UNIVERSITÉ PAUL SABATIER - TOULOUSE III

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIÈRE

T H È S E

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Spécialité : Chimie-Biologie-Santé

Présentée et soutenue par

Laurent LE GUYADER

le 9 novembre 2007

Titre :

UTILISATION DE SONDES PYRÉNIQUES *IN VIVO* POUR CARACTÉRISER L'ÉTAT DE PHASE GLOBAL DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE CELLULES EUCARYOTES.

APPLICATION À LA DÉTECTION DE LA LIAISON D'AGONISTES AU RÉCEPTEUR δ OPIOÏDE MURIN.

Directeurs de thèse :

Dr. Christophe LE ROUX et Dr. André LOPEZ

JURY

Pr. Robert MARTINO, Président

Dr. Guy DUPORTAIL, Rapporteur

Dr. Pierre-Emmanuel MILHIET, Rapporteur

Dr. Hervé ANSANAY, Examinateur

UNIVERSITÉ PAUL SABATIER - TOULOUSE III

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA MATIÈRE

T H È S E

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Spécialité : Chimie-Biologie-Santé

Présentée et soutenue par

Laurent LE GUYADER

le 9 novembre 2007

Titre :

UTILISATION DE SONDES PYRÉNIQUES *IN VIVO* POUR CARACTÉRISER L'ÉTAT DE PHASE GLOBAL DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DE CELLULES EUCARYOTES.

APPLICATION À LA DÉTECTION DE LA LIAISON D'AGONISTES AU RÉCEPTEUR δ OPIOÏDE MURIN.

Directeurs de thèse :

Dr. Christophe LE ROUX et Dr. André LOPEZ

JURY

Pr. Robert MARTINO, Président

Dr. Guy DUPORTAIL, Rapporteur

Dr. Pierre-Emmanuel MILHIET, Rapporteur

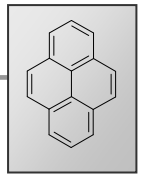
Dr. Hervé ANSANAY, Examinateur

à Stéphanie
qui m’a soutenue ces trois années.

Celui qui ne progresse pas chaque jour, recule chaque jour.

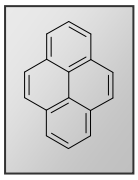
Confucius

Remerciements



Plutôt que de me lancer dans une longue litanie de remerciements, qui serait certainement non exhaustive, je m'en tiendrai à d'agréables généralités pour que tout le monde se sente concerné (même ceux qui le sont moins). Mais rassurez-vous, vous êtes nombreux à les mériter. Tout d'abord un grand merci à ceux et celles qui dés le début ont cru en moi et m'ont permis de démarrer et de mener à bien ce travail. Merci beaucoup à ceux et celles qui m'ont aidé par leurs avis éclairés et leur soutien technique pendant ces trois ans. Enfin un chaleureux merci à tout ceux et surtout celles qui ont partagé leur joie et leur bonne humeur avec moi. Merci bien sûr à mes proches et à ma famille. Merci aux « sages » de l'École Doctorale de Biologie-Santé-Biotechnologies pour n'avoir pas réussi à m'empêcher de faire cette thèse.

Résumé



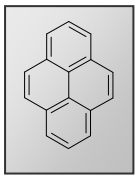
Le développement d'outils performants de criblage de nouvelles molécules capables d'induire une réponse cellulaire identique à celle d'un ligand (agoniste/ antagoniste, etc…), est un enjeu important pour la recherche pharmaceutique. Les principales cibles utilisées aujourd'hui sont les récepteurs trans-membranaires couplés aux protéines G (RCPG), dont l'activation déclenche une cascade de réactions intracellulaires (signalisation) régulant des fonctions essentielles de la cellule.

L'objectif de ce travail de thèse est la détection de l'initiation de la signalisation cellulaire par spectrométrie de fluorescence pour le récepteur δ opioïde murin (mDOR) qui induit un changement conformationnel responsable d'un épaississement de sa partie transmembranaire lors de la signalisation, au niveau de la membrane plasmique de cellules eucaryotes *in vivo*. Ce changement est supposé générer des modifications de phase lipidique de la membrane plasmique lors de cette interaction RCPG/agoniste, avec des redistributions locales de certains lipides comme le cholestérol, conduisant à la génération d'une phase liquide-ordonnée (lo).

Pour cela deux nouvelles sondes fluorescentes membranaires de la famille des Pyrène-cholestérol ont été synthétisées, le 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-méthylpyrényl)-20-one **1** et le 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-méthylpyrényl)-20-méthylidène **2**.

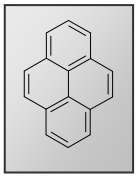
Dans un premier temps la comparaison du comportement de ces sondes vis-à-vis du cholestérol a été analysée dans différentes membranes modèles phospholipidiques. Les données de microcalorimétrie et de RMN-^{2}H indiquent que ces composés induisent des perturbations des lipides comparables à celle du cholestérol. Les données d'absorption, combinées à la propriété hypochromique du chromophore pyrène, ont permis de mettre en évidence un comportement auto-associatif de ces sondes. Nous extrapolons ce résultat à celui du cholestérol car des simulations en dynamique moléculaire déduisaient cette même associativité. Nous retrouvons qu'elle augmente avec le degré d'insaturation des chaînes acyles et qu'elle diminue quand la quantité de cholestérol croît (plus grande miscibilité des sondes dans les membranes enrichies en cholestérol). Dans un deuxième temps la sensibilité du spectre d'émission de fluorescence à la polarité de l'environnement a été vérifiée et mise à profit dans des membranes modèles pour discriminer les membranes en phase *ld* de celles en phase *lo* (où la polarité du cœur de la membrane est plus faible). Enfin, l'incorporation de la sonde **2** dans la membrane plasmique de cellules vivantes CHO qui sur-expriment mDOR, a permit le suivi dans le temps, par spectrofluorimétrie et microspectrofluorimétrie, de la perturbation de phase induite par un agoniste de ce récepteur. Les bases d'un criblage sélectif sont donc posées.

Abstract



The development of tools for the screening of new receptors' agonists is a major issue for pharmaceutical research. Currently, the main targets used are the G-protein coupled receptor of the plasma membrane which the activation trigger the signaling pathways involved in many cell functions. The goal of this thesis is the detection, using a spectrofluorometry approach *in vivo*, of the signaling pathway ignition by the mouse delta opioid receptor (mDOR). DOR is assumed to generate a relocalisation of some lipids (cholesterol) while agonist binding leading to the formation of a liquid-ordered phase (lo). Thus two fluorescent probes have been synthesized, which the 3beta-hydroxy-pregn-5-ene-21-(1-methylpyrenyl)-20-methylidene. Data from calorimetry and RMN-^{2}H studies show that this probe induces the same lipid membranes disturbance than cholesterol. Absorption data of the probe allowed the assessment of a self-association process of cholesterol in model membranes, which is as a function of the acyl-chains saturation degree of phospholipids. Then the polarity sensitive property of the probe has been used to distinguish between ld and lo phases in model membranes. Finally, we incorporated the probes in CHO cells over-expressing mDOR to monitor, by fluorescence spectroscopy, the mean phase state change of the plasma membrane triggered by a mDOR agonist. This is the first step of a new screening approach.

Sommaire



Abréviations **1**

1. LA MEMBRANE PLASMIQUE **5**

1.1 Les lipides **6**

1.1.1 Architecture lipidique 7

1.1.2 Les propriétés physico-chimiques des biomembranes 13

1.1.2.1 Propriétés de phase 14

1.1.2.2 Influence du cholestérol sur l'état de phase de la membrane 19

1.1.2.3 Propriétés physiques de la phase lo 23

1.2 Les protéines membranaires **25**

1.2.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) 28

1.3 Les interactions lipide-protéine **30**

1.3.1 Le mésappariement hydrophobe 31

1.4 Organisation fonctionnelle **34**

1.4.1 Organisation fonctionnelle transversale 34

1.4.2 Organisation fonctionnelle latérale 36

1.4.3 Les membranes résistantes aux détergents (DRM) et les rafts 39

1.5 Le criblage des récepteurs membranaires **43**

1.5.1 Présentation 43

1.5.2 Une approche complémentaire 44

1.6 But de l'étude **45**

2. PRÉSENTATION DES SONDES PYRÈNE-CHOLESTÉROL **47**

2.1 Présentation de la famille Pyrène-cholestérol **47**

2.2 Synthèse chimique des sondes **48**

3. CARACTÉRISATION DES SONDES PYRÈNE-CHOLESTÉROL **51**

3.1 Études préliminaires des potentialités des sondes **51**

3.1.1 Rappels sur la spectroscopie d'absorption et d'émission du pyrène 51

3.1.2 Solubilité dans les membranes modèles de phospholipides 55

3.1.3 Marquage des membranes plasmiques *in vivo* 57

3.1.3.1 Test de toxicité cellulaire 61

3.1.4 Sensibilité du groupement pyrène à la polarité de l'environnement 63

3.1.4.1 Qu'est ce que la polarité ? Les différentes échelles de mesure 63

3.1.4.2 Sensibilité de la sonde Py-met-chol à différents solvants 65

3.2 Comportement des sondes vis-à-vis du cholestérol dans des milieux modèles **70**

3.2.1 Mesure de la perturbation de phase du DPPC induite par la sonde Py-met-chol 71

3.2.1.1 Étude par calorimétrie différentielle à balayage 71

3.2.1.2 Étude par RMN-^{2}H 73

3.2.2 Effet du taux d'insaturation des chaînes acyles des phospholipides sur la distribution latérale des sondes dans des LUVs 75

3.2.2.1 Mesures de l'absorbance du chromophore pyrène dans des LUVs 78

3.2.2.2 Présentation du modèle isodesmique 80

3.2.2.3 Présentation du modèle dimérique 82

3.2.2.4 Analyse des résultats 83

3.3 Mesure de l'influence du cholestérol sur les propriétés physiques des membranes **88**

3.3.1 Distribution latérale des sondes en fonction de la fraction molaire de cholestérol 88

3.3.2 Évolution de la polarité membranaire en fonction de la fraction molaire de cholestérol 92

3.3.2.1 Détermination du taux de marquage des membranes 92

3.3.2.2 Résultats 94

3.4 Conclusion **96**

4 APPLICATION : DÉTECTION DE L'ACTIVATION DE RÉCEPTEURS OPIOIDES 99

4.1 Études sur des suspensions cellulaires par spectrofluorimétrie 99

4.1.1 Présentation du système 100

4.1.2 Effet de ligands sur des cellules sur-exprimant le récepteur δ opioïde murin 101

4.1.2.1 Effet du NaCl sur la liaison d'agonistes 101

4.1.2.2 Résultats 102

4.1.2.3 Effet du taux d'expression du récepteur δ sur l'amplitude du signal mesuré 104

4.1.3 Effet de ligands sur des cellules sur-exprimant le récepteur μ opioïde 105

4.2 Microspectrofluorimétrie sur des cellules sur-exprimant le récepteur δ opioïde 108

4.2.1 Présentation de la chaîne de mesure 108

4.2.2 Effet de ligands 110

4.3 Conclusion 112

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 113

6. MATÉRIEL & MÉTHODES 119

6.1 Produits chimiques utilisés 119

6.2 Préparation de liposomes (LUV) 120

6.3 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) 121

6.4 RMN ^{2}H 121

6.5 Préparation de MβCD chargées en sonde Pyrène-Cholestérol 122

6.6 Lignées cellulaires utilisées et conditions de culture 122

6.7 Marquage des membranes plasmiques *in vivo* 123

6.8 Test de toxicité cellulaire du Py-met-chol 124

6.9 Spectroscopie d'absorption 124

6.10 Spectroscopie de fluorescence 125

6.11 Microspectrofluorimétrie 125

6.12 Microscopie photonique **126**

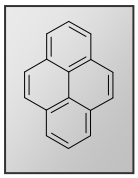
7. RÉFÉRENCES **127**

8. ANNEXES **145**

Publication dans *The Biophysical Journal*

Protocole de synthèse des sondes Pyrène-cholestérol (publié en fichier supplémentaire dans *The Biophysical Journal*)

Abréviations utilisées



ACAT	Acyl-coenzyme A:Cholestérol AcylTransférase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BP_{em}	Bande Passante en émission
BP_{ex}	Bande Passante en excitation
CHO (cellule)	Chinese Hamster Ovary (ovaire de hamster chinois)
DLS	Dynamic Light Scattering
DMF	DiMéthylFormamide
DMPC	1,2-DiMyristoyl-*sn*-glycero-3-PhosphatidylCholine
DMSO	DiMéthylSulfOxide
DOPC	1,2-DiOléoyl-*sn*-glycero-3-PhosphatidylCholine
DPPC	1,2-DiPalmitoyl-*sn*-glycero-3-PhosphatidylCholine
$DPPC_{d62}$	1,2-DiPalmitoyl-D62-*sn*-glycero-3-PhosphatidylCholine
DRM	Detergent Resistant Membrane
DSC	Differential Scanning Calorimetry
ESR	Electron Spin Resonance
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Förster/Fluorescence Resonance Energy Transfert
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanosine Exchange Factor (Facteur Échangeur de Guanosine)
GFP	Green Fluorescent Protein (protéine fluorescente verte)
GL	Glycolipide
GPI (ancre)	Glycosylated PhosphatidylInositol (Glycosyl Phosphatidyl Inositol)
GPL	GlycéroPhosphoLipide
GTP	Guanosine TriPhosphate
HEK (cellule)	Human Embryonic Kidney (cellule embryonnaire humaine de rein)
hMOR	human Mu Opioid Receptor
HPLC	High Precision Liquid Chromatography
HTS	High Throughput Screening
LDL	Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de faible densité)

