation de l'anesthésique et son partitionnement avec l'air, nous avons évité de laisser des volumes morts dans les cuvettes, en remplissant celles-ci au maximum de leur capacité. De plus, une obturation adéquate de l'ouverture est obtenue grâce à l'utilisation d'un bouchon de téflon muni d'un barillet et d'un septum pour l'insertion de la seringue Hamilton. Toutes les expériences en spectroscopie UV-visible et de fluorescence ont été faites avec la même cuvette de quartz et avec exactement le même volume d'échantillon (3 mL), afin de maintenir constant le volume d'air dans les échantillons.

Par ailleurs, l'halothane pur a une densité élevée (1,87 g/mL) et il n'est pas assez polaire pour se mélanger facilement à l'eau. En effet, lors de l'ajout d'une petite goutte d'halothane à 10 mL d'eau, on voit immédiatement la goutte d'halothane sombrer au fond du volume d'eau, sa solubilisation nécessite une agitation manuelle vigoureuse et ne nous assure pas que la répartition de l'anesthésique dans toutes les phases de l'échantillon (air, eau, membrane, protéine) soit réalisée au moment de prendre des mesures. C'est un problème rencontré par tous ceux qui travaillent avec cette molécule. Pour pallier cet inconvénient, nous avons effectué l'ajout d'anesthésique à nos échantillons en

perfusant lentement des volumes croissant d'une solution éthanolique d'halothane (5% v/v). La perfusion de la solution éthanolique d'anesthésique s'effectue grâce à un micro-injecteur Harvard Pump 11 Plus et d'une seringue de précision Hamilton Gastight® de 250 μ L. Le dispositif permet un débit d'injection aussi faible que 20 μ L/heure pendant 12,5 heures tout en maintenant une agitation continue à l'aide d'un micro-agitateur magnétique (Hellma Cuv-O-Stir modèle 333) qui permet la mesure simultanée de spectres d'absorption ou d'émission en cours d'injection de l'anesthésique. Cette manière de procéder nous assure qu'à tout moment en cours d'addition de l'anesthésique, le système est à l'équilibre, du moins, en autant qu'on puisse en juger par les paramètres que nous enregistrons. Ce ne doit pas être le cas des systèmes où l'anesthésique est ajouté puis dispersé par agitation manuelle vigoureuse car lorsque nous utilisons cette procédure, les paramètres observés (par exemple l'évolution d'une spectre en fonction de la concentration d'anesthésique) continuaient à se modifier pendant plusieurs dizaines de minutes après l'addition d'anesthésique alors que si l'ajout d'anesthésique est fait par la méthode de perfusion, l'évolution des paramètres cesse dès l'arrêt de l'injecteur.

Dans les mesures impliquant de la membrane pourpre, les mêmes préparations (natives, délipidées partiellement et solubilisées) étaient utilisées pour les mesures d'absorption et de fluorescence. Dans celles impliquant des vésicules, les différentes concentrations (dilutions) étaient préparées à partir de la même préparation de vésicules

2.3.1 Préparation des films de membranes pourpres

Pour réaliser les films de membranes pourpres, 250 μ L de MP de densité optique (D.O.) égale à 0,5, préalablement incubée dans un tampon phosphate 0,5 mM, contenant 1 mM de KCl, ajusté à un pH égal à 7,5 et composé d'eau lourde (D_2O) ou normale (H_2O), sont centrifugés à 50 000 g et resuspendus dans l'eau pure (H_2O ou D_2O). Cette opération est répétée deux fois et le culot

est finalement resuspendu dans 30 μL d'eau pure (H_2O ou D_2O), déposé sous forme de goutte au centre d'une fenêtre circulaire de BaF_2 et laissé à sécher pour la nuit à température ambiante dans un pétri de verre muni d'un couvercle, en présence d'un petit volume d'eau (H_2O ou D_2O). Par la suite, le film solide mais hydraté est monté sur le porte échantillon étanche (figure 2.3) pour la prise des mesures en spectroscopie UV-visible et FTIR.

2.3.2 Spectroscopie FTIR

Les spectres infrarouges ont été acquis sur un spectrophotomètre FTIR Perkin Elmer Spectrum 2000 muni d'un séparateur de faisceau de KBr, d'un détecteur MCT (Mercure-Cadmium-Tellure) refroidi à l'azote liquide et d'un système de chambre à vide. Les spectres proviennent de l'acquisition de 200 interférogrammes à une résolution de 2 cm^{-1} .

2.3.3 Spectroscopie UV-visible

Les mesures de densité optique (D.O.) de la bR ont été réalisées avec un spectrophotomètre à réseau de diodes Hewlett Packard 8452A, à l'aide du logiciel UV-Vis Chemstation (Agilent). Les spectres ont été enregistrés entre 190 nm et 820 nm à toute les 15 minutes et furent corrigés pour la dilution et la ligne de base. La concentration de la bR est évaluée selon la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon bc \quad (\text{Équation 2.1})$$

où A correspond à l'absorbance (D.O.), ϵ est le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde maximum (λ_{max}), et b est le trajet optique parcouru par la lumière à travers l'échantillon (1 cm). On peut ainsi déduire c , la concentration de la bR. La membrane pourpre native affiche un coefficient d'extinction molaire (ϵ_{570}) de $63\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 568 nm.

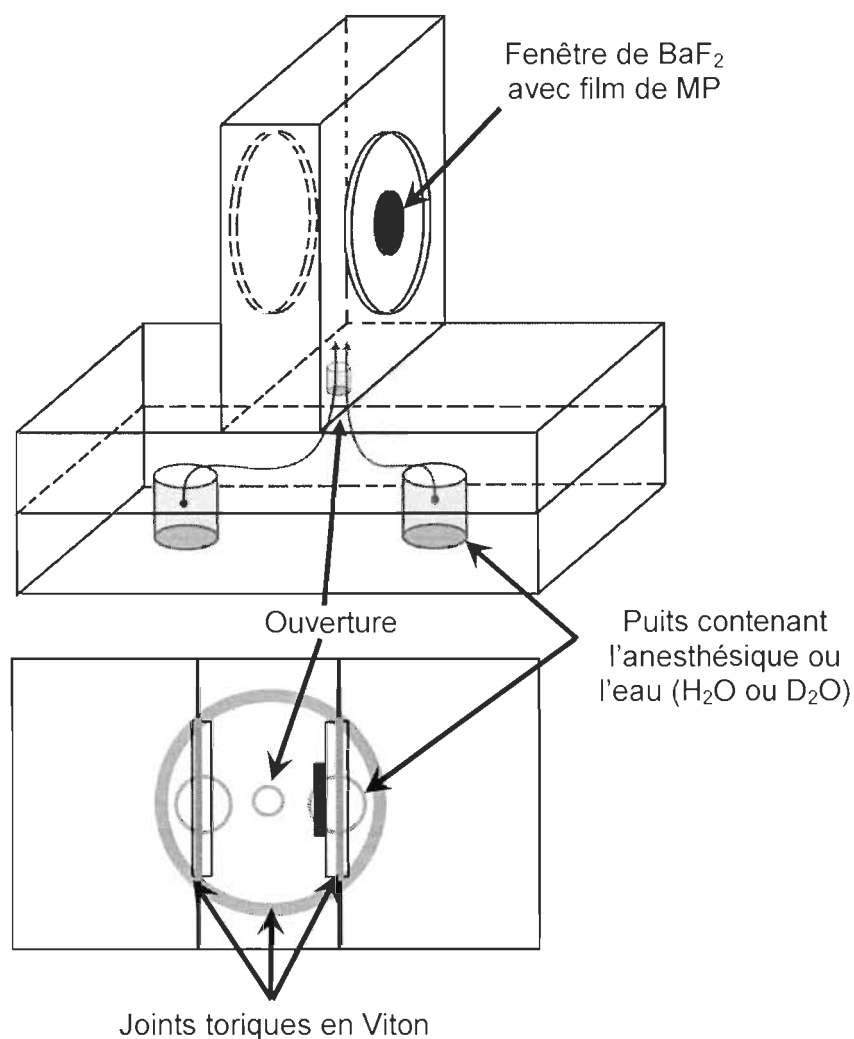


FIGURE 2.3 : Porte-échantillon étanche pour la prise des mesures en spectroscopie UV-visible et FTIR. Le film solide de membrane pourpre contenu sur la fenêtre de BaF₂ est fixé face vers l'intérieur sur le porte-échantillon. Une seconde fenêtre de BaF₂ est installée vis-à-vis, créant ainsi une chambre étanche. 250 µL d'eau (H₂O ou D₂O) sont introduits dans un des puits et 50 µL d'anesthésique (halothane) sont ajoutés dans le second puits. Le montage est placé dans l'axe de propagation de la source (UV-Visible ou IR).

2.3.4 Fluorométrie

Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec un spectrofluorimètre Cary Eclipse (Varian) muni d'un support à cuvette dont la température est contrôlée par effet thermoélectrique (Peltier) et d'un agitateur magnétique. Les fentes à l'émission et à l'excitation étaient réglées à 5 nm et la vitesse de balayage était de 10 nm.s⁻¹.

La longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) employée lors des mesures de quenching de fluorescence de la membrane pourpre était de 280 nm. La fluorescence était enregistrée entre 290 nm et 420 nm. Les spectres ont été enregistrés toutes les 15 minutes et ont été corrigés pour le tampon.

Les mesures de quenching de fluorescence du Laurdan ont été prises entre 400 nm et 600 nm, avec une longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) de 390 nm. La longueur d'onde d'excitation utilisée pour le Py-DPPC était fixée à 345 nm et l'émission était enregistrée entre 360 et 475 nm.

2.3.4.1 Mécanisme de quenching et traitement des données

L'atténuation de la fluorescence (quenching) est un outil efficace pour étudier l'accessibilité d'un quancheur à un fluorophore. La théorie sous-jacente aux mesures de fluorescence et du quenching de fluorescence est décrite dans la plupart des ouvrages sur le sujet. Celui de Joseph Lakowicz a été utilisé ici [138].

La relation qui décrit l'atténuation (quenching) de la fluorescence est définie par l'équation de Stern-Volmer :

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

où F et τ sont respectivement le rendement quantique et le temps de vie de fluorescence en absence (F_0) et en présence (F) de quenchneur, z est la concentration de quenchneur et K_{SV} est la constante de quenching de Stern-Volmer. La constante K_{SV} résulte du produit de la constante apparente de quenching dynamique (k_q) et du temps de vie en absence de quenchneur (τ_0) :

$$K_{SV} = k_q \tau_0 \quad (\text{Équation 2.3})$$

Le quenching de fluorescence dans les bicouches lipidiques est contrôlé par le degré de partitionnement du quenchneur dans la sous-phase hydrocarbonée, et par la diffusion de ce quenchneur dans cette sous-phase. Les quenchneurs apolaires (hydrophobes) se partitionnent de manière favorable dans les membranes, augmentant ainsi leur efficacité de quenchneur. Dans le cas où un fluorophore est situé dans une membrane (phase lipidique) et que le quenchneur s'associe et atténue la fluorescence dans la phase lipidique, alors une forme modifiée de l'équation de Stern-Volmer doit être utilisée. Dans un modèle de partition, la distribution du quenchneur entre la phase lipidique et la phase aqueuse est donnée par le coefficient de partition K_P selon :

$$K_P = \frac{[Q_L]}{[Q_A]} \quad (\text{Équation 2.4})$$

où $[Q_L]$ et $[Q_A]$ sont les concentrations de quenchneur dans la phase lipidique et aqueuse, respectivement. Ainsi, selon la loi de conservation des masses :

$$[Q_T]V_T = [Q_L]V_L + [Q_A]V_A \quad (\text{Équation 2.5})$$

où $[Q_T]$ est la concentration totale de quenchneur, V_L et V_A sont les volumes de la phase lipidique et aqueuse, et V_T est le volume total.

En remplaçant $[Q_A]$ par $[Q_L]/K_P$ dans l'équation 2.5 et en isolant $[Q_L]$, on obtient :

$$[Q_L] = \frac{K_P [Q_T]}{1 + K_P V_L/V_T - V_L/V_T} \quad (\text{Équation 2.6})$$

En définissant la fraction volumique de la phase lipidique comme étant :

$$\alpha = V_L/V_T \quad (\text{Équation 2.7})$$

On obtient :

$$[Q_L] = \frac{K_P [Q_T]}{1 + K_P \alpha - \alpha} \quad (\text{Équation 2.8})$$

En remplaçant $[Q_L]$ dans l'équation 2.2 :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + \frac{K_M K_P [Q_T]}{1 + K_P \alpha - \alpha} \quad (\text{Équation 2.9})$$

où K_M est la constante de quenching des fluorophores dans la membrane.

À n'importe quelle concentration, K_M , K_P et α sont constantes. On peut donc définir une constante apparente de quenching (k_{app}) comme étant :

$$k_{app} = \frac{K_M K_P}{1 + K_P \alpha - \alpha} \quad (\text{Équation 2.10})$$

Ainsi :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{app} [Q_T] \quad (\text{Équation 2.11})$$

En portant en graphique F_0/F en fonction de $[Q_T]$, on peut déterminer k_{app} par régression linéaire. En évaluant le k_{app} pour différentes concentrations de lipides, c'est à dire pour différentes fractions volumiques de lipides (α), on peut évaluer le K_P et le K_M en traçant le graphique de $1/k_{app}$ en fonction de α ou V_L/V_T , selon :

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{1 + K_P \alpha - \alpha}{K_M K_P} = \left(\frac{1}{K_M} - \frac{1}{K_M K_P} \right) \alpha + \frac{1}{K_M K_P} \quad (\text{Équation 2.12})$$

Ainsi, la pente (m) et l'ordonnée à l'origine (b) de la droite seront égales à :

$$Pente (m) = \left(\frac{1}{K_M} - \frac{1}{K_M K_P} \right) \quad (\text{Équation 2.13})$$

$$Ordonnée (b) = \frac{1}{K_M K_P}$$

Donc :

$$K_P = \frac{m}{b} + 1 \quad \text{et} \quad \frac{1}{K_M} = m + b \quad (\text{Équation 2.14})$$

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Mise au point des mesures à l'équilibre et choix de l'halothane comme anesthésique général

L'utilisation d'anesthésiques généraux volatils rend les mesures et la détermination de leur concentration dans l'échantillon difficile. De plus, l'halothane étant peu soluble dans l'eau, nous avons décidé d'utiliser des solutions d'halothane dissous dans l'éthanol, ainsi que de minimiser le volume d'air dans les cuvettes. Contrairement à certains auteurs travaillant à saturation [107, 139], les mesures ont été faites durant plus de 12 heures, par perfusion lente et hermétique de l'anesthésique dans les échantillons de membrane pourpre, ou de vésicules de DPPC. Cela nous permet d'obtenir des mesures à l'équilibre où on connaît de façon précise, à n'importe quel état d'avancement de l'expérience, la concentration d'anesthésique dans l'échantillon. Ceci permet de distinguer avec exactitude les différents modes lors de la transition de la bR et d'évaluer avec plus de précision les concentrations réelles d'AG se partitionnant dans les membranes.

Par ailleurs, l'halothane fut choisi pour des raisons spectroscopiques plutôt que physiologiques. Plusieurs autres anesthésiques généraux ont été testés auparavant sur la bactériorhodopsine, ainsi que sur les vésicules de DPPC. Notamment : l'enflurane, le bromoforme, l'isoflurane, voire même des anesthésiques locaux comme la dibucaïne, tétracaïne, et plusieurs solvants organiques comme l'acétone, l'éther, le chloroforme et plusieurs alcools [37, 140, 141]. Nous avons choisi l'halothane car des mesures de quenching de fluorescence nécessitaient la présence d'un atome lourd comme le brome (Br) comme quencheur potentiel. De plus, contrairement aux anesthésiques généraux composés d'éthers halogénés (enflurane, isoflurane), l'halothane est

plus puissant et il permet d'induire la forme 380 de la bR. C'est pour ces raisons que nous avons utilisé cet anesthésique.

3.2 Premier modèle : la bactériorhodopsine (bR)

Dans le cas de la bR, les conditions d'équilibre ont permis d'obtenir des mesures précises durant la transition spectrale et, par surcroît, de définir plus exactement les différents modes tel que définis au point 1.5.4.1 de l'introduction. La figure 3.1a montre les transitions spectrales obtenues pour un échantillon de membrane pourpre native. La forme native (bR_{568}) se transforme en bR_{560} à faible concentration, avec un point isobeste à 520 nm, et graduellement vers une forme désactivée à 480 (bR_{480}), avec un point isobeste à 510 nm, au fur et à mesure de l'ajout d'halothane. La présence de points isobestes est caractéristique d'un équilibre entre deux formes spectroscopiques. À plus grande concentration d'AG, la bR_{480} est transformée en une quatrième espèce absorbant à 380 nm (bR_{380}).

Comme on peut le voir sur la figure 3.2a, le maximum d'absorption de la bR se déplace faiblement vers le bleu (effet hypsochrome de 568 à 555 nm) entre 0 et 5 mM d'halothane et constitue le mode I. Par la suite, le maximum d'absorption se déplace à 480 nm entre 6 et 21 mM (mode II). Finalement, la forme bR_{380} apparaît par la suite (mode III). En fait, la bR_{380} apparaît dès la formation de bR_{480} , mais s'accélère lorsque la bR_{568} est presque complètement transformée en bR_{480} , comme en témoigne la figure 3.2b.

Toutefois, l'éthanol étant considéré comme un anesthésique général, quoique très faible, nous avons vérifié l'effet de celui-ci sur le spectre d'absorption de la bR. Comme on peut le voir sur la figure 3.1b, l'ajout d'un volume de 250 μ L d'éthanol à 3 mL d'un échantillon de MP native n'a d'autre effet que celui de la dilution de l'échantillon. En fait, l'éthanol ne provoque la formation de bR_{480} qu'à partir d'une concentration de l'ordre de 17 % v/v d'éthanol, et nécessite une concentration supérieure à 33% v/v afin de déplacer l'équilibre to-

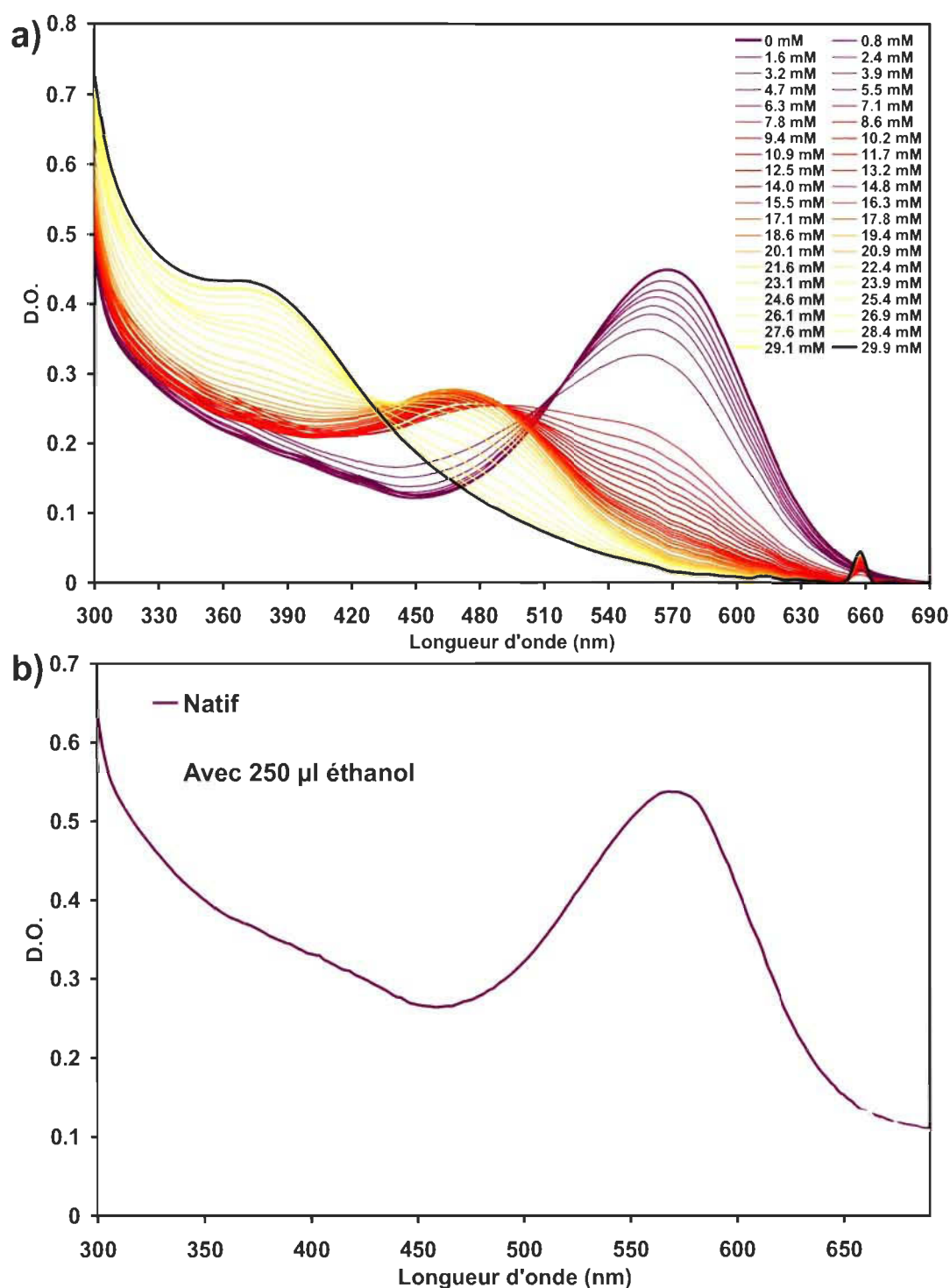


FIGURE 3.1 : Transitions spectrales de la bactériorhodopsine native et effet de l'éthanol sur la MP native. a) Transitions spectrales de la bactériorhodopsine contenu dans la membrane pourpre native, perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v. b) Effet de l'éthanol sur la MP native. Tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH 7,5. Cuvette de 3 mL avec un parcours optique de 1 cm.

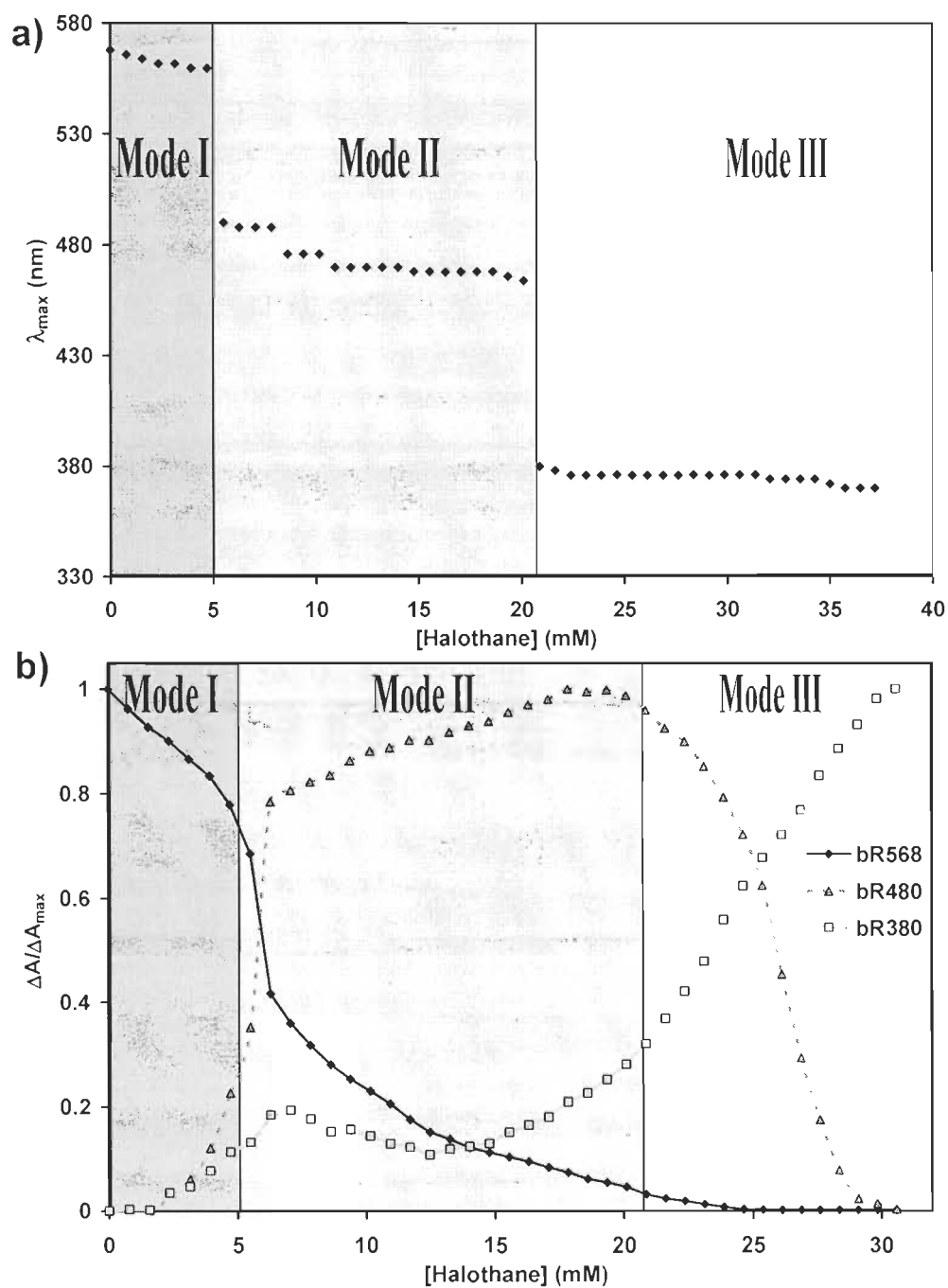


FIGURE 3.2 : Modes de transition de la bR native perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v. a) Maximum d'absorption de la membrane pourpre native dans un tampon Tris 10mM, KCl 50 mM à pH 7,5. b) Taux de changement ($\Delta A/\Delta A_{\max}$) des différentes formes de la bR.

talement vers la forme rouge [140]. Dans notre cas, nous sommes à un peu moins de 8 % v/v d'éthanol à la fin de la perfusion.

3.2.1 Étude des détergents sur la modulation de la bactériorhodopsine par les anesthésiques

Afin de comprendre l'importance des lipides lors de l'action des AG sur la membrane pourpre, nous avons vérifié si la membrane pourpre ayant subi une délipidation partielle ou une complète solubilisation affichait les mêmes transitions spectrales que la forme native.

En présence de CHAPS, environ 75% des lipides phosphatés sont extraits et la membrane pourpre affiche un déplacement du spectre vers le bleu de 6 nm ($\epsilon_{562} = 60\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [129]. Pour sa part, la solubilisation complète de la membrane pourpre est réalisée à l'aide de Triton X-100 à 10% v/v. Le processus est suivi spectroscopiquement par la transformation de la bactériorhodopsine adaptée à la lumière absorbant à 568 nm ($\epsilon_{568} = 63\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) en une espèce dont le λ_{max} se déplace vers 555 nm ($\epsilon_{555} = 58\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (figure 3.3) [132, 142]. Ce déplacement n'est pas sans rappeler celui que subit la bR native en présence d'AG dans la phase I de leur action.

Dans le cas de la membrane pourpre délipidée partiellement avec le CHAPS (figure 3.4), comme pour la membrane native, une concentration croissante d'halothane provoque l'apparition de bR₄₈₀, avec encore une fois un point isobeste à 510 nm. La bR₄₈₀ est transformée encore une fois en une forme dénaturée absorbant à 380 nm avec un autre point isobeste à 420 nm. On peut voir sur la figure 3.5 qu'il y a un petit déplacement du λ_{max} à faible concentration d'AG (mode I), mais moindre que celui observé pour les échantillons natifs.

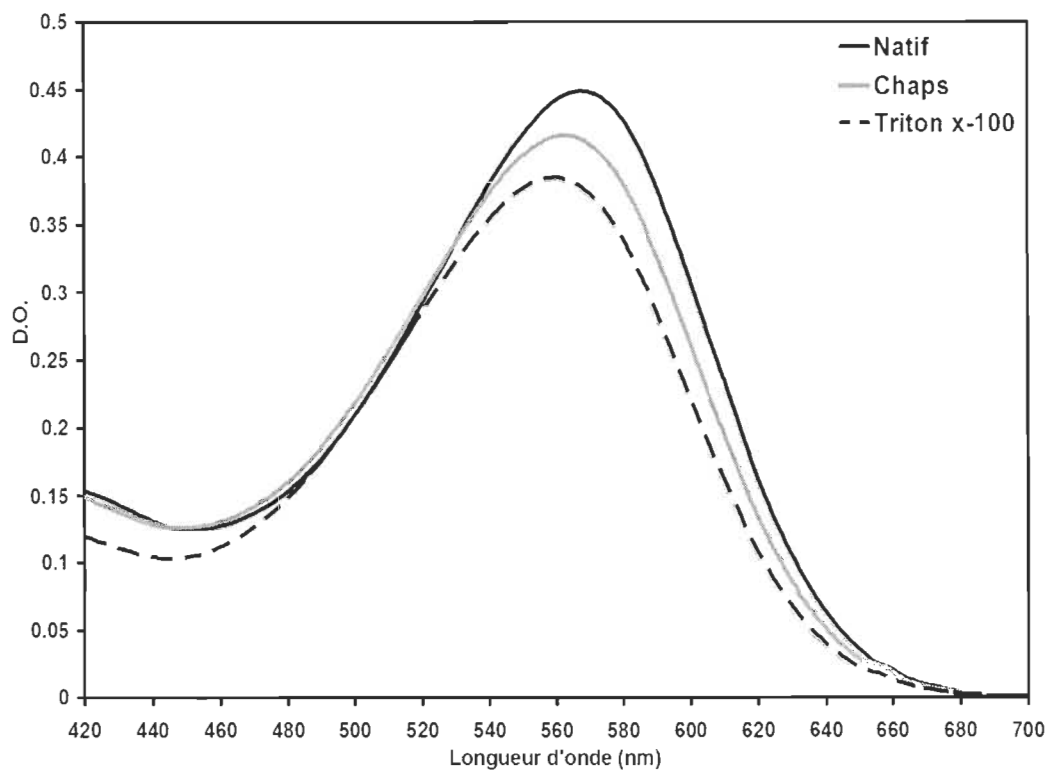


FIGURE 3.3 : Spectres d'absorption de la membrane pourpre. Spectres d'absorption de membrane pourpre native, partiellement délipidée à l'aide de CHAPS et solubilisée dans du Triton X-100 réduit. Tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH 7,5.

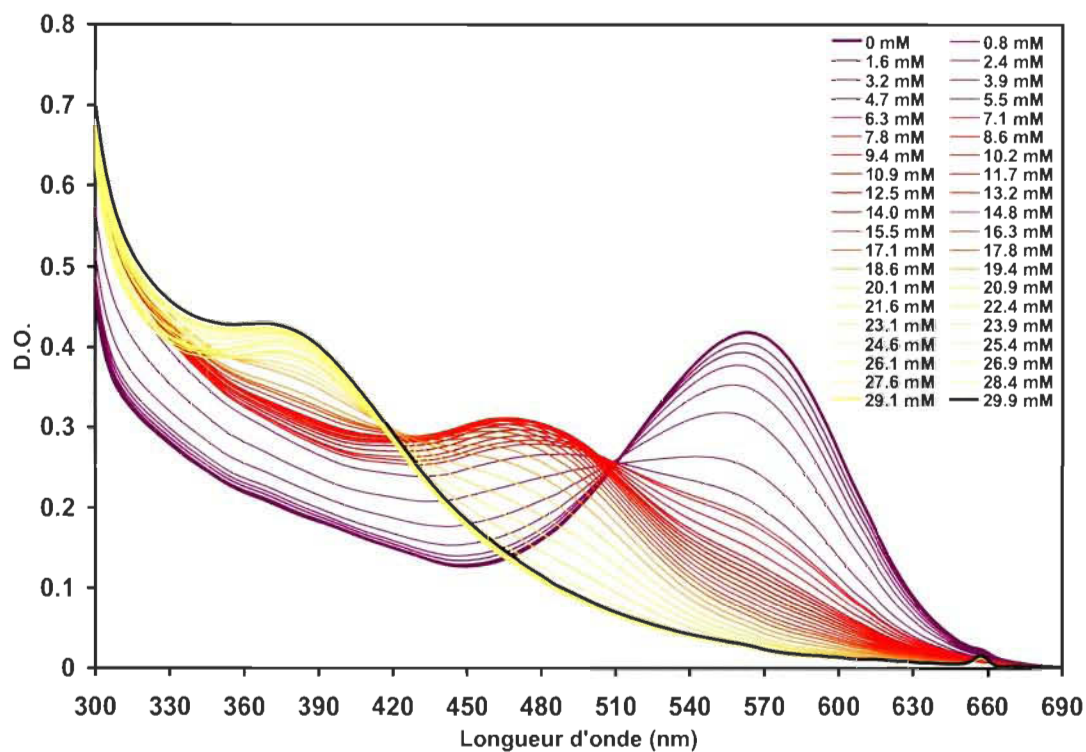


FIGURE 3.4 : Transitions spectrales de la bactériorhodopsine délipidée partiellement avec le CHAPS et perfusée à l'halothane /éthanol 5% v/v. Tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH = 7,5. Cuvette de 3 mL avec un parcours optique de 1 cm.

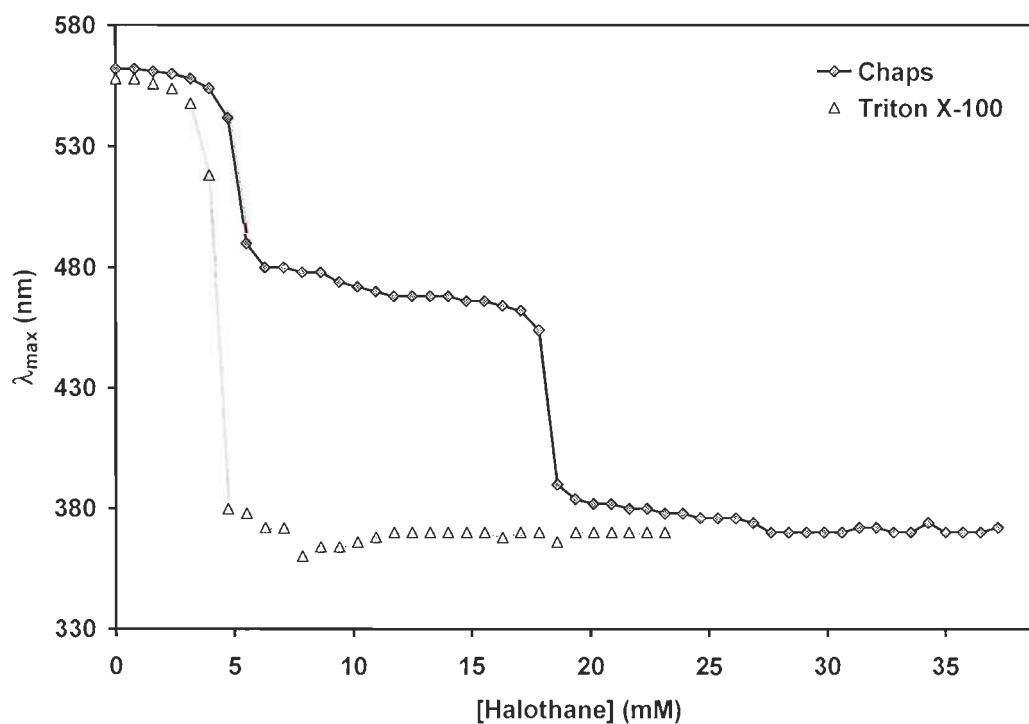


FIGURE 3.5 : Types de transition de la bR délipidée partiellement au Chaps ou solubilisée dans le Triton. Déplacement du maximum d'absorption de la membrane pourpre délipidée partiellement au Chaps ou solubilisée complètement dans le Triton perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v. Tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH 7,5.

D'autre part, dans sa forme complètement solubilisée, la bR réagit de manière très différente à l'ajout d'AG. Elle ne présente pas de forme spectrale à 480 nm, mais seulement la forme bR_{380} , associée à une structure dénaturée de la bactériorhodopsine où le rétinale se trouve libéré de la bactériopsine (figure 3.6). Cela se reflète mieux sur la figure 3.5, où on peut voir que le λ_{max} d'absorption de la bR solubilisée passe directement de 558 nm à 380 nm. Comme on peut le voir sur la figure 3.7, l'aspect coopératif de la transition est partiellement conservé mais la concentration d'AG à laquelle la bR est transformée est plus faible lorsque celle-ci est partiellement délipidée ou solubilisée.

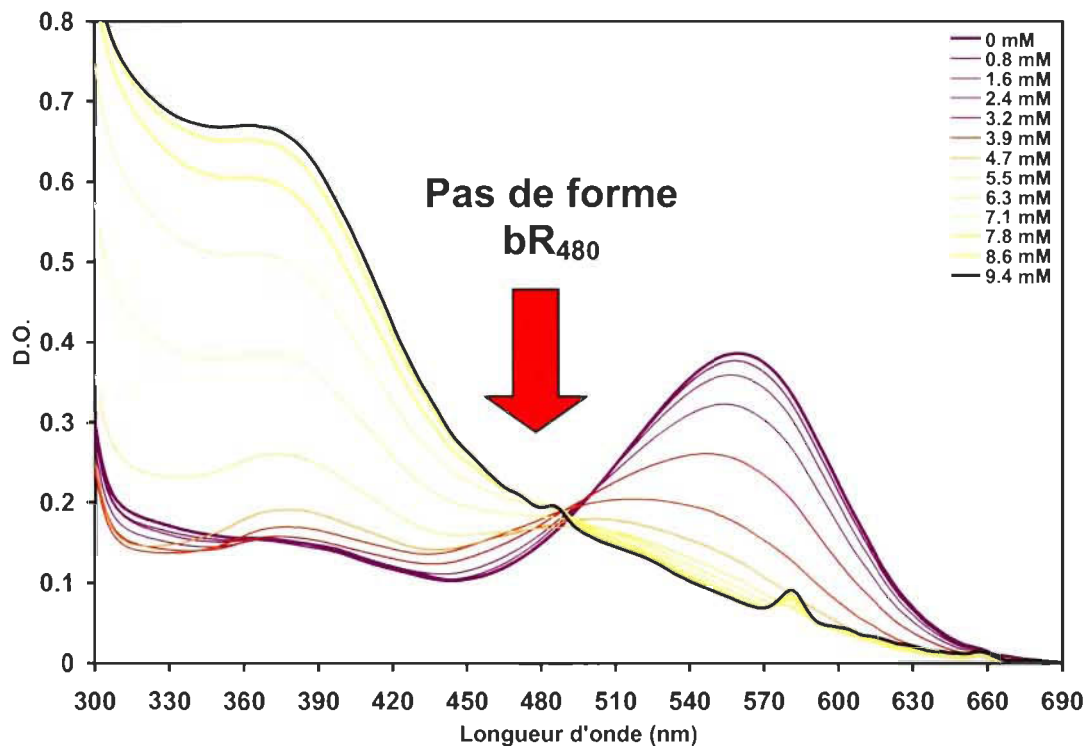


FIGURE 3.6 : Transitions spectrales de la bactériorhodopsine délipidée totalement. Transitions spectrales de la bactériorhodopsine délipidée totalement au Triton X-100 réduit, perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v. Tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH = 7,5. Cuvette de 3 mL avec un parcours optique de 1 cm.

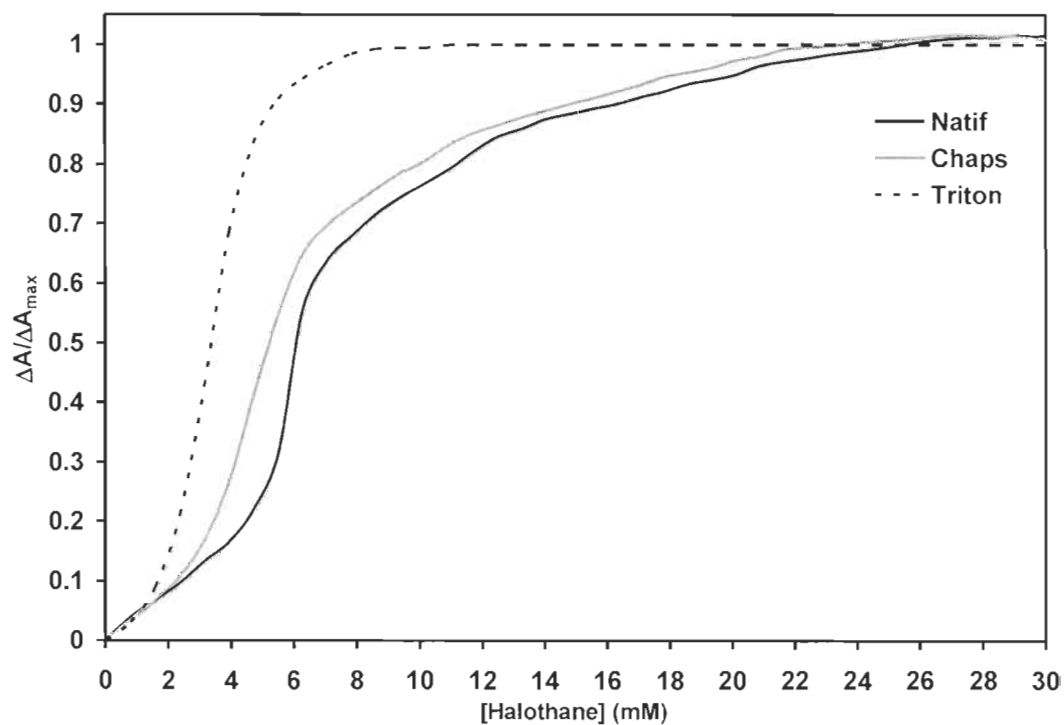


FIGURE 3.7 : Taux de changement du maximum d'absorption de la bactériorhodopsine. Taux de changement ($\Delta A / \Delta A_{\max}$) du maximum d'absorption de la bactériorhodopsine native, délipidée partiellement au Chaps et totalement au Triton X-100 réduit. Tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH = 7,5. Cuvette de 3 mL avec un parcours optique de 1 cm.

3.2.2 Conclusion préliminaire sur la délipidation

Le fait que la forme solubilisée de la bactériorhodopsine ne présente pas d'espèce spectrale à 480 nm et que l'échantillon délipidé à 75 % affiche une transition du type mode II ($bR_{565} \rightarrow bR_{480}$) en présence d'halothane, suggère que le processus par lequel la forme rouge (bR_{480}) de la bactériorhodopsine est induite, implique une action de cet AG au niveau des lipides de la membrane pourpre, ceux-ci étant d'une importance capitale pour le maintien et la formation de la membrane pourpre, ainsi que pour l'activité catalytique de la bR [78]. Par ailleurs, la seule manière autre qu'avec les AG de former l'espèce spectrale à 480 nm, est de délipider complètement la bR sans toutefois la solubiliser dans un détergent [102, 143]. La formation de bR_{480} pourrait ainsi être associée à une délipidation ou dissociation transitoire des lipides résiduels interagissant avec la bactériorhodopsine.

3.2.3 Localisation de la liaison de l'AG avec la membrane pourpre

La bR contient 8 résidus tryptophane (Trp) et 11 résidus tyrosine (Tyr) par molécule. Donc, il est possible d'utiliser la fluorescence intrinsèque de la bR dans le but de localiser la position où les AG agissent sur la protéine et provoquent la délipidation de celle-ci. De par la distribution des Trp dans la membrane, la bR possède un spectre d'émission caractéristique en fluorescence ($\lambda_{em} = 319$ nm). Selon la classification de Burstein [144, 145], son spectre se compose principalement de deux types de Trp : le type A ($\lambda_{em} \approx 307$ nm) qui est un Trp que l'on retrouve dans un environnement non-polaire et extrêmement rigide et le type I, qui se localise surtout dans un environnement polaire et rigide ($\lambda_{em} = 330$ nm) [144]. Six des huit tryptophanes de la bR se situent en périphérie et du côté extracellulaire de la protéine (figure 3.8). Les interactions entre les Trp et les lipides de la MP sont particulièrement importantes pour le maintien et la formation de la membrane [87]. Ainsi, en mettant à profit la présence d'atomes lourds que l'on retrouve sur certains AG,

on peut vérifier s'ils se fixent au voisinage des fluorophores. Le quenching de la fluorescence par le brome (Br) de l'halothane sur les échantillons utilisés précédemment peut nous fournir cette information.

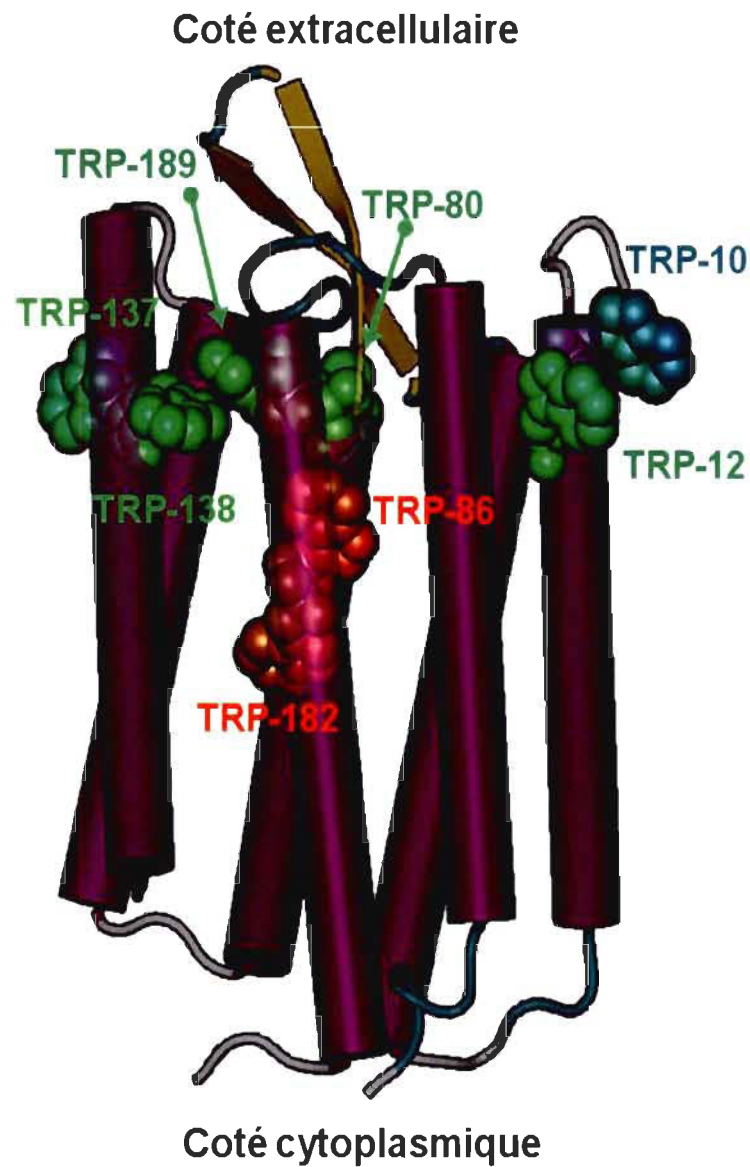


FIGURE 3.8 : Localisation des tryptophanes dans la bR. Six des huit résidus Trp de la bR se localisent en périphérie, du côté extracellulaire de la membrane pourpre. Les deux autres Trp (TRP-86 et TRP-182) se retrouvent dans le cœur de la protéine. La structure présentée provient du fichier PDB : 1C3W [82].

La figure 3.9a montre les spectres de fluorescence ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) de MP native perfusée à l'halothane. On constate d'abord que le quenching de la fluorescence de la bR est achevé à une concentration d'halothane d'environ 20 mM (figure 3.9b). À cette concentration, il n'y a que 20% de la bR₄₈₀ qui est transformée en bR₃₈₀; on comprend donc que la fluorescence ne puisse donner d'informations sur le mode III d'action de l'anesthésique. De plus, lorsqu'on compare les courbes d'absorption et de fluorescence pour l'échantillon natif, on remarque que le quenching de la fluorescence semble s'effectuer de manière simple et saturable alors que le changement de l'absorption, de par la forme sigmoïdale des courbes, est plutôt un phénomène coopératif (figure 3.9b). Autrement dit, la pénétration de l'AG dans la membrane pourpre se fait de manière saturable et les changements conformationnels de la bR se produisent de manière coopérative.

Par ailleurs, l'addition progressive d'halothane provoque un déplacement hypsochrome du maximum d'émission suggérant que les Trp davantage accessibles (en périphérie) sont quenchés plus facilement que ceux enfouis au sein de la protéine. Ce déplacement apparaît de façon plus évidente sur la figure 3.10. Ainsi, la composante à 330 nm du spectre, où les Trp se trouvent dans un environnement polaire et rigide, sont quenchés avant ceux enfouis dans la membrane, où les Trp ont un maximum d'émission à 307 nm. Ce phénomène se reflète aussi sur les graphiques de Stern-Volmer où l'on peut voir que nous avons au moins deux populations de fluorophores (figure 3.11). En séparant la courbe en deux et en traitant chaque intervalle de concentration, on peut déterminer des constantes de Stern-Volmer pour les deux populations apparentes de Trp. Les valeurs obtenues pour les deux populations de Trp sont $0,254 \text{ mM}^{-1}$ et $8,6 \text{ mM}^{-1}$. Elles indiquent normalement que l'anesthésique pénètre d'abord en surface de la protéine ($K_{\text{sv}} = 0,254 \text{ mM}^{-1}$) pour atteindre finalement les Trp au cœur de la protéine ($K_{\text{sv}} = 8,6 \text{ mM}^{-1}$).

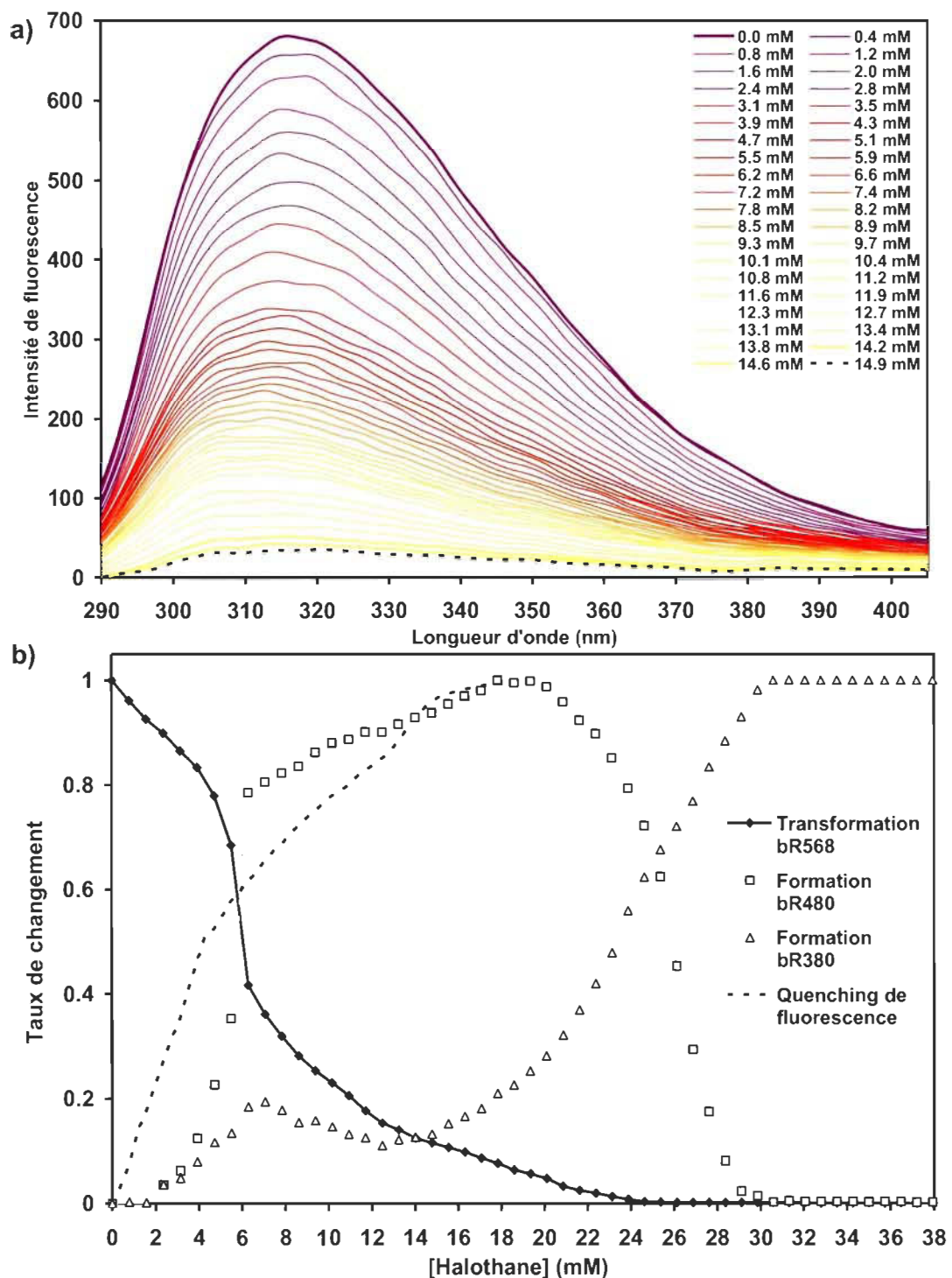


FIGURE 3.9 : Quenching de fluorescence de la bactériorhodopsine native perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v. A) Spectres de fluorescence pour la bR native. B) Taux de changement ($\Delta A/\Delta A_{\max}$ ou $\Delta F/\Delta F_{\max}$) de fluorescence et d'absorption pour la bR native.

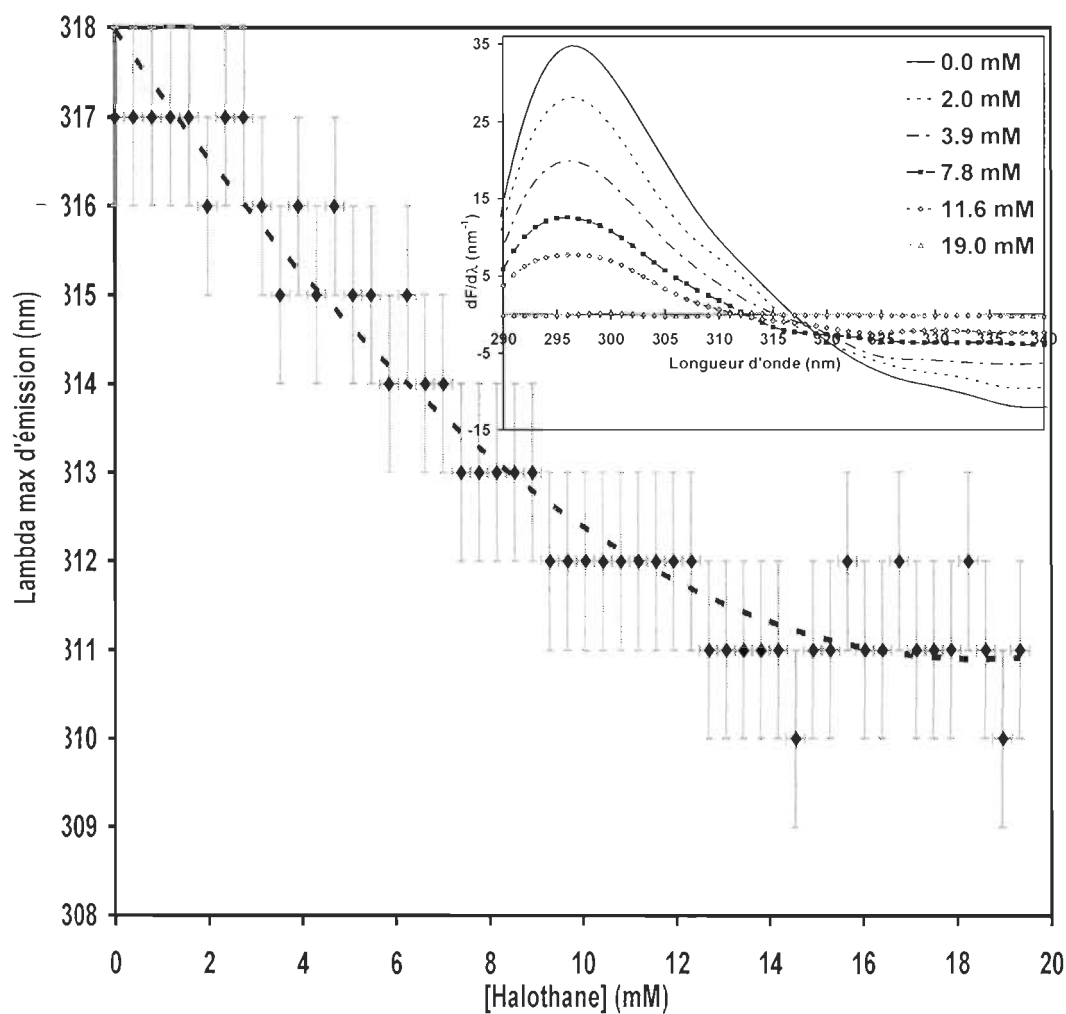


FIGURE 3.10 : Déplacement du maximum d'émission de fluorescence de la bR native lors de la perfusion à l'halothane/éthanol 5% v/v. L'encart montre l'évolution de la dérivée première ($dF/d\lambda$) des spectres entre 0 et 19 mM d'halothane.

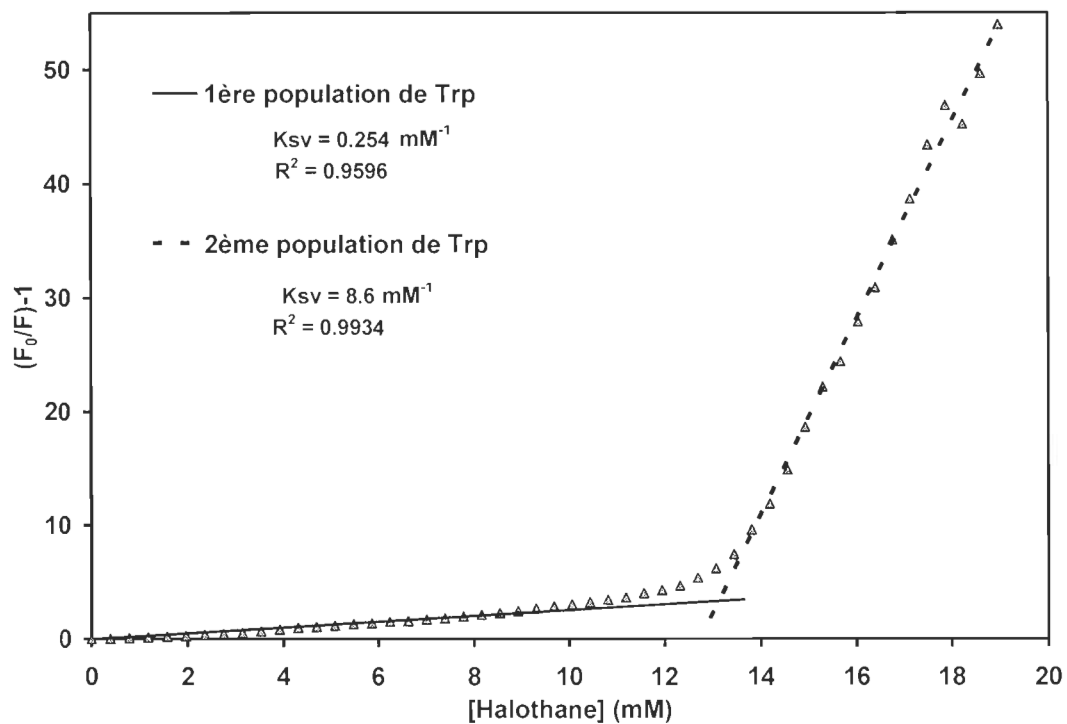


FIGURE 3.11 : Graphique de Stern-Volmer du quenching de la bactériorhodopsine native. Tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH = 7,5. Cuvette de 3 mL avec un parcours optique de 1 cm. Perfusion avec halothane/éthanol 5% v/v.

À ce point, certaines précisions s'imposent puisqu'on s'attend à ce que les fluorophores les plus difficiles d'accès présentent des constantes de Stern-Volmer plus petites que les fluorophores les plus accessibles. Or c'est le contraire qu'indique la figure 3.11. Par ailleurs, on peut tout aussi bien imaginer que les Trp localisés au centre de la bR, près du rétinale, ne deviennent facilement accessibles qu'après que l'anesthésique ait considérablement modifié la structure de la protéine, d'où l'apparition d'un K_{sv} supérieur vers la fin du quenching.

Dans un cas comme dans l'autre, nous ne croyons pas qu'il soit possible de donner une interprétation quantitative au quenching de la deuxième population de Trp. En effet, une appréciation correcte de la valeur de K_{sv} pour cette deuxième population nécessite que nous soyons en mesure d'évaluer la valeur du F_0 qui lui est propre. Or, dans la forme intacte de la bR, une partie importante de la fluorescence des tryptophanes enfouis au centre de la bR est quenchée par le rétinale [146-148]. L'efficacité du transfert d'énergie entre ces acides aminés et le chromophore risque d'être modifiée par des changements structuraux qui accompagnent l'ajout de l'anesthésique. Cela a comme conséquence que la valeur de F_0 , l'accessibilité et la fraction *quenchable* de ces tryptophanes varient à mesure qu'on ajoute de l'halothane à l'échantillon. Dans ces conditions, il est probablement préférable de limiter l'interprétation au fait qu'il y a au moins deux populations de tryptophanes qui se distinguent par la position de leur émission et par l'accessibilité qu'elles offrent à l'halothane. Que ces deux populations correspondent à des tryptophanes de surface et à des tryptophanes plus profondément enfouis est vraisemblable mais ne peut pas être quantitativement démontré par nos mesures. Pour cette raison, seule la valeur de K_{sv} de la première population et dont l'amplitude devrait rester en deçà de 80% de la fluorescence totale (6 des 8 Trp) peut avoir une signification réelle.

L'échantillon partiellement délipidé présente un déplacement de 4 nm de son maximum d'émission (320 nm) par rapport à l'échantillon natif (figure 3.12a). Ce petit déplacement s'explique par le changement d'environnement des Trp lors

de la délipidation partielle au CHAPS. Néanmoins, l'échantillon traité au CHAPS affiche une atténuation de sa fluorescence comparable à celle de l'échantillon natif (figure 3.12b). Comme pour la bR native, l'addition progressive d'halothane provoque un déplacement hypsochrome du maximum d'émission suggérant que les Trp de surface sont quenchés plus facilement que ceux enfouis au sein de la protéine (figure 3.13). Cependant, ce déplacement est plus prononcé que dans le cas de la bR native (9 nm vs 6 nm), suggérant que les populations de Trp sont sensiblement altérées. Le graphique de Stern-Volmer (figure 3.14) permet d'évaluer à $0,283 \text{ mM}^{-1}$ la valeur de K_{sv} correspondant à l'atténuation de 80% de l'intensité initiale de fluorescence, une valeur proche de celle obtenue pour l'échantillon natif.

Lorsqu'on solubilise complètement la bR dans le Triton X-100, son maximum d'émission de fluorescence se retrouve à 328 nm, indiquant que les Trp se retrouvent dans un environnement plus polaire et relâché (figure 3.15a). Cette augmentation de l'accessibilité des Trp et de la relaxation par le solvant permet au quencheur (l'halothane) d'avoir plus librement accès aux fluorophores. Ceci se traduit par une atténuation de la fluorescence beaucoup plus forte que pour les échantillons délipidés partiellement et natifs (figure 3.15b), comme le montre la valeur de K_{sv} de $0,477 \text{ mM}^{-1}$ (figure 3.16b), comparativement à $0,283 \text{ mM}^{-1}$ pour l'échantillon partiellement délipidé et $0,254 \text{ mM}^{-1}$ pour l'échantillon natif.

Toutefois, il demeure périlleux de faire une interprétation quantitative de ces différences puisque, dans l'échantillon natif, parmi les fluorophores situés à la surface, il nous est impossible de distinguer les tryptophanes qui sont en périphérie du trimère de la bR de ceux qui sont localisés plus au centre du trimère et que cette différence de localisation peut influencer leur accessibilité.

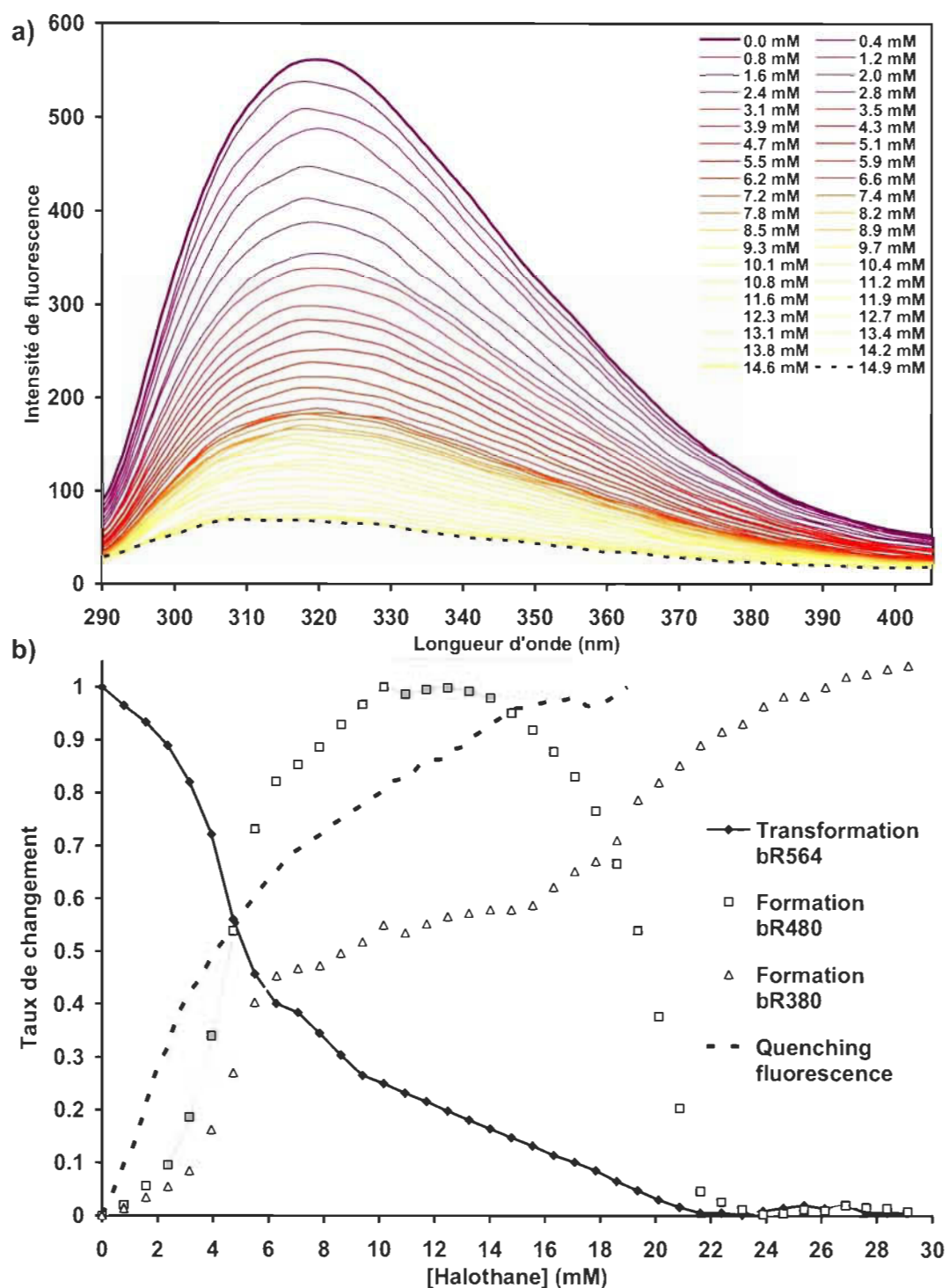


FIGURE 3.12 : Quenching de fluorescence de la bactériorhodopsine délipidée partiellement et perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v. a) Spectres de fluorescence. b) Taux de changement ($\Delta A/\Delta A_{\max}$ ou $\Delta F/\Delta F_{\max}$) de fluorescence et d'absorption pour la bR partiellement délipidée.

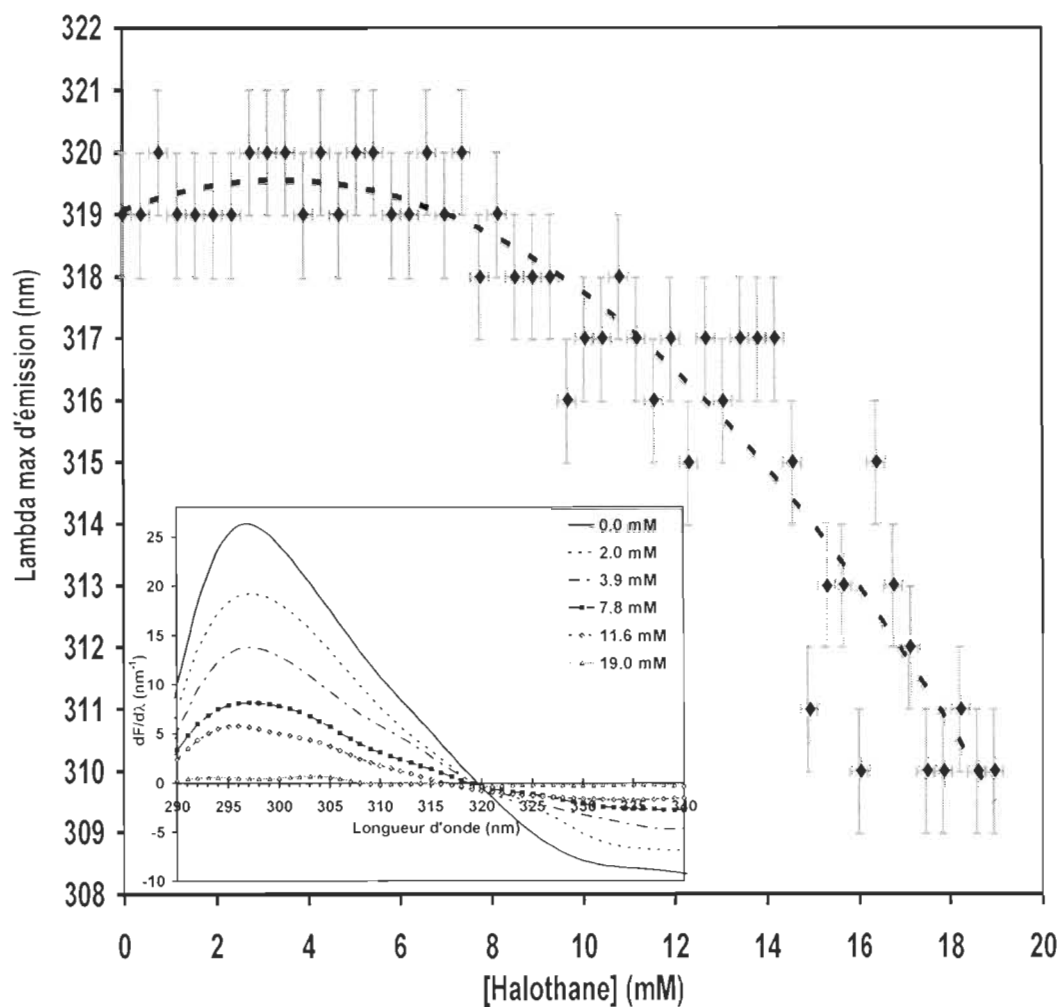


FIGURE 3.13 : Déplacement du maximum d'émission de fluorescence de la bR délipidée partiellement au CHAPS lors de la perfusion à l'halothane/éthanol 5% v/v. L'encart montre l'évolution de la dérivée première ($dF/d\lambda$) des spectres entre 0 et 19 mM.