LUV	Large Unilamelar vesicle
MβCD	Méthyl-β-cyclodextrine
mDOR	mouse Delta Opioid Receptor
MLV	MultiLamelar Vesicle
MSF	MicroSpectroFluorimètre
NBD	7-NitroBenz-2-oxa-1,3-Diazole
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	PhosphatidylCholine
PE	PhosphatidylÉthanolamine
PI	PhosphatidylInositol
PIP_2	PhosphatidylInositol 4,5-bisphosphate
PL	*cf.* GPL
PLC	PhosphoLipase C
POPC	1-Palmitoyl-2-Oléoyl-*sn*-glycéro-3-PhosphatidylCholine
POPE	1-Palmitoyl-2-Oléoyl-*sn*-glycéro-3-PhosphatidylÉthanolamine
PS	PhosphatidylSérine
Pyr_{10}-PC	1-palmitoyl-2-(pyrénodécanoyl)-sn-glycéro-3-PhosphoCholine
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
REG	Réticulum Endoplasmique Granuleux
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SANS	Small Angle Neutron Scattering
SL	SphingoLipide
SM	SphingoMyéline
SHSY-5Y	Lignée de neuroblastomes
SPT	Single Particle Tracking (Suivi de Particule Unique)
THF	TetraHydroFurane

La membrane plasmique

1

L'étude des membranes biologiques est devenue en quelques années une approche conceptuelle importante pour mieux comprendre, au niveau cellulaire, les processus du vivant. Les membranes biologiques sont généralement constituées de deux couches de molécules amphiphiles (lipides) se faisant face de manière antiparallèle dans lesquelles sont insérées des protéines. Ces membranes participent à des fonctions essentielles pour la cellule : elles forment des enveloppes imperméables efficaces dans la compartimentation de la cellule tout en assurant une grande diversité de fonctions d'échange (solutés, nutritifs, signaux…) entre ces compartiments. Chez certains procaryotes elles sont souvent restreintes à une membrane faisant partie de l'enveloppe bactérienne qui délimite l'organisme. Par conte chez les espèces plus évoluées que sont les eucaryotes, notamment les eucaryotes supérieurs, les membranes sont omniprésentes et diffèrent par leurs compositions lipidique et protéique et par leurs fonctions. Elles constituent l'enveloppe des organites (enveloppe nucléaire, endosomes, péroxysomes, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique rugueux, mitochondries, thylacoïdes…) tout en assurant un grand nombre de fonctions nécessaires à la cellule. Enfin, la limite même des cellules eucaryotes est une membrane, c'est la membrane plasmique (fig. 1.1).

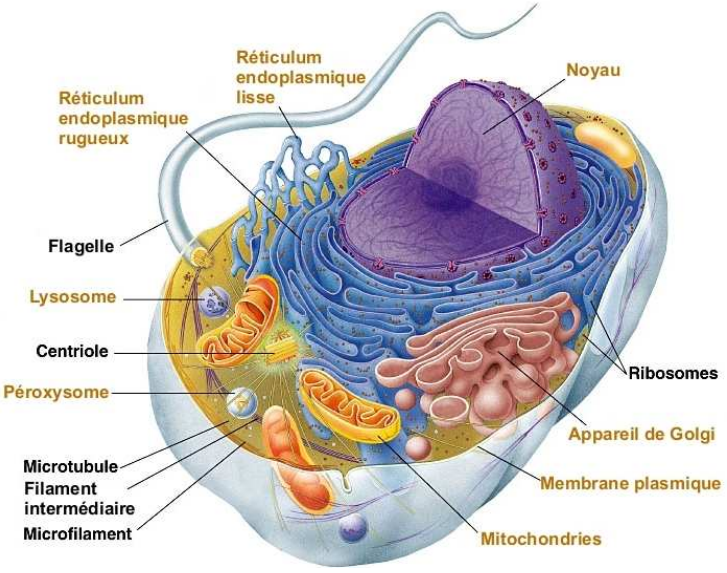


Figure 1.1. Représentation schématique de l'ensemble des structures cellulaires présentes dans les cellules eucaryotes animales. Les structures membranaires sont indiquées en marron. *D'après Pearson Education, Inc. Copyright © 2003.*

De nombreuses fonctions biologiques sont réalisées au niveau de la membrane plasmique, assurées dans leur grande majorité par les protéines qui y sont insérées (récepteurs membranaires). Dans un premier temps nous allons nous

intéresser plus particulièrement aux éléments structurels (lipides et protéines) de la membrane plasmique. Au passage, la physico-chimie des membranes lipidiques sera développée afin de mieux comprendre l'influence des lipides sur les fonctions membranaires. Nous aborderons ensuite l'organisation dynamique et fonctionnelle des constituants de la membrane plasmique, nécessaire à la réalisation de fonctions biologiques particulières, telle la signalisation cellulaire par les récepteurs membranaires couplés aux protéines G. Cela permettra alors d'aborder la notion de criblage des récepteurs membranaires et de présenter les travaux de la thèse, qui décrivent le développement et la caractérisation d'un nouvel outil potentiel de criblage.

1.1 Les lipides

Des cellules ont été observées pour la première fois par Robert Hooke, souvent considéré comme l'inventeur du microscope composé, en 1655. Ce n'est qu'en 1847 que Nicolas Théodore Gobley découvre les phospholipides en isolant la lécithine du jaune d'œuf. Au début du XX^{è} siècle, Irving Langmuir montre que les acides gras forment des monocouches, les groupes carboxyles en contact avec la surface de l'eau (Langmuir 1917), puis Gorter et Grendel démontrent la capacité de certains lipides à former des simples et des doubles couches. Ces derniers montrent également que la surface des lipides extraits des globules rouges est égale à deux fois la surface de ces cellules. Ils sont ainsi les premiers à formuler l'hypothèse d'une membrane cellulaire formée d'une double couche de lipides (Gorter et Grendel 1925). Le premier modèle membranaire à avoir été accepté par la majorité des scientifiques fût proposé par Danielli et Davson (Danielli et Davson 1935). Suite à leurs observations de l'adsorption de protéines sur des gouttelettes lipidiques d'origine animale, ils ont supposé que la bicouche lipidique était prise en sandwich entre deux couches de protéines. Bien qu'inexact, ce modèle a perduré jusqu'au début des années 70 lorsque Jonathan Singer et Garth Nicholson décrivirent le modèle de la mosaïque fluide (Singer et Nicolson 1972) : la membrane plasmique est toujours organisée en bicouche mais les têtes polaires des phospholipides sont directement en contact avec l'eau et les protéines membranaires « flottent » dans la bicouche ou en surface de celle-ci. Aujourd'hui ce modèle donne une assez bonne représentation de l'architecture de la membrane plasmique, mais les

progrès accomplis depuis en membranologie, notamment au niveau de l'organisation dynamique des constituants, montrent que la distribution des lipides et des protéines n'est pas aléatoire et suggèrent, pour rendre compte de la spécificité et de l'efficacité des fonctions, la présence de nombreux domaines fonctionnels (Engelman 2005).

Cependant un des rôles les plus importants de la membrane plasmique pour la cellule est celui de barrière imperméable entre le milieu intracellulaire (cytoplasmique) et extracellulaire pour la majorité des ions et des solutés, tout en étant capable d'assurer les échanges nécessaires, via une grande variété de protéines. La nature a su assurer cette fonction avec une grande diversité de réponses. La composition des membranes et notamment le rapport des protéines aux lipides est très variable en fonction de la nature et du rôle des membranes et de ceux des tissus et organismes. Ainsi le rapport massique peut passer de 0.23 pour la membrane plasmique de la myéline à 1.5 pour celle de cellules Hela et jusqu'à 3.2 pour une membrane mitochondriale interne, alors que celui de la membrane plasmique de cellules hépatiques de souris est de 0,85 (Granner, 1996). Considérant le fait que la masse molaire des protéines est beaucoup plus élevée que celle des lipides, le rapport molaire est beaucoup plus faible, de l'ordre de 1 sur 50 à 1 sur 100.

1.1.1 Architecture lipidique

Le « châssis » de la membrane plasmique est constitué de lipides amphiphiles dont la majorité, sous l'action de forces hydrophobes (minimisation de l'exposition des parties hydrophobes au milieu aqueux), forment une phase lamellaire constituée de deux feuillets avec les têtes polaires des lipides orientées vers le milieu aqueux et les parties hydrophobes vers le cœur membranaire. La grande diversité des lipides de la membrane plasmique favorise une organisation lamellaire de part l'association de géométries (volumes respectifs des parties hydrophobe et hydrophile) cylindrique, conique ou conique inversée

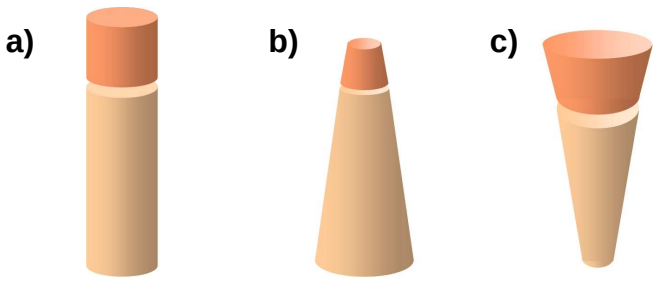


Figure 1.2. Formes des lipides membranaires selon les volumes de la tête polaire (foncé) et des chaînes acyles hydrophobes (clair). (a) cylindrique, (b) conique et (c) conique inversée.

(fig. 1.2). Dans une membrane biologique et dans les conditions physiologiques la géométrie moyenne des lipides est cylindrique, avec une section d'environ 0.63 nm² et une longueur moyenne de 1.0-1.5 nm, dépendante de la nature des chaînes acyles (Mouritsen 2005). On considère que l'épaisseur hydrophobe moyenne de la membrane plasmique est d'environ 3 nm alors que les parties polaires représenteraient au total 1.5 nm (Bowie 2005). Les carbohydrates portés par les glycolipides, les sphingolipides et les protéines forment un manteau cellulaire (glycocalyx) plus ou moins dense et pouvant dépasser 1 µm d'épaisseur, notamment pour les cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins des mammifères (VanTeeffelen et al. 2007). La présence d'un cœur hydrophobe dans la membrane s'oppose fortement à la diffusion d'eau, d'ions et de solutés hydrophiles. Plus de 1000 espèces lipidiques différentes ont été recensées dans la membrane plasmique, principalement représentées par les glycérophospholipides (communément appelés phospholipides, PL ou GPL), les sphingolipides (SL), les glycolipides (GL) et le cholestérol (Barenholz 2002; van Meer 2005). Seulement 10% de ceux-ci sont chargés (Mouritsen 2005). La synthèse des PL membranaires est accomplie dans toutes les cellules de l'organisme au niveau du feuillet cytoplasmique du REG. Elle se fait par estérification des acides gras et de l'acide phosphorique sur le glycérol. À partir de leurs produits de dégradation ces lipides peuvent être re-synthétisés, faisant l'objet d'autres voies métaboliques qui sont les voies principales de renouvellement des acides gras des lipides membranaires. La synthèse des sphingolipides a d'abord lieu dans le RE par amidification de la sphingosine pour former le céramide, puis la tête polaire est ajouté au niveau de l'appareil de Golgi. Le cholestérol est également synthétisé dans le RE. L'ensemble de ces lipides est amené dans la membrane plasmique par les processus d'exocytoses via le trans-Golgi.

Les **glycérophospholipides** sont l'espèce lipidique majoritaire et sont caractérisés par la nature de leur tête polaire et de leurs chaînes d'acides gras (fig. 1.3). La tête polaire est constituée d'un glycérol estérifié en position 3 par un acide phosphorique (phosphate), lui-même substitué par différents groupements qui définissent la nature du glycérophospholipide. À pH physiologique (généralement autour de pH 7), le phosphate porte une charge négative et donne à la partie polaire son caractère neutre ou chargé en fonction de la nature du substituant. Les têtes polaires des glycérophospholipides

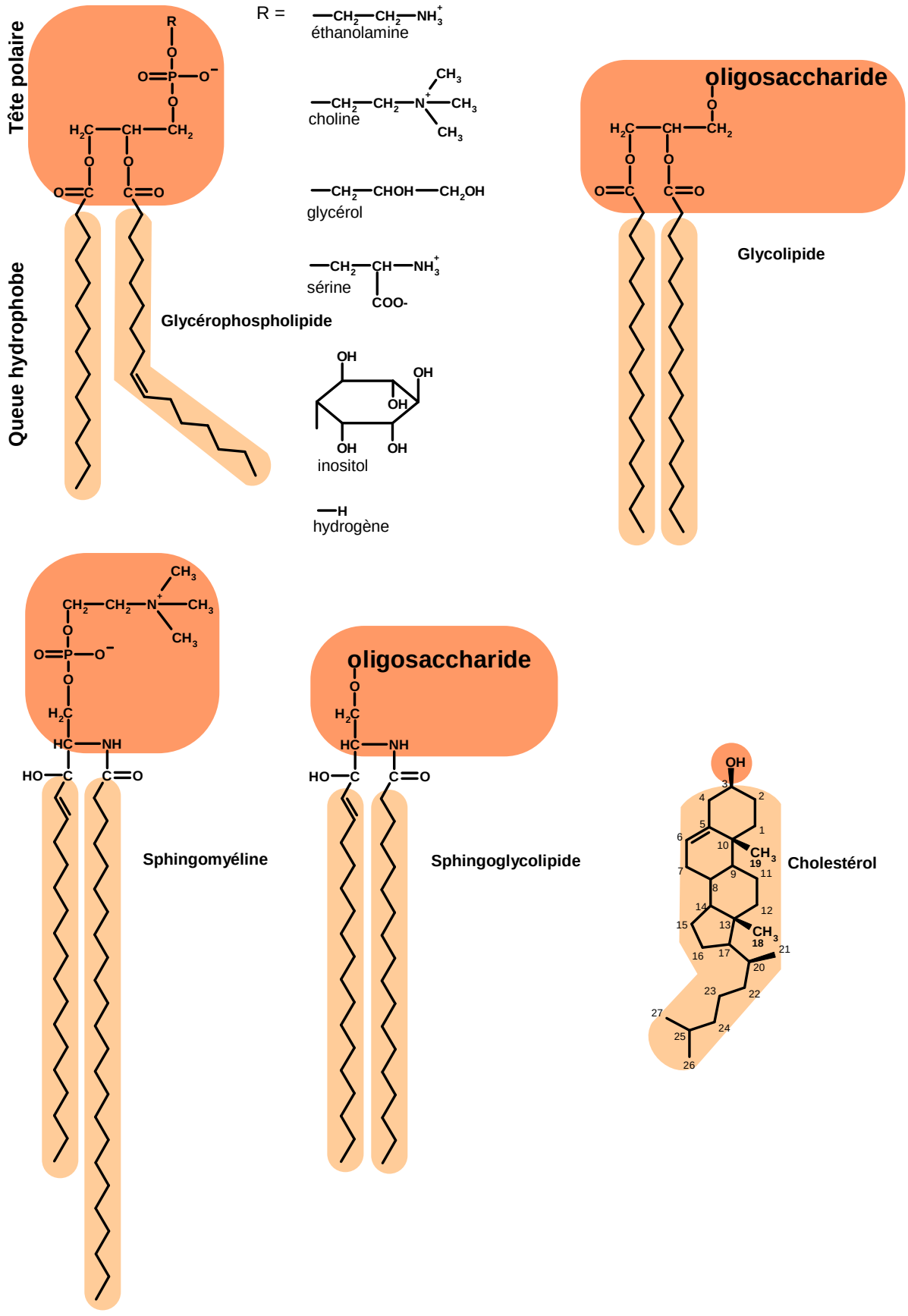


Figure 1.3. Formules développées planes des principaux lipides de la membrane plasmique des cellules eucaryotes.

les plus représentées dans la membrane plasmique, de manière quantitative, sont les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthanolamines (PE). En effet les glycéro-PC et glycéro-PE représentent respectivement 40-50 mol% et 22-26 mol% des phospholipides de la membrane plasmique des cellules endothéliales humaines (Helies-Toussaint et al. 2006), dendritiques humaines ou encore des mastocytes de rat (Laulagnier et al. 2004). On trouve ensuite les phosphatidylsérines (PS), l'acide phosphatidique (PA) et le phosphatidylinositol (PI) comptant ensemble pour 15-20 % des phospholipides de la membrane. Le PI (environ 1 % des lipides membranaires) est également présent sous une forme 4,5-bisphosphate (PIP_2), dont dérivent deux second messagers membranaires : le PI(3,4,5)P3 et le diacylglycérol (DAG). Le premier est issu de l'action d'une protéine kinase, et le second catalysé par une enzyme : la phospholipase C (PLC).

La partie hydrophobe des glycérophospholipides correspond aux deux chaînes d'acides gras, branchées en position 1 et 2 du glycérol via des liaisons ester. Ces chaînes ont une longueur et un nombre de doubles liaisons (insaturations) variables. Plus précisément, les principaux acides gras des phospholipides chez les mammifères sont les C16 et C18 pour les acides gras saturés, et les C18:1, C18:2, et C20:4 pour les acides gras insaturés (Felton et al. 2004). Les acides gras naturels ont toujours un nombre pair de carbones. Les glycérophospholipides contiennent d'autres acides gras poly-insaturés à plus longues chaînes carbonées, dans des proportions plus faibles, mais jouant un rôle important dans les propriétés fonctionnelles des membranes. On utilise une nomenclature simplifiée pour nommer les glycérophospholipides, dont le nom est fonction de la nature de la tête polaire et des caractéristiques des deux chaînes acyles. Par exemple les phosphatidylcholines ont généralement deux chaînes acyles de longueur comparable de 16 ou 18 carbones, avec celle en position 1 souvent saturée tandis que l'autre peut comporter plusieurs doubles liaisons en configuration *cis*. C'est le cas du 1-Palmitoyl-2-Oléoyl-*sn*-Glycéro-3-PhosphatidylCholine (C16:0,18:1 PC ou POPC) qui est le GPL majoritaire de la membrane plasmique dans la plupart des types cellulaires. De leur coté les glycérophospholipides à tête PE, PS ou PI présentent davantage d'insaturations sur une ou deux chaînes (majoritairement entre les carbones 9 et 10). Les glycérophosphoinositides (GPL à tête PI) sont tous estérifiés en position 2 par un acide arachidonique (C20:4) et en position 3 par un stéarate (C18). Ainsi, de part les volumes respectifs occupés par la tête polaire et par les deux chaînes acyles

(volume plus grand avec la présence de doubles liaisons *cis*), les glycéro-PC, glycéro-PI et glycéro-PS de la membrane plasmique ont le plus souvent une géométrie cylindrique ; les glycéro-PE et les glycéro-PA ayant eux une géométrie conique.

Les **sphingolipides** (fig. 1.3) ont une base lipidique commune, appelée céramide, constituée d'une longue chaîne amino-alcool (2-amino-1,3-dihydroxy-octadec-4-ène dont le nom trivial est sphingosine) connectée à un acide gras par une liaison amide. Comme nomenclature simplifiée, on utilise généralement la notation dXX:n,XX:n pour définir les longueurs (XX)/nombre de doubles liaisons (n) des chaînes acyles du céramide (en premier la sphingosine, puis l'acide gras) (Valsecchi et al. 2007). Dans les cellules du cervelet de rat, les sphingolipides représentent seulement entre 5 et 10 % en mole de la totalité des phospholipides (Sonnino et al. 2007). La particularité de cette classe de lipides et de posséder à la fois un groupement hydroxyle et amide qui peuvent être donneur aussi bien qu'accepteur de liaisons hydrogène, et un groupement carboxyle (comme tous les glycérophospholipides) qui peut être accepteur de liaisons hydrogène (Barenholz et Thompson 1999). Dans les fibroblastes humains, on trouve majoritairement des sphingolipides à céramides en d18:1,16:0 puis en d18:1,24 :0 ou d18:1,24:1 avec une double liaison en configuration *cis*, ce qui en fait les lipides les plus longs (Valsecchi et al. 2007). Dans les cellules de mammifères, la tête polaire peut être une phosphatidylcholine, on parle alors de la sphingomyéline. La sphingomyéline représente jusqu'à 9 mol% des phospholipides de la membrane des cellules du système nerveux central : c'est le cas chez l'homme au niveau des cellules dendritiques (Laulagnier et al. 2004). Les sphingomyélines ont dans la majorité des cas une géométrie conique inversée. La tête polaire peut également être un saccharide (cas des cérébrosides) ou un oligosaccharide (cas des gangliosides). La chaîne oligosaccharidique varie en fonction de la nature, de l'ordre d'enchaînement et du degré de ramification des différents sucres entre eux. Ainsi les sphingolipides ont une tête polaire bien plus volumineuse que la partie hydrophobe, ce qui leur confère une géométrie conique.

Les **glycérolipides** (fig. 1.3) représentent une autre classe de composés fortement amphiphiles dérivant du glycérol, estérifié en position 1 et 2 par un acide gras et connecté, par une liaison osidique en position 3, à un oligosaccharide au lieu d'un phosphate. Bien que très abondants chez les espèces photosynthétiques comme les algues et les plantes (cas de la membrane du thylacoïde des

chloroplastes), on trouve plus rarement ces composés dans le règne animal où ils peuvent ne représenter que 2 mol% des lipides membranaires. Ils sont néanmoins impliqués dans des processus importants pour la cellule, telle la reconnaissance cellulaire. Enfin, de part la grande taille de leur tête polaire oligosaccharidique, ces composés adoptent une géométrie conique.

Le **cholestérol** (fig. 1.3) fait partie de la famille des stérols, des molécules principalement synthétisées au niveau du foie par les cellules hépatiques et au niveau de l'intestin par les entérocytes. Les autres cellules de l'organisme s'approvisionnent en cholestérol via les lipoprotéines (LDL) de la circulation sanguine. Cependant il est l'unique stérol présent dans la membrane plasmique des cellules de mammifères. Il comprend quatre cycles carbonés avec un groupement hydroxyle sur le carbone 3, une chaîne aliphatique (6-méthylheptan-2-yl) sur le carbone 17 et deux groupements méthyles sur les carbones 10 et 13. Ces quatre substitutions sur le tétracycle rigide plan (cycles en configuration *trans*) sont liées en avant du plan de la figure 1.2, soit vers la face β du cholestérol. Le cholestérol possède 8 carbones asymétriques, ce qui fait 2^8 soit 256 stéréo-isomères dont un seul existe dans la nature: le 3β-ol lévogyre. La tête polaire (l'hydroxyle) a une taille réduite par rapport au reste de la molécule, entièrement hydrophobe, ce qui est néanmoins suffisant pour qu'il s'insère dans les membranes : le long axe de la molécule est perpendiculaire au plan de la membrane avec l'hydroxyle orienté vers le milieu aqueux (Yeagle 1985). Le cholestérol a ainsi une forme conique (fig. 1.2). Cependant il est quasiment insoluble dans l'eau et forme des agrégats plutôt que des bicouches ou encore des micelles. Dans les cellules, l'accumulation du cholestérol exogène et la synthèse du cholestérol *de novo* sont étroitement régulées pour assurer une certaine constance (homéostasie) de la teneur en cholestérol membranaire. Dans la plupart des types cellulaires, comme les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), plus de 90% du cholestérol se trouve dans la membrane plasmique (Lange et Ramos 1983) et il représente respectivement 18 mol% et 45 mol% des phospholipides membranaires dans les érythrocytes humains (Yeagle 1985) et les mastocytes de rat (Laulagnier et al. 2004). Toujours chez le rat, le rapport molaire du cholestérol aux phospholipides de la membrane plasmique des hépatocytes est proche de 0,5 (Kremmer et al. 1976).

Le cholestérol sera présenté ici uniquement en temps que composé structural de la membrane plasmique mais il faut savoir qu'il est également le précurseur de nombreuses molécules dont la

vitamine D3 qui intervient dans la calcification des os, les hormones stéroïdes (cortisol, cortisone et aldostérone), les hormones sexuelles (progestérone, œstrogène et testostérone) et les acides biliaires qui interviennent dans la digestion des aliments. Le transport du cholestérol entre les tissus se fait via des lipoprotéines au niveau de la circulation sanguine ; il peut parfois s'accumuler sur les parois des vaisseaux sanguins et former des plaques d'athérome, sources d'accidents cardiovasculaires. Enfin le cholestérol est un élément indispensable au bon fonctionnement de la protéine Sonic Hedgehog, impliquée dans la mise en place de la polarité du système nerveux central lors de l'embryogénèse. Par exemple, une carence sévère en cholestérol aux stades précoces du développement provoque une holoprosencéphalie : c'est à dire la cyclopie (Wolf 1999).

1.1.2 Les propriétés physico-chimiques des biomembranes

Les considérations théoriques et expérimentales de la physico-chimie des lipides en milieux modèles suggèrent que ces derniers, de part leur température de transition, leur géométrie, la nature de leur tête polaire (notamment leur charge), leur capacité à donner/accepter les liaisons hydrogène au niveau de l'interface lipide-eau, ou encore la conformation de leurs chaînes acyles, peuvent générer une organisation latérale particulière de la membrane. En effet la miscibilité relative des lipides les uns par rapport aux autres est à l'origine de la formation de domaines membranaires, via des ségrégations latérales de phase. L'étude des mécanismes à l'origine de la genèse de ces domaines membranaires permet de mieux comprendre l'organisation de la membrane plasmique et l'influence des propriétés physiques des domaines lipidiques sur ses différentes fonctions.

Une des approches possibles dans la compréhension de ces phénomènes est la mesure des variations des propriétés physiques de la membrane lipidique, ou d'une partie de la membrane, en fonction de sa composition en lipides (études sur des membranes lipidiques modèles) ou lors de la réalisation d'une fonction biologique particulière, telle la fixation d'un ligand sur son récepteur (études sur des protéo-liposomes). Ainsi les modèles simplifiés, construits à partir de lipides de synthèse ou extraits des membranes cellulaires, ont été extrêmement étudiés dans le but de comprendre les interactions qui régissent ces structures.

En phase aqueuse, les lipides ont une tendance naturelle à adopter plusieurs types de phases et cette propriété est appelée le polymorphisme lipidique. Ce chapitre concerne plus particulièrement les propriétés des membranes modèles en phase lamellaire, reflétant le mieux l'organisation globale des lipides dans les membranes naturelles.