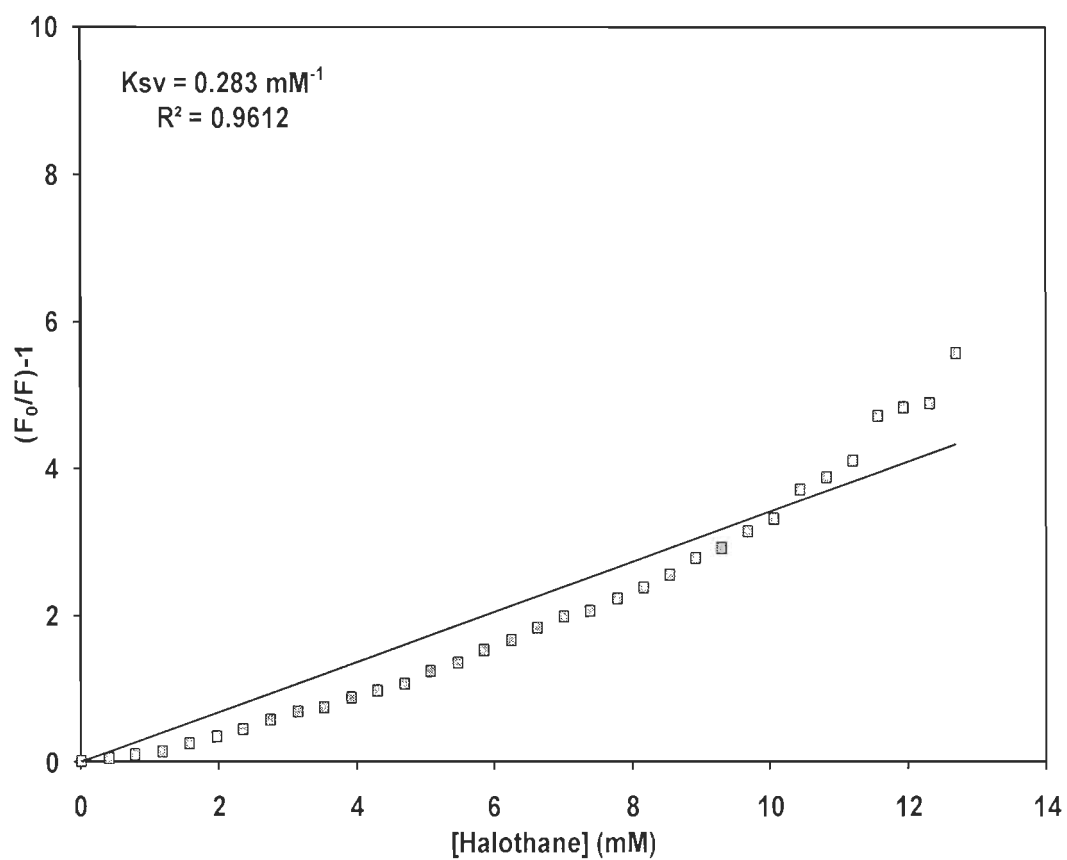


FIGURE 3.14 : Graphique de Stern-Volmer du quenching de la bactériorhodopsine délipidée partiellement au CHAPS. Tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH = 7,5. Cuvette de 3 mL avec un parcours optique de 1 cm. Perfusion avec halothane/éthanol 5% v/v.

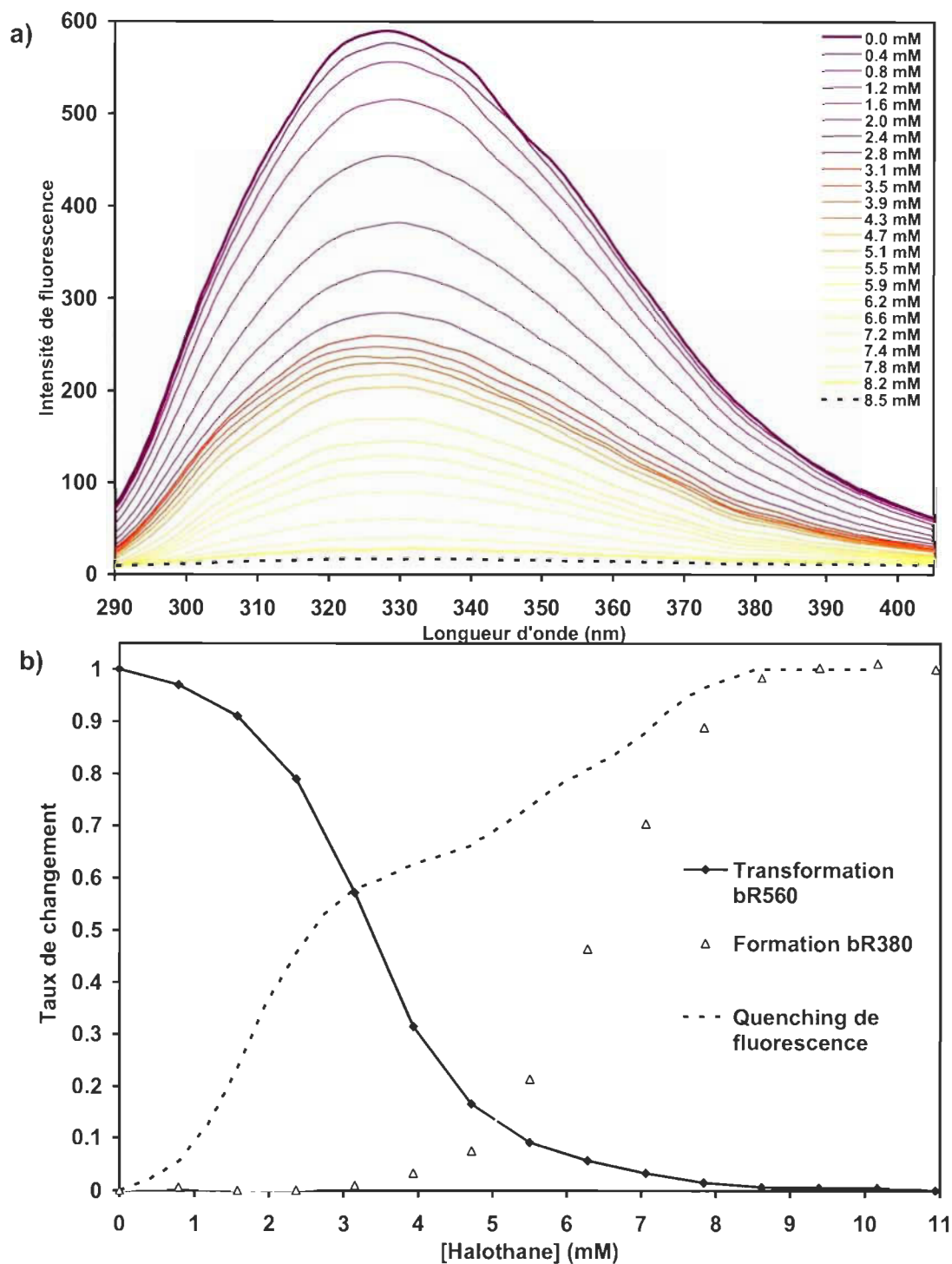


FIGURE 3.15 : Quenching de fluorescence de la bactériorhodopsine solubilisée dans le Triton X-100 et perfusée à l'halothane/éthanol 5% v/v. a) Spectres de fluorescence. b) Taux de changement ($\Delta A/\Delta A_{\max}$ ou $\Delta F/\Delta F_{\max}$) de fluorescence et d'absorption pour la bR délipidée totalement.

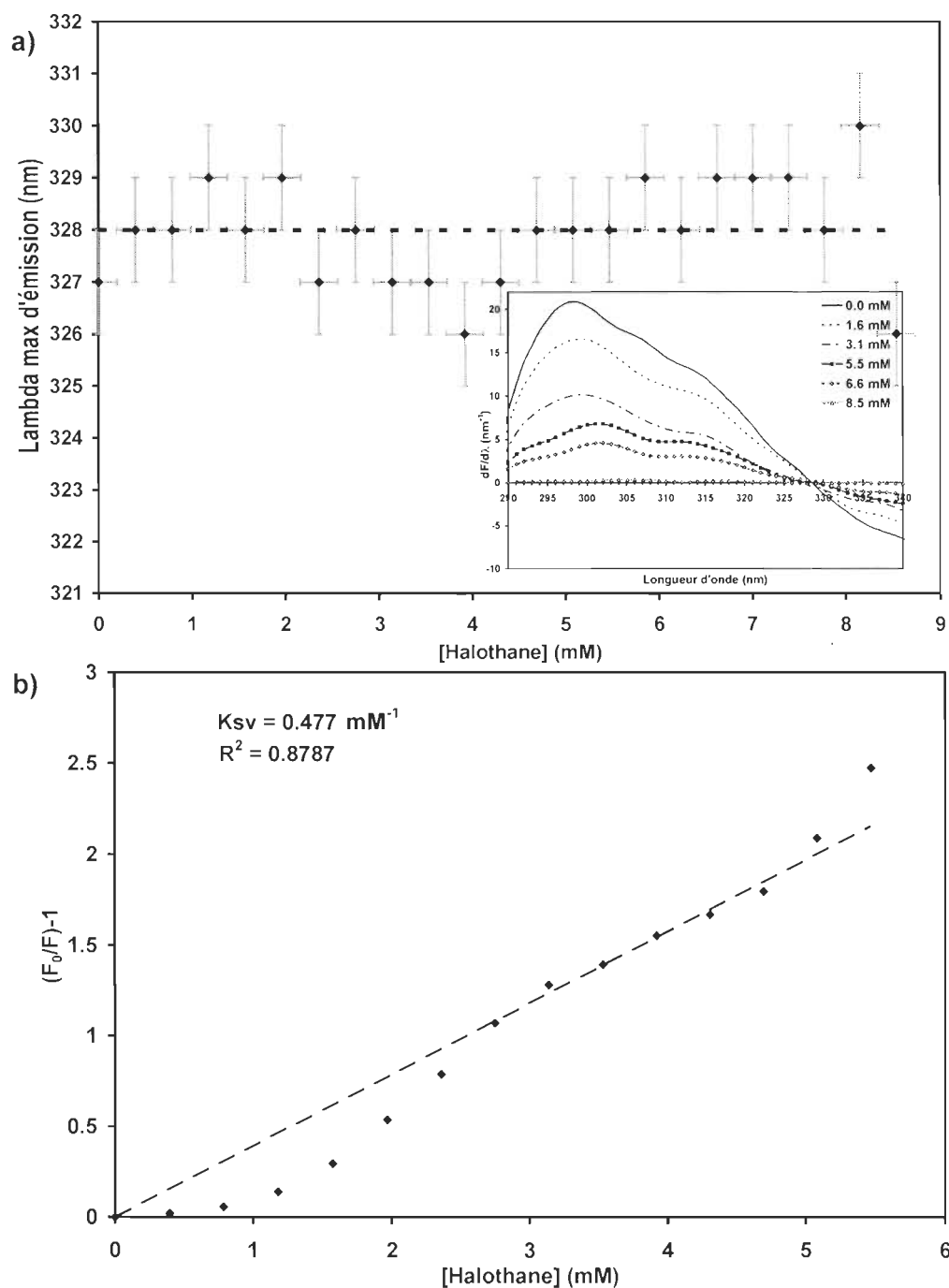


FIGURE 3.16 : Quenching de fluorescence de la bactériorhodopsine solubilisée dans le Triton X-100 avec halothane/éthanol 5% v/v. a) Déplacement du maximum d'émission de fluorescence de la bR solubilisée. L'encart montre l'évolution de la dérivée première ($dF/d\lambda$) des spectres entre 0 et 8,5 mM. b) Courbe de Stern-Volmer du quenching de la bactériorhodopsine délipidée totalement au Triton X-100.

Par ailleurs, à une échelle supérieure d'organisation, des différences dans l'arrangement quaternaire (i.e. trimères de bR), voir même quinquénaire (fragments de membrane pourpre), influencent la diffusion et la mobilité de la protéine, de même que sur le taux statistique de collisions avec le quencheur, influençant directement la nature diffusionnelle du quenching. Ceci a pour effet de modifier la constante de quenching et déplace l'équilibre vers la non linéarité. Par ailleurs, d'autres phénomènes d'ordre optique se superposent aussi, notamment, une augmentation de la turbidité et donc, de la diffusion de la lumière, difficile à corriger sur les spectres. À cela s'ajoute aussi l'effet de partitionnement tripartite du quencheur qui, dans ce cas-ci, affiche une nette préférence pour la phase lipidique. Enfin, la bR possédant plusieurs Trp dans des environnements différents, et chaque population de Trp présentant une susceptibilité et une accessibilité différente pour le quencheur, font que les constantes de quenching de chacun des Trp se superposent. Ceci a pour effet de complexifier le phénomène et de provoquer une non linéarité dans les courbes de quenching.

Dans le cas de la membrane native, la plus petite des deux constantes de quenching observées est reliée à l'atténuation d'environ les deux tiers de la fluorescence totale. Il est tout à fait vraisemblable que les fluorophores qui soient les premiers quenchés soient ceux de la surface de la protéine. Toutefois, il demeure périlleux de faire une interprétation quantitative de cette observation puisque, parmi les fluorophores situés à la surface, il nous est impossible de distinguer les tryptophanes qui sont en périphérie du trimère de la bR de ceux qui sont localisés plus au centre du trimère et que cette différence de localisation peut influencer leur accessibilité.

Par ailleurs, dans la forme native, en absence d'anesthésique, du moins, une partie importante de la fluorescence des tryptophanes est quenchée par le rétinol de la bactériorhodopsine [146-148]. L'efficacité du transfert d'énergie entre ces acides aminés et le chromophore risque d'être modifiée par des

changements structuraux qui accompagnent l'ajout de l'anesthésique. Cela pourrait avoir comme conséquence que l'accessibilité des tryptophanes varie à mesure qu'on ajoute de l'halothane à l'échantillon. Dans ces conditions, il est probablement plus prudent de limiter l'interprétation au fait qu'il y ait au moins deux populations de tryptophanes qui se distinguent par la position de leur émission et par l'accessibilité qu'elles offrent à l'halothane. Que ces deux populations correspondent à des tryptophanes de surface et à des tryptophanes plus profondément enfouis est vraisemblable mais ne peut pas être clairement démontré par nos mesures.

De plus, l'interprétation des constantes de quenching reste périlleuse car plusieurs phénomènes se superposent à l'atténuation de la fluorescence. Premièrement, la modification de l'arrangement quaternaire (i.e. trimères de bR), voire même quinquénaire (fragments de membrane pourpre), influe sur la diffusion et la mobilité de la protéine, de même que sur le taux statistique de collisions avec le quencheur, influençant directement la nature diffusionnelle du quenching. Ceci a pour effet de modifier la constante de quenching et déplace l'équilibre vers la non linéarité. Deuxièmement, d'autres phénomènes d'ordre optique se superposent aussi. Notamment, une augmentation de la turbidité et donc, une augmentation de la diffusion de la lumière difficile à corriger sur les spectres. À cela s'ajoute aussi l'effet de partitionnement tripartite du quencheur qui, dans ce cas-ci, affiche une nette préférence pour la phase lipidique. De plus, la bR possédant plusieurs Trp dans des environnements différents, et chaque population de Trp présentant une susceptibilité et une accessibilité différente pour le quencheur, font que les constantes de quenching de chacun des Trp se superposent. Ceci a pour effet de complexifier le phénomène et de provoquer une non linéarité dans les courbes de quenching.

3.2.4 Conclusion sur les mesures de fluorescence

Dans le contexte de l'équation 2.2, on s'aperçoit que l'inverse du K_{SV} correspond à la concentration nécessaire au quenching de la moitié d'une

population donnée. Pour les échantillons natifs et partiellement délipidés, ces concentrations sont de 3,9 mM pour la forme native, 3,5 mM pour la forme partiellement délipidée (traité au Chaps) et 2,1 mM pour la forme délipidée au Triton. Avec le déplacement spectral correspondant au mode I, le quenching de la fluorescence de ces tryptophanes constitue la cible la plus sensible de l'halothane.

Pour la forme native comme pour celles qui sont délipidées, le quenching de plus de la moitié de la fluorescence précède la transformation de la forme pourpre à la forme rouge. Ainsi, la pénétration de l'anesthésique en surface de la protéine doit perturber les interactions de la protéine avec les lipides environnants et provoquer une délipidation graduelle de la protéine, rendant accessibles à l'anesthésique les régions hydrophobes plus enfouies dans la membrane et, par le fait même, les Trp moins accessibles qui sont dans un environnement non polaire et plus rigide. La position des Trp de la bR à l'interface, au niveau des glycérols des lipides, semble constituer le site de pénétration initial des AG dans la MP. Les interactions entre les Trp de la bR et les lipides de la MP sont d'une importance capitale pour le maintien structural et fonctionnel de la membrane [87]. La présence d'AG à ce niveau doit affecter ces interactions et créer, transitoirement, une délipidation de la bR.

3.2.5 Changements structuraux lors de la transition spectrale

Afin d'observer les changements structuraux concomitants à la transition spectrale, des mesures en FTIR ont été effectuées sur des films de membranes pourpres en présence de vapeur d'anesthésique.

3.2.5.1 Caractéristiques spectrales des films de MP

La première étape consistait à vérifier si les films secs de membrane pourpre se comportaient de la même manière que la bactériorhodopsine en

suspension aqueuse en présence d'anesthésique. Il s'avère que les films secs préparés à partir de suspensions aqueuses de membranes pourpres sont tout à fait insensibles à la présence de vapeurs d'halothane. Toutefois, les films maintenus humides en présence de vapeur d'eau saturante montrent, en présence d'halothane en phase gazeuse, les mêmes transitions spectrales que celles observées en suspension aqueuse. La figure 3.17 montre l'évolution temporelle du spectre d'absorption d'un film de membrane pourpre en présence de vapeur d'halothane. On constate que les films de membrane pourpre présentent les mêmes caractéristiques spectrales que leurs suspensions aqueuses. La bR_{568} se transforme en bR_{565} au début de l'exposition et graduellement vers une forme rouge à 480 nm (bR_{480}) avec un point isobeste à 505 nm au fur et à mesure que la vapeur d'halothane pénètre la membrane. À plus long terme, la bR_{480} est transformé en une quatrième espèce absorbant à 380 nm (bR_{380}).

L'atteinte de l'équilibre par un tel système prend un temps considérable. Il faut effectivement près de 3 heures pour que l'halothane pénètre complètement le film et génère les différentes formes spectrales. La lenteur du phénomène peut ainsi être mise à profit pour tenter d'établir la séquence de changements structuraux qui accompagnent les transitions spectrales.

3.2.5.2 Spectroscopie FTIR de films de membrane pourpre native

La figure 3.18a montre le spectre IR d'un film de membrane pourpre native séché à température ambiante. Les différentes bandes du spectre sont bien résolues et sont similaires à ce que l'on retrouve dans la littérature [93, 149, 150]. L'assignation de ces bandes se retrouve dans le tableau 3.1.

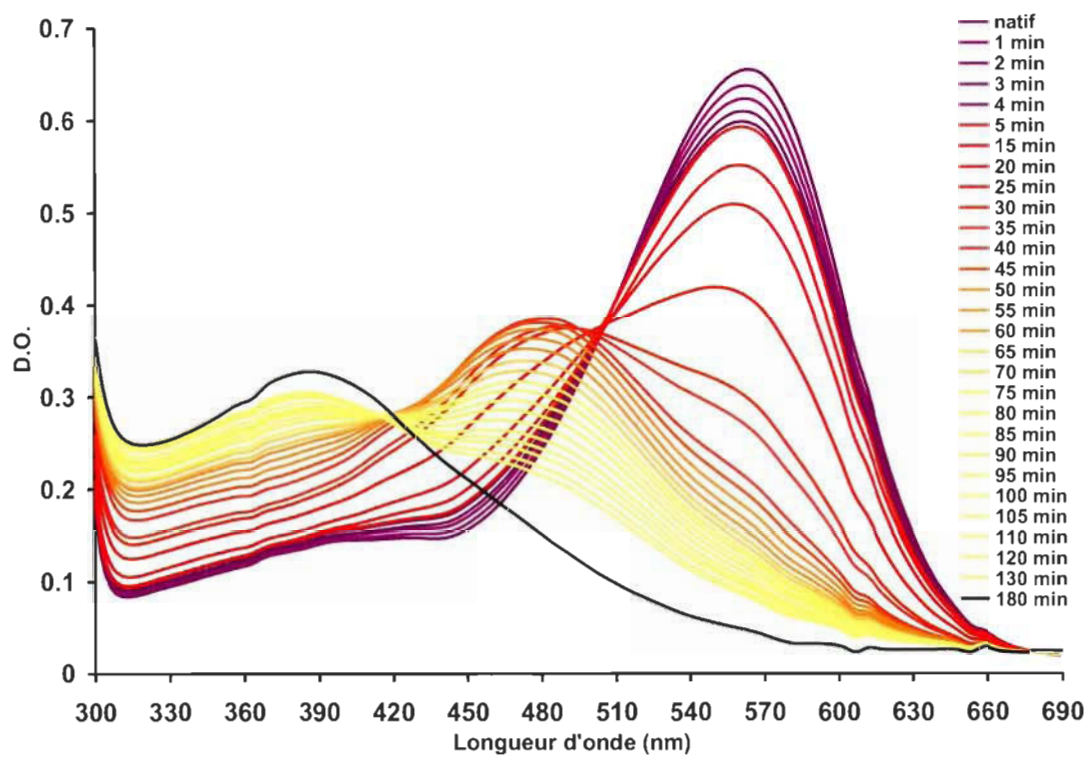


FIGURE 3.17 : Transitions spectrales d'un film de membrane pourpre.
 Transitions spectrales d'un film de membrane pourpre en présence de D_2O et de 50 μL d'halothane (vapeur). Fenêtre de BaF_2 .

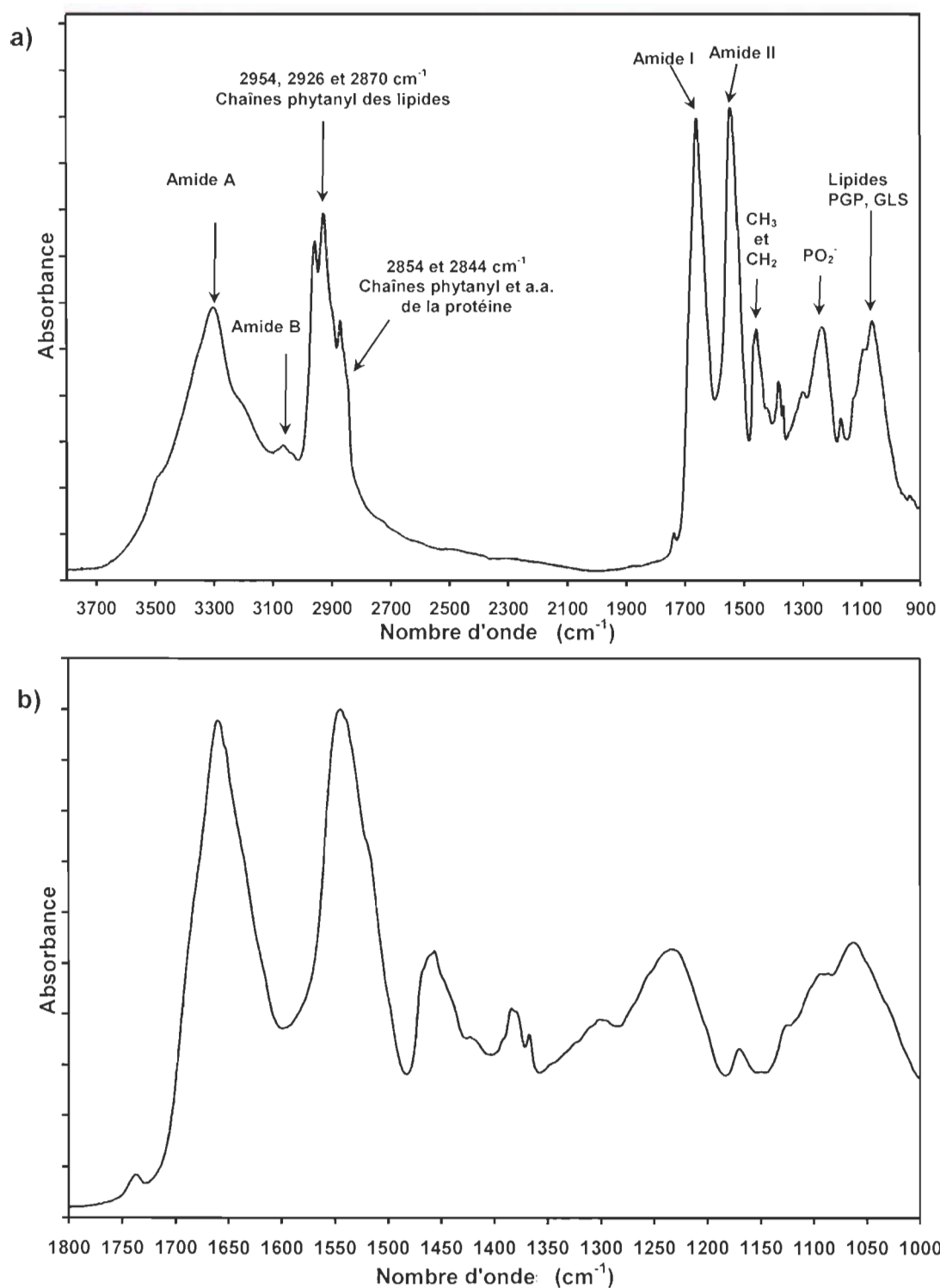


FIGURE 3.18 : Spectre FTIR d'un film de membrane pourpre native. Fenêtre de BaF_2 . a) Région de 900 cm^{-1} à 3800 cm^{-1} b) Région de 1000 à 1800 cm^{-1} .

TABEAU 3.1
Assignation des bandes IR entre 900-3600 cm⁻¹ pour la membrane pourpre native [93, 151].

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Localisation	Assignment
3300	Amide A (protéine)	Étirement N-H
3060	Amide B (protéine)	Étirement C-H aromatique Phe, Tyr, Trp
2954	Chaînes phytanyles des lipides	Étirement asymétrique CH ₃
2926	Chaînes phytanyles des lipides	Étirement asymétrique CH ₂
2870	Chaînes phytanyles des lipides	Étirement symétrique CH ₃
2854	Chaînes phytanyles des lipides et acides aminés (a.a.) de la bR	Étirement symétrique méthylène -C-CH ₂ -C et Leu, Met, Glu, Lys et Arg
2844		
1740	Groupelements carboxyles protonés de Glu et Asp	Étirement C=O Asp96, Asp115
1658	Amide I (protéine)	Étirement C=O (80%) du squelette polypeptidique
1544	Amide II (espèce E ₁ de α _{II})	Déformation plane N-H (40-60%) et Étirement C-N (18-40%)
1528	Chromophore (rétinal)	Étirement C=C
1518	Amide II (espèce A de α _{II})	Déformation plane N-H (40-60%) et Étirement C-N (18-40%), Tyr
1464	Déformation CH ₂ et déformation asymétrique CH ₃ (lipides et a.a)	Déformation CH ₂ et déformation asymétrique CH ₃
1456		
1446		
1383	Chaînes phytanyles des lipides, Leu, Val	Déformation symétrique CH ₃
1367	Chaînes phytanyles des lipides, Leu, Val	Déformation symétrique CH ₃
1232	Têtes polaires phospholipides	Étirement asymétrique (PO ₂ ⁻)
1167	Protéine et lipides	CH ₃ basculement
1062	Lipides PGP, GLS	Étirement asymétrique C-O-C et P-O-C

Les régions d'importance se situent entre 2800 à 3300 et 1000 à 1800 cm^{-1} et les différents pics sont attribués soit à la protéine, soit aux lipides. On retrouve à 3300 et 3060 cm^{-1} les bandes amide A et amide B qui correspondent à l'étirement N-H du polypeptide et aux C-H des acides aminés aromatiques. On constate aussi que la position de l'amide A se retrouve à 10 cm^{-1} plus haut que les valeurs typiques pour une protéine. Les bandes à 2954 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} et 2870 cm^{-1} , proviennent surtout des chaînes phytanyles (lipides) et sont attribuées à l'étirement asymétrique des CH_3 , des groupements méthylène CH_2 et à l'étirement symétrique des CH_2 , respectivement. Les épaulements à 2854 cm^{-1} et 2844 cm^{-1} sont assignés à l'étirement symétrique du méthylène lié à un carbone non substitué ($-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}$) et proviennent des lipides et de certains acides aminés de la bR (Leu, Met, Glu, Lys et Arg).

La région entre 1500 cm^{-1} et 1750 cm^{-1} est constituée principalement des modes de vibration provenant du squelette polypeptidique et de certains acides aminés de la bR. La faible bande à 1740 cm^{-1} a été étudiée considérablement dans le photocycle de la bR et correspond au mode d'étirement du groupement carboxyle ($\text{C}=\text{O}$) du glutamate (Glu) et de l'aspartate (Asp) protonés. La structure secondaire de la bR se compose principalement d'hélices alpha de type I (α_I) et II (α_{II}), ainsi que de plus petites régions constituées de feuillets et de tours β et de structures non ordonnées (random coil). Chacune de ces structures possède un mode vibrationnel de l'amide I distinct entre 1710 et 1630 cm^{-1} et contribue à la bande observée à 1658 cm^{-1} qui se compose à 80% de l'étirement $\text{C}=\text{O}$ du squelette polypeptidique. Dans l'hélice α_{II} la bande amide I a une position anormalement élevée comparativement à une hélice normale (α_I), et consiste en des modes vibrationnels symétriques de type A, E_1 et E_2 (composantes parallèles (A) et perpendiculaires (E_1 et E_2) du lien peptidique), dont les deux premiers sont actifs en infrarouge. Des études de dichroïsme en infrarouge ont démontré que les bandes de l'amide I et l'amide A étaient polarisées perpendiculairement au plan de la membrane [151, 152]. La fréquence de la composante parallèle (mode de vibration de type A ou étirement en phase du

C=O) de l'amide I (1667 cm^{-1}) est plus élevée que pour une hélice alpha normale (1655 cm^{-1}). Qui plus est, et contrairement à ce que l'on retrouve d'habitude, la position pour la composante polarisée perpendiculairement E_1 du lien C=O se retrouve 7 cm^{-1} plus bas que pour le mode symétrique A de l'amide I, soit à 1660 cm^{-1} [153].

Concrètement, les deux types d'hélices (α_I et α_{II}) diffèrent en ce que le plan du lien peptidique dans une hélice α_I est essentiellement parallèle à l'axe de l'hélice, alors que celui de l'hélice α_{II} est incliné, avec les liens N-H pointant vers l'intérieur de l'hélice. Ceci a deux effets sur les modes normaux en infrarouge. Premièrement, la liaison hydrogène entre le C=O et H-N est légèrement plus longue dans une hélice α_{II} ($3,00\text{ Å}$) que dans une hélice α_I ($2,86\text{ Å}$), résultant en un affaiblissement du lien hydrogène, et donc une augmentation de la constante de force de l'étirement C=O et de la déformation N-H. Ceci conduit directement à un déplacement de 4 cm^{-1} de l'amide I et de 10 cm^{-1} de l'amide A. Deuxièmement, cette différence structurale résulte en différentes transitions du couplage des dipôles des hélices. Pour une hélice de type α_I , les valeurs pour l'amide I sont 1659 cm^{-1} pour la composante A et 1656 cm^{-1} pour l'espèce E_1 ; pour une hélice α_{II} , elles se retrouvent à 1667 cm^{-1} (espèce A) et 1659 cm^{-1} (composante E_1). Pour l'amide II, les valeurs pour une hélice de type α_I sont 1517 cm^{-1} (composante A) et 1537 cm^{-1} (composante E_1), et 1513 cm^{-1} (espèce A) et 1538 cm^{-1} (espèce E_1) pour une hélice α_{II} . Par photo-sélection, l'orientation des liens N-H dans le plan de l'hélice procure au spectre une bande amide II aussi intense que celle de l'amide I (figure 3.18b) [153, 154].

3.2.5.3 Échange isotopique et structure tertiaire

L'utilisation de la deutériation des liens N-H à l'aide d'eau lourde (D_2O) permet d'étudier la structure tertiaire de la bR. Dans la bR, les régions périphériques du squelette polypeptidique de la protéine sont accessibles à l'échange isotopique H/D, alors que le cœur intramembranaire de la protéine est

inaccessible aux deutérons de l'eau lourde [152, 155]. Il a d'ailleurs été démontré par spectroscopie FTIR polarisée que le cœur de la protéine se compose principalement d'hélices α orientées perpendiculairement au plan de la membrane et largement enfouies dans la membrane [156]. Les structures de types feuillets et tours se retrouvent ainsi en surface, directement accessibles au solvant.

L'effet le plus marqué de la deutériation sur l'absorption infrarouge de la bR native est la diminution de la bande amide II (1544 cm^{-1}) au profit d'une augmentation à 1456 cm^{-1} (Figure 3.19). Ce déplacement est causé par l'échange N-H \rightarrow N-D des groupements peptidiques, causant une diminution de la fréquence de vibration de l'amide II. Dans la bR, l'effet est plutôt léger à cause de l'existence du cœur membranaire. Les estimations le situent à environ 20% après 48 heures d'exposition à température ambiante [156]. La complète deutériation n'est possible que lorsqu'on utilise des détergents pour dénaturer et régénérer la membrane pourpre dans le D₂O [155]. Dans notre cas, le pourcentage obtenu après 24 heures de préincubation est de 12%. La bande intense à 1685 cm^{-1} et les faibles bandes à 1640 et 1626 cm^{-1} dans le spectre de différence de la figure 3.19 sont significatives de la deutériation des structures β (feuillets et tours) que l'on retrouve dans les boucles et en surface de la protéine. La bande amide I se trouve aussi faiblement déplacée de 1658 cm^{-1} à 1655 cm^{-1} par la deutériation du lien N-H. On retrouve dans le tableau 3.2 la position et l'assignation des différents éléments de structures secondaires que l'on retrouve dans la bande amide I de la membrane pourpre dans le D₂O et le H₂O.

3.2.5.4 Spectroscopie FTIR en présence d'halothane

L'obtention de spectres de membrane pourpre en présence d'halothane nécessite l'attribution de ses bandes d'absorption dans l'infrarouge afin d'identifier les régions interprétables. L'halothane possède une faible absorption à

3018 cm^{-1} provenant du C-H, ainsi que quatre bandes majeures dans la région de 1400 à 1000 cm^{-1} (1312 , 1270 , 1180 et 1130 cm^{-1}) provenant surtout de l'étirement C-F et de modes vibrationnels du lien C-C (figure 3.20a). De très faibles bandes se retrouvent aussi à 1383 cm^{-1} et 1529 cm^{-1} , mais elles sont négligeables (figure 3.20b).

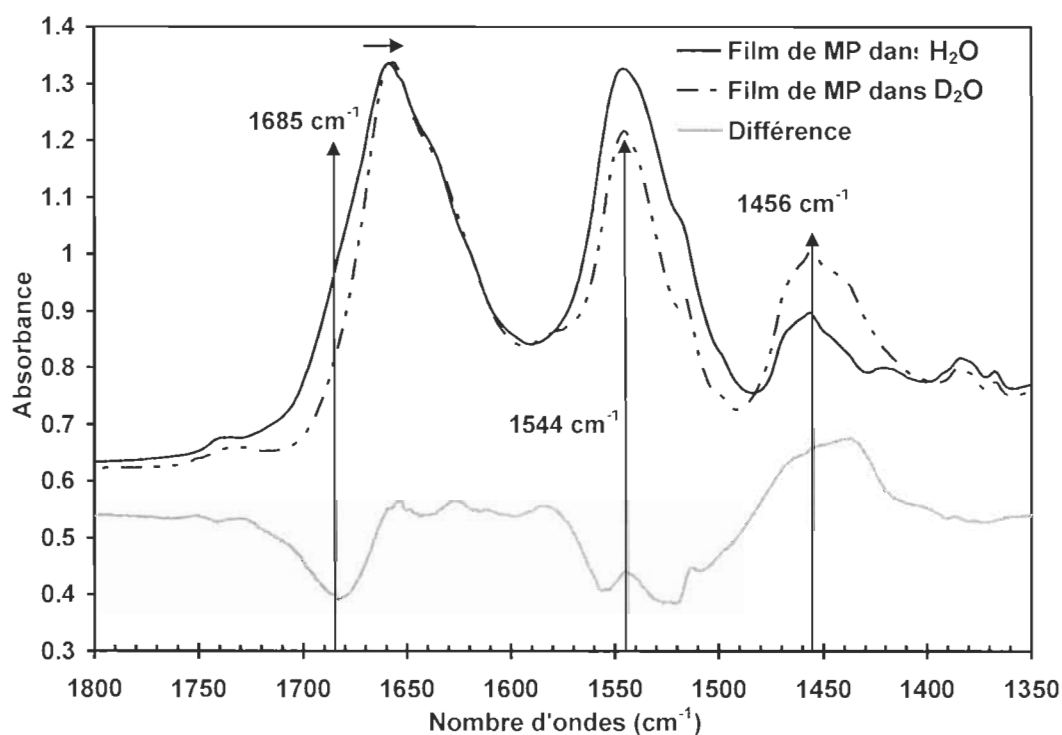


FIGURE 3.19 : Spectre FTIR de films de membrane pourpre préincubée dans le H_2O ou D_2O durant 24 heures. Fenêtre de BaF_2 . Région de 1350 cm^{-1} à 1800 cm^{-1} . En gris (courbe au bas), spectre de différence $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$.

TABLEAU 3.2
Position et assignation des bandes IR de la membrane pourpre native
dans le D₂O et le H₂O [93, 155-157].

H ₂ O		D ₂ O	
Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Éléments de structure secondaire	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Éléments de structure secondaire
1689	Tours	1690	Tours
1678	Tours	1680	Tours
1673	Tours	1675	Tours
1665	Hélices α_{II}	1667	Hélice α_{II} et tours
1658	Hélices α_{II} et α_I	1658	Hélices α_{II} et α_I
1650	Hélices α désordonnée	1652	Hélices α_{II} et α_I
1640	Tours 3_{10}	1645	Désordonnée
1630	Structures β	1640	Tours 3_{10} et Structures β
1626	Structures β	1632	Structures β
1618	Structures β	1626	Structures β
		1618	Structures β

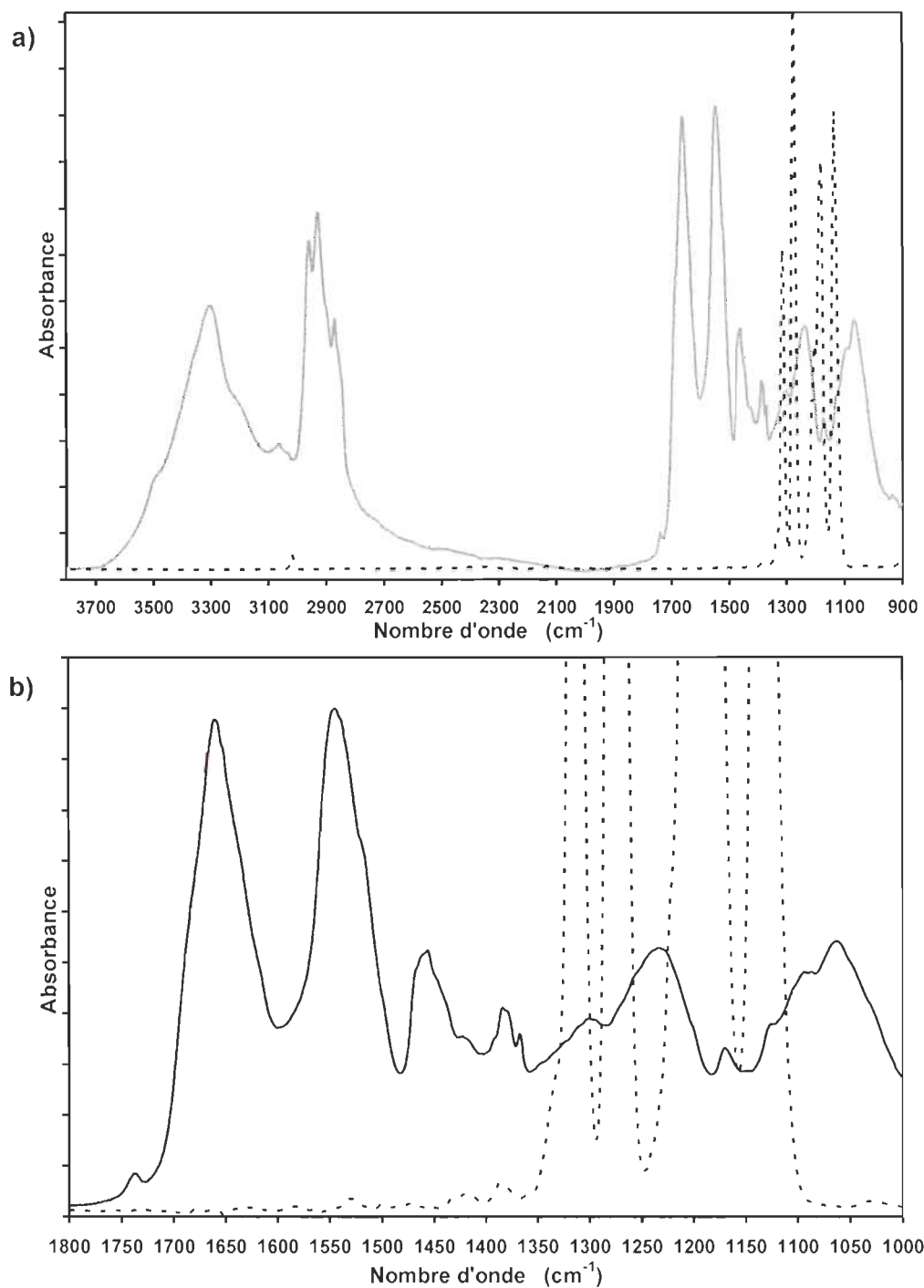


FIGURE 3.20 : Spectre FTIR de vapeur d'halothane. Spectre FTIR de vapeur d'halothane (trait pointillé) superposé au spectre d'un film de membrane pourpre (trait plein). Fenêtre de BaF₂. a) Région de 900 à 3800 cm⁻¹ b) Région de 1000 cm⁻¹ à 1800 cm⁻¹.

3.2.5.5 Modifications structurales des films de MP par l'halothane

Les mesures effectuées en spectroscopie FTIR, dans les mêmes conditions qu'en absorption, ont permis d'observer les changements structuraux concomitants à la transition spectrale observée. Les spectres pris en présence de D₂O ou de H₂O affichent les modifications structurales subies lors de l'interaction avec l'halothane. La région d'importance (de 1750 à 1350 cm⁻¹) est constituée de la vibration amide I (étirement C=O) et de l'amide II (déformation N-H dans le plan) du squelette polypeptidique de la bR.

On retrouve sur la figure 3.21a, les spectres d'un film de MP dans une atmosphère humide de H₂O en présence de vapeurs d'halothane. La première observation est l'augmentation de l'intensité de la bande amide I et la diminution de celle de la bande amide II durant l'ajout d'halothane. Cette augmentation/diminution des bandes amide est attribuable à une réorientation des hélices par rapport au plan de la fenêtre. La bR s'orientant naturellement de manière perpendiculaire lorsque déposée sur une fenêtre [151, 158], la réorientation des hélices et des groupements C=O (amide I) dans l'axe de propagation de la lumière fait augmenter l'intensité de cette bande par photosélection. De la même manière, la réorientation des groupements N-H des liens peptidiques provoque une diminution de la bande amide II. Cette réorientation des hélices est aussi présente dans les spectres de MP en présence de D₂O (figure 3.22a).

Au niveau des changements structuraux, le déplacement d'environ 8 cm⁻¹ de 1658 à 1650 cm⁻¹ est la conséquence d'une réorganisation des hélices α de type II à des hélices α de type I (figure 3.20a) [93, 154]. Sur les spectres de différence (figure 3.21b), ce réarrangement des hélices α_{II} en hélices α_I apparaît aux positions 1665 cm⁻¹ et 1650 cm⁻¹. Conjointement avec les bandes à 1630 cm⁻¹ et 1678 cm⁻¹, qui sont attribuées aux structures β (feuillets et tours), ces changements au niveau des hélices sont caractéristiques d'une transformation des hélices en tours ou en structures non-ordonnées [159].

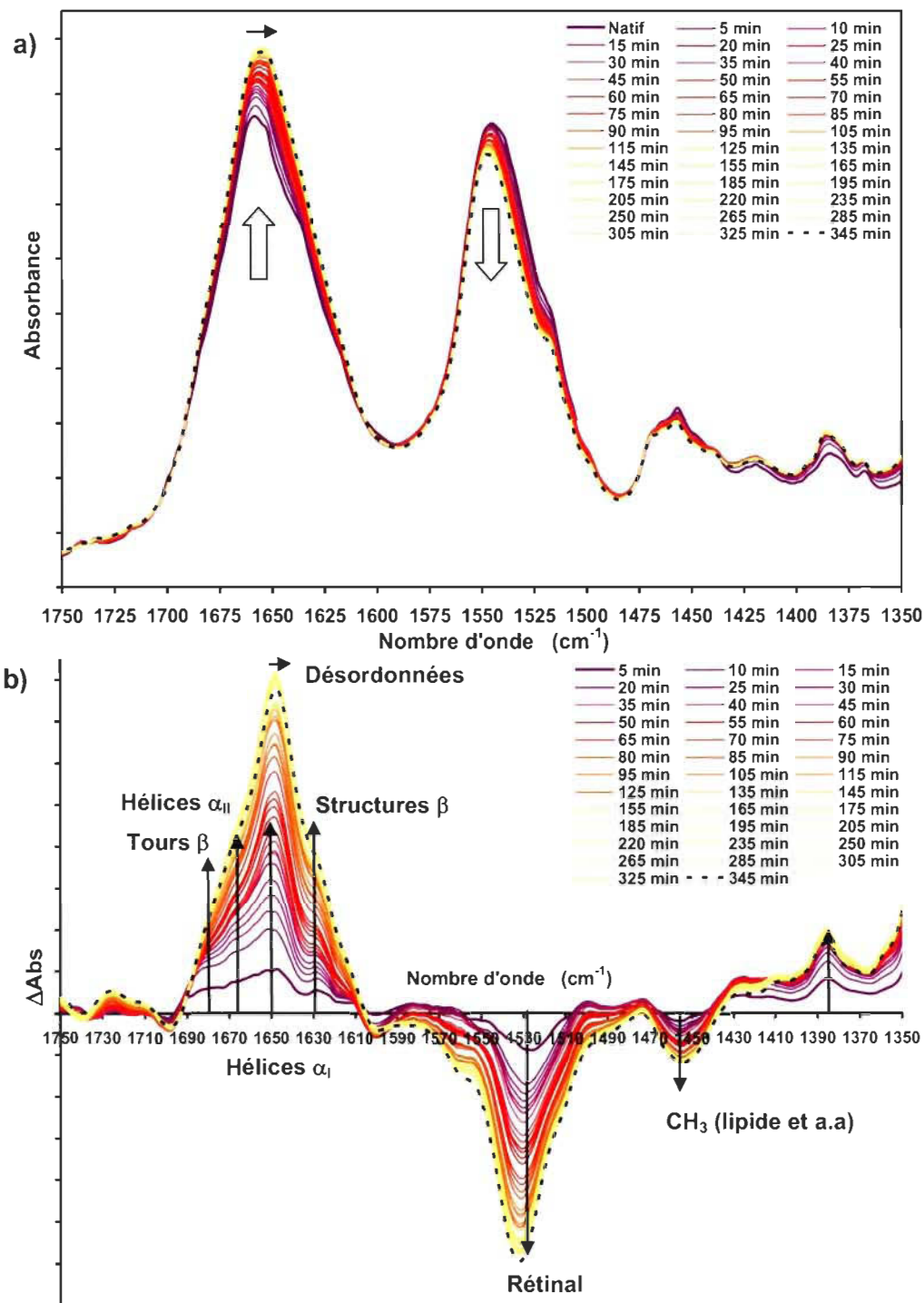


FIGURE 3.21 : Spectres FTIR d'un film de membrane pourpre (H_2O) en présence d'halothane. Spectres FTIR d'un film de membrane pourpre, en présence de vapeur de H_2O et de 50 μL d'halothane (vapeur). Fenêtre de BaF_2 . a) Spectres entre 1350 et 1750 cm^{-1} . b) Spectres de différence (soustraction du spectre natif).

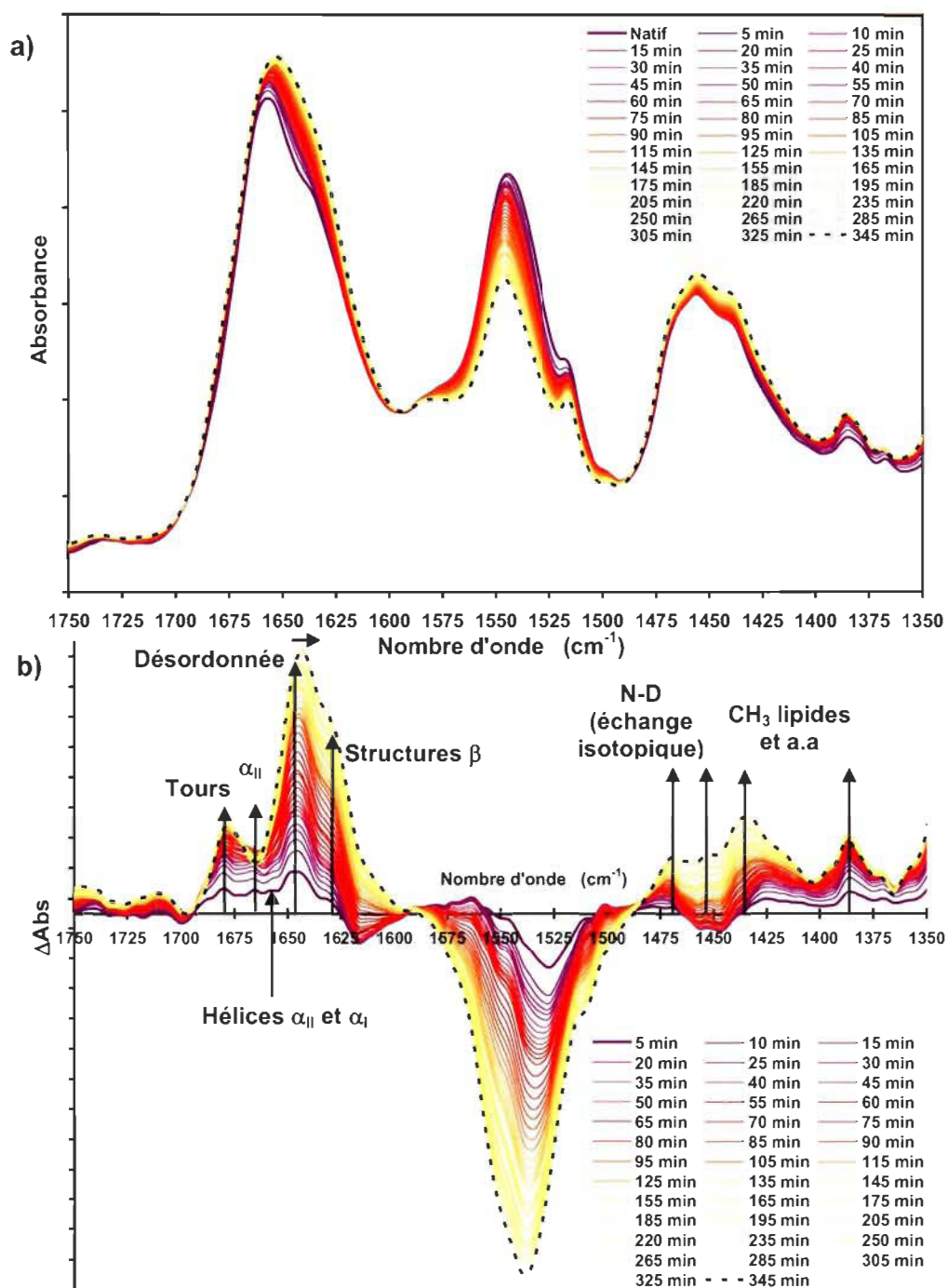


FIGURE 3.22 : Spectres FTIR d'un film de membrane pourpre (D_2O) en présence d'halothane. Spectres FTIR d'un film de membrane pourpre préincubée dans le D_2O , en présence de vapeur de D_2O et de 50 μL d'halothane (vapeur). Fenêtre de BaF_2 . a) Spectres entre 1350 cm^{-1} et 1750 cm^{-1} . b) Spectres de différence (soustraction du spectre natif).

La région comprise entre 1510 et 1570 cm^{-1} est constituée de plusieurs bandes, notamment celles attribuées aux hélices α_{II} à 1518 cm^{-1} et 1544 cm^{-1} . La bande à 1528 cm^{-1} est assignée au chromophore (liens $\text{C}=\text{C}$ du rétinale), et dénote les modifications apportées à l'environnement de celui-ci par les changements structuraux de la protéine. De plus, le déplacement de 1650 à 1644 cm^{-1} sur les spectres de différence semble indiquer que les hélices se déforment progressivement pour donner de la pelote statistique (random coil). Les bandes dans la région de 1456 et 1383 cm^{-1} indiquent que les lipides et les groupements méthyles des acides aminés (CH_3/CH_2) sont aussi affectés par la présence d'halothane (figure 3.21b).

Les mesures effectuées avec la membrane pourpre préincubée durant 24 heures dans le D_2O démontrent le même phénomène de réorientation des hélices observé précédemment (figure 3.22a), c'est-à-dire une augmentation ou une diminution des bandes amide attribuable à une réorientation des hélices par rapport au plan de la fenêtre. Cependant, l'effet de l'échange isotopique ($\text{N-H} \rightarrow \text{N-D}$) est superposé à la réorganisation des hélices. Ainsi, la diminution à 1544 cm^{-1} et l'augmentation à $\sim 1455\text{ cm}^{-1}$ s'expliquent par la substitution isotopique des protons des liens N-H par des deutérons N-D (figure 3.22a) [157]. Comme mentionné précédemment en 3.2.5.3, la préincubation de membrane pourpre permet d'échanger environ 12% des protons périphériques de la bR. En présence d'halothane, la quantité de groupements échangeables passe à 29 %, indiquant qu'une partie du cœur membranaire devient accessible aux deutérons et qu'une partie des liens hydrogène des hélices ont été brisés, rendant possible l'échange isotopique. Cependant, cette estimation de la fraction des groupements échangeables est sujette à l'erreur due au phénomène de réorientation des hélices et à la contribution de groupements autres que l'amide II dans la région de 1545 cm^{-1} . Néanmoins, ce taux limité d'échange isotopique nous indique que les changements doivent surtout s'opérer en périphérie de la protéine.

Du point de vue structural, les changements sont les mêmes pour l'échantillon incubé dans le D₂O que pour celui incubé dans l'H₂O. Le déplacement de l'amide I de 1656 à 1652 cm⁻¹ indique que des changements se produisent au niveau du type d'hélice (α_{II} vs α_I) qu'on retrouve dans la bR (figure 3.22a). Sur les spectres de différence (figure 3.22b), cette réorganisation des hélices α_{II} en hélices α_I se manifeste surtout sur les premiers spectres à 5 et 10 minutes. Les bandes à 1658, 1650 et 1667 cm⁻¹ proviennent des C=O des hélices α_{II} , α_I et des tours respectivement. Cependant, la bande à 1650 cm⁻¹ se déplace graduellement vers 1645 cm⁻¹, attribuée à de la pelote statistique (random coil), comme si les hélices se déformaient graduellement. De la même manière, les structures β et les tours augmentent constamment si l'on en juge par les bandes à 1630 cm⁻¹ et 1680 cm⁻¹ respectivement. La région amide II est plus difficilement interprétable en raison de la forte congestion des bandes dans cette zone et de l'échange isotopique. Néanmoins, les épaulements à 1550 cm⁻¹ et 1510 cm⁻¹ sont attribuables à la deutériation du cœur membranaire (hélices) de la protéine et le maximum à 1528 cm⁻¹ provient de l'étirement éthylène (C=C) du chromophore [155]. Des changements s'opèrent aussi au niveau des lipides (1470, 1452 et 1385 cm⁻¹), mais la bande du N-D (1455 cm⁻¹) est superposée à ces changements.

En atmosphère de D₂O, comme en présence de H₂O, l'état de protonation des groupements carboxyles de l'aspartate (Asp 96 et Asp 115) de la bR est aussi altéré par la présence de l'halothane, si l'on en juge par les bandes entre 1730 cm⁻¹ et 1740 cm⁻¹ [150].

En se basant sur la figure 3.17, on peut affirmer que la forme bR₄₈₀ (forme rouge) correspond au spectre à environ 45 minutes et que la forme bR₃₈₀ (forme jaune) est observée à 185 minutes (ou encore le dernier spectre à 345 minutes). On remarque aussi que le spectre FTIR obtenu à 5 minutes est associé à la transition du mode I discutée précédemment, c'est-à-dire la transition de 568 nm à 565 nm). Ainsi, en soustrayant le spectre natif du spectre à 5 minutes, on

obtient les changements se produisant pendant le mode I (transition de 568 nm à 565 nm), et en soustrayant le spectre à 45 minutes à celui natif, on obtient les modifications produites pendant le mode II. La forme jaune (mode III) est obtenue en soustrayant le spectre à 185 minutes de celui à 45 minutes, afin de distinguer les structures différentes entre la forme jaune (bR₃₈₀) et la forme rouge (bR₄₈₀). Ainsi, on peut voir quels changements structuraux majeurs on retrouve entre chacune des formes.

Sur les figures 3.23a et b, on peut voir que les changements qui apparaissent dans le mode I sont surtout au niveau de la transformation des hélices α_{II} en hélices α_I (1665, 1658 et 1650 cm^{-1}) et que cette transformation s'accompagne aussi de modifications au niveau des boucles (tours, 1680 cm^{-1}) et des structures inter-hélicales (structures β , 1630 cm^{-1}). Cette réorganisation semble aussi s'accompagner de modifications au niveau de l'état de protonation des carboxyles de l'aspartate (Asp96 et Asp115, 1730 cm^{-1}) et de l'environnement du chromophore (1528 cm^{-1}). Les altérations au niveau des lipides sont déjà bien instaurées (1456 et 1383 cm^{-1}). Concernant la forme rouge (bR₄₈₀), on a toujours des changements au niveau des boucles et des tours, mais le phénomène de réorientation des hélices est plus prononcé. Cette réorientation des hélices provoque des changements plus grands au niveau du chromophore (1528 cm^{-1}). Cette hypothèse est très plausible puisque dans la forme rouge (bR₄₈₀) le rétinale affiche un grand déplacement de son λ_{max} . Lorsque la bR se retrouve dans la forme jaune à 380 nm, la réorientation des hélices se poursuit mais également, le déplacement de la bande à 1650 vers 1645 cm^{-1} indique que les hélices se transforment en structures désordonnées (random coil). Il apparaît aussi que le cœur de la protéine subit des modifications importantes (1550 et 1510 cm^{-1}). Enfin, on note que les changements au niveau des lipides (1456 et 1383 cm^{-1}) sont presque complétés dès l'apparition de la forme 480 nm.

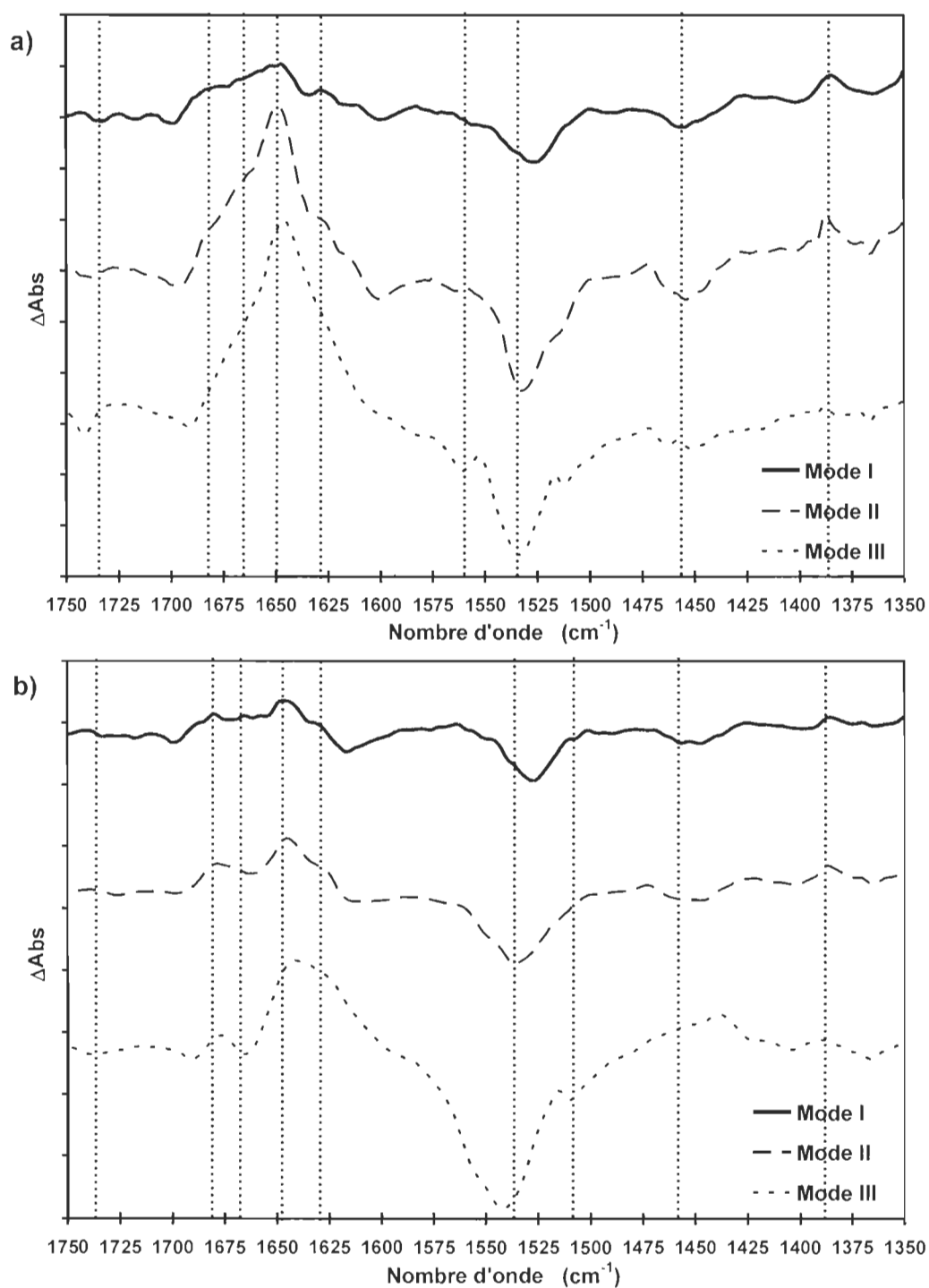


FIGURE 3.23 : Changements structuraux lors des transitions spectrales.
 Mode I (spectres à 5 minutes - spectre Natif), mode II (spectre à 45 minutes - spectre Natif) et mode III (spectre à 185 minutes - spectre à 45 minutes) a) Dans l'H₂O b) Dans le D₂O.

3.2.5.6 Conclusions sur les changements structuraux

L'action de l'halothane provoque non seulement une réorganisation des éléments de structure secondaire mais aussi une réorientation de ces éléments structuraux. Considérant la structure de la bR et les contraintes membranaires qui lui sont imposées, les changements structuraux semblent se produire surtout aux extrémités de la protéine, au niveau des boucles inter-hélicales. Ces modifications aux extrémités de la protéine pourraient provoquer la détrimérisation progressive de la bR et déstabiliser les interactions entre les hélices. De plus, les changements au niveau de la bande à 1665 cm^{-1} , donc des hélices α_{II} , sont associés à l'organisation trimérique de la bR dans la membrane [150]. L'altération des hélices a pour effet de modifier l'environnement du chromophore et provoque ainsi le déplacement de son maximum d'absorption à 480 nm. Finalement, la transformation graduelle des hélices en structures désordonnées laisse apparaître la forme libérée du rétinal à 380 nm. Cependant, la forme bR₃₈₀, qui est associée à une forme dénaturée de la bactériorhodopsine, semble conserver plus de structure que la forme dénaturée observée lors de dénaturation thermique ou chimique [160-162].

3.3 Second modèle : les vésicules de DPPC

Compte tenu de l'importance du rôle que jouent les lipides dans l'apparition des différentes formes spectrales de la bR en présence d'anesthésiques, il devient pertinent d'évaluer l'impact de ces derniers sur la phase purement lipidique d'une membrane. Il existe déjà un corpus imposant d'études sur cette question (voir section 1.4.1 et 1.7.2 de l'introduction). Toutefois, la manière dont se distribuent les anesthésiques dans la phase lipidique et les propriétés physico-chimiques qui gouvernent cette distribution ne sont pas encore bien comprises et justifie qu'on tente d'évaluer, d'une façon la plus quantitative possible, l'incorporation de l'halothane à des vésicules lipidiques.

3.3.1 Distribution transversale des AG dans les vésicules de DPPC

La distribution des AG dans les vésicules unilamellaires de DPPC est suivie grâce au quenching de la fluorescence de deux sondes dont la localisation membranaire est différente : le Laurdan et le Py-DPPC. Ces sondes sont ajoutées à un rapport molaire de 1:1000 afin de limiter les effets néfastes que celles-ci peuvent créer sur les propriétés physico-chimiques de la membrane [37]. La localisation du Laurdan se situe au niveau des groupements ester des phospholipides et il est hautement sensible à la polarité de son environnement. L'augmentation de l'hydratation de la membrane (ex. lors de la transition de l'état gel à liquide cristal de phospholipides) résulte en une diminution de l'émission du Laurdan et en un déplacement bathochrome de son maximum d'émission d'environ 40 nm [163]. Cependant, la distribution du Laurdan est indépendante de la phase lipidique [164, 165]. Les mêmes caractéristiques s'appliquent aussi au Py-DPPC [166, 167]. Néanmoins, la localisation de la portion pyrène de ce dernier se situe dans le cœur de la membrane et est déterminée largement, voir même exclusivement, par la longueur et la conformation de la chaîne hydrocarbonée le portant [168].

Puisque le quencheur (halothane) était injecté dans la cuvette sous forme de solution dans l'éthanol (halothane/éthanol 5 % v/v), il est impératif de vérifier si ce dernier interfère avec nos mesures car l'éthanol, du moins à concentration élevée, est reconnu pour modifier les propriétés de la membrane. Il est soluble dans les phases lipidiques 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. Cependant, le rapport des intensités I_{440}/I_{490} de la fluorescence du Laurdan n'est pas affecté pour des concentrations d'éthanol inférieures à 1,2 M [169] et celui-ci n'a pas d'effet sur la transition de phase pour des concentrations inférieures à 5 mole % [170].

L'effet observé dans notre cas, c'est-à-dire lors de la perfusion de 3 mL de vésicules de DPPC 1 mM avec 250 μ L d'éthanol 95%, n'est rien d'autre que celui de la dilution. Comme on peut le voir sur la figure 3.24, l'éthanol n'affecte en rien le spectre du Py-DPPC. La même observation s'applique au Laurdan; l'ajout d'une petite quantité d'éthanol n'a qu'un effet de dilution sur les suspensions de vésicules [141]. Ce résultat était prévisible puisque les quantités d'alcool utilisées correspondent à moins d'un dixième des concentrations limites données ci-dessus.

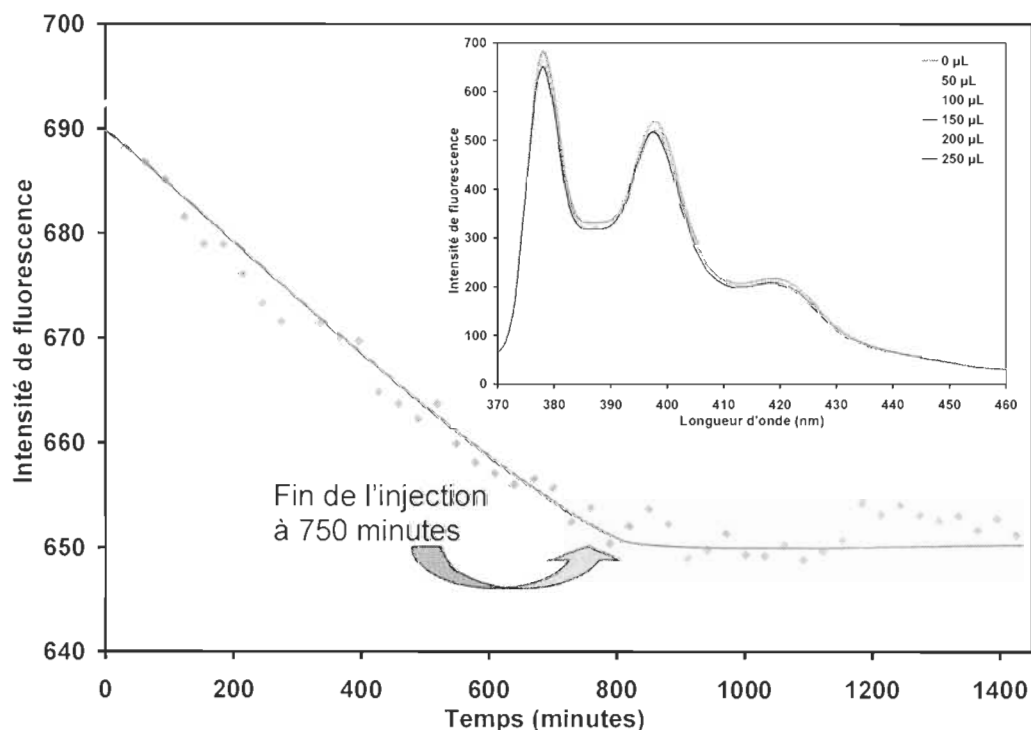


FIGURE 3.24 : Effet de l'éthanol sur les vésicules de DPPC/ Laurdan. Effet de l'éthanol sur les vésicules à 1 mM de DPPC/ Laurdan 1000:1, tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion de 250 μ L d'éthanol 95% sur 12,5 heures, intensité de fluorescence à 378 nm. Encart : spectres d'émission du Py-DPPC à différents volumes d'éthanol.

3.3.2 Vérification de l'insertion des sondes dans la membrane

L'usage des sondes fluorescentes que nous avons choisies est bien documenté. Néanmoins, il convient de vérifier si les sondes que nous avons insérées dans les vésicules de DPPC sont correctement localisées car des défauts de localisation pourraient nous induire en erreur lors de l'interprétation des données. À cette fin, nous avons mesuré le quenching de la fluorescence des sondes à l'aide de l'ion bromure. Cet ion lourd hydrosoluble devrait nous indiquer si une quantité mesurable de fluorophores s'est mal insérée dans la membrane et si elle est accessible à la phase aqueuse.

Cette vérification a été réalisée en utilisant des vésicules à 10 mM en DPPC contenant la sonde à un rapport sonde:lipide de 1:2000. Comme on peut le voir sur la figure 3.25, la fluorescence du Laurdan n'est que très peu affectée par la présence de KBr, indiquant que le Laurdan est bien inséré dans la membrane, qu'il n'a pas accès à la phase aqueuse et qu'il n'est pas accessible à l'ion Br^- . Quant au Py-DPPC, environ 8% de sa fluorescence est quenchée par le bromure quand ce dernier est ajouté à une concentration atteignant 50 mM. Au-delà de cette concentration, l'intensité de la fluorescence ne varie plus. Ceci nous indique qu'une petite quantité de sondes sont accessibles au solvant et manifestement mal insérées dans la membrane. Il n'en demeure pas moins que la majorité des sondes semblent correctement insérées et que les informations qu'on peut obtenir d'elles seront valables dans la mesure où une partie importante de leur fluorescence sera affectée par le quenchneur.

3.3.3 Mesure de la partition de l'halothane dans des membranes de DPPC par le quenching de la fluorescence du Laurdan

Comme mentionné précédemment, le Laurdan est une sonde lipophile affichant une grande sensibilité face à la polarité et à la mobilité du solvant et, de ce fait, à l'état physique des lipides qui l'entourent. Ainsi, les mesures ont été

faites à 25°C et 55°C afin d'éviter tout recoupement des spectres du Laurdan dans différentes phases lipidiques, la température de transition du DPPC étant 42°C. Ainsi, le maximum d'émission (λ_{em}) du Laurdan à 25°C et 55°C est observé à 442 nm et 490 nm, respectivement, pour une excitation (λ_{ex}) à 390 nm (figure 3.26).