Les méthodes employées dans la mesure des paramètres physico-chimiques des membranes ou des lipides font principalement appel à la spectroscopie de fluorescence (mode stationnaire, durée de vie et polarisation de fluorescence), à la résonance magnétique nucléaire (RMN), à la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et aux études d'isothermes de compression, permettant ainsi d'appréhender les propriétés collectives des lipides d'une membrane ou leur comportement dans les monocouches. Récemment, l'évolution de l'outil informatique a permis d'étudier les interactions lipidiques au sein d'une bicouche lipidique par des modélisations moléculaires de plus en plus poussées.

1.1.2.1 Propriétés de phase

Les lipides sont caractérisés par leur faible solubilité dans l'eau (hydrophobicité), due principalement au fait qu'ils ne forment pas de liaisons hydrogène avec ce solvant. Les espèces lipidiques extraites des membranes cellulaires sont amphiphiles et sont connues pour former des phases cristallines liquides lorsqu'elles sont suspendues dans l'eau. Ces mélanges lipidiques s'assemblent pour former ce qu'on appelle des phases lamellaires, correspondant à des superpositions de bicouches lipidiques séparées par des couches d'eau. En effet leurs têtes polaires peuvent échanger des liaisons hydrogènes avec le milieu aqueux (hydratation), alors que les parties hydrophobes vont s'organiser de manière à minimiser au maximum le contact avec l'eau : c'est l'effet hydrophobe (Mouritsen 2005). Évidemment, ces structures en bicouches ne peuvent être ouvertes aux extrémités, mais se referment sur elles-mêmes pour former des vésicules uni- ou multilamellaires. Au sein d'une membrane, une espèce lipidique donnée peut adopter collectivement une conformation particulière, dépendante principalement de sa nature et de la température. La conformation d'un lipide, tels que les glycérophospholipides, glycolipides et sphingolipides, fait référence aux arrangements spatiaux des

atomes de la molécule dans la bicouche, notamment au niveau des atomes de carbones des chaînes acyles. La conformation de plus faible énergie aboutie à des organisations très ordonnées des lipides, pour lesquels toutes les liaisons C-C des chaînes acyles sont en conformation *trans* (all-*trans*). On parle alors de phase gel, lβ ou solide-ordonnée (so). En augmentant la température du système on induit de plus en plus de mouvements de rotation autour des liaisons C-C pour aboutir à des conformations désordonnées des chaînes acyles (augmentation de la probabilité d'isomérisation *trans*->gauche) ; on parle alors de phase fluide ou liquide désordonnée (ld ou lα) (fig. 1.4). La température à laquelle une bicouche lipidique va passer d'un état ordonné à un état désordonné (et réciproquement) est appelée température de transition de phase (*Tm*). La transition de phase (transition du premier ordre) est un phénomène mettant en jeu les propriétés collectives (ou coopératives) de l'ensemble des lipides de la membrane. Ainsi, plus les lipides sont nombreux à changer de conformation en même temps et plus la transition de phase est nette. Deux caractéristiques principales ont une influence sur la température de transition d'une espèce lipidique: la longueur des chaînes acyles et le nombre de

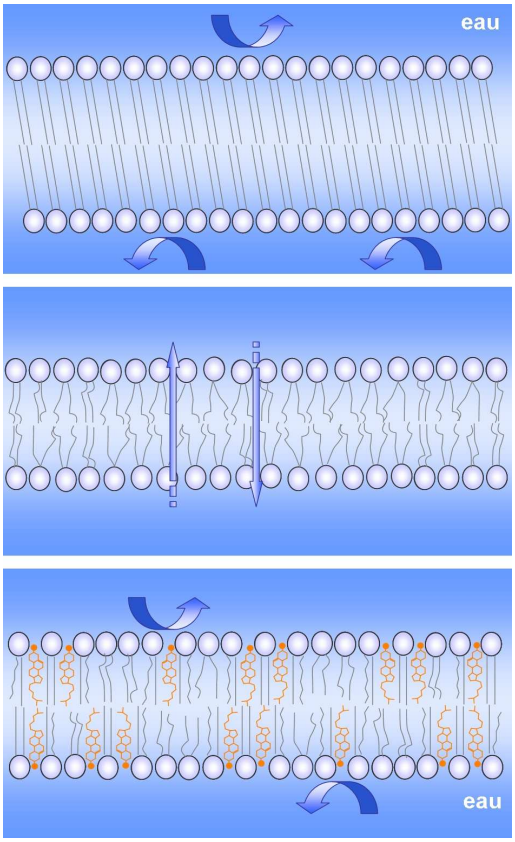


Figure 1.4. États de phase lipidique des biomembranes. L'organisation des chaînes acyles des phospholipides conditionne l'état de phase de la membrane. Les flèches représentent les mouvements d'eau possibles.

doubles liaisons qu'elles portent. On comprend aisément qu'il faut apporter d'autant plus d'énergie à la membrane pour initier les mouvements de rotation C-C qu'il y a de ces liaisons. Par conséquent plus les chaînes hydrocarbonées sont longues et plus la température de transition est élevée. Par exemple les membranes de DMPC (diC14 :0-PC) transitent autour de 23°C alors que celles composées de DPPC (diC16 :0-PC) transitent vers 41.5°C. Les doubles liaisons en conformation *trans* augmentent la température de transition de phase (effet d'ordre) (London et Brown 2000) alors que les doubles liaisons en conformation *cis*, plus présentes dans le monde du vivant, vont diminuer drastiquement cette température. Le DOPC (C18:1;C18:1), qui a une double liaison en configuration *cis* sur chacune des chaînes acyles entre les carbones 9 et 10, a une température de transition autour de -20°C (contre 55°C pour le DSPC en C18:0).

Les méthodes pour déterminer cette température de transition sont diverses. Les mesures de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) permettent avec une excellente sensibilité de mesurer la transition de phase gel-fluide de suspension de vésicules lipidiques lamellaires. En effet, le passage des conformations ordonnées des chaînes acyles à des conformations désordonnées s'apparente à une fusion et est un processus endothermique. Le principe de la DSC est donc d'apporter la chaleur nécessaire aux lipides pour que les membranes passent de l'état gel à l'état fluide et de mesurer l'écart de température entre cette chaleur et celle du système. On détecte ainsi un pic de chaleur plus ou moins large au niveau de la température de transition de phase (*cf.* chapitre 3.2.1.1 pour plus de détail).

La RMN du deutérium est aussi largement utilisée pour mesurer l'ordre des chaînes acyles (et donc l'état de phase) à partir des éclatements quadrupolaires des spectres RMN (Vist et Davis 1990). Cependant cette technique nécessite l'utilisation de phospholipides deutérés (*cf.* chapitre 3.2.1.2).

L'utilisation de la polarisation de fluorescence permet aussi de mesurer efficacement la fluidité des membranes et donc d'appréhender cette transition de phase gel-fluide. Cette technique fait appel à l'anisotropie de fluorescence, dont la mesure indique le degré de liberté d'une molécule fluorescente au sein de la membrane (c'est à dire la facilité avec laquelle la molécule tourne sur elle-même). Pour mesurer cette anisotropie, on excite les fluorophores (incorporés dans la bicouche lipidique ou liés à un lipide) avec une lumière polarisée. Les fluorophores, dont le moment de transition est orienté le long du vecteur électrique de la lumière incidente, vont être excités et émettre des photons

(fluorescence). Si les fluorophores sont immobiles, les photons seront émis dans le même plan que la lumière excitatrice ; en revanche si l'orientation des fluorophores est modifiée avant l'émission des photons, la fluorescence se fera selon un axe différent (on parle de dépolarisation). Ainsi dans une phase gel, où les mouvements rotationnels des molécules sont très limités, on mesure un taux de polarisation plus élevé que dans une phase fluide. Le 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene et ses dérivés sont les sondes fluorescentes les plus utilisées dans la détermination de la fluidité membranaire, aussi bien en milieu modèle que dans la membrane plasmique (Barrow et Lentz 1985; Parente et Lentz 1985; Beck et al. 1993).

Les sondes lipidiques à fluorophore pyrène ont également été utilisées dans la détection de la transition de phase gel-fluide de membranes phospholipidiques. L'apparition d'excimères (dimères à l'état excité qui ont une signature spectrale spécifique) est en effet représentative de la dynamique latérale du cœur de la membrane sous certaines conditions. Galla et Hartmann ont ainsi déterminé la température de transition du DPPC grâce à une sonde lécithine-pyrène (Galla et Hartmann 1980).

Enfin, les techniques faisant appel à la diffraction des rayons X, à la diffraction des neutrons aux petits angles (ou SANS pour Small Angle Neutron Scattering) ou encore à la microscopie à force atomique (AFM) apportent généralement les données structurelles les plus fines sur l'architecture des membranes lipidiques.

Ces approches sont bien sûr transposables à des membranes composées de mélanges de différentes espèces lipidiques, bien que dans ce cas la notion de phase telle qu'elle est définie (propriété collective des lipides) soit inappropriée. En effet, si les lipides d'une membrane donnée ont des températures de transition intrinsèques différentes, alors il y aura des transitions différentielles au sein de la membrane, provoquant des hétérogénéités (coexistence de domaines de phase différente). De la même manière les interactions spécifiques entre deux espèces de lipides auront une influence sur la transition. Ces phénomènes provoquent ainsi ce qu'on appelle une ségrégation latérale de phase.

La longueur moyenne des chaînes acyles des phospholipides détermine l'épaisseur hydrophobe de la membrane. Quand une membrane passe de l'état gel à l'état fluide, le volume des phospholipides augmente (Almeida et al. 1992; Greenwood et al. 2006). Par exemple chaque lipide d'une membrane de DPPC en phase gel (25°C) occupe un volume d'environ 0.94 ml/g, qui passe à 1.01 ml/g en phase

fluide (50°C). Cette augmentation est la conséquence du plus grand espace occupé par les chaînes acyles dans le plan de la membrane. Corollairement la longueur apparente de ses chaînes désordonnées est plus courte, ce qui fait que l'épaisseur hydrophobe d'une bicouche en phase fluide est plus faible qu'en phase gel. Des travaux menés par SANS ont montré que l'épaisseur membranaire de liposomes de DMPC de 100 nm de diamètre, passe de 49.6 Å en phase lβ (10°C) à 45.7 Å en phase ld (30°C) (Kiselev et al. 2006). L'analyse des profils de densité électronique de liposomes de DPPC (acquis en diffraction de rayons X) aboutie à la même observation, avec une diminution d'environ 5 Å entre les phases lβ et ld mesurés respectivement à 24°C et 50°C. Cette diminution correspond à une diminution de l'épaisseur hydrophobe de 34.46 Å à 29.86 Å (Nagle et al. 1996). Des mesures sur des bicouches de DPPC en AFM montrent une diminution de l'épaisseur de la membrane de 6 Å entre 22°C et 52°C (Leonenko et al. 2004).

Au sein d'une membrane en phase gel, outre les diffusions rotationnelle et conformationnelle, la diffusion latérale est également restreinte. Dans une membrane supportée de DMPC, le coefficient de diffusion de GM1 (couplé au fluorophore Bodipy-FL) mesuré en FCS, est de l'ordre 0.8±0.1 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$ à 20°C (lβ) et de 3.9±0.1 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$ à 30°C (ld) (Forstner et al. 2006). Par une approche de FRAP avec du DPPE-NBD incorporé dans des liposomes multilamellaires de DPPC en phase ld (50°C), Vaz et al. mesurent des coefficients de diffusion latérale d'environ 12 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$ (Vaz et al. 1985). Dans les mêmes conditions et avec la même sonde, Pucadyil et al. ont mesuré un coefficient de diffusion latérale de 0.02 $\mu m^2/s$ en phase lβ (23°C) (Pucadyil et al. 2007), mettant en évidence l'influence drastique du changement de phase sur la diffusion des lipides. L'augmentation de la température au-delà de *Tm* au sein d'une phase fluide a comme conséquence d'augmenter le coefficient de diffusion.

D'une manière générale, l'évolution a fait que plus les chaînes hydrocarbonées sont longues et plus elles comportent de doubles liaisons, ce qui tend à favoriser une membrane en phase fluide dans une gamme de températures autour de la température physiologique. Malgré la grande diversité des espèces lipidiques qui forment la membrane plasmique, offrant des possibilités de ségrégations latérales de phase (gel par rapport à fluide), il est peu probable que des domaines en phase gel existent, du fait de leur manque de « pertinence » physiologique. Tout d'abord parce que de tels domaines

tendent à exclure les protéines ; que les bicouches lipidiques contenant à la fois des domaines gel et fluide sont perméables aux petites molécules ; que la diffusion latérale dans les phases gels est très lente et enfin parce que la présence d'une grande quantité de cholestérol dans la membrane inhibe probablement la transition gel-fluide (*cf.* chapitre 1.2.2) (London et Brown 2000; Nishimura et al. 2006). D'ailleurs, des mesures de fluorescence utilisant le Laurdan (la sonde fluorescente 6-lauroyl-dimethylaminonaphtalene) incorporé dans la membrane plasmique de sept lignées cellulaires différentes, semblent confirmer que toute la membrane se trouve dans un état de phase fluide à la température physiologique (37°C) (Parasassi et al. 1993).

1.1.2.2 Influence du cholestérol sur l'état de phase de la membrane

Le cholestérol est connu depuis longtemps pour interagir de manière spécifique avec les phospholipides de la bicouche lipidique. De nombreuses études portent sur l'effet du cholestérol sur les mouvements rotationnel et translationnel des phospholipides, sur la conformation de leurs chaînes acyles (effet d'ordre) et sur la transition de phase gel-fluide. Le cholestérol est miscible aussi bien dans les phases gels que dans les phases fluides, cependant il tend à fluidifier la première et à rigidifier la seconde (Sparr et al. 2002). Certaines membranes lipidiques fortement enrichies en cholestérol forment une phase fluide aux propriétés physiques particulières : la phase lo, pour liquide-ordonnée (fig. 1.4) (Ipsen et al. 1987). Ce phénomène est la conséquence d'une augmentation de l'ordre des chaînes acyles des phospholipides par le cholestérol et peut-être expliqué par une formation de complexes entre le cholestérol et les phospholipides, appelés complexes condensés. Ces complexes seraient alors moins miscibles dans la phase ld (McConnell et Radhakrishnan 2003; McConnell 2005; Zhang et al. 2007). Pour des concentrations

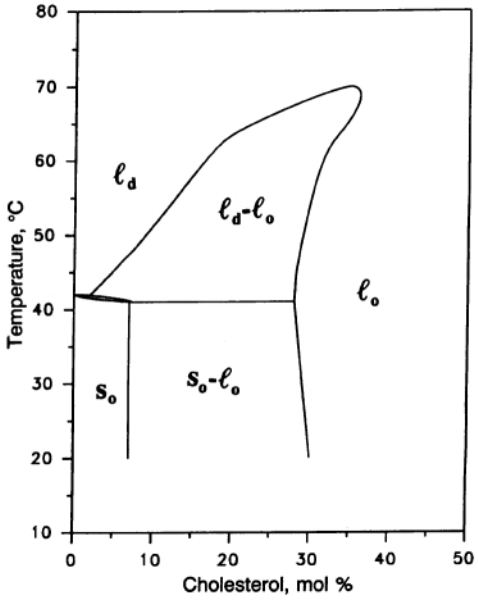


Figure 1.5. Diagramme de phase du DPPC en fonction de la quantité de cholestérol et de la température déterminé à partir de données de DSC, RMN ^2H, diffraction des rayons X et de modélisations moléculaires (d'après Sankaram et Thompson, 1991).

plus faibles en cholestérol, cette phase lo peut même coexister avec une phase désordonnée : on parle d'immiscibilité liquide-liquide « ld-lo ».

Par des mesures de DSC, couplées aux données acquises par RMN-^{2}H sur des liposomes multilamellaires, Vist et Davis ont construit le diagramme de phase de DPPC en fonction de la concentration en cholestérol et de la température (Vist et Davis 1990). La figure 1.5 illustre ces comportements de phase pour des suspensions multilamellaires de DPPC (Sankaram et Thompson 1991). Pour les faibles concentrations en cholestérol (<7 mol%) on distingue la transition so-ld, avec une coexistence de ces deux phases autour de 41.2°C. Entre 7 et 22 mol% on observe également des co-existences de phases so-lo et ld-lo, suivant que l'on se place au-dessous ou au-dessus de la température de transition de phase gel-fluide (environ 1 degré inférieur à *Tm*). Enfin une phase aux propriétés entièrement lo est atteinte pour une concentration autour de 25 mol% de cholestérol, quelle que soit la température. Une étude de microcalorimétrie a révélé la présence d'immiscibilité lo-ld à des concentrations en cholestérol inférieures à 5 mol% (McMullen et McElhaney 1995).

Les effets du cholestérol sur la transition de phase des membranes phospholipidiques (principalement les PCs) sont aujourd'hui bien décrits, mais il subsiste encore des incertitudes sur les interactions moléculaires cholestérol-phospholipides au niveau des phases lo. Les plus grandes contributions sont probablement les forces de van der Waals et les forces hydrophobes (Ohvo-Rekila et al. 2002). Des études comparatives sur différents stérols ont permis de comprendre que la structure du cholestérol lui permettait de s'insérer dans une membrane de façon quasi-parallèle à la normale de la bicouche. La configuration pour laquelle les interactions de la partie hydrophobe du cholestérol avec les lipides et l'hydratation du groupement hydroxyle sont les plus favorables correspond à un angle de tilt d'environ 20° (angle par rapport à la normale de la bicouche) (Murari et al. 1986; Rog et Pasenkiewicz-Gierula 2001a; Smondyrev et Berkowitz 2001; Aittoniemi et al. 2006). Ainsi, de part sa structure, le cholestérol est le stérol qui favorise le plus les conformations ordonnées des chaînes acyles saturées des phospholipides et de la sphingomyéline, en diminuant la probabilité d'isomérisation *trans*-gauche des liaisons C-C (Schuler et al. 1991; Barenholz 2002). Cet effet de condensation des chaînes acyles (réduction du désordre) se ferait par la face α du tétracycle du cholestérol (McMullen 1996), la chaîne carbonée en position 17 du cholestérol étant probablement

trop flexible pour avoir un grand pouvoir de condensation (Yeagle 1985). L'effet de condensation est évidement moins prononcé dans les phases gels où les liaisons C-C sont déjà principalement all-*trans*. L'augmentation de l'ordre des chaînes acyles entre une phase fluide et une phase lo peut être mise en évidence par des mesures en RMN-^{2}H, grâce au calcul du paramètre d'ordre (S_{mol}). Brièvement, S_{mol} est représentatif de l'angle moyen que font les liaisons C-C des chaînes acyles par rapport à la normale de la bicouche. Ainsi, en exprimant S_{mol} en fonction de la position de la deutération le long des chaînes acyles des phospholipides (à partir des éclatements quadrupolaires des spectres RMN) on obtient une information sur la conformation (taux d'ordre) de ces chaînes. En phase fluide, l'ordre des chaînes du DMPC, du DPPC et du DSPC (diC18:0-PC) est deux fois plus important quand la bicouche contient 50 mol% de cholestérol. Cet effet est plus prononcé entre les carbones 3 et 10 des chaînes d'acides gras (Sankaram et Thompson 1990).

L'amplitude de l'interaction du cholestérol avec les phospholipides est spécifique des lipides considérés. Tout d'abord, la différence de longueur hydrophobe entre le cholestérol et les phospholipides hôtes (mésappariement hydrophobe) affecte largement leurs interactions. L'étude de McMullen et McElhaney a ainsi montré que le cholestérol diminue le *Tm* de bicouches de PC ayant des chaînes saturées en C18 ou plus, mais augmente le *Tm* avec des PC ayant des chaînes saturées en C16 ou moins. Les auteurs en ont déduit que le cholestérol a une longueur hydrophobe correspondant à une chaîne saturée de 17 carbones, et qu'il interagit préférentiellement avec les phospholipides de même longueur. Sugahara et al. ont développé une méthode intéressante pour mettre en évidence ces observations : ils ont synthétisé deux phospholipides de longueurs de chaîne différentes (DPPC et DSPC) et un cholestérol ayant chacun un motif thiolate-disulfide au niveau de la tête polaire. Ainsi, après avoir constitué des liposomes de composition variable, ils ont ponté ces motifs par une réaction chimique de manière covalente afin de former des dimères. L'analyse par HPLC des lipides ainsi formés a montré une plus grande formation de dimères cholestérol-DSPC à partir de 24 mol% de cholestérol dans la membrane (Sugahara et al. 2002). D'autres approches montrent une plus grande affinité du cholestérol pour le DPPC que pour le DLPC (diC12-PC) dans des mélanges ternaires DPPC/DLPC/cholestérol (Silvius et al. 1996; Feigenson et Buboltz 2001).

L'interaction cholestérol/phospholipide dépend aussi très largement des interactions entre le cœur

stéroïde et les chaînes acyles, largement défavorisées par les chaînes acyles insaturés. En effet, la présence d'insaturations en configuration *cis* limite l'attraction des forces de van der Waals avec le cholestérol. Il en résulte un effet de condensation par le cholestérol d'autant plus faible que les phospholipides sont insaturés, comme le montrent les résultats comparatifs en RMN ^{1}H-^{13}C de bicouches de DPPC, POPC (C16:0;C18:1-PC) et DOPC (Warschawski et Devaux 2005b, a). De même, il a été établi que la fonction de distribution des orientations des sondes DPH dans la bicouche est liée à la probabilité d'isomérisations *trans*-gauches des liaisons C-C. Ainsi, dans des mélanges phospholipides/cholestérol, un plus faible effet de condensation par le cholestérol sur des PLs insaturés a été rapporté (Straume et Litman 1987; Mitchell et Litman 1998). Une invariance des volumes du POPC et du DOPC en fonction de la concentration en cholestérol dans la membrane a d'ailleurs été constatée (Greenwood et al. 2006), ainsi qu'une plus faible condensation des chaînes acyles du POPC par rapport à celles du DPPC (Worthman et al. 1997). La diminution de l'effet de condensation montre que le cholestérol est moins miscible dans les bicouches phospholipidiques aux chaînes insaturées, ce qui induit une ségrégation latérale du cholestérol (Pasenkiewicz-Gierula et al. 1991) et une plus faible miscibilité (Brzustowicz et al. 2002).

Les interactions cholestérol-phospholipides sont aussi affectées par la nature de la tête polaire, avec les interactions les moins favorables rapportées dans les membranes composées de phospholipides à tête PE (Ohvo-Rekila et al. 2002).

Les diagrammes de phase des mélanges binaires phospholipides/cholestérol ou sphingomyéline/cholestérol sont relativement similaires. En milieu modèle, la cinétique de transfert du cholestérol entre des vésicules lipidiques est beaucoup plus affectée par la présence de sphingomyéline que de PC (Barenholz et Thompson 1999) suggérant une plus grande affinité du cholestérol pour la sphingomyéline que pour les phosphatidylcholines ayant des chaînes acyles relativement similaires. Ces données sont consistantes avec les résultats obtenus par des expériences de polarisation de fluorescence et de FRET sur des mélanges lipidiques ternaires SM/cholestérol/POPC (1:1:1) révélant une ségrégation latérale de phase à température ambiante, avec d'une part un domaine SM/cholestérol et d'autre part un domaine POPC (de Almeida et al. 2003; Frazier et al. 2007). Il est possible que la structure particulière de ces lipides favorise leur interaction avec le cholestérol : tout d'abord, le

groupement 3β-hydroxyle du cholestérol positionné au niveau de l'interface lipide-eau peut former une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle du groupement amide de la sphingomyéline (Sankaram et Thompson 1990) ; ensuite les chaînes acyles saturées de la sphingomyéline favorisent les interactions de van der Waals avec le cœur stéroïde plan et rigide du cholestérol (Epand et Epand 2004). De plus, Smaby et al. ont montré par des mesures d'aires moléculaires dans des monocouches que le cholestérol condensait les chaînes acyles saturées de la SM autant que celles des PCs (Smaby et al. 1994). Cependant la nature de cette interaction reste controversée et certains auteurs ont proposé que le mésappariement hydrophobe entre les constituants lipidiques de la membrane était une force suffisante pour induire une co-ségrégation SM/cholestérol dans des membranes phospholipidiques (Holopainen et al. 2004).

1.1.2.3 Propriétés physiques de la phase lo

Un effet corollaire de l'accroissement de l'ordre des chaînes acyles par le cholestérol est l'augmentation de l'épaisseur hydrophobe de la membrane, telle celle observée lors du passage d'une phase fluide à une phase gel. L'épaisseur moyenne d'une phase lo se situe entre celle de la phase gel et de la phase fluide. Une estimation de l'épaisseur hydrophobe du DMPC donne des valeurs de 21.4 Å en phase ld (35°C), 32.5 Å en phase lβ (10°C) et 26.2 Å en phase lo (35°C, 25 mol% de cholestérol) (Sankaram et Thompson 1990). Des mesures de SANS confirment ces observations et montrent une légère différence d'épaisseur (~1.1 Å) entre les bicouches de DMPC contenant 20 mol% et 47 mol % de cholestérol (Pencer et al. 2005).

Par la condensation des chaînes acyles, le cholestérol diminue l'aire de la section transversale des phospholipides. Cette observation est facilement mise en évidence par des mesures d'isothermes de compression sur des monocouches phospholipide/cholestérol ou SM/cholestérol (Weis 1985; Yuan et Johnston 2002; Scheffer et al. 2005; Stottrup et Keller 2006). Par conséquent les phases lo ont une plus grande densité surfacique que les phases ld et on les qualifie de plus rigides (on emploie plus couramment le terme de « packing »). Ceci a été vérifié par une modélisation moléculaire dans un mélange DMPC/cholestérol (3:1) (Rog et Pasenkiewicz-Gierula 2001b). Greenwood et al. ont mesuré

expérimentalement une diminution significative des volumes du DPPC, du DMPC et de la SM entre la phase ld et la phase lo (Greenwood et al. 2006).

Les membranes enrichies en cholestérol se révèlent par conséquent moins perméables aux solutés et aux molécules d'eau elles-mêmes. Erilov et al. ont quantifié par une approche utilisant une sonde paramagnétique, que le nombre de molécules de D_2O qui pénètrent le cœur de la bicouche de DPPC est deux fois moindre lorsqu'elle contient 50 mol% de cholestérol (Erilov et al. 2005). Cette diminution est également vraie pour des liposomes constituées de DMPC et contenant 30 mol% de cholestérol (Milon et al. 1986). Subczynski et al. ont utilisé des acides stéariques contenant un motif nitroxide (sonde paramagnétique) placés à différentes profondeurs dans la bicouche. Ils ont ainsi mesuré les taux de collision de la sonde avec un élément hydrosoluble afin de déterminer la pénétration des molécules d'eau dans la bicouche. Ils ont montré que le cholestérol induisait une augmentation de l'hydrophobicité de la bicouche entre les têtes polaires et les carbones 7 à 9 des chaînes acyles. Cet effet est moindre sur les bicouches de phospholipides insaturés, naturellement moins perméables à l'eau (Subczynski et al. 1994; Subczynski et Kusumi 2003). L'utilisation de sondes fluorescentes dérivées des 3-hydroxyflavones confirme ses résultats (Klymchenko et al. 2004).