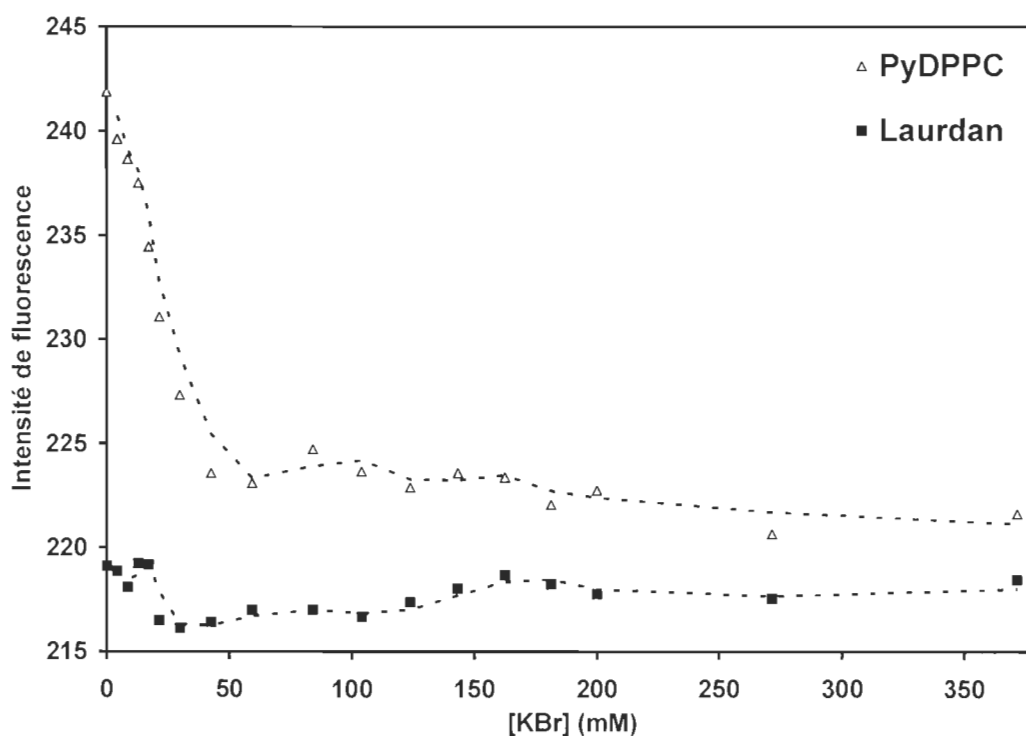


FIGURE 3.25 : Insertion des sondes dans la membrane. Quenching de la fluorescence du Laurdan et du Py-DPPC par des concentrations croissantes de KBr à 25°C. Les sondes sont insérées à un rapport sonde:lipide 1:2000 dans des vésicules de DPPC 10 mM. Tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5.

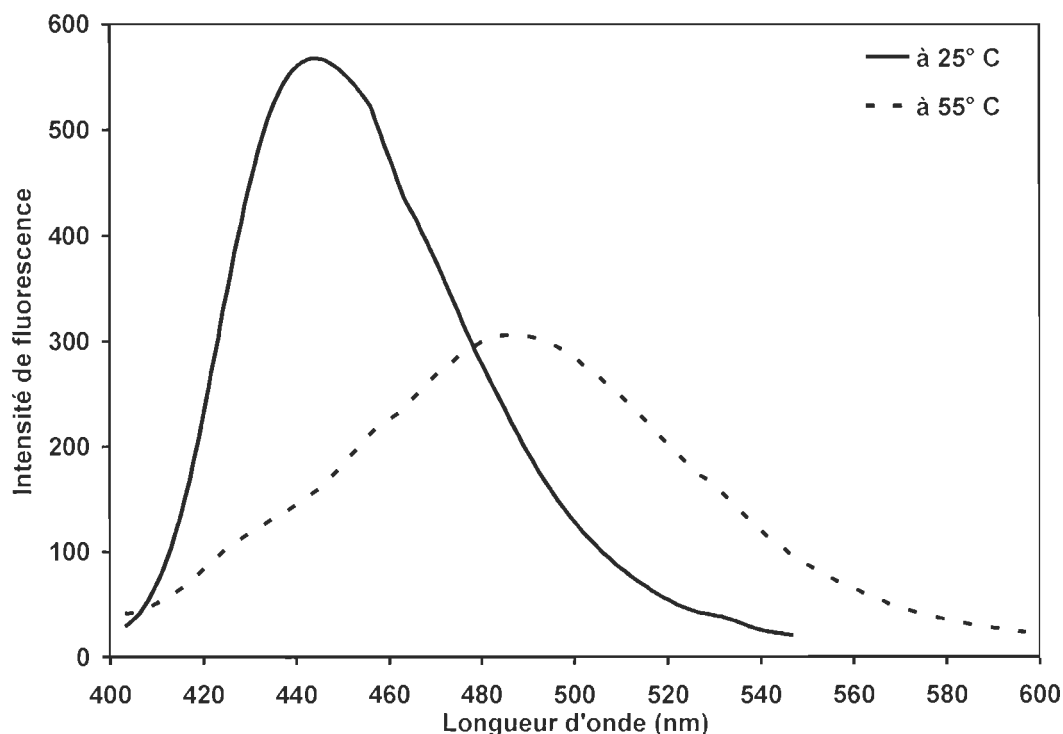


FIGURE 3.26 : Sensibilité du Laurdan envers la phase lipidique (gel ou cristal liquide). Vésicules à 7 mM de DPPC/Laurdan 1000:1, tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5.

Le quenching de fluorescence procure de l'information sur l'accessibilité d'une molécule (quencheur) envers une autre (sonde) et peut nous renseigner sur la distribution du quencheur par rapport à la sonde. Le quenching de fluorescence étant un phénomène basé sur la diffusion des molécules, il est normal que la température ait une influence sur les vitesses de quenching. En effet, à température élevée, l'énergie cinétique des molécules est plus grande et leur vitesse de diffusion doit être augmentée. Ainsi, les différences entre les constantes de quenching à 25°C et 55°C peuvent être attribuables aux propriétés thermodynamiques (énergie cinétique) de la réaction autant qu'aux caractéristiques physico-chimiques (phase lipidique) de la membrane.

La figure 3.27a présente les spectres de fluorescence du Laurdan en présence d'halothane (quencheur) à 55°C. L'absence de déplacement du maximum d'émission indique qu'il n'y pas de changement de phase des lipides, car s'il en était autrement, le maximum d'émission du Laurdan serait déplacé de 490 nm à 442 nm et il y apparaîtrait un épaulement dans le spectre du Laurdan. Dans le cas des mesures effectuées à 55°C, le DPPC est en phase fluide (L_α ou cristal liquide) et le quenching s'effectue de manière linéaire (figure 3.27b). Dans ces conditions, il est possible d'évaluer les constantes de quenching apparentes (K_{app}) et d'estimer le coefficient de partition (K_P) entre la phase lipidique et la phase aqueuse, ainsi que la constante de quenching réelle (K_M) dans la phase lipidique (voir section 2.3.4.1). Ainsi, ayant effectué les mesures pour différentes concentrations de vésicules, nous pouvons évaluer le rapport de volume de lipide sur le volume total (V_L/V_T) et déterminer graphiquement le K_P et le K_q de l'halothane (quencheur) (figure 3.28 et tableau 3.3). Les valeurs de K_M et K_P obtenues pour l'halothane dans le DPPC à 55°C sont $4.97 \times 10^{-2} \mu M$ et 344, respectivement. Toutefois, la valeur de partition obtenue indique le nombre de molécules par sonde fluorescente. Puisque nous utilisons les sondes dans un rapport sonde/lipide de 1:1000, cette partition revient à 0,344 molécules d'halothane par lipide. Ces valeurs de partition concordent avec celles que l'on retrouve dans la littérature, soit entre 114 de 330, tout dépendant des systèmes étudiés et des conditions expérimentales [26, 171-174].

L'effet des anesthésiques sur les lipides a été passé en revue aux points 1.4.1 et 1.7.2; rappelons néanmoins que les anesthésiques généraux ont la propriété d'abaisser la température de transition de phase (T_m) des lipides. Outre cet abaissement du T_m , on retrouve aussi des effets sur le polymorphisme des lipides, dont l'induction d'une transition de la phase L_β (état gel) à L_α (cristal liquide) [37, 109]. De plus, il a été démontré que la distribution des anesthésiques dans les bicouches de DPPC était différente entre la phase fluide (L_α) et la phase gel (L_β) et qu'ils induisaient aussi, à concentration élevée, des phases intermédiaires où les chaînes acyles se retrouvent interdigitées [37].

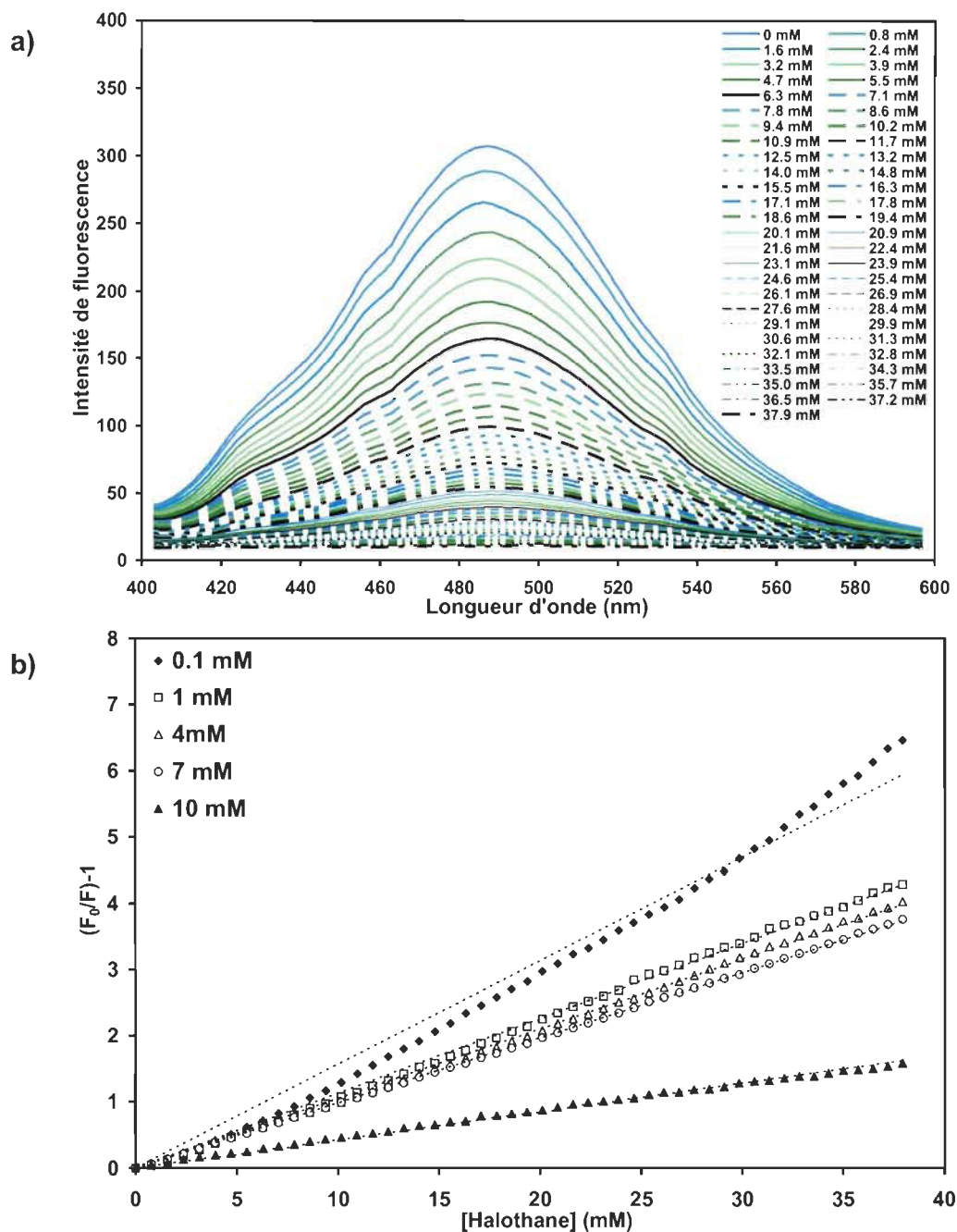


FIGURE 3.27 : Quenching du Laurdan à 55°C. Quenching du Laurdan à 55°C, vésicules à 7 mM de DPPC/ Laurdan 1000:1, tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5 % v/v. a) Spectres de fluorescence mesurés en cours de perfusion. Les concentrations d'halothane correspondantes sont indiquées dans la figure. b) Graphique de Stern Volmer obtenu pour les concentrations de lipide indiquées dans la figure.

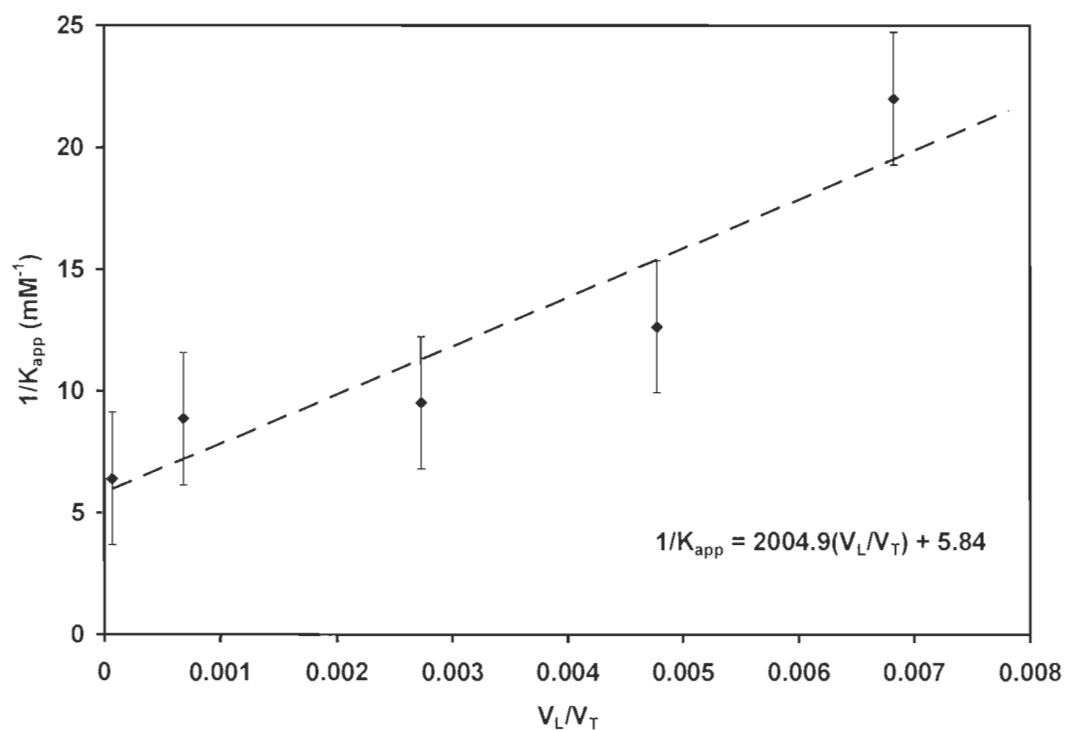


FIGURE 3.28 : Coefficient de partition de l'halothane dans les vésicules de DPPC à 55°C. Estimation du coefficient de partition à partir de la constante de quenching apparente observée à différentes concentrations de lipide. Le graphique est une représentation de l'équation 2.12 (section 2.3.4.1). Vésicules de DPPC/ Laurdan 1000:1, tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5% v/v.

TABLEAU 3.3
Coefficient de partition de l'halothane dans le DPPC (Laurdan).

[DPPC] (mM)	V_L (mL)	V_L/V_T	K_{app} (mM)	$1/K_{app}$ (mM⁻¹)
0,1	2,22E-04	6,82E-05	0,156	6,39
1	2,22E-03	6,82E-04	0,113	8,86
4	8,87E-03	2,73E-03	0,105	9,52
7	1,55E-02	4,78E-03	0,083	12,1
10	2,22E-02	6,82E-03	0,044	22,6
Volume partiel DPPC : 1228 Å³				
Volume total : 3,25 mL				

Le K_{app} est évalué à partir des pentes des courbes de quenching du Laurdan dans le DPPC à 55°C. La valeur de 1228 Å³ de volume partiel pour le DPPC est utilisée pour évaluer le rapport V_L/V_T [175].

Dans les cas des vésicules à 25°C, l'atténuation de la fluorescence du Laurdan ne s'effectue pas de manière linéaire et laisse présager la présence de multiples constantes de quenching, comme si plusieurs phénomènes se superposaient (figure 3.29). On peut facilement imaginer que les lipides en phase gel (à 25°C) se fluidifient au fur et à mesure que l'anesthésique (quencheur) pénètre dans la membrane, induisant localement des changements de phase de gel à fluide. Néanmoins, ces changements de phase n'apparaissent pas sur les spectres car les sondes se retrouvant dans la phase fluide sont quenchées instantanément, dû à la présence implicite d'anesthésiques, alors que les sondes dans la phase gel n'ont explicitement peu ou presque pas de quencheur dans leur voisinage. Ainsi, la diminution de la fluorescence est principalement causée par le quenching des sondes dans les microdomaines fluides. Ce phénomène combiné avec la perfusion lente à l'équilibre fait qu'on n'aperçoit pas de déplacement du λ_{max} d'émission ou encore d'épaulement dans les spectres (figure 3.29a). C'est ce que l'on peut voir sur la figure 3.29b; initialement, la fluorescence du Laurdan à 25°C est faiblement affectée par l'halothane mais lorsque l'anesthésique induit localement des changements de phase dans les lipides, l'importance du quenching augmente considérablement. De ce fait, dans la phase gel, le quenching débute à des concentrations où l'halothane provoquait plus de 50% de l'atténuation de la fluorescence dans la phase L_u (à 55°C, figure 3.27b).

3.3.4 Conclusions sur le quenching de la fluorescence du Laurdan

L'abaissement du T_m et les modifications morphologiques des vésicules de phospholipides par les anesthésiques ne sont pas un résultat nouveau en soi. Par contre, la fluctuation locale des domaines de lipides, due à la distribution hétérogène des anesthésiques dans la membrane, peut conduire à la formation de régions interfaciales à hautes concentrations locales d'anesthésiques, lesquelles pourraient être supérieures à la concentration moyenne dans la membrane. Ainsi, ce résultat peut s'expliquer par la superposition de deux transi-

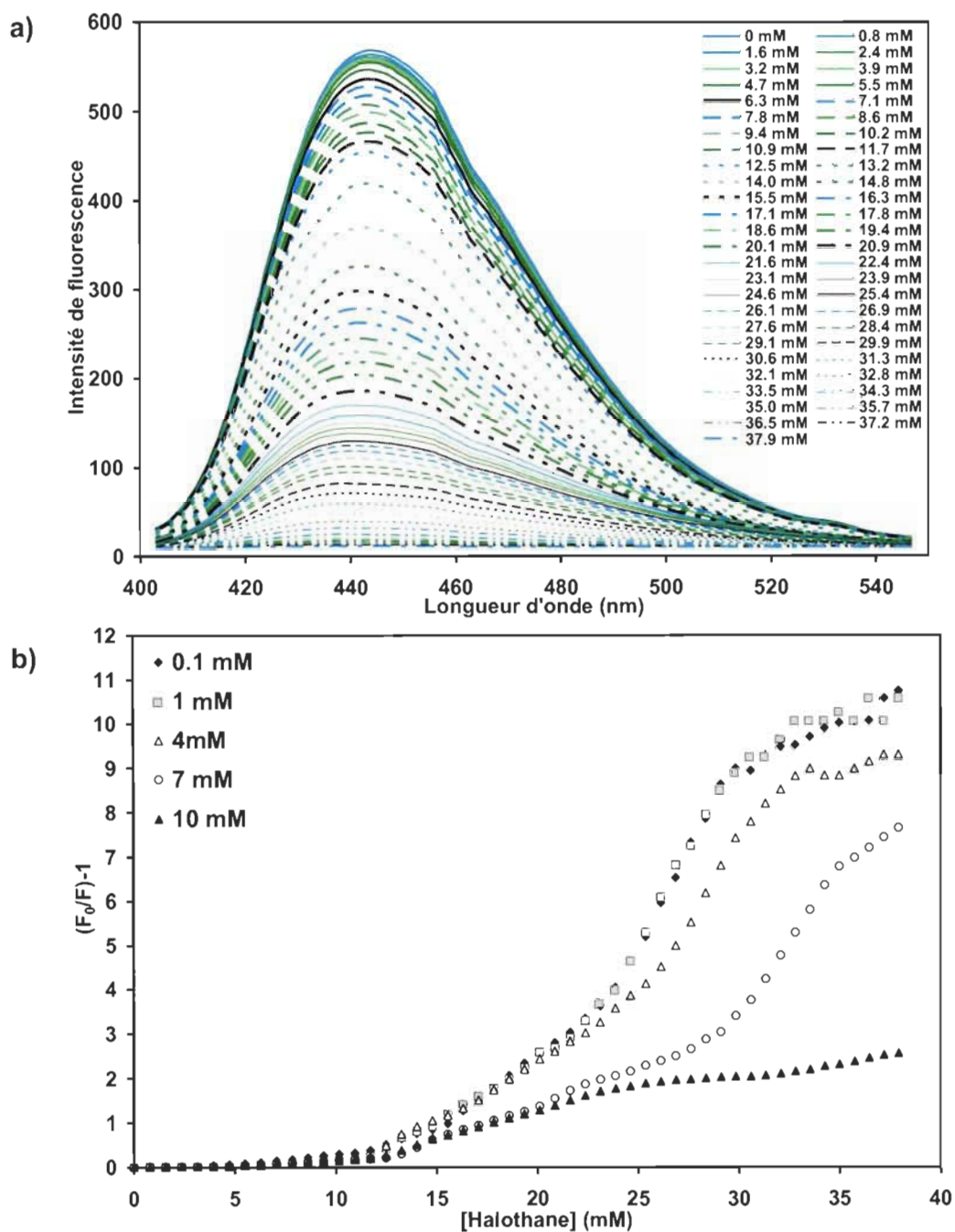


FIGURE 3.29 : Quenching du Laurdan à 25°C. Quenching du Laurdan à 25°C, vésicules à 7 mM de DPPC/ Laurdan 1000:1, tampon Tris 10 mM, KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5% v/v. A) Spectres de fluorescence mesurés en cours de perfusion. Les concentrations d'halothane correspondantes sont indiquées dans la figure. B) Graphique de Stern Volmer obtenu pour les concentrations de lipide indiquées dans la figure.

tions de phase causées par une distribution non-aléatoire des anesthésiques dans la membrane. Comme la transition gel à liquide cristallin des lipides est fortement influencée par la présence d'anesthésiques, ce que l'on observerait à 25°C n'est pas le quenching des sondes dans la phase gel (L_β), mais plutôt celui des sondes déjà en phase fluide. L'halothane semble, à première vue, préférer une phase lipidique plutôt qu'une autre, mais il n'en est rien puisque c'est la présence de celui-ci qui provoque localement le changement de phase. De plus, il semble que tout défaut ou fluctuation de la membrane aura une influence notable sur la distribution de l'anesthésique et créera artificiellement des sites potentiels d'interactions pour les anesthésiques.

3.3.5 Quenching du Py-DPPC et partition de l'halothane dans la membrane

La fluorescence du pyrène lié à des phospholipides est grandement utilisée pour étudier les membranes, notamment la diffusion latérale et la fluidité membranaire, les interactions protéines-lipides, la fusion membranaire et plusieurs autres phénomènes membranaires [166]. Ses caractéristiques principales sont un long temps de vie d'excitation, une hydrophobicité appréciable et la formation d'excimères dépendante de la concentration. Dans ce cas-ci, au lieu d'étudier la formation d'excimères, nous avons examiné l'interaction de l'halothane (AG) avec les vésicules de DPPC. Ces mesures ont été faites à faible ratio de pyrène : phospholipides afin que la formation d'excimères ne contribue pas à la fluorescence du pyrène [174]. Ainsi, l'atténuation (quenching) de la fluorescence du pyrène reflètera uniquement la proximité de l'halothane (quencheur) et du fluorophore. Il est important de rappeler ici que la sonde fluorescente, qui est rattachée à l'extrémité d'une des chaînes acyles du DPPC, se localise au centre de la membrane. Le spectre d'émission de cette sonde se compose principalement de deux bandes caractéristiques à 376 nm et 396 nm et on retrouve également une bande moins importante à 418 nm (figure 3.30). Le Py-DPPC, lorsqu'incorporé dans des membranes a la propriété de former des excimères (dimères excités) dépenda-

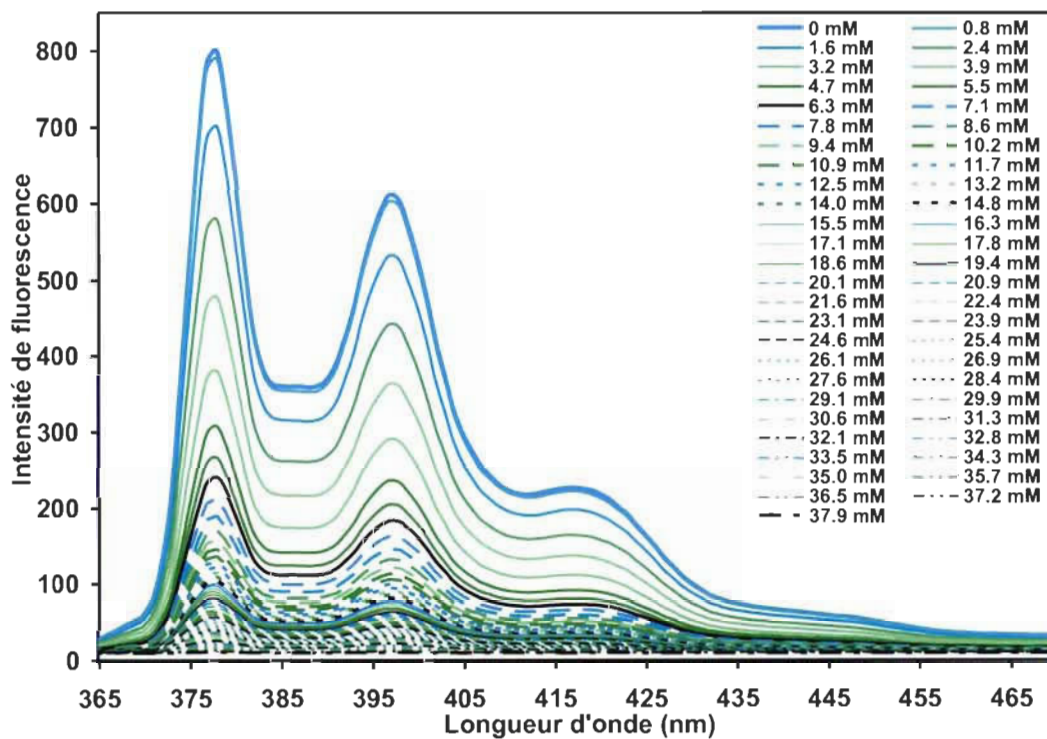


FIGURE 3.30 : Quenching du Py-DPPC à 25°C. Spectres de fluorescence mesurés en cours de perfusion. Les concentrations d'halothane correspondantes sont indiquées dans la figure. Vésicules de DPPC/Py-DPPC 1000:1 à 10 mM, tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5% v/v.

ment de la concentration utilisée. La formation d'excimères est observable par l'apparition de fluorescence à 480 nm. Donc, typiquement, la fluorescence à 376 et 396 nm est caractéristique de la forme monomérique de la sonde [176]. Conséquemment, le quenching de la fluorescence du Py-DPPC sera causé par l'apparition de l'halothane (quencheur) dans le cœur de la membrane.

Sur la figure 3.30, on peut voir les spectres de fluorescence lors du quenching du Py-DDPC à 25°C. La première observation que l'on peut faire est qu'il n'y a pas formation d'excimères, on a donc une distribution homogène de la sonde dans la membrane. Contrairement au Laurdan, les courbes de quenching nous donnent des relations linéaires autant à 25°C qu'à 55°C (figure 3.31). Ceci nous indique que l'halothane se distribue dans le cœur de la membrane de la même manière, peu importe la morphologie des lipides. Ce résultat est intéressant puisque, compte tenu des résultats obtenus avec le Laurdan, on se serait attendu à avoir une différence dans la distribution de l'halothane dans les différentes phases des lipides. Néanmoins, cela permet d'évaluer le coefficient de partage de l'halothane entre la phase aqueuse et la phase membranaire à ces deux températures. À partir du graphique de $1/K_{app}$ en fonction de V_L/V_T (tableau 3.4 et figure 3.32), on peut évaluer encore une fois les coefficients de partition de l'halothane dans la membrane. Les valeurs de K_M obtenues pour les vésicules à 25°C et à 55°C sont de 2,65 μM et 5,04 μM , respectivement. Les coefficients de partage (K_P) calculés à partir de la régression linéaire sont de 172 à 25°C et de 105 à 55°C. Comme nous travaillons à des concentrations en sonde/lipide de l'ordre de 1:1000, cela donne 0,172 et 0,105 molécules d'halothane par lipide à 25°C et 55°C, respectivement. Ces valeurs de partition indiquent que la quantité d'halothane solubilisée dans les vésicules est plus grande à basse température. Cette différence peut s'expliquer par l'augmentation de la vitesse de diffusion de l'halothane à plus haute température. Toutefois, ces valeurs sont similaires à ce que l'on retrouve dans la littérature [174].

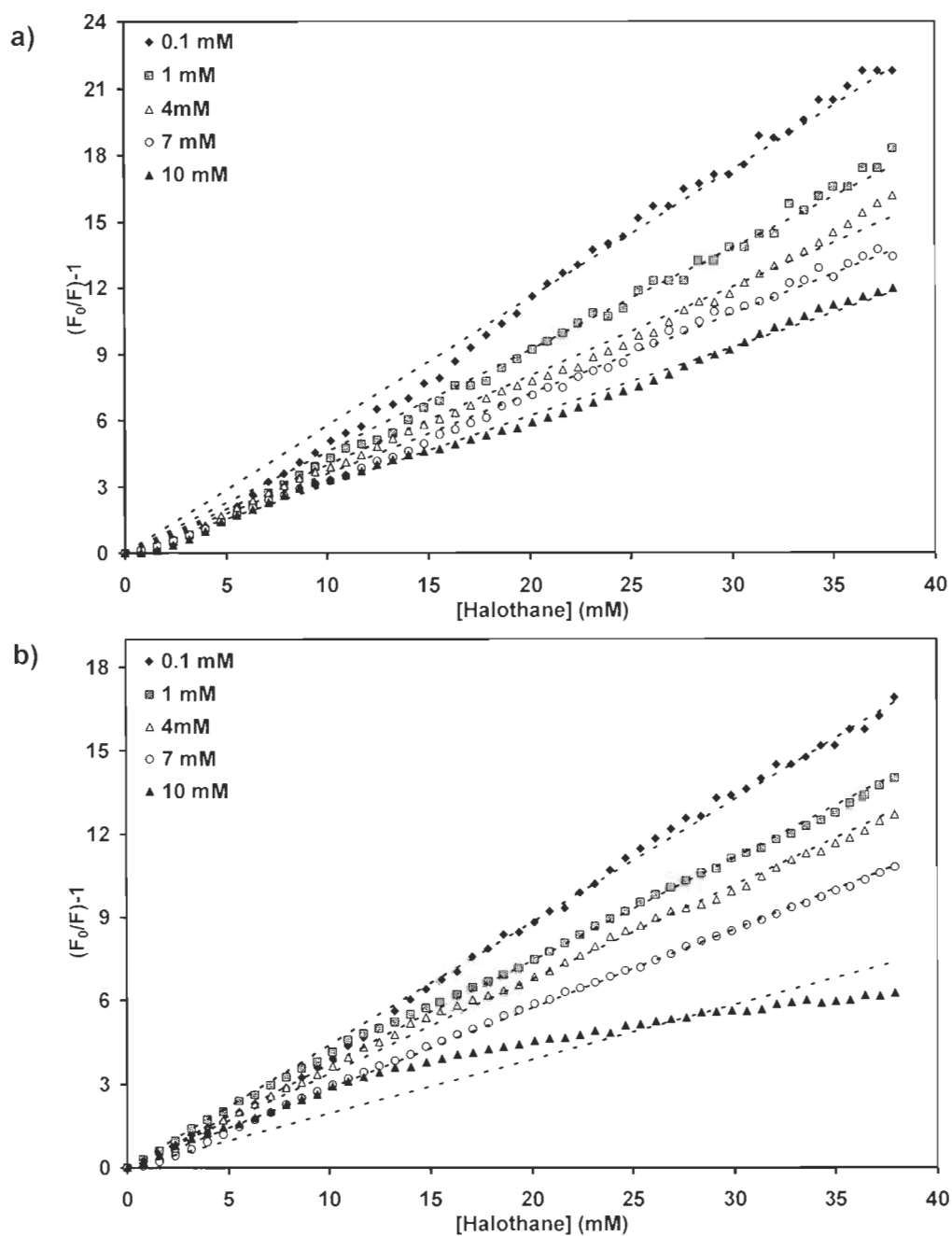


FIGURE 3.31 : Quenching du Py-DPPC. Graphique de Stern Volmer obtenu pour les concentrations de lipide indiquées dans la figure. a) à 25°C et b) à 55°C. Vésicules de DPPC/ Py-DPPC 1000:1, tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μL d'halothane/éthanol à 5% v/v.

TABLEAU 3.4
Coefficient de partition de l'halothane dans le DPPC (Py-DPPC).

[DPPC] (mM)	V_L/V_T	25°C		55°C	
		K_{app} (mM)	$1/K_{app}$ (mM ⁻¹)	K_{app} (mM)	$1/K_{app}$ (mM ⁻¹)
0,1	6,82E-05	0,578	1,73	0,441	2,27
1	6,82E-04	0,461	2,17	0,372	2,69
4	2,73E-03	0,402	2,49	0,339	2,95
7	4,78E-03	0,361	2,77	0,286	3,50
10	6,82E-03	0,311	3,22	0,195	5,14
Volume partiel DPPC: 1228 Å³					
Volume total: 3,25 mL					

Le K_{app} est évalué à partir des pentes des courbes de quenching du Py-DPPC dans le DPPC à 25°C ou 55°C. La valeur de 1228 Å³ de volume partiel pour le DPPC est utilisée pour évaluer le rapport V_L/V_T [175]

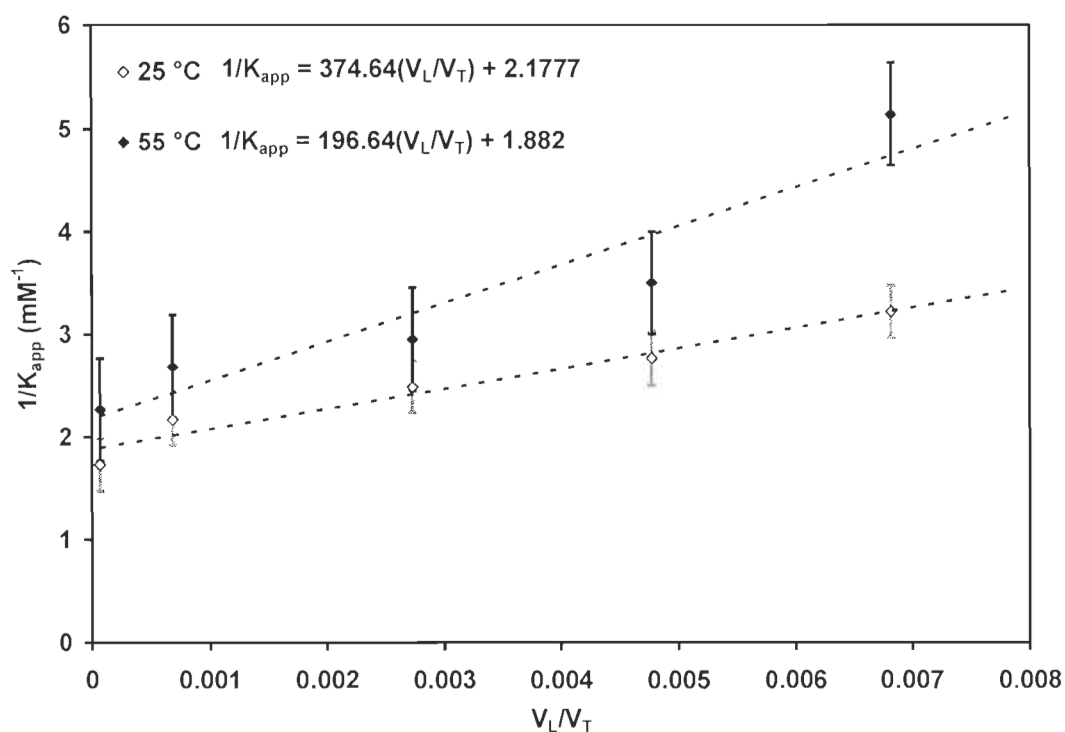


FIGURE 3.32 : Coefficient de partition de l'halothane dans les vésicules de DPPC. Estimation du coefficient de partition à 25°C et 55°C, à partir de la constante de quenching apparente observée à différentes concentrations de lipide. Le graphique est une représentation de l'équation 2.12 (section 2.3.4.1). Vésicules de DPPC/Py-DPPC 1000:1, tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5% v/v.