La diffusion latérale des lipides au sein de membranes en phase lo et de membranes en phase ld a été mesurée par différentes approches et semble dépendante de la nature des mélanges utilisés et donc de la force des interactions cholestérol/lipides mises en jeu. L'analyse de la diffusion de sondes lipidiques fluorescentes (par des techniques de FRAP ou de FCS) dans des mélanges binaires avec des phospholipides aux chaînes acyles courtes ou insaturées montrent une tendance pour ces lipides à se déplacer 3 à 8 fois plus lentement dans les phases lo que ld. À l'inverse, l'utilisation de phospholipides à haut Tm (par exemple le DSPC, le DPPC et la SM) montre que le coefficient de diffusion augmente légèrement à partir de 30 mol% de cholestérol, avec un effet moins prononcé pour les mélanges cholestérol/sphingomyéline (Bacia et al. 2004; Chiantia et al. 2006; Kahya et Schwille 2006).

En résumé, comparée à une membrane en phase liquide désordonnée, une membrane naturelle (par exemple la membrane plasmique) en phase liquide ordonnée serait enrichie en cholestérol, phospholipides saturés et sphingomyéline et donc plus épaisse, plus rigide (plus grande densité

surfacique des lipides), moins perméable à l'eau et avec une diffusion latérale des constituants moyennement affectée (globalement légèrement ralentie).

1.2 Les protéines membranaires

Bien que les lipides aient principalement un rôle dans la structure de la membrane plasmique, ils assurent quelques fonctions importantes de signalisation (Eyster 2007). Cependant ce sont les protéines qui assurent la quasi-totalité des fonctions de la membrane plasmique. La nature des protéines exprimées à la membrane dépend essentiellement du tissu auquel appartient la cellule et la présence d'une protéine donnée en grande quantité contribue à la spécialisation de la membrane. Le rôle des protéines membranaires est très large : elles vont transmettre vers l'intérieur de la cellule des informations sur le milieu extérieur (protéines réceptrices, canaux…) ; elles vont participer à la courbure ou à la stabilité de la membrane ; elles vont servir de point d'ancrage à des structures extracellulaires ou intracellulaires, tout cela contribuant à la dynamique fonctionnelle des membranes.

Les protéines membranaires sont transcrites dans le noyau puis traduites au niveau du réticulum endoplasmique granuleux (REG) et sont directement insérées dans sa membrane ou liées à un lipide dans le lumen où une disulfide isomérase catalyse l'oxydation des groupes -SH libres portés par les cystéines pour former des ponts disulfures. La plupart des protéines sont alors glycosylées au niveau de l'amine d'une asparagine par une oligosaccharyl transférase. Ces modifications sont utilisées comme un moyen de vérification du bon repliement des protéines afin qu'elles soient exportées dans des vésicules adressées vers le *cis*-Golgi. D'autres maturations des protéines ont alors lieu, notamment des modifications des glycosylations aboutissant à des oligosaccharides composés de mannoses, de N-acétylglucosamines et dans certains cas d'acides sialiques (chargés négativement). Les protéines sont ensuite adressées à la membrane plasmique par des vésicules du trans-Golgi contenant également des lipides néo-synthétisés, permettant un renouvellement de celle-ci.

On peut distinguer deux classes de protéines membranaires selon un critère d'extraction. D'une part les protéines intrinsèques (ou intégrales) qui sont insolubles dans les solvants aqueux et qu'on ne peut extraire que si l'on déstabilise suffisamment la membrane avec des détergents. D'autre part les

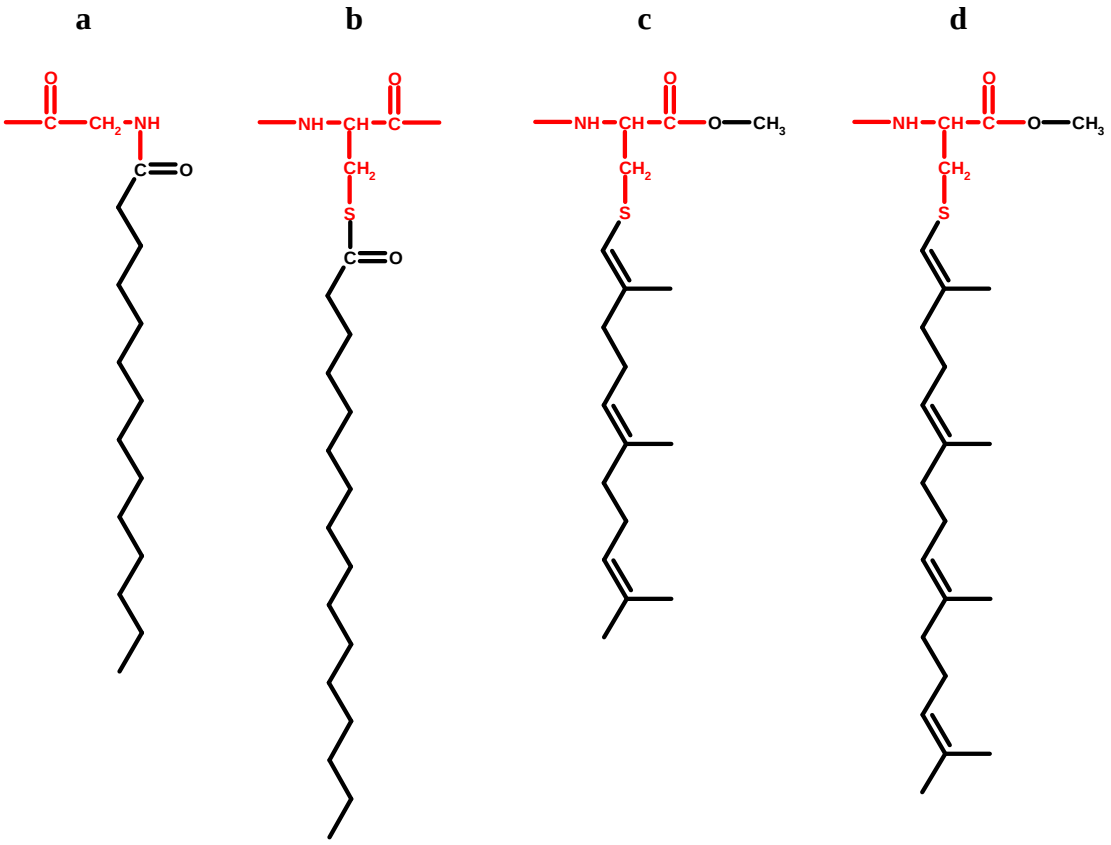


Figure 1.6. Modification des protéines membranaires par des liaisons covalentes à des lipides. La partie acide aminé est en rouge. (a) N-myristoylglycine (C14), (b) S-palmitoylcystéine, (c) S-farnésylcystéine et (d) S-géranylgéranylcystéine.

protéines extrinsèques (ou périphériques), extractibles par des solutions tamponnées acide ou basique si la force ionique est suffisamment élevée.

Les protéines extrinsèques ne pénètrent pas dans la membrane plasmique et peuvent être associées aux lipides de l'un des deux feuillets par des liaisons faibles (force électrostatique, liaison hydrogène). L'amphiphysine par exemple, une protéine assurant sa fonction sous forme de dimère, s'associe aux lipides du feuillet interne chargés négativement via un domaine en hélice α riche en lysine et arginine, des acides aminés chargés, afin d'induire une courbure de la membrane (McMahon et Gallop 2005).

Parmi les protéines intrinsèques, certaines sont liées de manière covalente à des lipides, telles les protéines à ancre GPI : ces protéines sont liées à leur extrémité C-terminale à un glycérophospholipide (ayant un PI comme tête polaire) par un enchaînement de quatre sucres, d'un phosphate et de l'éthanolamine. Un certain nombre de protéines sont également liées à un lipide par une liaison covalente sur un acide aminé (fig. 1.6). Parmi ces modifications post-traductionnelles, on trouve

principalement des branchements par une liaison amide sur une glycine (cas du groupement myristoyl, un acide gras de 14 atomes de carbone) ou par une liaison thio-ether sur une cystéine (cas du groupement palmitoyl (C16) et des groupements isoprényl : farnésyl et géranylgéranyl). Tous ces groupements lipidiques permettent un ancrage de la protéine au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique. Contrairement à la prénylation et la myristoylation qui sont irréversibles, la palmitoylation est un processus dynamique qui implique des cycles de palmitoylation/dépalmitoylation régulés par certaines protéines et permettant ainsi à la protéine cible d'adopter alternativement une forme soluble ou liée à la membrane pour assurer sa fonction. C'est le cas de la protéine Ras qui est à la fois farnésylée et palmitoylée : des cycles de palmitoylation/dépalmitoylation lui permettent de passer d'un ancrage à la membrane plasmique (palmitoylée) à un ancrage dans l'appareil de Golgi (dépalmitoylée) via le cytosol (Rocks et al. 2005).

Les protéines intrinsèques les plus répandues sont les protéines transmembranaires dont l'enchaînement des acides aminés forme des feuillets bêta qui s'auto-organisent en tonneau (dit bêta) ainsi que les protéines dont un ou plusieurs segments traversent la membrane. Ces derniers sont constitués d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes (Isoleucine, Valine, Leucine) organisés en hélices alpha. Cette classe de protéines transmembranaires a de nombreux représentants : tout d'abord les récepteurs comportant une activité enzymatique associée, activable par la liaison du ligand. Cette activité enzymatique, de type tyrosine-phosphorylase, serine/thréonine-phosphorylase ou encore guanylyl cyclase, peut être intrinsèque ou bien directement associée à la protéine réceptrice. Les récepteurs de l'insuline, du facteur de croissance des fibroblastes (EGF) et du facteur de croissance des neurones (NGF) en font partie (Alberts et al. 2002).

Enfin, cette classe de protéines comprend des récepteurs transduisant le signal par l'intermédiaire de partenaires protéiques hétéro-trimériques, les protéines G, et dont l'activation par la liaison d'un agoniste va entraîner la modulation de l'activité de différents effecteurs protéiques secondaires souvent associés à la membrane (*cf.* chapitre 1.1.3.1). Parmi ces effecteurs secondaires on retrouve des enzymes (adénylyl cyclase, GMPc phosphodiestérase, des phospholipases...), des canaux (calcique ou potassique) ou encore des échangeurs ioniques.

1.2.1 Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les RCPGs sont des protéines monomériques transmembranaires de quelques centaines d'acides aminés (300 à 1200 résidus environ) dont la caractéristique majeure est leur organisation en sept régions hydrophobes en hélice α (fig. 1.7) traversant la membrane plasmique. Il existe environ 1500 représentants de cette famille chez les vertébrés (Bockaert et Pin 1999). De nombreuses données biochimiques et immunologiques permettent de préciser le caractère transmembranaire des domaines hydrophobes et d'assigner une orientation à la protéine : l'extrémité amino-terminale est extracellulaire alors que l'extrémité carboxy-terminale est à l'intérieur de la cellule (Spiegel 1996). La longueur des extrémités amino et carboxy-terminales, de même que celle de certaines boucles extra et intracellulaires, varie d'un récepteur à l'autre. Le nombre et la localisation des sites de glycosylations au niveau extracellulaire sont également variables. Parmi la super famille des RCPGs, 90 % sont proches structurellement de la rhodopsine. La rhodopsine est à l'heure actuelle un des seuls RCPGs dont on connaisse la structure 3D, établie au milieu des années 90, avec le récepteur β2-adrénergique (Rosenbaum et al. 2007). Aujourd'hui on dispose de données structurales fines (résolution de 2.8 Å) obtenues à partir de mesures de diffraction des rayons X de cristaux de rhodopsine bovine (Palczewski

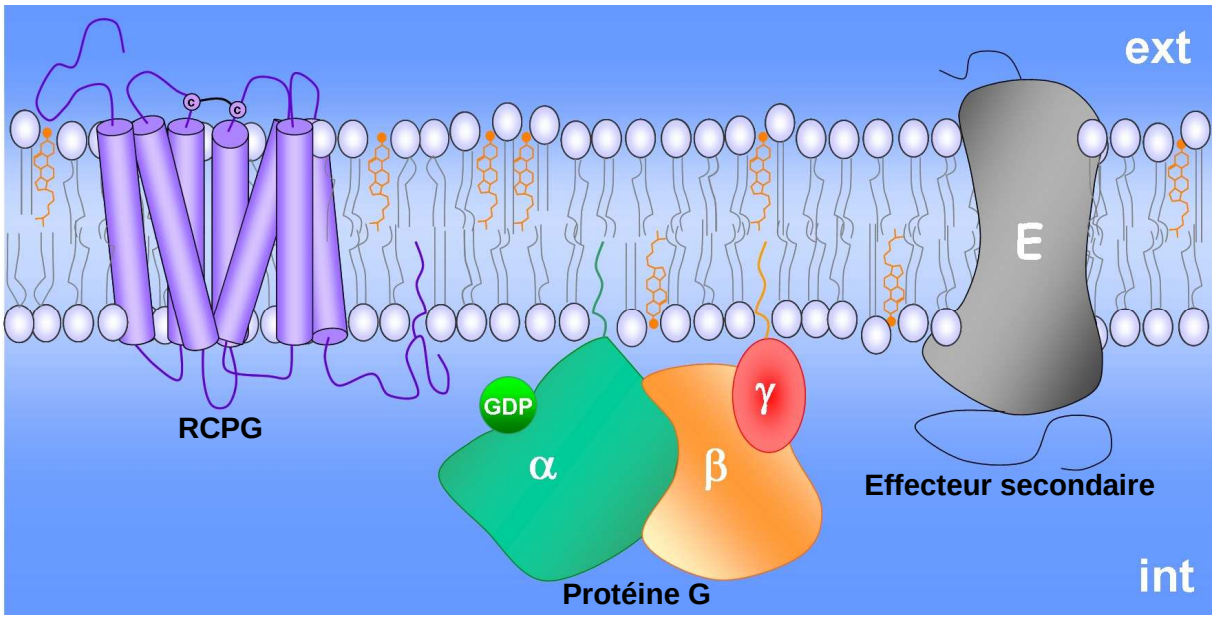


Figure 1.7. Représentation schématique de la membrane plasmique avec un récepteur à 7 segments transmembranaires, les trois sous-unités d'une protéine G et un effecteur secondaire.

et al. 2000). Les régions extracellulaires correspondent aux trois boucles inter-hélices (dont deux sont liées par un pont di-sulfure entre deux cystéines) et à la partie amino-terminale qui est glycosylée. La partie transmembranaire correspond bien entendu aux sept hélices α, n'ayant pas nécessairement la même épaisseur hydrophobe. Au niveau cytoplasmique on trouve trois boucles inter-hélices et la partie carboxy-terminale pouvant porter des palmitoylations permettant un ancrage dans le feuillet interne de la membrane plasmique.

À partir d'une même structure de base à sept domaines transmembranaires, les RCPGs sont capables d'être liés par des molécules de nature très différente. En effet, ces récepteurs reconnaissent des ligands aussi structurellement différents que des ions (Ca^{2+}, Na^{+}…), des amines (adrénaline, dopamine…), des acides aminés (acide glutamique), des nucléotides (adénosine, ATP...), des polypeptides (chimiokines), des glycoprotéines, des molécules odorantes et gustatives, et enfin des photons.

La protéine G est hétérotrimérique et chaque polypeptide provient de gènes distincts. La sous-unité α (~34 kDa) lie le GTP avec une grande affinité et spécificité. Les sous-unités β (~40 kDa) et γ (~7 kDa) sont étroitement associées mais pas de manière covalente. La protéine G est liée au feuillet interne de la membrane plasmique grâce à des modifications lipidiques post-traductionnelles : un groupement prényl est greffé au niveau carboxy-terminal de la sous-unité γ et il y a une palmitoylation (parfois une myristoylation) au niveau amino-terminale de la sous-unité α. Il existe de nombreuses isoformes des sous-unités de la protéine G, permettant une interaction plus ou moins spécifique avec les différents RCPGs et effecteurs secondaires.

Cet ensemble de récepteurs est à l'origine de la régulation de nombreuses fonctions physiologiques bien que leur seule véritable fonction connue soit la catalyse de la séparation du GDP de la sous-unité α de la protéine G au profit de la liaison du GTP. Cela est provoqué par la liaison d'un agoniste au récepteur : le site de liaison de la plupart des RCPGs est situé dans la cavité transmembranaire (délimitée par les hélices α) mais pour certains le site est externe à la membrane et le ligand se fixe aux boucles extra-cellulaires. Ainsi le récepteur va subir un changement de conformation (mouvement d'une boucle, déplacement d'une hélice transmembranaire…) et interagir avec la protéine G au niveau

cytoplasmique (Bockaert et Pin 1999). On peut citer par exemple le déplacement des domaines transmembranaires III et IV du récepteur β2-adrénergique lors de la liaison d'agonistes (Gether et al. 1997). La figure 1.7 schématise les principaux acteurs de cet ensemble fonctionnel dans un état dit "basal" (c'est à dire sans liaison d'un agoniste). L'interaction du RCPG avec la protéine G induit l'échange du GDP en GTP et provoque la séparation des sous-unités α et β/γ. La sous-unité α va alors activer ou inhiber un troisième partenaire protéique : l'effecteur secondaire. Une protéine spécifique (GEF) permet l'échange du GTP par un GDP au niveau de la sous-unité α et régénère ainsi la protéine G. Les effecteurs secondaires sont des protéines très diverses (enzymes, canaux…) et dans la majorité des expérimentations actuelles, ils sont utilisés comme rapporteur de l'activité d'un type de RCPG donné (*cf.* chapitre 1.2).

Ces mécanismes membranaires sont le point de départ d'un nombre incroyable de voies de signalisations cellulaires. L'étape à laquelle je me suis intéressé est l'initiation de ces voies, à savoir le déclenchement de la signalisation cellulaire par la fixation d'un agoniste au niveau de la partie extracellulaire d'un RCPG.

1.3 Les interactions lipide-protéine

Les interactions lipides-protéines de la membrane plasmique jouent un rôle clé dans la réalisation de ses fonctions puisque la composition lipidique de la membrane autour d'une protéine doit être telle qu'elle supporte au mieux le fonctionnement optimal de cette protéine. En effet les lipides peuvent s'assimiler à un solvant en deux dimensions pour les protéines membranaires et on les distingue en trois populations : les lipides qui entourent la protéine (lipides annulaires), ceux qui sont généralement entre des hélices α intra- ou inter-protéique (lipides non-annulaires) et ceux qui composent le reste de la membrane. Les interactions des phospholipides avec les protéines se font à différents niveaux. Les données de modélisation moléculaire montrent que les chaînes acyles peuvent avoir des interactions de type van der Waals avec certains acides aminés et que l'oxygène non estérifié du phosphate peut engager une liaison hydrogène avec le groupement amino-terminale (Damodaran et al. 1995). D'autre

part, la nature de la tête polaire des phospholipides a une influence sur son taux d'hydratation et donc son interaction avec la protéine. Par exemple les PCs sont davantage hydratées que les PEs, et ces derniers procurent un environnement beaucoup plus favorable à l'activation de la rhodopsine (Lee 2004). Cette protéine serait également en interaction directe avec les molécules de cholestérol (Albert et al. 1996).

1.3.1 Le mésappariement hydrophobe

Les propriétés physiques des lipides, qui définissent l'état de phase ou encore l'épaisseur hydrophobe de la membrane, sont un facteur influençant l'activité des protéines transmembranaires. Réciproquement, la conformation d'une protéine peut dans certains cas modifier les propriétés physiques des lipides. Par exemple pour des forts rapports protéines/lipides, la rhodopsine et la bacterioopsine sont connues pour modifier la courbure (Botelho et al. 2006) et la rigidité (Dumas et al. 1999) de la membrane. En effet, l'épaisseur hydrophobe de la bicouche lipidique est censée s'ajuster à l'épaisseur hydrophobe de la protéine afin de minimiser l'exposition des acides aminés hydrophobes de la protéine au milieu aqueux. Ainsi, la différence entre l'épaisseur hydrophobe de la bicouche lipidique et l'épaisseur hydrophobe de la protéine, appelée mésappariement hydrophobe, devrait induire une distorsion de la bicouche ou de la protéine, voire des deux. Étant donnée la relative rigidité des protéines vis-à-vis des lipides (Zaccai 2000), les modèles de mésappariement hydrophobe supposent que les chaînes acyles des lipides au voisinage de la protéine ajustent leur longueur en fonction de l'épaisseur hydrophobe de la protéine (fig. 1.8). Piknova et al. ont mesuré la différence de température de transition de phase gel-fluide entre des bicouches composées de PCs (de diC12:0 à diC18:0) et des

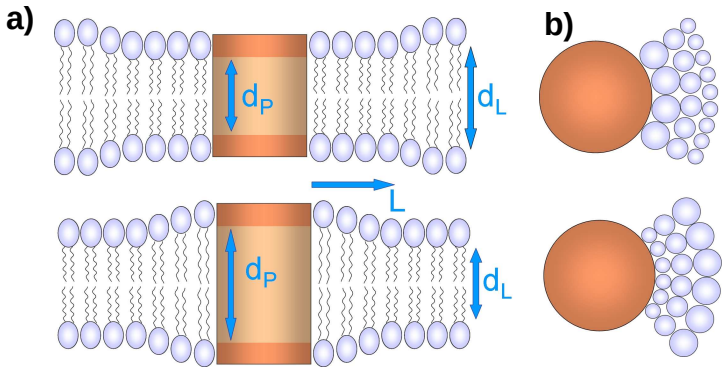


Figure 1.8. Modèle du mésappariement hydrophobe. a) illustration de l'ajustement de l'épaisseur hydrophobe de la bicouche (d_L), via la longueur des chaînes acyles, à l'épaisseur hydrophobe de la protéine (d_P). L représente l'effet à longue distance du ré-appariement hydrophobe. b) représentation des volumes occupés par les lipides dans chacun des cas.

bicouches en présence de bactériorhodopsine (Piknova et al. 1993). Les auteurs montrent que les écarts mesurés reflètent un mésappariement hydrophobe entre la membrane et la protéine, concluant que cette dernière a une épaisseur hydrophobe proche d'une membrane de DPPC en phase fluide. De plus ils évaluent à 1.5 nm la distance latérale sur laquelle la protéine arrive à contraindre la bicouche (fig. 1.8, paramètre L).

Beaucoup de profils d'activité protéique en fonction de l'épaisseur membranaire sont similaires, avec la plus haute activité pour des environnements lipidiques en C18, correspondant à la plupart des membranes biologiques (Lee 2004). Cela montre que les protéines ont besoin d'une épaisseur hydrophobe optimale pour assurer pleinement leur fonction. Le mésappariement hydrophobe lipides-protéine correspond à un système hors équilibre où les forces hydrophobes tendent à induire un changement dans le comportement de la protéine ou de la bicouche lipidique pour ramener le système dans un état énergétique moindre. Les mécanismes possibles pour les protéines, par exemple dans le cas d'un mésappariement positif (épaisseur de la protéine > épaisseur de la bicouche) sont l'ajustement de l'épaisseur de la protéine ou, le cas échéant, l'ajustement de l'orientation des hélices α par rapport à la normale de la bicouche jusqu'à correspondre à l'épaisseur hydrophobe de cette bicouche, ou encore l'oligomérisation des protéines pour limiter l'exposition de leurs parties hydrophobes (Killian 1998; de Planque et Killian 2003).

En ce qui concerne les lipides, les adaptations de l'épaisseur de la bicouche passent par l'ajustement de la longueur des chaînes acyles : une augmentation d'épaisseur hydrophobe étant corrélée à l'accroissement de l'ordre des chaînes acyles et réciproquement. Nezil et al. ont inséré un peptide structuré en hélice α rigide de longueur connue, dans des membranes de POPC et mesuré certains paramètres en RMN ^2H. En phase fluide, l'épaisseur hydrophobe du peptide est supérieure à celle de la bicouche de POPC, ce qui contraint la bicouche à augmenter son épaisseur hydrophobe. Le mésappariement hydrophobe est compensé en augmentant l'ordre (et donc l'épaisseur) de la membrane par l'ajout de 30 mol% de cholestérol (Nezil et Bloom 1992). Un autre exemple de l'importance de l'état ordonné des lipides sur la conformation de la protéine concerne la Ca^{2+}-ATPase. Cette protéine de la membrane plasmique d'érythrocyte a été reconstituée dans différents environnements lipidiques et son activité maximale a été mesurée dans les membranes de DPPC en

phase gel, ainsi que dans des membranes issues du cristallin (où les lipides sont ordonnés). L'activité la plus faible est mesurée dans les membranes de POPC en phase fluide, montrant l'influence de l'épaisseur et de l'ordre des lipides de la membrane sur la fonction de la protéine (Tang et al. 2006).

Plusieurs travaux montrent que des protéines couplées aux protéines G modifient leur épaisseur hydrophobe lors de la liaison d'un agoniste pour assurer leur fonction. La résonance plasmonique de surface (SPR) est un moyen utilisé pour mesurer ces variations d'épaisseur dans des systèmes membranaires modèles. Son principe est le suivant : à l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différent (le verre et l'eau) on envoie un faisceau de lumière monochromatique et polarisée à un angle de réflexion interne totale. Dans ces conditions une composante électromagnétique de la lumière, appelée onde évanescente, pénètre le milieu d'indice de réfraction inférieur sur une courte distance. L'interposition d'un film d'argent à l'interface des deux milieux engendre une résonance entre les électrons délocalisés de la couche périphérique de l'argent et l'onde évanescente, conduisant à une perte d'énergie lumineuse dans le faisceau réfléchi (réflectance) et ceci dans un angle précis appelé angle de résonance. Cet angle de résonance dépend de plusieurs paramètres et notamment de l'indice de réfraction du milieu (l'échantillon) dans lequel l'onde évanescente se propage. Dans le cas de bicouches supportées contenant des protéines, l'analyse des variations de l'angle de résonance en fonction de la réflectance donne des informations sur l'épaisseur du système.