3.3.6 Conclusions sur le quenching du Py-DPPC

Le quenching de la fluorescence du Py-DPPC par l'halothane dépend peu de la température et de la phase lipidique. Qui plus est, on trouve une plus grande quantité (0,172 molécules/lipide à 25°C vs 0,105 molécules/lipide à 55°C) d'halothane dans le cœur de la membrane lorsque celle-ci est en phase L_{β} (gel) que lorsqu'elle est en phase cristal liquide. Toutefois, ce résultat peut s'expliquer par le fait qu'à température élevée, les molécules d'halothane (quencheur) diffusent plus rapidement dans la membrane, augmentant ainsi leur efficacité de quenching, donnant ainsi l'impression qu'on a besoin de moins d'halothane pour quencher toutes les sondes. Néanmoins, lorsque les lipides se fluidifient ou se désorganisent en raison de la présence d'anesthésiques dans le cœur de la membrane, cela permet à d'autres molécules d'halothane de pénétrer en surface. Ceci explique la courbe de quenching du Laurdan à 25°C obtenue à la figure 3.29b : une certaine quantité d'halothane se distribuerait d'abord dans la région hydrocarbonée de la membrane en désorganisant graduellement les chaînes acyles, provoquant ainsi progressivement une transition dans la structure des lipides. Lorsque cette transition s'effectue, de nouvelles molécules d'halothane peuvent pénétrer au niveau des têtes polaires, rester en surface et compléter ainsi les changements morphologiques sur les lipides.

Cela dit, il faut probablement mentionner certaines réserves en ce qui concerne l'interprétation des résultats obtenus avec le Py-DPPC, compte tenu de la taille non négligeable du fluorophore qui y est rattaché. En effet, l'insertion d'une sonde fluorescente comme le pyrène au niveau d'une membrane pourrait entraîner des perturbations structurales et dynamiques par rapport au système ne contenant que le DPPC pur. De plus, on l'a vu en utilisant l'ion bromure comme quencheur, il existe une incertitude quant à la localisation et à l'orientation d'au moins 8% de ces sondes dans la membrane. Pour pallier en partie ce problème, on a utilisé une sonde analogue à sa contrepartie phospholipidique afin de minimiser les différences de propriétés physico-

chimiques. Qui plus est, l'utilisation de lipides bromés à différentes positions dans la chaîne a permis de démontrer, dans le cas du Py-DPPC, que la distribution transversale du pyrène est déterminée principalement par la longueur et la conformation de la chaîne hydrocarbonée le portant. Le groupement pyrène ne démontre pas de tendance intrinsèque à se partitionner en surface de la membrane et à forcer la chaîne acyle à adopter une conformation distordue et mime donc bien l'état de son précurseur naturel [168].

On l'a mentionné, le désavantage de l'utilisation d'une sonde lipidique comme le Py-DPPC tient principalement à la taille relativement grande de son fluorophore. On pourrait ainsi être tenté de croire que l'encombrement du pyrène rattaché à la chaîne acyle du lipide peut affecter considérablement les propriétés natives du phospholipide, du moins pour les molécules se retrouvant à proximité de la sonde. Cette question a été examinée encore récemment et il appert, de façon peut-être contre-intuitive, que, loin de générer localement du désordre autour du groupe pyrène, l'introduction de Py-DMPC dans une bicouche de DMPC en phase L_α augmente le paramètre d'ordre et le degré de compaction sur une distance de 1,5 à 2 nm, autour du pyrène [177]. Ainsi, il devient moins aisé d'imaginer que l'anesthésique pénètre aisément le cœur hydrophobe de la membrane parce que le pyrène y génère des défauts structuraux. De plus, la même étude signale que jusqu'à une concentration de sondes 5 mol%, la formation d'excimère demeure un événement rare.

Par ailleurs, l'éventualité de l'immiscibilité du Py-DPPC dans le DPPC a également été envisagée. Les facteurs principaux responsables de l'immiscibilité du Py-DPPC dans les membranes seraient la température, la différence de température de transition de phase (T_m) entre la matrice membranaire et le lipide portant le pyrène, et la différence structurale avec le lipide précurseur [178]. Dans notre cas, le Py-DPPC a peu d'influence sur le T_m du DPPC qui passe de 41°C pour le DPPC pur à 40.7°C dans un mélange Py-DPPC:DPPC à 1:100 [176], soit un ratio 10 fois plus élevé que dans notre

cas. Qui plus est, le Py-DPPC se distribue de manière homogène entre les phases gel et liquide cristallin de bicouches lipidiques bien qu'au voisinage de la température de transition de phase, le Py-DPPC affiche une faible préférence pour la phase liquide cristalline dans le DPPC. Il n'y a cependant aucune immiscibilité dans une phase ou l'autre dans ces systèmes jusqu'à une concentration de sondes de 10 mol% [167]. Ce dernier résultat diffère cependant de celui présenté par Somerharju et ses collaborateurs [179] et où la partition préférentielle pour la phase fluide apparaît au-delà d'une concentration de sondes de 5 mol%, ce qui reste toutefois 50 fois supérieur aux concentrations de sonde que nous avons utilisées.

Compte tenu de ces réserves, il demeure raisonnable de dire que le Py-DPPC indique que l'anesthésique pénètre d'abord le cœur hydrophobe de la bicouche et se distribue par après au niveau des têtes polaires. Ce résultat nous est apparu étonnant, surtout que rien dans les mesures antérieures ne laissait supposer que l'anesthésique pouvait si facilement atteindre le cœur hydrophobe de la membrane ou de l'une ou l'autre de ses composantes. Nous ne pouvons néanmoins en faire abstraction, surtout qu'il a été obtenu et ré-obtenu de façon consistante. On peut difficilement arguer qu'il résulte d'une mauvaise incorporation de la sonde dans les vésicules. En effet, si on devait admettre que le fluorophore du Py-DPPC se localisait accidentellement à la surface de la vésicule, sa courbe de quenching devrait ressembler à celle du Laurdan, or, ce n'est pas le cas. Par ailleurs, les courbes de quenching du Py-DPPC sont des fonctions de saturation simples qui conduisent rapidement à 100% de quenching. Comme il est difficile d'admettre que 100% des sondes puissent être mal localisées, on doit donc admettre que le cœur hydrophobe d'une bicouche de lipide pur se sature rapidement d'anesthésique sans oublier que le fluorophore pourrait créer un environnement propice à la localisation de l'halothane.

3.3.7 Comparaison du comportement des deux sondes

Lorsqu'on compare les résultats obtenus pour les deux sondes, on constate que la majeure partie de la fluorescence de la sonde à l'intérieur du cœur de la membrane, le Py-DPPC, est fortement atténuée à une concentration d'anesthésique où la fluorescence du Laurdan l'est très peu (figure 3.33a et b). Autant à 25°C qu'à 55°C, l'halothane se distribue d'abord dans le cœur hydrophobe de la membrane et modifie graduellement la structure de la bicouche pour finalement permettre à l'anesthésique de s'infiltrer progressivement à l'interface des têtes polaires, où se trouve le Laurdan. En outre, les coefficients de partition indiquent aussi que la distribution transversale de l'halothane n'est pas uniforme dans la membrane. Si on assume une efficacité de quenching similaire pour les deux sondes, à 55°C on retrouve 0,342 molécules d'halothane dans la membrane par lipide pour le Laurdan, contre 0,105 molécules d'anesthésique par lipide pour le Py-DPPC. Ainsi, près du tiers des molécules d'halothane doivent se retrouver dans le cœur de la membrane à cette température. À l'inverse, à 25°C on retrouve plus d'halothane dans le cœur (0,172 molécules/lipide) de la membrane, mais le quenching complet de la fluorescence du Laurdan nécessite la même quantité d'halothane qu'à 55°C. Cette observation indique que l'halothane est en équilibre dynamique non seulement entre les phases aqueuses et lipidiques, mais aussi entre des positions précises à l'intérieur de la membrane.

À 25°C, l'insertion graduelle d'halothane au niveau des chaînes acyles induit progressivement une transition de phase dans les lipides et permet à d'autres molécules d'anesthésiques de pénétrer au niveau des têtes polaires pour finalement se localiser préférentiellement à ce niveau à saturation (figure 3.34). Ainsi, la fluorescence du Py-DPPC est atténuée avant celle du

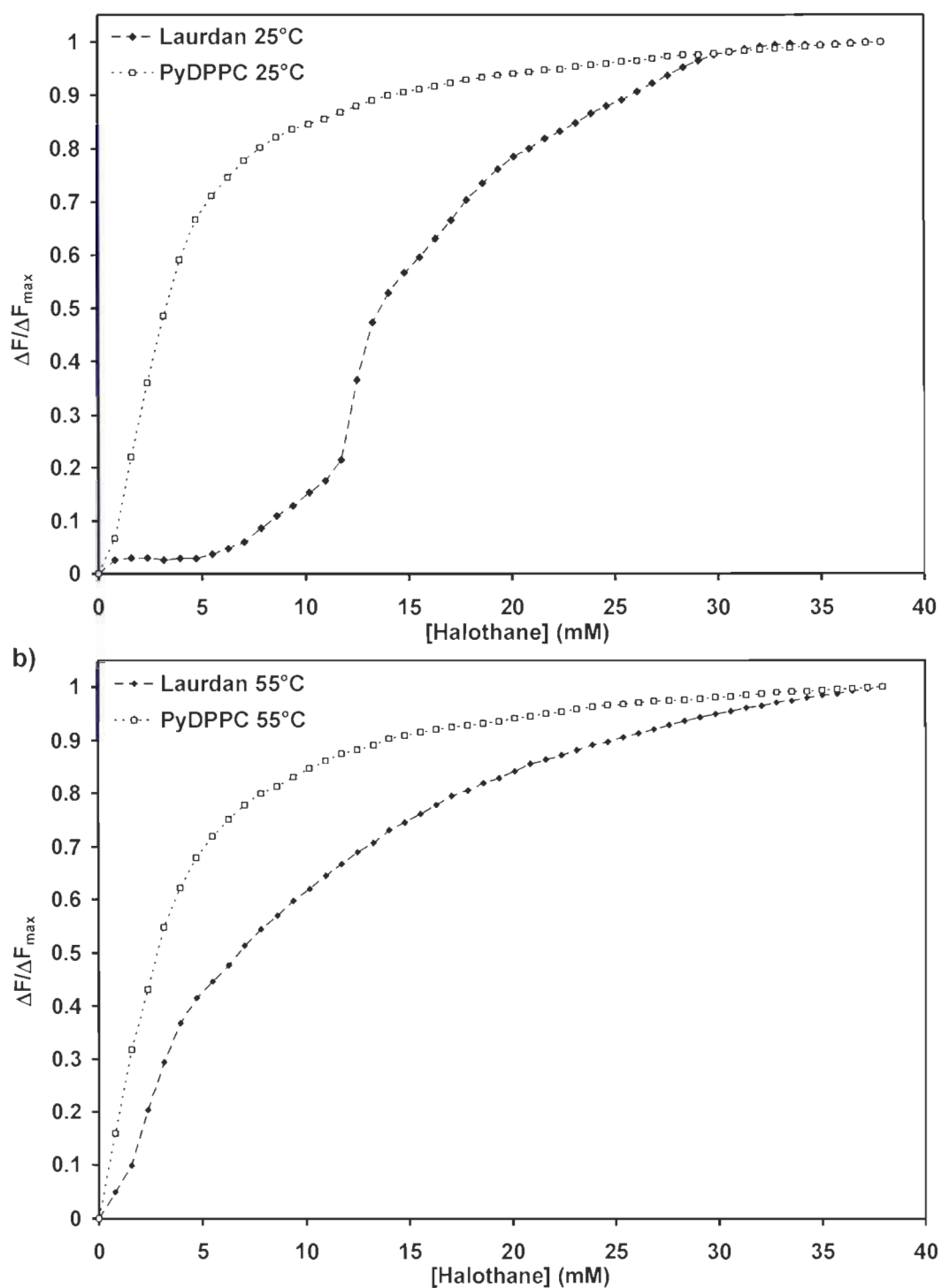


FIGURE 3.33 : Comparaison du quenching du Laurdan et du Py-DPPC. a) à 25°C. b) à 55°C. Vésicules 4 mM DPPC à un ratio lipide/sonde de 1000:1, tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5% v/v.

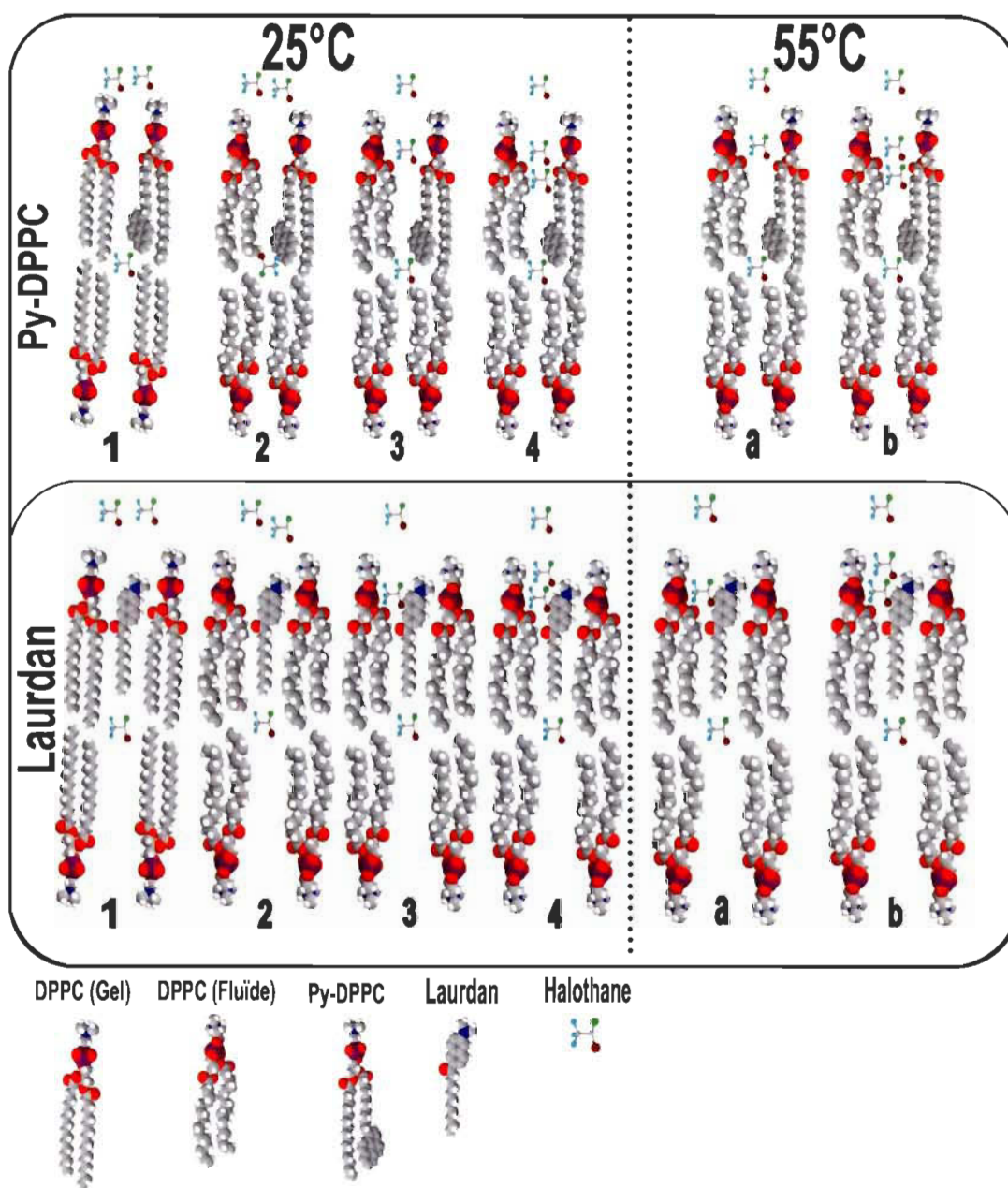


FIGURE 3.34 : Distribution de l'halothane dans les vésicules. Schémas représentant la distribution de l'halothane en fonction du temps/concentration à **25°C** ; **1)** L'halothane pénètre dans le cœur de la membrane. **2)** La présence d'halothane dans la membrane induit des changements de phase. **3)** De l'halothane s'insère au niveau des têtes polaires **4)** Distribution de l'halothane à saturation. **À 55°C** ; **a)** L'halothane pénètre dans la membrane à la fois en surface et dans le cœur hydrophobe. **b)** Distribution de l'halothane à saturation.

Laurdan. Puisqu'à 55°C les lipides sont déjà en phase cristal liquide, l'anesthésique peut donc d'emblée se localiser au niveau des têtes polaires. Néanmoins, la quantité d'anesthésique nécessaire pour quencher les sondes reste la même à 25°C ou 55°C et la distribution finale à l'équilibre sera la même.

Les différences de sensibilité des deux sondes face à l'ajout d'halothane aux membranes sont importantes et il y a lieu de se demander si leur réponse reste la même quand elles sont présentes simultanément dans le même échantillon. Pour le vérifier, nous avons réalisé des mesures de quenching de fluorescence par l'halothane sur des vésicules contenant les deux sondes à un rapport sonde:lipide de 1:2000 chacune, afin de minimiser l'influence que peut exercer l'insertion de sondes dans la membrane. Les mêmes mesures de quenching de fluorescence ont été effectuées dans les mêmes conditions que pour les sondes prises individuellement. Les résultats obtenus sont semblables et en concordance avec ceux obtenus précédemment avec le Laurdan et le Py-DPPC pris séparément.

Comme on peut le voir sur la figure 3.35b, à 55°C, le quenching du Laurdan, comme celui du Py-DPPC, s'effectue de manière plutôt linéaire. Les constantes de quenching obtenues sont 0,1829 mM et 0,0507 mM pour le Py-DPPC et le Laurdan, respectivement. Ces valeurs sont comparables à celles que nous avons obtenues précédemment pour les mesures effectuées avec les sondes prises séparément (0,1947 mM pour le Py-DPPC et 0,0443 mM pour le Laurdan : Tableau 3.3 et 3.4).

Les résultats récoltés à 25°C (figure 3.35a) sont également similaires à ceux obtenus avec chacune des deux sondes prises séparément. Aux faibles concentrations d'halothane, la fluorescence du Laurdan à 25°C n'est pratiquement pas atténuée mais lorsque l'anesthésique induit localement des changements de phase dans les lipides, le quenching augmente largement. Ainsi, dans la phase gel, le quenching débute à des concentrations provoquant

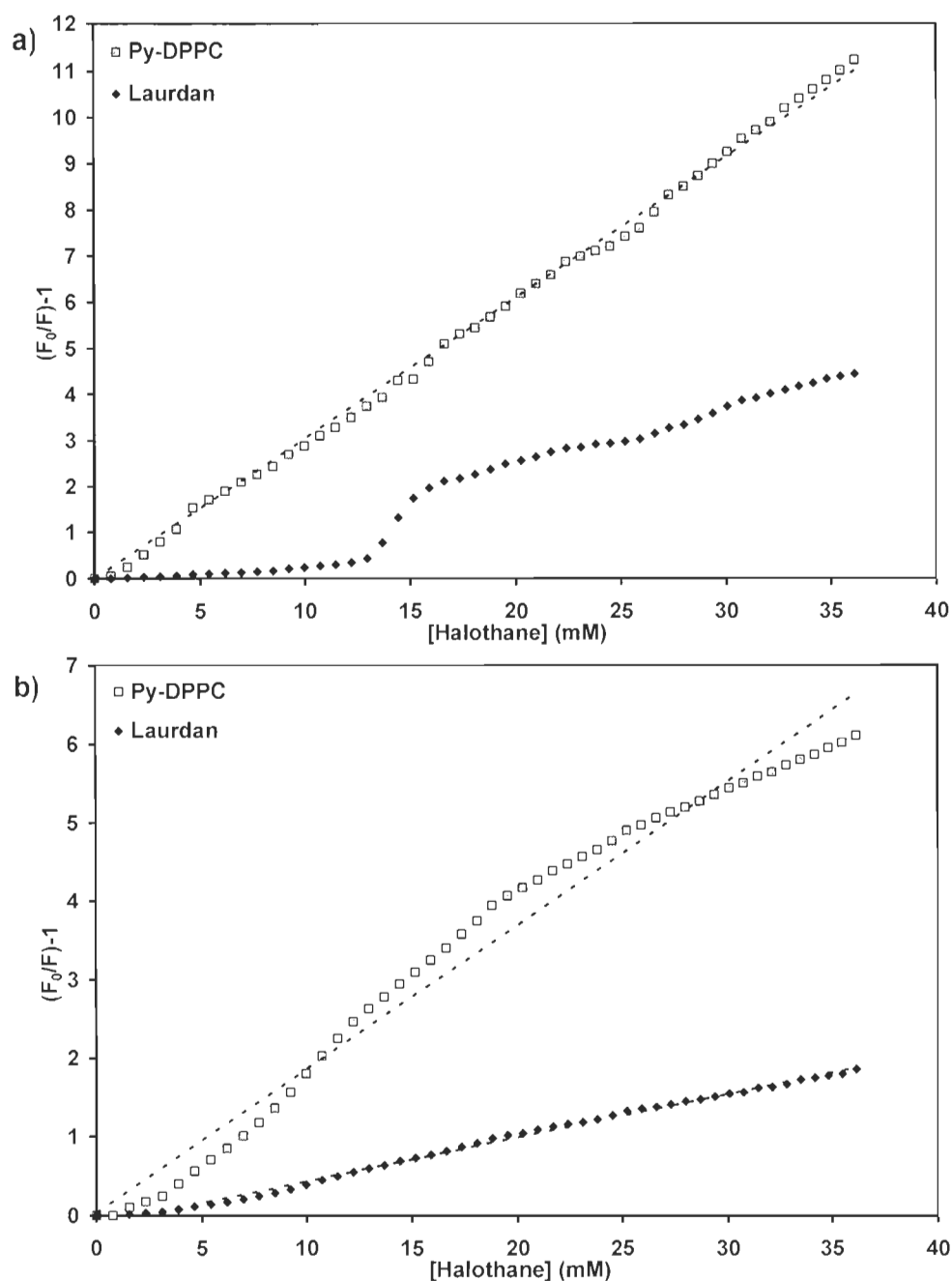


FIGURE 3.35 : Quenching du Py-DPPC et du Laurdan simultanément dans des vésicules de DPPC à 10 mM. Graphique de Stern Volmer obtenu pour des vésicules à 10 mM DPPC. a) à 25°C et b) à 55°C. Vésicules de DPPC à 10 mM de lipide avec un ratio sonde:lipide de 1:2000 pour chaque sonde. Tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5% v/v.

plus de 50% de l'atténuation de la fluorescence dans la phase L_α (figure 3.36).

Concernant le Py-DPPC, les courbes de quenching nous donnent également des relations linéaires, autant à 25°C qu'à 55°C (figure 3.35). Ceci nous indique que l'halothane atteint facilement ce fluorophore dans le cœur de la membrane, indépendamment de la morphologie des lipides. La constante de quenching du Py-DPPC à 25°C mesurée dans ces conditions est 0,3051 mM comparativement à 0,3108 mM dans le cas du Py-DPPC seul.

Cette expérience confirme que l'anesthésique pénètre d'abord le cœur hydrophobe de la bicouche et se distribue par après au niveau des têtes polaires. Autant à 25°C qu'à 55°C, l'halothane se distribue d'emblée près du fluorophore du Py-DPPC dans le cœur hydrophobe de la membrane et modifie graduellement la structure de la bicouche pour finalement permettre à l'anesthésique de s'infiltrer graduellement à l'interface des têtes polaires, où se trouve le Laurdan.

À saturation, les résultats obtenus avec les deux sondes fluorescentes nous indiquent que l'état de départ de la bicouche n'a pas d'influence notable sur la distribution de l'anesthésique dans la membrane. Cependant, dépendamment de la concentration, la distribution de l'anesthésique est hétérogène selon la phase lipidique. En phase gel (25°C), l'halothane se localise d'abord dans le cœur de la membrane, fluidifie progressivement la membrane pour finalement permettre à l'anesthésique de se localiser à l'interface. Puisque les lipides sont d'ores et déjà en phase fluide à 55°C, cette étape de fluidification de la membrane est absente et les anesthésiques se distribuent autant dans le cœur qu'à l'interface de la membrane. Ainsi, la distribution transversale de l'halothane dans la membrane est dynamique et non-uniforme : l'anesthésique est en équilibre non seulement entre les phases aqueuses et lipidiques, mais aussi entre des positions précises à l'intérieur de la membrane.

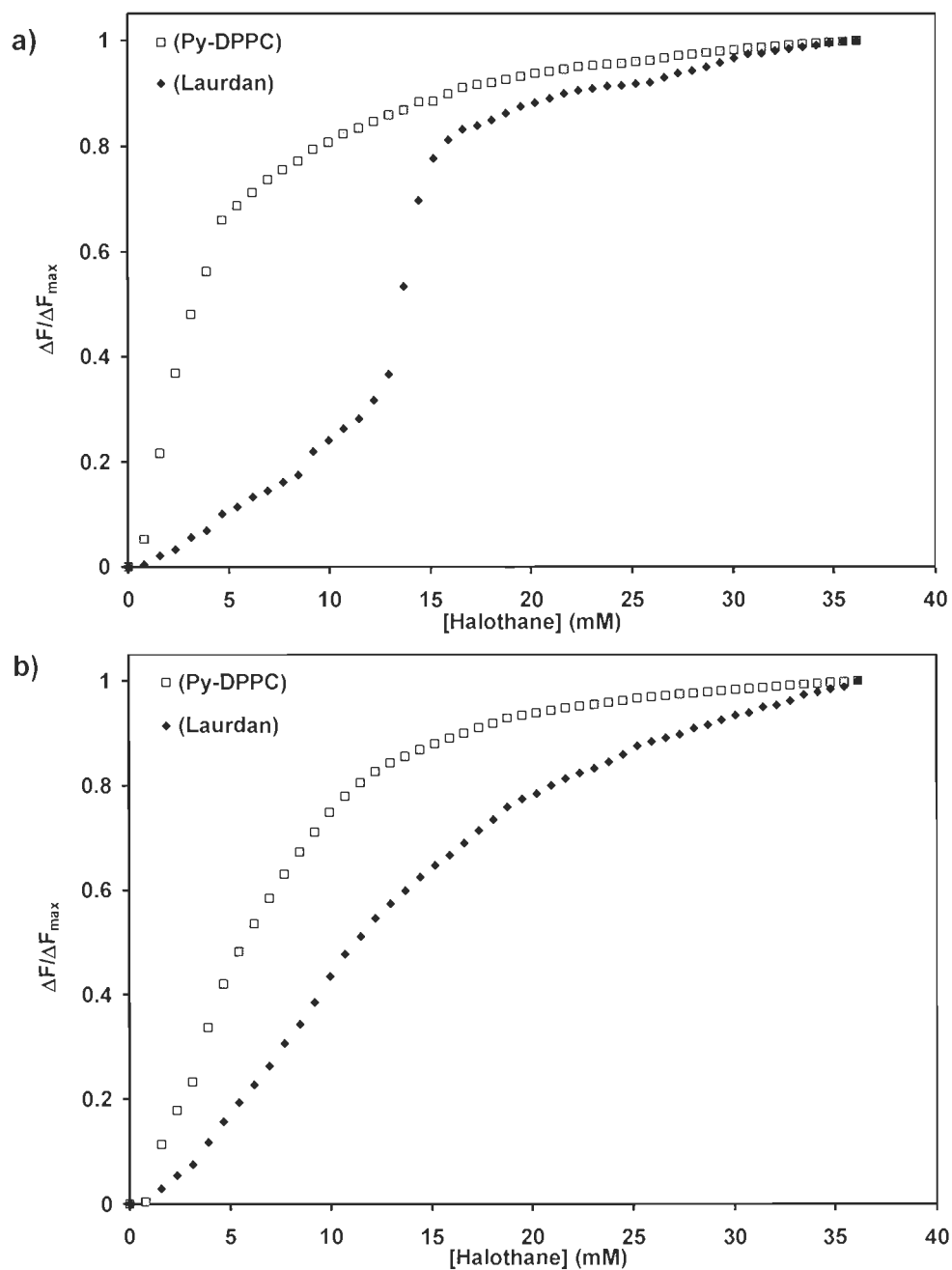


FIGURE 3.36 : Comparaison du quenching du Py-DPPC et du Laurdan simultanément dans des vésicules de DPPC à 10 mM. a) à 25°C. b) à 55°C. Vésicules de DPPC à 10 mM de lipide avec un ratio sonde:lipide de 1:2000 pour chaque sonde. Tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5% v/v.

3.3.8 Conclusions sur la distribution transversale des AG dans les vésicules de DPPC

Plusieurs évidences expérimentales suggèrent que la fluidification des bicouches débute par le changement de conformation des chaînes hydrocarbonées de la membrane. Ce processus est aléatoire et constitue l'étape de nucléation pour la transition de phase des lipides. Cette distorsion des chaînes acyles se communique d'une chaîne à l'autre et crée des fluctuations de densités à l'intérieur de la membrane. La relaxation des régions à hautes densités s'effectue via une expansion latérale qui augmente la mobilité des lipides à l'intérieur et en surface de la membrane. Il en résulte un accroissement de la mobilité des têtes polaires, amenant à la formation de domaines fluides [180]. Certains auteurs ont déjà démontré par calorimétrie que l'insertion d'anesthésiques dans la région hydrocarbonée de la membrane affecte la coopérativité des chaînes acyles, et que ces fluctuations se manifestent par un élargissement de la transition de phase et une diminution de la température de transition due à la présence d'anesthésiques au niveau des têtes polaires [170]. On peut ainsi conclure que l'insertion d'halothane dans le cœur de la membrane peut générer localement les mêmes modifications amenant à la formation de zones de nucléation de fluidification de la membrane. Ces fluctuations de densité dans le cœur de la membrane permettent aux molécules d'halothane de s'introduire en surface et de modifier considérablement la mobilité des têtes polaires, parachevant ainsi graduellement la fluidification de la bicouche.

3.3.9 Effet électrostatique sur la distribution de l'AG dans la membrane

Les lipides composants la majorité des membranes sont zwitterioniques (comme la phosphatidylcholine PC) ou anioniques (comme la phosphatidylsérine PS). Cependant, les biomembranes sont des mélanges de composition beaucoup plus complexes contenant aussi des protéines et des stérols. L'interface des membranes est le lieu d'interactions entre les molécules d'eau,

les têtes polaires des lipides, les protéines et les ions. Dans la plupart des cas, les membranes biologiques portent une charge négative de l'ordre de $0,05 \text{ C.m}^{-2}$ [181]. La phosphosérine (PS) possède trois charges résiduelles : deux sont négatives et associées aux groupements phosphate et carboxyle, alors que la charge positive restante est contenue dans le groupement ammonium, conférant ainsi une charge résultante nette négative. La présence de surfaces chargées à l'interface, due à la présence de PS, de contre-ions et de molécules d'eau hautement polarisées confère à la membrane des propriétés électrostatiques importantes [182]. Les lipides chargés sont une source d'interactions électrostatiques non-spécifiques dans les membranes, affectant les couches ioniques et la concentration des petites molécules chargées à l'interface de la bicouche [181, 183]. Plusieurs processus physiologiques dépendent de l'arrangement spécifique des charges dans la membrane et les interactions électrostatiques constituent l'une des forces déterminantes dans l'interaction des macromolécules avec les membranes (ex.: trafic des protéines, adsorption et insertion membranaire, fusion membranaire, endo/exocytose, perméabilité, conductivité des canaux ioniques, etc.) [180, 181, 183].

Considérant les résultats présentés précédemment et les effets de la composition lipidique sur la modulation des propriétés membranaires, on peut s'attendre à ce que des modifications électrostatiques de la bicouche affectent la distribution des anesthésiques dans la membrane. Lorsqu'on ajoute du DPPS dans la membrane, on modifie les propriétés électrostatiques de la surface en insérant des charges négatives dans la bicouche.

La figure 3.37 présente les courbes de quenching du Laurdan dans des vésicules de DPPC à différents ratios molaires de DPPC : DPPS. À 25°C , on retrouve le même type de courbe de quenching que pour la DPPC pure. À faible concentration, la fluorescence du Laurdan est faiblement affectée par l'halothane mais lorsque l'anesthésique induit localement des changements de phase dans les lipides, l'amplitude du quenching augmente considérablement. Cependant, la

présence de DPPS inhibe le changement de phase des lipides induit par l'insertion d'halothane dans la membrane. En effet, le début du quenching qui se produit à 12 mM d'halothane pour les vésicules de DPPC pure, passe à près de 20 mM, avant que des changements notables apparaissent pour un mélange binaire PC/PS 10:1 (figure 3.37a). Ainsi, plus la densité de charges négatives de la membrane augmente, c'est-à-dire avec l'ajout graduel de DPPS, plus la quantité d'halothane nécessaire pour fluidifier les lipides augmente. À un ratio molaire DPPS/DPPC inférieur à 18%, la température de transition du mélange binaire DPPS/DPPC est de 42-44°C [184], ce qui est très près de la valeur du T_m pour la DPPC pure qui est de 41°C. Cela suggère que les propriétés thermotropiques du mélange DPPS/DPPC sont quasi similaires à celles d'un échantillon de DPPC pure. Conséquemment, l'effet du DPPS sur la distribution de l'AG dans la membrane doit être principalement de nature électrostatique. Notons au passage que l'intensité absolue de fluorescence des deux sondes (Laurdan et Py-DPPC) est affectée par la présence de DPPS. Ce dernier diminue, de façon reproductible, le niveau de fluorescence de plus de 50% dans certain cas, un phénomène pour lequel nous n'avons pas encore d'explication logique.

À 55°C, l'insertion de DPPS dans la membrane a pour effet d'inhiber ou de retarder la distribution de l'halothane à la surface de la membrane. Comme on peut le voir sur la figure 3.37b, l'efficacité à laquelle la fluorescence du Laurdan est quenchée par l'halothane diminue avec l'augmentation de la concentration de PS dans la membrane. La présence de charges négatives provenant de la phosphosérine semble produire un effet d'écran à la pénétration de l'anesthésique dans la membrane. Il est possible aussi que la présence de DPPS dans la bicouche crée des défauts dans la membrane et affecte la distribution de l'anesthésique. Toutefois, comme mentionné précédemment, tout défaut dans la bicouche devrait permettre à l'anesthésique de pénétrer plus facilement la membrane. Ce qui n'est pas le cas ici, l'insertion de l'anesthésique est rendue plus difficile lorsqu'il y a des charges négatives sur la membrane.

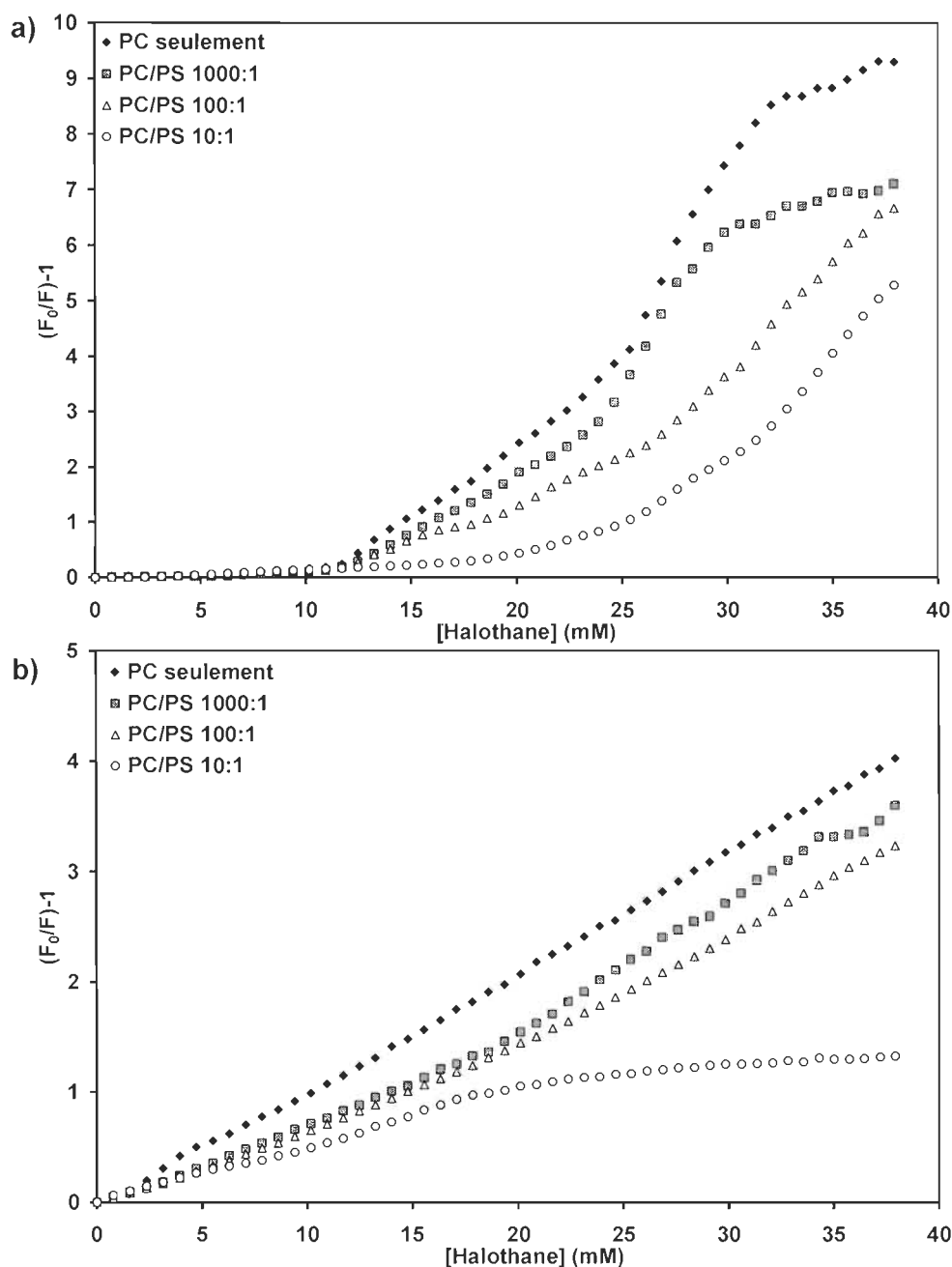


FIGURE 3.37 : Effet de charges sur le quenching du Laurdan. Quenching de la fluorescence à des concentrations croissantes d'halothane pour des vésicules de DPPC contenant les fractions de DPPS indiquées dans la figure. **a)** à 25°C **b)** à 55°C. Vésicules de DPPC/Laurdan/DPPS 1000:1 à différents ratios molaires de PC/PS, 4 mM lipides totaux, tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5% v/v.

De la même manière, les résultats obtenus avec la sonde se trouvant dans le cœur de la membrane (Py-DPPC), montrent que les effets provoqués par la présence de DPPS sont de nature électrostatique. La présence de PS dans la membrane inhibe ou empêche la diffusion de l'halothane dans la membrane et affecte l'atténuation de la fluorescence de la sonde. Autant à 25°C qu'à 55°C, l'augmentation graduelle du ratio molaire de DPPS/DPPC (variant de 0,1 % à 10 %), affecte le quenching de la sonde (figure 3.38). Toutefois, l'effet est plus notable à 55°C qu'à 25°C. On sait d'ores et déjà qu'à cette température l'halothane peut s'insérer au niveau des têtes polaires et que dans cette région la présence de charges négatives doit être plus effective. Donc il semble normal que l'effet du DPPS soit plus notable à 55°C.

3.3.10 Conclusions sur l'effet du DPPS sur la distribution de l'AG dans la membrane

De multiples processus métaboliques dépendent de l'arrangement des charges dans la bicouche lipidique où les interactions électrostatiques constituent l'une des forces les plus déterminantes dans l'interaction des macromolécules avec les membranes. La composition lipidique exerce une grande influence sur le potentiel électrostatique, l'hydratation, et l'ionisation de la membrane. Conséquemment, les interactions de petites molécules comme les anesthésiques, ou encore de macromolécules comme les protéines, sont influencées par la présence de lipides portant des charges. Dans ce cas-ci, la présence de PS inhibe ou empêche la pénétration de l'anesthésique dans la membrane. Comme l'insertion de charges au niveau des têtes polaires accroît la polarité et la polarisation des autres molécules présentes (eau, esters du glycérol, phosphate, choline), il ne faut probablement pas être surpris que cet effet fasse paraître encore plus important le caractère hydrophobe de l'halothane qui, néanmoins, reste une molécule polarisable.

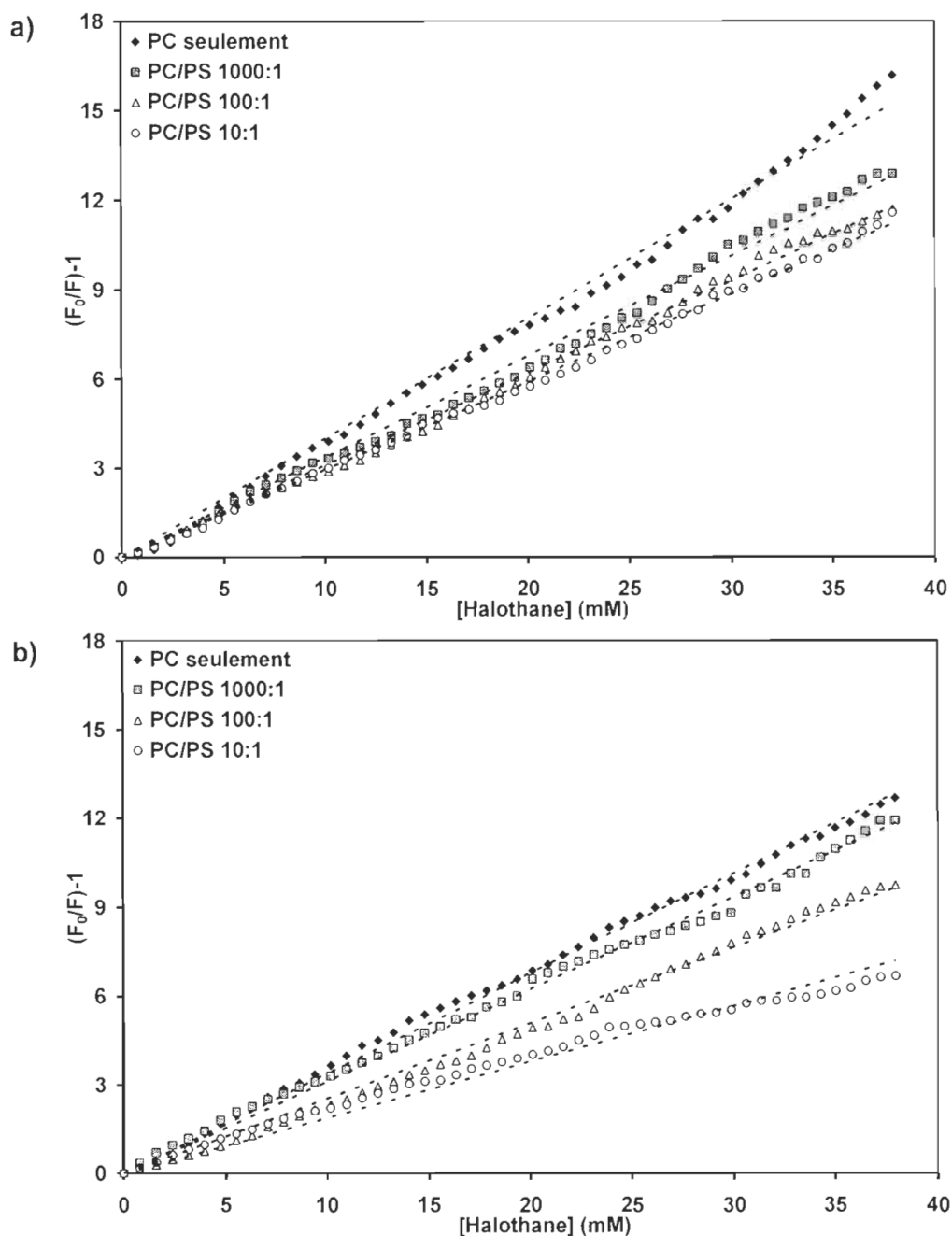


FIGURE 3.38 : Effet de charges sur le quenching du Py-DPPC. Quenching de la fluorescence à des concentrations croissantes d'halothane pour des vésicules de DPPC contenant les fractions de DPPS indiquées dans la figure. **a)** à 25°C **b)** À 55°C. Vésicules de DPPC/Py-DPPC/DPPS 1000:1 à différents ratios molaires de PC/PS, 4 mM lipides totaux, tampon Tris 10 mM/KCl 50 mM à pH 7,5. Perfusion sur 12,5 heures avec 250 μ L d'halothane/éthanol à 5% v/v.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

4.1 Mesures à l'équilibre et modèles

Les anesthésiques généraux sont utilisés quotidiennement depuis plus d'un siècle déjà et même si des réponses émergent quant à leur mécanisme physiologique, le mécanisme moléculaire par lequel ils agissent reste incompris. Les difficultés engendrées par l'hydrophobicité et le caractère volatil des anesthésiques généraux ont rendu difficile la prise de mesures à l'équilibre. Dans le cas de l'halothane, le dose effective (DE_{50}) se situe à environ 0,32 mM chez l'homme et la concentration efficace (CE_{50}) est de 20 mM au niveau des canaux sodiques [185]. Les résultats obtenus à partir de perfusions sur plus de douze heures sont, de toute évidence, à l'équilibre ou très proches des conditions d'équilibre et constituent un avancement dans le domaine.

La plupart des travaux effectués jusqu'à maintenant se sont surtout concentrés sur les changements structuraux et fonctionnels des membranes. Peu d'études ont été effectuées sur des systèmes composés de protéines et de lipides. Les membranes biologiques étant des systèmes ultra-complexes, nous avons eu recours à des modèles.

Le premier modèle, celui de la membrane pourpre, est utilisé depuis plus de vingt ans pour étudier l'effet des anesthésiques locaux et généraux. Incontestablement, la bactériorhodopsine ne fait pas partie du système nerveux central et elle ne constitue pas la cible physiologique réelle des AG que sont les récepteurs neuronaux. Cependant, elle constitue le modèle de transport ionique des récepteurs transmembranaires et partage beaucoup d'homologies structurales avec ceux-ci. De plus, elle est sensible aux anesthésiques dans l'intervalle de concentration clinique et affiche, comme pour les symptômes physiologiques, une réversibilité face aux effets des anesthésiques [109, 111].

Dans le second modèle étudié, les vésicules lipidiques, le choix du DPPC comme lipide de base est un choix classique. En effet, c'est de loin le lipide le plus utilisé dans la fabrication de membranes modèles. Il présente un thermotropisme caractérisé par deux états physiques différents (L_α fluide et L_β gel) à une température près de la température corporelle. De plus, les phosphocholines (PC) constituent plus de 30% de la composition des membranes des mammifères [186]. Cependant, le DPPC est considéré comme un lipide de "remplissage" (bulk) dans les membranes biologiques et ses caractéristiques physiques sont très éloignées du comportement des mélanges de lipides constituant les membranes biologiques. Malgré tout, lorsqu'on tient compte du fait que les biomembranes sont généralement dans un état fluide et qu'elles varient localement en composition en formant des domaines de compositions différentes, le DPPC reste un lipide pertinent pour étudier ce phénomène, d'autant plus que quand vient le temps de soumettre à l'action de l'anesthésique un modèle mixte de protéoliposomes contenant la protéine et des lipides, la DPPC se révèle être le lipide qui solvate le mieux la bR [187].

Quantités d'études ont été réalisées sur l'interaction des anesthésiques avec le DPPC, en s'attardant surtout sur les modifications structurales provoquées sur les différentes phases lipidiques. Toutefois, peu d'études se sont concentrées sur la manière de modifier ces interactions afin d'en extraire de l'information nouvelle. Nous avons utilisé un mélange binaire de DPPC/DPPS dans ce but, afin de déterminer quels sont les types d'interactions qui sont aptes à moduler la réponse de la membrane à l'anesthésique. Ainsi, comme la réponse de l'anesthésique est différente en présence de DPPS, qui est un lipide portant une charge négative, on peut affirmer que les interactions électrostatiques, à l'instar des forces hydrophobes, ont aussi une influence sur le mécanisme moléculaire de l'anesthésie générale. Quoiqu'il en soit, ces deux modèles doivent être considérés comme complémentaires plutôt que singulièrement car les conclusions tirées à partir de l'un peuvent confirmer les hypothèses formulées à partir de l'autre.

4.2 Les anesthésiques généraux et les protéines membranaires

La composante lipidique des membranes est primordiale pour la distribution, l'organisation et la fonction des protéines transmembranaires. Cette régulation est due principalement aux interactions lipide-protéine qui modulent les transitions conformationnelles de la protéine, tant au niveau du couplage des domaines hydrophobes avec le cœur de la membrane qu'au niveau électrostatique de l'interface. Les fonctions des protéines sont ainsi contrôlées par la composition de la membrane et par les propriétés des lipides qui la composent. Ainsi, la bicouche lipidique constitue en soi un mécanisme de régulation allostérique des protéines [188]. Les protéines membranaires, plus particulièrement celles composées d'hélices transmembranaires, ne sont pas des corps rigides autour desquels les lipides membranaires se contorsionnent pour créer la meilleure interaction. Au contraire, les deux, lipides et protéines modifient leur structure afin de stabiliser leurs interactions réciproques, modifiant ainsi la fonction de la protéine. Au-delà des lipides annulaires qui entourent les protéines membranaires, il y a aussi plusieurs protéines qui nécessitent la présence de lipides spécifiques qui se lient fortement à la protéine et agissent comme cofacteur. Ces lipides que l'on nomme non-annulaires, assurent souvent un bon empaquetage au niveau de l'interface protéine-protéine [117]. De plus, des modifications de l'épaisseur membranaire ou des liaisons hydrogènes entre la protéine et les têtes polaires ont pour conséquences de modifier la conformation de la protéine et de ce fait, sa fonction.

Dans le cas de la membrane pourpre, les interactions entre les lipides et la protéine sont bien connues et documentées. À partir des informations et des données accumulées sur ce système, nous avons démontré que les anesthésiques peuvent modifier ces interactions et induire des formes transitoires qui sont similaires à celles que l'on obtient lorsqu'on délipide la bactériorhodopsine progressivement. L'étude réalisée avec les formes partiellement et totalement délipidées de la bR indique clairement que les

interactions avec les lipides endogènes de la protéine, qui agissent comme cofacteurs ou modulateurs allostériques de la bR, sont affectées par la présence d'AG. Les résultats obtenus en spectroscopie d'absorption et de fluorescence montrent que les anesthésiques agissent d'abord sur les régions de surface les plus accessibles et que graduellement, l'AG se distribue dans les zones plus enfouies de la bR, simulant ainsi sa délipidation.

Ces conclusions sont corroborées par les changements structuraux que l'on observe en FTIR. La modulation de la structure de la protéine prend naissance en surface, au niveau des boucles et des tours, pour ensuite se propager à travers les hélices de la protéine. La présence d'AG au niveau des têtes polaires des lipides doit affecter les liaisons hydrogène entre ceux-ci et la bR, provoquant des changements au niveau des boucles et/ou tours de la bR. Ces modifications des boucles doivent induire une redistribution de l'énergie diédrale (mécanique) des liens, et se propager le long des hélices afin de relaxer la structure, à la manière d'un ressort que l'on tord aux extrémités. Cette relaxation des hélices a pour effet de faire basculer la conformation de la bR dans un état inactif d'un point de vue fonctionnel.

La séquence de ces événements est reconstruite sur la figure 4.1 où l'apparition des modes I, II et III sous l'effet de l'halothane ainsi que l'amplitude du quenching des tryptophanes de la bR sont indiqués en fonction de la concentration totale d'halothane, ainsi que du rapport des concentrations entre l'halothane et la bactériorhodopsine. La figure indique également les changements structuraux observés par spectroscopie vibrationnelle au cours de ces différents modes d'action. Cette figure rappelle que la première cible de l'anesthésique se situe à l'interface de la protéine et de la phase aqueuse. Cette

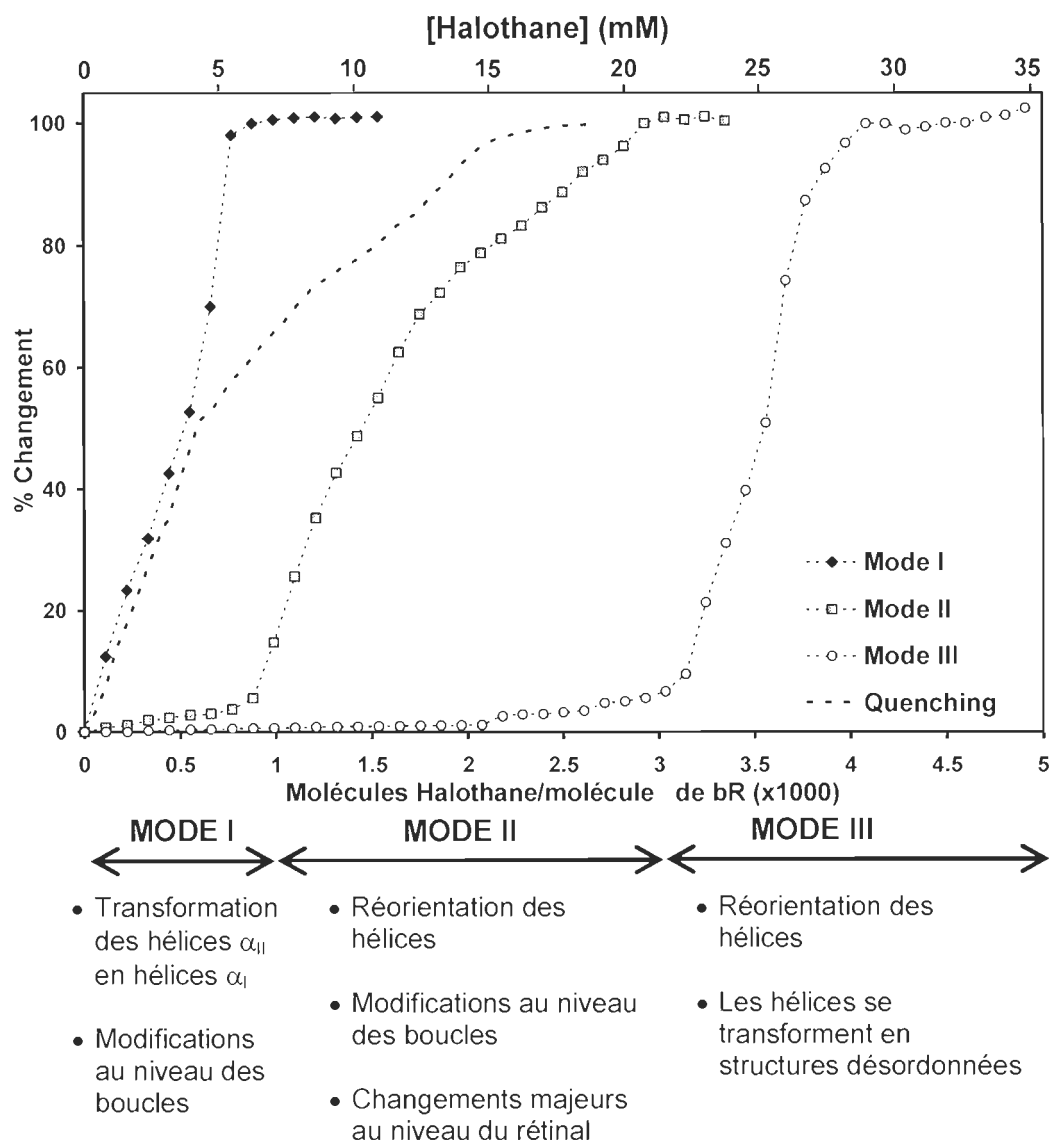


FIGURE 4.1 : Bactériorhodopsine : séquence des événements. Superposition des observations effectuées sur la bactériorhodopsine en équilibre avec des concentrations croissantes d'halothane exprimées en valeur absolue et en valeur relative (molécules d'anesthésique/bR). Les différentes courbes correspondent au % de changement en terme de % de l'amplitude maximale ($\Delta A / \Delta A_{max}$) pour les modes I, II et III. La courbe de quenching est donnée en termes de % du niveau initial de fluorescence. Les modifications structurales rapportées sous l'échelle des concentrations sont les observations majeures obtenues des spectres FTIR. La forme spectrale de la bR qui prédomine lors de ces observations (forme pourpre, rouge ou jaune) permet de classer les modifications structurales selon les modes I, II ou III.

conclusion s'appuie moins sur l'intervalle de concentrations où s'opère le mode I que sur l'amplitude du quenching de la fluorescence des tryptophanes qui survient aux plus faibles concentrations d'anesthésique. À cet égard, on note la grande spécificité apparente de cette cible qui est atteinte en deçà de la concentration clinique. La modification des hélices α_{II} et des boucles interhélices est également en accord avec cette localisation initiale de l'anesthésique.

Les modifications structurales qui débutent dans le mode I se poursuivent dans le mode II, notamment en ce qui a trait aux boucles interhélices. À cela s'ajoutent le début de la réorientation des hélices et l'apparition de modifications des bandes vibrationnelles du rétinol dont le λ_{max} change dramatiquement au cours de ce mode. Rappelons également que c'est lors de cette étape que l'activité de pompage de protons de la protéine disparaît. Il est tout à fait vraisemblable que ce mode corresponde à l'insertion de l'anesthésique dans les parties plus profondes de la membrane. Les modifications de la structure trimérique de la protéine et de son réseau cristallin qui surviennent également durant ce mode, en plus du fait que le mode II soit absent dans les préparations délipidées, appuient la conclusion qu'à cette étape, les interactions lipide-protéine (et protéine-protéine) se disloquent.

Enfin, dans le mode III, des modifications structurales encore plus importantes surviennent, notamment en termes de transformation des hélices en structures désordonnées. Selon toute vraisemblance, dans ce mode, la protéine est sur la voie de la dénaturation.

Le modèle de la membrane pourpre démontre que les AG n'ont pas individuellement les protéines ou les lipides comme cible, mais plutôt une spécificité conjointe pour les deux à la fois, principalement dans le mode II. Les mesures effectuées sur des échantillons partiellement ou totalement délipidés indiquent que cette spécificité est formée de l'interface entre la protéine et les lipides qui l'entourent, mais aussi de la surface délimitée par la protéine et les

têtes polaires des lipides. Cette interface ne constitue probablement pas une cible spécifique, mais plutôt un environnement propice à la distribution d'anesthésique, ceux-ci étant guidés principalement par leur hydrophobicité relative et leur caractère diélectrique. Donc, les propriétés électrostatiques des AG doivent déterminer le ciblage membranaire, mais leur caractère hydrophobe doit être responsable de la modulation de la protéine concernée. Les zones membranaires constituées de protéines peuvent ainsi former des régions électrostatiques favorables au partitionnement de l'AG, de par la composition lipidique différente du reste de la membrane. Néanmoins, les protéines membranaires sont liées directement aux lipides qui les entourent et elles sont sensibles aux modifications de leur environnement lipidique.

4.3 Les anesthésiques généraux et les lipides

Le squelette des membranes biologiques est la bicouche lipidique et se compose d'un double feuillet de lipides. Les anesthésiques ont des effets très diversifiés sur les lipides membranaires. Les anesthésiques purement hydrophobes se distribuent préférentiellement dans le cœur membranaire, alors que les xénobiotiques amphiphiles se localisent plutôt à l'interface de la membrane [16, 32, 35]. Parmi les effets causés, rappelons les modifications de la fluidité, de l'épaisseur membranaire, de la température de transition de phase et la séparation de phases latérales. Ils modifient aussi le profil de pression latérale de la membrane et augmentent la perméabilité [38, 170, 189]. Les propriétés électriques de la membrane comme la constante diélectrique ou le potentiel dipolaire de surface sont aussi affectés par la présence d'anesthésique [36, 190]. Tous ces changements des paramètres physico-chimiques de la bicouche lipidique ont un impact sur la structure et la fonction des protéines membranaires et sur les points de contacts avec les éléments du cytosquelette adjacent.

Il ne fait aucun doute que le caractère hydrophobe commun des anesthésiques est une variable importante dans l'action des anesthésiques. Néanmoins, la polarité de ces molécules, voire même leur polarisabilité est une caractéristique déterminante dans l'efficacité ou la puissance de ces molécules à provoquer l'anesthésie. Le caractère dipolaire est une propriété distinctive des anesthésiques modernes présentement en utilisation. L'halothane qui fut le premier anesthésique de "design" (synthétisé de novo), doit du moins en partie, son fort potentiel anesthésiant au lien C-H, moins polaire que les liens C-F, C-Cl et C-Br qu'il contient. Ainsi, le caractère dipolaire des anesthésiques est un élément encore plus important que leur hydrophobicité dans l'évaluation de la puissance d'un anesthésique. La composition et la structure de la membrane ont une influence sur la distribution de l'anesthésique dans la bicouche et doivent jouer un rôle primordial sur sa localisation dans la membrane.

À saturation, les résultats obtenus avec les sondes fluorescentes démontrent que l'état de la bicouche n'a pas d'influence notable sur la distribution de l'anesthésique dans la membrane. Cependant, dépendamment de la concentration, la distribution de l'anesthésique est hétérogène selon la phase lipidique. En phase gel (25°C), l'anesthésique se localise d'abord dans le cœur de la membrane, fluidifie graduellement la membrane pour finalement permettre à l'anesthésique de se localiser à l'interface. Puisque les lipides sont déjà en phase fluide à 55°C, l'étape de fluidification de la membrane est absente et les anesthésiques s'y distribuent autant dans le cœur qu'à l'interface. On peut donc dire que la structure de la bicouche (phase) a une influence déterminante sur la distribution de l'anesthésique à faible concentration. La distribution transversale de l'halothane est dynamique et non-uniforme dans la membrane et l'anesthésique est en équilibre dynamique non seulement entre les phases aqueuses et lipidiques, mais aussi entre des positions précises à l'intérieur de la membrane.

Ces phénomènes sont bien illustrés par les mesures que nous avons réalisées avec les deux sondes fluorescentes et dont les résultats sont résumés dans la figure 4.2. On y observe que dans le cas de lipides purs, l'anesthésique atteint facilement le cœur hydrophobe de la membrane, indépendamment de l'état physique des lipides. Par ailleurs, même à une température bien au-dessus de la température de fusion des lipides, l'insertion d'anesthésique au niveau de l'interface lipide-eau présente un retard par rapport à son insertion dans le cœur hydrophobe. Ce résultat exclut la possibilité que l'effet de l'anesthésique sur la protéine, du moins au cours du mode I, soit médié par les lipides. Par ailleurs, cette possibilité ne peut être exclue si on considère le mode II d'action de l'anesthésique sur la protéine. En effet, les concentrations d'halothane qui induisent le mode II sont comparables à celles où l'anesthésique s'insère à la surface de la membrane. Il devient donc difficile de dire si l'effet du xénobiotique peut être médié par le lipide, surtout si ce dernier est en phase fluide.

Par ailleurs, la composition lipidique exerce une influence sur la distribution de l'anesthésique dans la membrane. Le potentiel électrostatique, l'hydratation, et l'ionisation de la membrane sont tous des facteurs qui peuvent modifier l'interaction de l'anesthésique avec la bicouche. Ainsi, nous avons démontré que la présence de lipides portant une tête polaire chargée, comme la phosphosérine (PS), peut modifier la distribution de l'halothane dans la membrane. La particularité de cette approche réside dans le fait qu'au lieu d'observer les effets de l'anesthésique sur la membrane, nous avons étudié l'effet de la composition de la membrane sur la distribution de l'anesthésique. Bien que certains anesthésiques généraux soient apolaires (Xe, cyclopropane) et que la caractéristique commune majeure soit leur hydrophobicité, la plupart de ces molécules présentent une contrepartie polaire ou polarisable. De ce fait, les plus puissants anesthésiques généraux auront un caractère dipolaire (permanent ou inducible) favorisant leur insertion à une interface.

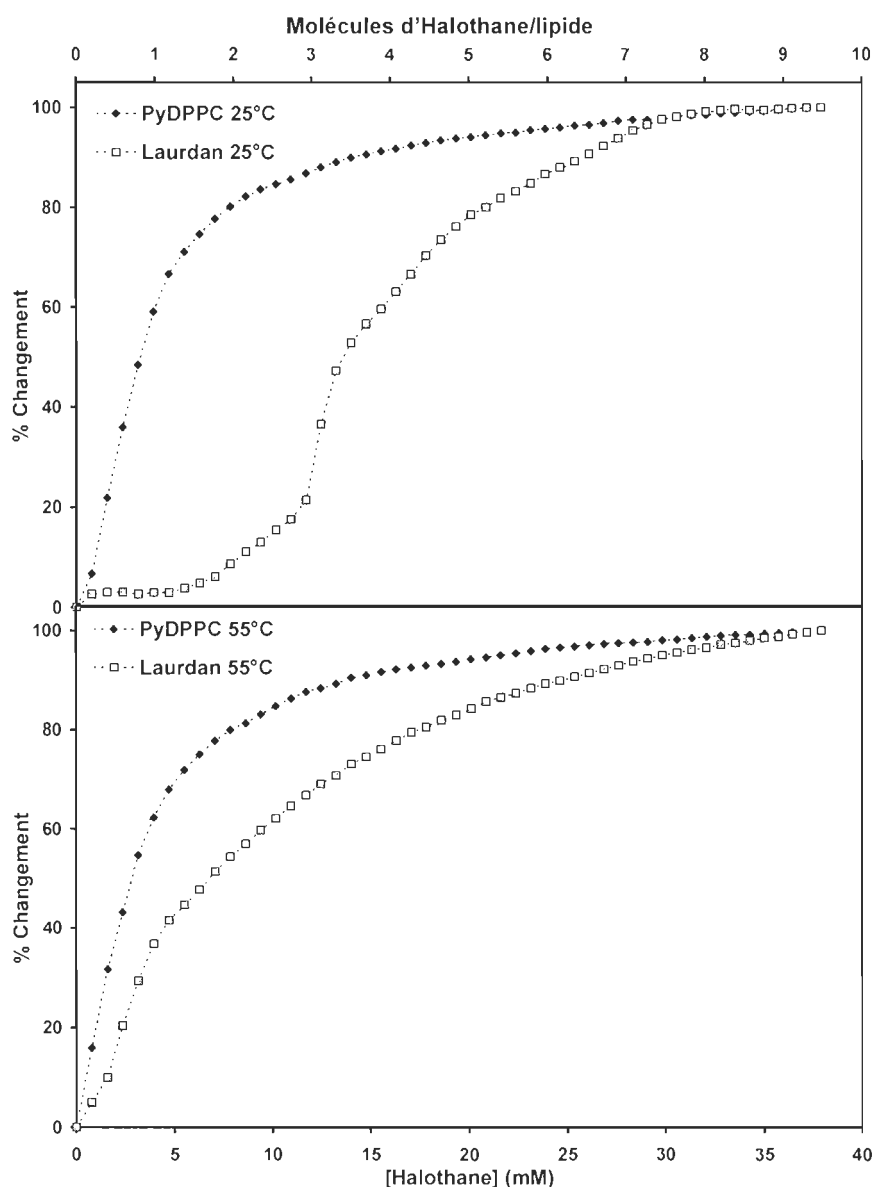


FIGURE 4.2 : Distribution de l'halothane dans les vésicules. Superposition des observations effectuées sur les sondes localisées à la surface et au cœur de vésicules de DPPC (4 mM) en équilibre avec des concentrations croissantes d'halothane exprimées en valeur absolue (échelle du bas) et en valeur relative (molécules d'anesthésique/lipide, échelle du haut). Comme les vésicules contiennent 1 sonde par 1000 lipides, on peut multiplier l'axe du haut par 1000 pour avoir la concentration relative en terme de molécules d'anesthésique par sonde. Les valeurs de % de changement correspondent au % d'atténuation du niveau initial de fluorescence. On notera que 80% du quenching du Py-DPPC est effectué à environ 2 molécules d'anesthésique par lipide.

On peut facilement imaginer qu'à l'échelle d'une biomembrane réelle, la structure, la composition et la topographie électrostatique de la bicouche joue un rôle prépondérant dans la distribution de l'anesthésique dans la membrane. Qui plus est, l'arrangement des couches d'ions et la polarisation des molécules d'eau à l'interface doivent créer des zones d'interactions plus spécifiques pour les anesthésiques, voire même guider les molécules anesthésiantes vers leur cible ultime. Néanmoins, il paraît plus approprié ici de parler d'environnement spécifique que de cible spécifique car il ne fait aucun doute que l'induction d'une anesthésie générale passe par la modulation de la réponse des protéines responsables de la propagation de l'influx nerveux. Or, ces protéines membranaires baignent dans un environnement lipidique qui est directement relié à leur stabilité structurale et fonctionnelle.

4.4 Le mécanisme d'action

Il serait présomptueux de proposer un mécanisme universel d'action des anesthésiques généraux vu la complexité du phénomène et la quantité de chercheurs qui ont travaillé et qui travaillent toujours sur le sujet. Comme mentionné en introduction, cette complexité se manifeste à plusieurs niveaux organisationnels. D'un point de vue physiologique, on connaît les structures neuro-cérébrales qui doivent être ciblées, mais il est difficile d'affirmer à une échelle cellulaire quels types cellulaires ou quelles structures subcellulaires (axones, dendrites, corps neuronaux, etc.) sont primordiales dans l'établissement d'une anesthésie générale. Toutefois, les symptômes provoqués par les anesthésiques sont de toute évidence attribuable à leur effet sur le système nerveux et, à une échelle moléculaire, il doit y avoir un mécanisme général qui permette d'expliquer l'action des anesthésiques, peu importe que la cible moléculaire soit dans le thalamus ou le mésencéphale.

Il apparaît évident que les canaux et récepteurs membranaires responsables de la propagation de l'influx nerveux sont impliqués dans

l'établissement de la perte de sensation et de conscience. Néanmoins, suggérer une action directe et spécifique des anesthésiques sur ces protéines semble intrépide compte tenu de la grande variabilité structurale des anesthésiques généraux, de la grande diversité des macromolécules sensibles aux anesthésiques et des concentrations cliniques ou pharmacologiques supérieures à ce que l'on retrouve dans le cas de drogues ou narcotiques plus spécifiques (c'est-à-dire mM versus nM). C'est donc dire que même si l'effet des anesthésiques peut sembler spécifique à certains canaux ou récepteurs membranaires, voire même certaines voies métaboliques, leur mode d'action reste non spécifique et indirect. C'est dans cette dualité que réside toute la complexité du phénomène. Ne tenir compte que d'un seul système, d'un seul modèle ou d'une seule échelle d'étude, c'est ignorer toute l'information qui se cache à d'autres niveaux et qui nous permettrait d'avoir une vision globale.

Nous avons démontré que la sensibilité aux anesthésiques d'une protéine membranaire comme la bR dépend énormément de la composition des lipides qui l'entourent. Nous avons aussi fait la preuve que la distribution des anesthésiques dans les membranes composées exclusivement de lipides dépend de la structure et de la composition de la bicouche. Dans ce contexte, dire que les anesthésiques n'agissent strictement que sur les lipides ou exclusivement sur les protéines serait nier que les deux sont intimement reliés dans un contexte biomembranaire. Les anesthésiques doivent exercer leur action à la fois sur les lipides et les protéines, sans avoir réellement de spécificité directe pour l'un ou l'autre, mais plutôt pour l'environnement particulier que constitue l'interface protéine-lipide. Cette interface est tout aussi complexe à imaginer que le mécanisme d'action des anesthésiques ou encore que l'origine de la conscience dans le cerveau.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arnulf, G. (1989) "*L'histoire Tragique Et Merveilleuse De L'anesthesie*", Édition Lavauzelle, Paris, France.
2. Desmonts, J. M. (1994) [Have anesthesia-related mortality and morbidity decreased in the last 30 years? Evaluation based on a review of epidemiologic studies], *Bull Acad Natl Med* 178, 1537-1547; discussion 1547-1550.
3. Rosenker, M. V., Sumwalt, R., Hersman, D., Chealander, S., and O'Leary Higgins, K. (2009) Annual Review of Aircraft Accident Data: U.S. Air Carrier Operations, Calendar Year 2005., (Records Management Division, C.-. Ed.), p 6, National Transportation Safety Board.
4. Lagasse, R. S. (2002) Anesthesia safety: model or myth? A review of the published literature and analysis of current original data, *Anesthesiology* 97, 1609-1617.
5. Liem EB, Lin CM, Suleman MI, Doufas AG, Gregg RG, Veauthier JM, Loyd G, and DI., S. (2004) Anesthetic requirement is increased in redheads., *Anesthesiology* 101, 279-283.
6. Eger, E. I., 2nd, and Saidman, L. J. (2005) Illustrations of inhaled anesthetic uptake, including intertissue diffusion to and from fat, *Anesth Analg* 100, 1020-1033.
7. Alkire, M. T., and Miller, J. (2005) General anesthesia and the neural correlates of consciousness, *Prog Brain Res* 150, 229-244.
8. Cariani, P. (2000) Anesthesia, neural information processing, and conscious awareness, *Conscious Cogn* 9, 387-395.
9. John, E. R., and Prichep, L. S. (2005) The anesthetic cascade: a theory of how anesthesia suppresses consciousness, *Anesthesiology* 102, 447-471.
10. Arhem P, Klement G, and J., N. (2003) Mechanisms of anesthesia: towards integrating network, cellular, and molecular level modeling., *Neuropsychopharmacology* 28 40-47.
11. Urban, B. W., and Friederich, P. (1998) Anesthetic mechanisms in-vitro and in general anesthesia, *Toxicol Lett* 100-101, 9-16.
12. Urban, B. W., Bleckwenn, M., and Barann, M. (2006) Interactions of anesthetics with their targets: non-specific, specific or both?, *Pharmacol Ther* 111, 729-770.

13. Richards, C. D. (2002) Anaesthetic modulation of synaptic transmission in the mammalian CNS, *Br J Anaesth* 89, 79-90.
14. Urban, B. W. (2002) Current assessment of targets and theories of anaesthesia, *Br J Anaesth* 89, 167-183.
15. Miller, K. W. (1985) The nature of the site of general anesthesia, *Int Rev Neurobiol* 27, 1-61.
16. North, C., and Cafiso, D. S. (1997) 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.
17. Cantor, R. S. (2001) Breaking the Meyer-Overton rule: predicted effects of varying stiffness and interfacial activity on the intrinsic potency of anesthetics, *Biophys J* 80, 2284-2297.
18. Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1991) Stereospecific effects of inhalational general anesthetic optical isomers on nerve ion channels, *Science* 254, 427-430.
19. Dickinson, R., Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1994) Can the stereoselective effects of the anesthetic isoflurane be accounted for by lipid solubility?, *Biophys J* 66, 2019-2023.
20. Hill, M. W. (1974) The effect of anaesthetic-like molecules on the phase transition in smectic mesophases of dipalmitoyllecithin. I. The normal alcohol up to C equals 9 and three inhalation anaesthetics, *Biochim Biophys Acta* 356, 117-124.
21. Lieb, W. R., Kovalycsik, M., and Mendelsohn, R. (1982) Do clinical levels of general anaesthetics affect lipid bilayers? Evidence from Raman scattering, *Biochim Biophys Acta* 688, 388-398.
22. Pang, K. Y., Braswell, L. M., Chang, L., Sommer, T. J., and Miller, K. W. (1980) The perturbation of lipid bilayers by general anesthetics: a quantitative test of the disordered lipid hypothesis, *Mol Pharmacol* 18, 84-90.
23. Boggs, J. M., Yoong, T., and Hsia, J. C. (1976) Site and mechanism of anesthetic action. I. Effect of anesthetics and pressure on fluidity of spin-labeled lipid vesicles, *Mol Pharmacol* 12, 127-135.
24. Boggs, J. M., Roth, S. H., Yoong, T., Wong, E., and Hsia, J. C. (1976) Site and mechanism of anesthetic action. II. Pressure effect on the nerve conduction-blocking activity of a spin label anesthetic, *Mol Pharmacol* 12, 136-143.

25. Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1979) The structure of lipid bilayers and the effects of general anaesthetics. An x-ray and neutron diffraction study, *J Mol Biol* 133, 469-500.
26. Simon, S. A., McIntosh, T. J., Bennett, P. B., and Shrivastav, B. B. (1979) Interaction of halothane with lipid bilayers, *Mol Pharmacol* 16, 163-170.
27. Craig, N. C., Bryant, G. J., and Levin, I. W. (1987) Effects of halothane on dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: a Raman spectroscopic study, *Biochemistry* 26, 2449-2458.
28. Baber, J., Ellena, J. F., and Cafiso, D. S. (1995) Distribution of general anesthetics in phospholipid bilayers determined using ^2H NMR and ^1H - ^1H NOE spectroscopy, *Biochemistry* 34, 6533-6539.
29. Ueda, I., Tseng, H. S., Kaminoh, Y., Ma, S. M., Kamaya, H., and Lin, S. H. (1986) Anesthetics release unfreezable and bound water in partially hydrated phospholipid lamellar systems and elevate phase transition temperature, *Mol Pharmacol* 29, 582-588.
30. Trudell, J. R., and Hubbell, W. L. (1976) Localization of molecular halothane in phospholipid bilayer model nerve membranes, *Anesthesiology* 44, 202-205.
31. Koubi, L., Tarek, M., Klein, M. L., and Scharf, D. (2000) Distribution of halothane in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer from molecular dynamics calculations, *Biophys J* 78, 800-811.
32. Tang, P., Yan, B., and Xu, Y. (1997) Different distribution of fluorinated anesthetics and nonanesthetics in model membrane: a ^{19}F NMR study, *Biophys J* 72, 1676-1682.
33. Chipot, M. A. W. a. A. P. (1997) Interactions of Anesthetics with the Water-Hexane interface. A molecular dynamics study, *J. Phys. Chem. B* 101, 782-791.
34. Tu, K., Tarek, M., Klein, M. L., and Scharf, D. (1998) 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.
35. Pohorille, A., Wilson, M. A., New, M. H., and Chipot, C. (1998) Concentrations of anesthetics across the water-membrane interface; the Meyer-Overton hypothesis revisited, *Toxicol Lett* 100-101, 421-430.
36. Qin, Z., Szabo, G., and Cafiso, D. S. (1995) Anesthetics reduce the magnitude of the membrane dipole potential. Measurements in lipid vesicles using voltage-sensitive spin probes, *Biochemistry* 34, 5536-5543.

37. Hauet, N., Artzner, F., Boucher, F., Grabielle-Madelmont, C., Cloutier, I., Keller, G., Lesieur, P., Durand, D., and Paternostre, M. (2003) Interaction between Artificial Membranes and Enflurane, a General Volatile Anesthetic: DPPC-Enflurane Interaction, *Biophys J* 84, 3123-3137.
38. Cantor, R. S. (1997) The lateral pressure profile in membranes: a physical mechanism of general anesthesia, *Biochemistry* 36, 2339-2344.
39. Dreger, M., Krauss, M., Herrmann, A., and Hucho, F. (1997) Interactions of the nicotinic acetylcholine receptor transmembrane segments with the lipid bilayer in native receptor-rich membranes, *Biochemistry* 36, 839-847.
40. Sunshine, C., and McNamee, M. G. (1994) Lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of membrane lipid composition and fluidity, *Biochim Biophys Acta* 1191, 59-64.
41. Pan, J. Z., Xi, J., Tobias, J. W., Eckenhoff, M. F., and Eckenhoff, R. G. (2007) Halothane binding proteome in human brain cortex, *J Proteome Res* 6, 582-592.
42. Carmody, J. J. (2009) Some scientific reflections on possible mechanisms of general anaesthesia, *Anaesth Intensive Care* 37, 175-189.
43. Dubois, B. W., and Evers, A. S. (1992) ¹⁹F-NMR spin-spin relaxation (T₂) method for characterizing volatile anesthetic binding to proteins. Analysis of isoflurane binding to serum albumin, *Biochemistry* 31, 7069-7076.
44. Dubois, B. W., Cherian, S. F., and Evers, A. S. (1993) Volatile anesthetics compete for common binding sites on bovine serum albumin: a ¹⁹F-NMR study, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6478-6482.
45. Xu, Y., Tang, P., Firestone, L., and Zhang, T. T. (1996) ¹⁹F nuclear magnetic resonance investigation of stereoselective binding of isoflurane to bovine serum albumin, *Biophys J* 70, 532-538.
46. Eckenhoff, R. G., and Shuman, H. (1993) Halothane binding to soluble proteins determined by photoaffinity labeling, *Anesthesiology* 79, 96-106.
47. Eckenhoff, R. G. (1998) Do specific or nonspecific interactions with proteins underlie inhalational anesthetic action?, *Mol Pharmacol* 54, 610-615.
48. Eckenhoff, R. G. (1996) An inhalational anesthetic binding domain in the nicotinic acetylcholine receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2807-2810.
49. Ishizawa, Y., Sharp, R., Liebman, P. A., and Eckenhoff, R. G. (2000) Halothane binding to a G protein coupled receptor in retinal membranes by photoaffinity labeling, *Biochemistry* 39, 8497-8502.

50. Johansson, J. S., Gibney, B. R., Rabanal, F., Reddy, K. S., and Dutton, P. L. (1998) A designed cavity in the hydrophobic core of a four-alpha-helix bundle improves volatile anesthetic binding affinity, *Biochemistry* 37, 1421-1429.
51. Johansson, J. S., Scharf, D., Davies, L. A., Reddy, K. S., and Eckenhoff, R. G. (2000) A designed four-alpha-helix bundle that binds the volatile general anesthetic halothane with high affinity, *Biophys J* 78, 982-993.
52. Raines, D. E., and McClure, K. B. (1997) Halothane interactions with nicotinic acetylcholine receptor membranes. Steady-state and kinetic studies of intrinsic fluorescence quenching, *Anesthesiology* 86, 476-486.
53. Ueda, I. (1965) Effects of diethylether and halothane on firefly luciferin bioluminescence., *Anesthesiology* 26, 603-606.
54. Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1984) Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors?, *Nature* 310, 599-601.
55. Franks, N. P., Jenkins, A., Conti, E., Lieb, W. R., and Brick, P. (1998) Structural basis for the inhibition of firefly luciferase by a general anesthetic, *Biophys J* 75, 2205-2211.
56. Eckenhoff, R. G., Pidikiti, R., and Reddy, K. S. (2001) Anesthetic stabilization of protein intermediates: myoglobin and halothane, *Biochemistry* 40, 10819-10824.
57. Davies, L. A., Klein, M. L., and Scharf, D. (1999) Molecular dynamics simulation of a synthetic four-alpha-helix bundle that binds the anesthetic halothane, *FEBS Lett* 455, 332-338.
58. Davies, L. A., Zhong, Q., Klein, M. L., and Scharf, D. (2000) Molecular dynamics simulation of four-alpha-helix bundles that bind the anesthetic halothane, *FEBS Lett* 478, 61-66.
59. Tang, P., Eckenhoff, R. G., and Xu, Y. (2000) General anesthetic binding to gramicidin A: the structural requirements, *Biophys J* 78, 1804-1809.
60. Lopez, M. M., and Kosk-Kosicka, D. (1997) Entropy-driven interactions of anesthetics with membrane proteins, *Biochemistry* 36, 8864-8872.
61. Karon, B. S., Geddis, L. M., Kutchai, H., and Thomas, D. D. (1995) Anesthetics alter the physical and functional properties of the Ca-ATPase in cardiac sarcoplasmic reticulum, *Biophys J* 68, 936-945.
62. Forman, S. A., Miller, K. W., and Yellen, G. (1995) A discrete site for general anesthetics on a postsynaptic receptor, *Mol Pharmacol* 48, 574-581.

63. Takenoshita, M., and Steinbach, J. H. (1991) Halothane blocks low-voltage-activated calcium current in rat sensory neurons, *J Neurosci* 11, 1404-1412.
64. Mihic, S. J., Ye, Q., Wick, M. J., Koltchine, V. V., Krasowski, M. D., Finn, S. E., Mascia, M. P., Valenzuela, C. F., Hanson, K. K., Greenblatt, E. P., Harris, R. A., and Harrison, N. L. (1997) Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors, *Nature* 389, 385-389.
65. Harris, R. A., Mihic, S. J., Dildy-Mayfield, J. E., and Machu, T. K. (1995) Actions of anesthetics on ligand-gated ion channels: role of receptor subunit composition, *Faseb J* 9, 1454-1462.
66. Franks, N. P., and Lieb, W. R. (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia, *Nature* 367, 607-614.
67. de Meyer, F. J., Venturoli, M., and Smit, B. (2008) Molecular simulations of lipid mediated protein-protein interactions, *Biophys J*.
68. White, S. H., and Wimley, W. C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 319-365.
69. Booth, P. J., and Curran, A. R. (1999) Membrane protein folding, *Curr Opin Struct Biol* 9, 115-121.
70. Tillman, T. S., and Cascio, M. (2003) Effects of membrane lipids on ion channel structure and function, *Cell Biochem Biophys* 38, 161-190.
71. Baribeau, J. Les interactions lipides-protéines dans la membrane pourpre: une approche analytique. Thèse, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 1987.
72. Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1971) Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium, *Nat New Biol* 233, 149-152.
73. Khorana, H. G., Gerber, G. E., Herlihy, W. C., Gray, C. P., Anderegg, R. J., Nihei, K., and Biemann, K. (1979) Amino acid sequence of bacteriorhodopsin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5046-5050.
74. Bayley, H., Huang, K. S., Radhakrishnan, R., Ross, A. H., Takagaki, Y., and Khorana, H. G. (1981) Site of attachment of retinal in bacteriorhodopsin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 2225-2229.
75. Henderson, R., and Unwin, P. N. (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy, *Nature* 257, 28-32.

76. Henderson, R., and Unwin, P. N. (1977) Structure of the purple membrane from *Halobacterium halobium*, *Biophys Struct Mech* 3, 121.
77. Belrhali, H., Nollert, P., Royant, A., Menzel, C., Rosenbusch, J. P., Landau, E. M., and Pebay-Peyroula, E. (1999) Protein, lipid and water organization in bacteriorhodopsin crystals: a molecular view of the purple membrane at 1.9 Å resolution, *Structure Fold Des* 7, 909-917.
78. Sternberg, B., L'Hostis, C., Whiteway, C. A., and Watts, A. (1992) The essential role of specific *Halobacterium halobium* polar lipids in 2D-array formation of bacteriorhodopsin, *Biochim Biophys Acta* 1108, 21-30.
79. Grigorieff, N., Beckmann, E., and Zemlin, F. (1995) Lipid location in deoxycholate-treated purple membrane at 2.6 Å, *J Mol Biol* 254, 404-415.
80. Grigorieff, N., Ceska, T. A., Downing, K. H., Baldwin, J. M., and Henderson, R. (1996) Electron-crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin, *J Mol Biol* 259, 393-421.
81. Mitsuoka, K., Hirai, T., Murata, K., Miyazawa, A., Kidera, A., Kimura, Y., and Fujiyoshi, Y. (1999) The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution, *J Mol Biol* 286, 861-882.
82. Luecke, H., Schobert, B., Richter, H. T., Cartailler, J. P., and Lanyi, J. K. (1999) Structure of bacteriorhodopsin at 1.55 Å resolution, *J Mol Biol* 291, 899-911.
83. Kates, M. (1993) Biology of halophilic bacteria, Part II. Membrane lipids of extreme halophiles: biosynthesis, function and evolutionary significance, *Experientia* 49, 1027-1036.
84. Weik, M., Patzelt, H., Zaccai, G., and Oesterhelt, D. (1998) Localization of glycolipids in membranes by in vivo labeling and neutron diffraction, *Mol Cell* 1, 411-419.
85. Essen, L., Siebert, R., Lehmann, W. D., and Oesterhelt, D. (1998) Lipid patches in membrane protein oligomers: crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11673-11678.
86. Krebs, M. P., Li, W., and Halambeck, T. P. (1997) Intramembrane substitutions in helix D of bacteriorhodopsin disrupt the purple membrane, *J Mol Biol* 267, 172-183.
87. Haupts, U., Tittor, J., and Oesterhelt, D. (1999) Closing in on bacteriorhodopsin: progress in understanding the molecule, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 367-399.

88. Mukhopadhyay, A. K., Bose, S., and Hendler, R. W. (1994) Membrane-mediated control of the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochemistry* 33, 10889-10895.
89. Mukhopadhyay, A. K., Dracheva, S., Bose, S., and Hendler, R. W. (1996) Control of the integral membrane proton pump, bacteriorhodopsin, by purple membrane lipids of *Halobacterium halobium*, *Biochemistry* 35, 9245-9252.
90. Hendler, R. W., and Dracheva, S. (2001) Importance of lipids for bacteriorhodopsin structure, photocycle, and function, *Biochemistry (Mosc)* 66, 1311-1314.
91. Joshi, M. K., Dracheva, S., Mukhopadhyay, A. K., Bose, S., and Hendler, R. W. (1998) Importance of specific native lipids in controlling the photocycle of bacteriorhodopsin, *Biochemistry* 37, 14463-14470.
92. Pomerleau, V., Harvey-Girard, E., and Boucher, F. (1995) Lipid-protein interactions in the purple membrane: structural specificity within the hydrophobic domain, *Biochim Biophys Acta* 1234, 221-224.
93. Barnett, S. M., Dracheva, S., Hendler, R., and Levin, I. W. (1996) Lipid-induced conformational changes of an integral membrane protein: an infrared spectroscopic study of the effects of Triton X-100 treatment on the purple membrane of *Halobacterium halobium* ET1001, *Biochemistry* 35, 4558-4567.
94. Neutze, R., Pebay-Peyroula, E., Edman, K., Royant, A., Navarro, J., and Landau, E. M. (2002) Bacteriorhodopsin: a high-resolution structural view of vectorial proton transport, *Biochim Biophys Acta* 1565, 144-167.
95. Fischer, W. B., Sonar, S., Marti, T., Khorana, H. G., and Rothschild, K. J. (1994) Detection of a water molecule in the active-site of bacteriorhodopsin: hydrogen bonding changes during the primary photoreaction, *Biochemistry* 33, 12757-12762.
96. Braiman, M., and Mathies, R. (1982) Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsin's primary photoproduct: evidence for a distorted 13-cis retinal chromophore, *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 403-407.
97. Maeda, A., Tomson, F. L., Gennis, R. B., Ebrey, T. G., and Balashov, S. P. (1999) Chromophore-protein-water interactions in the L intermediate of bacteriorhodopsin: FTIR study of the photoreaction of L at 80 K, *Biochemistry* 38, 8800-8807.
98. Zimanyi, L., Varo, G., Chang, M., Ni, B., Needleman, R., and Lanyi, J. K. (1992) Pathways of proton release in the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochemistry* 31, 8535-8543.

99. Luecke, H., Schobert, B., Cartailler, J. P., Richter, H. T., Rosengarth, A., Needleman, R., and Lanyi, J. K. (2000) Coupling photoisomerization of retinal to directional transport in bacteriorhodopsin, *J Mol Biol* 300, 1237-1255.
100. Balashov, S. P. (2000) Protonation reactions and their coupling in bacteriorhodopsin, *Biochim Biophys Acta* 1460, 75-94.
101. Mathies, R. A., Lin, S. W., Ames, J. B., and Pollard, W. T. (1991) From femtoseconds to biology: mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump, *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 20, 491-518.
102. Baribeau, J., and Boucher, F. (1987) Is the purple color of bacteriorhodopsin maintained by lipid protein interactions?, *Biochim. Biophys. acta* 890, 275-278.
103. Henry, N., Beaudoin, N., Baribeau, J., and Boucher, F. (1988) Further characterization of anesthetic-treated purple membranes, *Photochem. Photobiol.* 47, 85-90.
104. Pande, C., Callender, R., Baribeau, J., Boucher, F., and Pande, A. (1989) Effect of lipid-protein interaction on the color of bacteriorhodopsin, *Biochim Biophys Acta* 973, 257-262.
105. Moller, C., Buldt, G., Dencher, N. A., Engel, A., and Muller, D. J. (2000) Reversible loss of crystallinity on photobleaching purple membrane in the presence of hydroxylamine, *J Mol Biol* 301, 869-879.
106. Uruga, T., Hamanaka, T., Kito, Y., Uchida, I., Nishimura, S., and Mashimo, T. (1991) Effects of volatile anesthetics on bacteriorhodopsin in purple membrane, *Halobacterium halobium* cells and reconstituted vesicles, *Biophys Chem* 41, 157-168.
107. Nakagawa, T., Hamanaka, T., Nishimura, S., Uchida, I., Mashimo, T., and Kito, Y. (2000) The quantitative analysis of three action modes of volatile anesthetics on purple membrane, *Biochim Biophys Acta* 1468, 139-149.
108. Messaoudi, S., Daigle, I., and Boucher, F. (1993) Structural features underlying the anesthetic-induced equilibrium between three spectral species of bacteriorhodopsin: bR570, bR480 and bR380, *Journal of Molecular Structure* 297, 19-27.
109. Gao, M. Reversibility of anesthetic-induced conformational and functional changes in the purple membrane. Thèse, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 2003.
110. Lee, K. H., McIntosh, A. R., and Boucher, F. (1991) The interaction between halogenated anaesthetics and bacteriorhodopsin in purple

membranes as examined by intrinsic ultraviolet fluorescence, *Biochem Cell Biol* 69, 178-184.

111. Boucher, F., Taneva, S. G., Elouatik, S., Dery, M., Messaoudi, S., Harvey-Girard, E., and Beaudoin, N. (1996) Reversible inhibition of proton release activity and the anesthetic-induced acid-base equilibrium between the 480 and 570 nm forms of bacteriorhodopsin, *Biophys J* 70, 948-961.
112. Muller, D. J., Heymann, J. B., Oesterhelt, F., Moller, C., Gaub, H., Buldt, G., and Engel, A. (2000) Atomic force microscopy of native purple membrane, *Biochim Biophys Acta* 1460, 27-38.
113. Nakagawa, T., Hamanaka, T., Nishimura, S., Uruga, T., and Kito, Y. (1994) The specific binding site of the volatile anesthetic diiodomethane to purple membrane by X-ray diffraction, *J Mol Biol* 238, 297-301.
114. Hamanaka, T., Nakagawa, T., Kito, Y., Nishimura, S., Uchida, I., and Mashimo, T. (1998) Binding of volatile anesthetics to purple membranes studied by X-ray diffraction, *Toxicol Lett* 100-101, 397-403.
115. Becher, B., and Ebrey, T. G. (1976) Evidence for chromophore-chromophore (exciton) interaction in the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Biochem Biophys Res Commun* 69, 1-6.
116. Nishimura, S., Mashimo, T., Hiraki, K., Hamanaka, T., Kito, Y., and Yoshiya, I. (1985) Volatile anesthetics cause conformational changes of bacteriorhodopsin in purple membrane, *Biochim Biophys Acta* 818, 421-424.
117. Lee, A. G. (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins, *Biochim Biophys Acta* 1666, 62-87.
118. Bangham, A. D. (1968) Membrane models with phospholipids, *Prog Biophys Mol Biol* 18, 29-95.
119. Marsh, D. (1991) General features of phospholipid phase transitions, *Chem Phys Lipids* 57, 109-120.
120. Raudino, A., Zuccarello, F., Larosa, C., and Buemi, G. (1990) Thermal-Expansion and Compressibility Coefficients of Phospholipid-Vesicles - Experimental-Determination and Theoretical Modeling, *J Phys Chem-US* 94, 4217-4223.
121. Johnson, S. M., and Bangham, A. D. (1969) The action of anaesthetics on phospholipid membranes, *Biochim Biophys Acta* 193, 92-104.

122. Jorgensen, K., Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G., and Zuckermann, M. J. (1993) The effect of anaesthetics on the dynamic heterogeneity of lipid membranes, *Chem Phys Lipids* 65, 205-216.
123. Koubi, L., Tarek, M., Bandyopadhyay, S., Klein, M. L., and Scharf, D. (2001) Membrane structural perturbations caused by anesthetics and nonimmobilizers: a molecular dynamics investigation, *Biophys J* 81, 3339-3345.
124. Koubi, L., Tarek, M., Bandyopadhyay, S., Klein, M. L., and Scharf, D. (2002) Effects of the nonimmobilizer hexafluoroethane on the model membrane dimyristoylphosphatidylcholine, *Anesthesiology* 97, 848-855.
125. Pickholz, M., Saiz, L., and Klein, M. L. (2005) Concentration effects of volatile anesthetics on the properties of model membranes: a coarse-grain approach, *Biophys J* 88, 1524-1534.
126. Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1974) Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane, *Methods Enzymol* 31, 667-678.
127. Kates, M., Kushwaha, S. C., and Sprott, G. D. (1982) *Lipids of purple membrane from extreme halophiles and of methanogenic bacteria*, Vol. 88, Academic press.
128. Oesterhelt, D., and Hess, B. (1973) Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of *Halobacterium halobium*, *Eur J Biochem* 37, 316-326.
129. Szundi, I., and Stoeckenius, W. (1987) Effect of lipid surface charges on the purple-to-blue transition of bacteriorhodopsin, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3681-3684.
130. Miercke, L. J., Ross, P. E., Stroud, R. M., and Dratz, E. A. (1989) Purification of bacteriorhodopsin and characterization of mature and partially processed forms, *J Biol Chem* 264, 7531-7535.
131. Tiller, G. E., Mueller, T. J., Dockter, M. E., and Struve, W. G. (1984) Hydrogenation of triton X-100 eliminates its fluorescence and ultraviolet light absorption while preserving its detergent properties, *Anal Biochem* 141, 262-266.
132. Seigneuret, M., Neumann, J. M., and Rigaud, J. L. (1991) Detergent delipidation and solubilization strategies for high-resolution NMR of the membrane protein bacteriorhodopsin, *J Biol Chem* 266, 10066-10069.

133. Blok, M. C., van Deenen, L. L., and De Gier, J. (1976) Effect of the gel to liquid crystalline phase transition on the osmotic behaviour of phosphatidylcholine liposomes, *Biochim Biophys Acta* 433, 1-12.
134. Ladbroke, B. D., and Chapman, D. (1969) Thermal analysis of lipids, proteins and biological membranes. A review and summary of some recent studies, *Chem Phys Lipids* 3, 304-356.
135. Li, Q. T., and Sawyer, W. H. (1992) Effect of ionic strength on the transfer of 1-pyrenemethyl-3 beta-hydroxy-22,23-bisnor-5-cholenate between bilayer vesicles containing phosphatidylserine, *Chem Phys Lipids* 63, 55-63.
136. MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P., Takeshita, K., Subbarao, N. K., and Hu, L. R. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles, *Biochim Biophys Acta* 1061, 297-303.
137. Chen, P. S., Toribara, T. Y., and Warner, H. (1956) Microdetermination of Phosphorus., *Anal Chem*, 28, 1756.
138. Lakowicz, J. R. (1991) *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 2: Principles*, Vol. 2, Plenum Publishing Corporation.
139. Carnini, A., Phillips, H. A., Shamrakov, L. G., and Cramb, D. T. (2004) Revisiting lipid – general anesthetic interactions(II): Halothane location and changes in lipid bilayer microenvironment monitored by fluorescence., *Canadian Journal of Chemistry* 82, 1139–1149.
140. Messaoudi, S. Phénoménologie et aspect structural de l'équilibre entre quatre formes spectrales de la bactériorhodopsine tel qu'influencé par les anesthésiques et les solvants. Mémoire, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 1991.
141. Cloutier, I. La cible moléculaire des anesthésiques généraux : peut-on distinguer la proie de son ombre? Mémoire, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, 2003.
142. Dencher, N. A., and Heyn, M. P. (1978) Formation and properties of bacteriorhodopsin monomers in the non-ionic detergents octyl-beta-D-glucoside and Triton X-100, *FEBS Lett* 96, 322-326.
143. Baribeau, J. Les interactions lipides-protéines dans la membrane pourpre: une approche analytique. Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), Trois-Rivières, 1987.

144. Permyakov, E. A., and Shnyrov, V. (1983) A spectrofluorometric study of the environment of tryptophans in bacteriorhodopsin, *Biophysical Chemistry* 18, 145-152.
145. Reshetnyak, Y. K., Koshevnik, Y., and Burstein, E. A. (2001) Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues, *Biophys J* 81, 1735-1758.
146. Kalisky, O., Feitelson, J., and Ottolenghi, M. (1981) Photochemistry and fluorescence of bacteriorhodopsin excited in its 280-nm absorption band, *Biochemistry* 20, 205-209.
147. Plotkin, B. J., and Sherman, W. V. (1984) Spectral heterogeneity in protein fluorescence of bacteriorhodopsin: evidence for intraprotein aqueous regions, *Biochemistry* 23, 5353-5360.
148. Palmer, P. L., and Sherman, W. V. (1985) Alkaline quenching of bacteriorhodopsin tryptophanyl fluorescence: evidence for aqueous accessibility or a hydrogen-bonded chain, *Photochem Photobiol* 42, 541-547.
149. Cladera, J., Sabes, M., and Padros, E. (1992) Fourier transform infrared analysis of bacteriorhodopsin secondary structure, *Biochemistry* 31, 12363-12368.
150. Torres, J., Sepulcre, F., and Padros, E. (1995) Conformational changes in bacteriorhodopsin associated with protein-protein interactions: a functional alpha I-alpha II helix switch?, *Biochemistry* 34, 16320-16326.
151. Rothschild, K. J., and Clark, N. A. (1979) Polarized infrared spectroscopy of oriented purple membrane, *Biophys J* 25, 473-487.
152. Rothschild, K. J., and Clark, N. A. (1979) Anomalous amide I infrared absorption of purple membrane, *Science* 204, 311-312.
153. Krimm, S., and Dwivedi, A. M. (1982) Infrared spectrum of the purple membrane: clue to a proton conduction mechanism?, *Science* 216, 407-408.
154. Wang, J., and El-Sayed, M. A. (2000) The effect of protein conformation change from alpha(II) to alpha(I) on the bacteriorhodopsin photocycle, *Biophys J* 78, 2031-2036.
155. Kluge, T., Olejnik, J., Smilowitz, L., and Rothschild, K. J. (1998) Conformational changes in the core structure of bacteriorhodopsin, *Biochemistry* 37, 10279-10285.

156. Earnest, T. N., Herzfeld, J., and Rothschild, K. J. (1990) Polarized Fourier transform infrared spectroscopy of bacteriorhodopsin. Transmembrane alpha helices are resistant to hydrogen/deuterium exchange, *Biophys J* 58, 1539-1546.
157. Wang, J., and El-Sayed, M. A. (1999) Temperature jump-induced secondary structural change of the membrane protein bacteriorhodopsin in the premelting temperature region: a nanosecond time-resolved Fourier transform infrared study, *Biophys J* 76, 2777-2783.
158. Earnest, T. N., Roepe, P., Braiman, M. S., Gillespie, J., and Rothschild, K. J. (1986) Orientation of the bacteriorhodopsin chromophore probed by polarized Fourier transform infrared difference spectroscopy, *Biochemistry* 25, 7793-7798.
159. Rothschild, K. J., Gillespie, J., and DeGrip, W. J. (1987) Evidence for rhodopsin refolding during the decay of Meta II, *Biophys J* 51, 345-350.
160. Heyes, C. D., and El-Sayed, M. A. (2001) Effect of temperature, pH, and metal ion binding on the secondary structure of bacteriorhodopsin: FT-IR study of the melting and premelting transition temperatures, *Biochemistry* 40, 11819-11827.
161. Heyes, C. D., and El-Sayed, M. A. (2002) The role of the native lipids and lattice structure in bacteriorhodopsin protein conformation and stability as studied by temperature-dependent Fourier transform-infrared spectroscopy, *J Biol Chem* 277, 29437-29443.
162. Heyes, C. D., Wang, J., Sanii, L. S., and El-Sayed, M. A. (2002) Fourier transform infrared study of the effect of different cations on bacteriorhodopsin protein thermal stability, *Biophys J* 82, 1598-1606.
163. Parasassi, T., and Gratton, E. (1995) Membrane Lipid Domains and Dynamics as Detected by Laurdan Fluorescence, *Journal of Fluorescence* 5, 59-69.
164. Bagatolli, L. A., and Gratton, E. (2000) A correlation between lipid domain shape and binary phospholipid mixture composition in free standing bilayers: A two-photon fluorescence microscopy study, *Biophys J* 79, 434-447.
165. Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., and Gratton, E. (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence, *Biophys J* 60, 179-189.
166. Somerharju, P. (2002) Pyrene-labeled lipids as tools in membrane biophysics and cell biology, *Chem Phys Lipids* 116, 57-74.

167. Hresko, R. C., Sugar, I. P., Barenholz, Y., and Thompson, T. E. (1986) Lateral distribution of a pyrene-labeled phosphatidylcholine in phosphatidylcholine bilayers: fluorescence phase and modulation study, *Biochemistry* 25, 3813-3823.
168. Sassaroli, M., Ruonala, M., Virtanen, J., Vauhkonen, M., and Somerharju, P. (1995) Transversal distribution of acyl-linked pyrene moieties in liquid-crystalline phosphatidylcholine bilayers. A fluorescence quenching study, *Biochemistry* 34, 8843-8851.
169. Zeng, J., and Chong, P. L. (1995) Effect of ethanol-induced lipid interdigitation on the membrane solubility of Prodan, Acdan, and Laurdan, *Biophys J* 68, 567-573.
170. Engelke, M., Jessel, R., Wiechmann, A., and Diehl, H. A. (1997) Effect of inhalation anaesthetics on the phase behaviour, permeability and order of phosphatidylcholine bilayers, *Biophys Chem* 67, 127-138.
171. Honemann, C. W., Washington, J., Honemann, M. C., Nietgen, G. W., and Durieux, M. E. (1998) Partition coefficients of volatile anesthetics in aqueous electrolyte solutions at various temperatures, *Anesthesiology* 89, 1032-1035.
172. Johansson, J. S., and Zou, H. (1999) Partitioning of four modern volatile general anesthetics into solvents that model buried amino acid side-chains, *Biophys Chem* 79, 107-116.
173. Roth, S. H., and Miller, K. W., (Eds.) (1984) *Molecular and cellular mechanisms of anesthetics*, Plenum medical book company, University of Calgary.
174. Washington, K., Sarasua, M. M., Koehler, L. S., Koehler, K. A., Schultz, J. A., Pedersen, L. G., and Hiskey, R. G. (1984) Utilization of heavy-atom effect quenching of pyrene fluorescence to determine the intramembrane distribution of halothane, *Photochem Photobiol* 40, 693-701.
175. Greenwood, A. I., Tristram-Nagle, S., and Nagle, J. F. (2006) Partial molecular volumes of lipids and cholesterol, *Chem Phys Lipids* 143, 1-10.
176. Metso, A. J., Jutila, A., Mattila, J. P., Holopainen, J. M., and Kinnunen, P. K. J. (2003) Nature of the Main Transition of Dipalmitoylphosphocholine Bilayers Inferred from Fluorescence Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B* 107, 1251-1257.
177. Repakova, J., Holopainen, J. M., Karttunen, M., and Vattulainen, I. (2006) Influence of pyrene-labeling on fluid lipid membranes, *J Phys Chem B* 110, 15403-15410.

178. Barenholz, Y., Cohen, T., Haas, E., and Ottolenghi, M. (1996) Lateral organization of pyrene-labeled lipids in bilayers as determined from the deviation from equilibrium between pyrene monomers and excimers, *J Biol Chem* 271, 3085-3090.
179. Somerharju, P. J., Virtanen, J. A., Eklund, K. K., Vainio, P., and Kinnunen, P. K. (1985) 1-Palmitoyl-2-pyrenedecanoyl glycerophospholipids as membrane probes: evidence for regular distribution in liquid-crystalline phosphatidylcholine bilayers, *Biochemistry* 24, 2773-2781.
180. Cevc, G., and Marsh, D. (1987) *Phospholipid Bilayers: Physical Principles and Models*, John Wiley & Sons.
181. Cevc, G. (1990) Membrane electrostatics, *Biochim Biophys Acta* 1031, 311-382.
182. Pandit, S. A., Bostick, D., and Berkowitz, M. L. (2003) Mixed bilayer containing dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylserine: lipid complexation, ion binding, and electrostatics, *Biophys J* 85, 3120-3131.
183. Langner, M., and Kubica, K. (1999) The electrostatics of lipid surfaces, *Chem Phys Lipids* 101, 3-35.
184. Luna, E. J., and McConnell, H. M. (1977) Lateral phase separations in binary mixtures of phospholipids having different charges and different crystalline structures, *Biochim Biophys Acta* 470, 303-316.
185. Roth, S. H., and Miller, K. W. (1986) *Molecular and cellular mechanism of anesthetics*, Plenum Publishing Corporation, New York.
186. Cevc, G. (1993) *Phospholipids handbook*, Marcel Dekker Inc., New York.
187. Hauet, N., Paternostre, M., Létourneau, D., and Boucher, F. (2009) Interaction of the general volatile anesthetic Enflurane with bacteriorhodopsin-DPPC proteoliposomes *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 98, 39 - 45.
188. Andersen, O. S., and Koeppe, R. E., 2nd. (2007) Bilayer thickness and membrane protein function: an energetic perspective, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36, 107-130.
189. Cantor, R. S. (1999) Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers, *Biophys J* 76, 2625-2639.
190. Enders, A. (1990) The influence of general, volatile anesthetics on the dynamic properties of model membranes, *Biochim Biophys Acta* 1029, 43-50.