Salamon et al. ont ainsi observé que la rhodopsine, reconstituée dans une membrane d'egg-PC, augmentait son épaisseur de 6 Å lors de son activation par les photons (Salamon et al. 1996). Ils ont trouvé des résultats similaires avec le récepteur δ opioïde humain (hDOR) reconstitué dans des membranes egg-PC/DOPG (3:1) lors de la liaison d'agonistes, telle la Deltorphine II (Salamon et al. 2000). Dans une membrane constituée de POPC/SM (1:1) l'activation de hDOR, sous l'effet d'un mésappariement hydrophobe, fait qu'il se localise préférentiellement dans des zones riches en sphingomyéline (plus épaisses), augmentant ainsi de 30 fois la liaison du récepteur à la protéine G (Alves et al. 2005). Cette nouvelle localisation de la protéine activée peut être la conséquence de deux processus : soit une relocalisation de la protéine, soit un tri moléculaire des lipides qui entourent la protéine. Compte tenu des vitesses de diffusion des lipides par rapport aux protéines (en moyenne 1000 fois plus rapide), le deuxième processus est le plus probable.

Ainsi la dynamique d'interaction entre les protéines et leur environnement lipidique fait partie intégrante de la réalisation de leur fonction au sein des membranes et le sondage des propriétés de phase de la membrane lipidique peut nous renseigner sur l'activation d'un type de récepteur donné.

1.4 Organisation fonctionnelle

Aujourd'hui, devant la difficulté de la détermination structurale des constituants membranaires et de leur dynamique conformationnelle, rotationnelle et translationnelle, une vision intégrée des fonctions qui leur sont associées est incontournable. Les nouvelles approches mettent constamment en relation les paramètres expérimentaux (structure, dynamique, interactions…) afin d'avoir une vue intégrée de la membrane et de déterminer les fonctions biologiques correspondantes. Désormais, l'un des enjeux majeurs en membranologie est la compréhension des mécanismes dynamiques qui engendrent, ou qui découlent, de la réalisation de fonctions biologiques membranaires. Et si l'hétérogénéité de distribution latérale et transversale des constituants de la membrane plasmique et l'organisation en domaines fonctionnels ne font aujourd'hui aucun doute, c'est la nature, le rôle et la genèse de ces domaines qu'il reste à élucider.

1.4.1 Organisation fonctionnelle transversale

La membrane présente une grande asymétrie transversale due aux mouvements spontanés ou assistés des lipides d'un feuillet à l'autre (translocations, ou encore appelés « Flip-Flop »), et aux fusions membranaires générées par les processus d'exocytoses et d'endocytoses qui font fluctuer en permanence la composition lipidique de la membrane. Les mouvements assistés de lipides mettent en jeu des protéines spécifiques de certains GPL, comme les ATP-ases de type P (translocases) qui transloquent les aminophospholipides (PS et PE) vers le feuillet interne, ou non spécifiques comme les scramblases (Ikeda et al. 2006). Dans certains type cellulaire, comme les plaquettes, la cellule est amenée à exposer des glycéro-PS à sa surface afin d'initier la coagulation sanguine. Une déficience dans la régulation ou le fonctionnement des scramblases concernées aboutie à des troubles

hémorragiques, appelés syndrome de Scott (Bevers et al. 1999). D'autre part les glycéro-PC et la SM, qui représentent autour de 50 mol% des phospholipides membranaires et ont une charge globale neutre, sont principalement localisées dans le feuillet externe (extracellulaire) alors que les glycéro-PS et glycéro-PI, dont la charge globale des têtes polaires est négative, et les glycéro-PE (neutres) sont localisés au niveau du feuillet interne (cytoplasmique). Par conséquent le feuillet interne porte les charges négatives et le feuillet externe les groupements neutres, ce qui contribue au fait, avec la différence de concentration ionique de part et d'autre de la membrane, que la membrane a un potentiel électrique non nul, estimé à 10^5 V·cm^{-1} (Yeung et al. 2006).

Le glycéro-PI est uniquement présent au niveau du feuillet interne, permettant à certaines protéines contenant des résidus basiques d'adhérer à la membrane par des interactions électrostatiques. C'est le cas des protéines MARCKS et GAP43 qui possèdent toutes les deux un domaine riche en lysine en plus de palmitoylations (McLaughlin et Murray 2005). Ce type d'interaction est réversible puisqu'il est dépendant du taux de calcium intracellulaire (pouls calcique) hautement régulé par la cellule. On retrouve ce phénomène dans l'interaction de certains RCPGs, via leur boucle intracellulaire, avec le feuillet interne.

Le cholestérol est sujet à des mouvements de « flip-flop » très rapides d'un feuillet à l'autre ($t_{1/2}$ ~1 s) (Steck et al. 2002). Ainsi, il semble présent dans les mêmes proportions dans les deux feuillets dans la plupart des types cellulaires (Munro 2003) mais est plus fortement associé (complexé) aux phospholipides, notamment avec la sphingomyéline, dans le feuillet externe (Lange et al. 2007). Il a été proposé pour cette dernière, lorsqu'elle comporte une chaîne acyle en C24, une interdigitation avec le feuillet interne (Barenholz et Thompson 1999). Les acétylations et prénylations portées par certaines protéines, comme les protéines G, sont exclusivement présentes au niveau du feuillet interne.

Les protéines à ancre GPI, impliquées dans de nombreux processus de reconnaissance inter-cellulaire, sont uniquement présentes sur le feuillet externe. Elles jouent cependant un rôle dans la signalisation, telle la protéine Thy-1, bien que l'on n'ait pas encore clairement identifié la façon dont elles transduisent le signal vers le feuillet interne (Rege et Hagood 2006). L'ancre GPI et la protéine sont probablement en interaction avec une cinquantaine de phospholipides du feuillet externe (Sharom et Lehto 2002). Ces ancres GPI peuvent être clivées par des phospholipases C ou D endogènes

spécifiques pour réguler l'expression de ces protéines, et par des PLC libérées par des bactéries pour infecter une cellule eucaryote.

Les glycolipides sont exclusivement localisés dans le feuillet extracellulaire de la membrane. Cette asymétrie de distribution trouve son origine dans le lumen de l'appareil de Golgi, où lipides et protéines sont glycosylés. Tous les sucres (porteurs de charges négatives) sont exposés à la surface de la membrane plasmique (milieu extracellulaire) où ils jouent des rôles importants dans les interactions de la cellule avec son environnement et protègent contre les agressions mécaniques, chimiques et enzymatiques. Néanmoins ils peuvent être un point de reconnaissance de certains organismes pathogènes.

Une des conséquences de cette asymétrie de répartition transversale des espèces lipidiques est que les chaînes acyles portées par les lipides membranaires sont principalement présentes sous forme saturées au niveau du feuillet externe, et insaturés (majoritairement des doubles liaisons *cis* entre les carbones 9 et 10 et des groupements isoprényl) au niveau du feuillet interne, conférant une dissymétrie physico-chimique à la membrane plasmique. Parallèlement, des études menées grâce à des sondes lipidiques ESR ou fluorescentes ont révélé que le feuillet interne est plus fluide que le feuillet externe (Devaux et Morris 2004).

1.4.2 Organisation fonctionnelle latérale

On conçoit facilement que pour une composition donnée d'un grand nombre de molécules dans le plan de la membrane plasmique, il existe une infinité de distributions latérales possibles résultant des mouvements de ces molécules sous l'influence de l'agitation thermique. Cela correspond virtuellement à une infinité de fonctions biologiques possibles si l'on considère les propriétés physiques globales ou locales particulières de chaque distribution et le fait que les motifs générés soient autant de cibles de reconnaissance différentes. Par exemple, une trop forte agrégation latérale du ganglioside GM1 à la surface membranaire empêche la fixation de la toxine du choléra, une protéine qui reconnaît GM1 et induit l'activation de la protéine $G_{\alpha s}$ indépendamment de la voie des RCPGs (Shi et al. 2007). Cependant les mouvements (on parlera de diffusion) browniens ne peuvent expliquer une telle

hétérogénéité de distribution latérale des constituants de la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Le recrutement des constituants membranaires nécessaire à la formation des domaines est possible car les protéines et les lipides diffusent dans le plan de la membrane. Ces diffusions sont caractérisées expérimentalement par le coefficient de diffusion D ($\mu m^2 \cdot s^{-1}$). On sait aujourd'hui que la formation des domaines est la résultante de divers processus dynamiques spécifiques (interactions moléculaires, forces hydrophobes…) et non spécifiques (température, activités protéiques…). La membrane plasmique est ainsi organisée en domaines de compositions, de tailles et de durées de vie très variables (ce qui rend leur identification difficile) en adéquation avec la fonction biologique qu'ils assurent (Mukherjee et Maxfield 2004). On a d'ailleurs identifié aujourd'hui de nombreux cas particuliers d'organisations bien définies temporellement et spatialement.

Parmi ceux-ci citons les jonctions communicantes, des domaines composés de regroupement de pores, eux-mêmes formés de six connexines (protéines), permettant l'échange de solutés entre les cellules. Les jonctions inter-cellulaires serrées compartimentent la membrane plasmique des cellules épithéliales en un domaine apical et un domaine baso-latéral. Enfin, la partie antérieure du spermatozoïde (acrosome) arbore deux macrodomaines distincts de composition différente au niveau de la membrane plasmique (Martinez et Morros 1996). Les exemples de compartimentation de la membrane sont nombreux.

En ce qui concerne les micro-domaines, les processus d'endocytose et d'exocytose sont sources d'initiation de la formation de domaines lipidiques et protéiques suffisamment stables pour pouvoir être observés en microscopie électronique, c'est le cas des cavéoles. Il s'agit d'invaginations membranaires de très petite taille (50 nm de diamètre) recouvertes sur leur face cytoplasmique par un manteau spiralé formé par la « polymérisation » de la cavéoline. Cette protéine est capable de s'insérer profondément dans la membrane et d'y stabiliser des microdomaines riches en cholestérol. L'existence des cavéoles a été initialement observée dans les cellules endothéliales mais on les trouve dans presque toutes les cellules. La purification des cavéoles, couplée à l'immunocytochimie, a montré qu'elles sont enrichies en cholestérol, en glycolipides (telle que la sphingomyéline) et en protéines ancrées à la membrane par une ancre GPI. Le cholestérol est nécessaire à la formation des cavéoles. En effet, leur fonction est inhibée par la déplétion de la membrane en cholestérol (Hooper 1999). Le

rôle des cavéoles dans l'endocytose reste incertain, même s'il semble qu'elles soient impliquées dans l'internalisation de certains récepteurs après leur activation. Une autre source de formation de domaines est la voie d'internalisation de certains récepteurs membranaires, tels les RCPGs, par les puits de clathrine. Ces vésicules d'endocytose (~100 nm) se forment au niveau de zones de la membrane plasmique enrichies en phosphoinositides, par la polymérisation des clathrines et de complexes AP-2 (Rappoport et al. 2004).

Comme on l'a vu au chapitre 1.1.1, la géométrie des GPLs est fonction des volumes respectifs occupés par la partie hydrophile et la partie hydrophobe. Par conséquent, une localisation latérale particulière de certains lipides peut induire ou renforcer la courbure de la membrane. Par exemple les acides lysophosphatidique et phosphatidique ont une géométrie conique opposée et sont inter-convertis par la lysophosphatidic acid acyl transférase et la phospholipase A_2. Par conséquent cela induit un changement de courbure d'une région de la membrane (McMahon et Gallop 2005).

Les approches biophysiques les plus couramment utilisées pour la mesure de la diffusion latérale des constituants de la membrane plasmique de cellules vivantes (Marguet et al. 2006) sont le retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) (Axelrod et al. 1976; Lopez et al. 1988), la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) (Schwille 2001) et le suivi de particule unique (SPT) (Lee et al. 1991; Saxton et Jacobson 1997). Les deux premières techniques font appel à un marquage de la molécule d'intérêt par un fluorophore lié de manière covalente ou non et le SPT par une particule d'or colloïdale fonctionnalisée. Ces techniques permettent, entre autre, de mesurer des coefficients de diffusion latérale dans des échelles de temps et de taille qui leurs sont propres. Dans la membrane plasmique, pour les composés ayant une diffusion dite « libre », les lipides ont généralement un coefficient de diffusion latérale de l'ordre de 0.1 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$ et les protéines diffusent en moyenne dix fois plus lentement. Pour ces dernières, la diffusion serait fonction du rayon de leur partie transmembranaire (Gambin et al. 2006). Bien sûr toutes sortes d'interactions vont influencer le comportement diffusionnel d'une molécule. Par exemple, l'état de phosphorylation des phosphoinositides (c'est-à-dire la quantité de groupements phosphate liés à l'inositol) influe sur la vitesse de diffusion de ces lipides, comme cela a été montré dans les cellules CHO ou HEK (Cho et al. 2006). Pour les phospholipides saturés, la longueur des chaînes acyles est un facteur influençant la

diffusion latérale : plus ces chaînes sont longues et plus la diffusion du lipide est importante (Vaz et al. 1985). Le développement d'algorithmes élaborés d'analyse des données expérimentales obtenues en SPT (Saxton 1993; Simson et al. 1995; Meilhac et al. 2006) d'une part, et l'apparition de la technique du FRAP à rayon variable (FRAPrv) (Salomé et al. 1998) ont permis de mettre en évidence l'existence de microdomaines membranaires, de tailles inférieures au pouvoir de résolution spatiale des microscopes optiques (classiquement 250-300 nm). Daumas et al. ont montré dans des fibroblastes que 90 % des trajectoires du récepteur μ opioïde humain (hMOR), un RCPG, contenaient des confinements dans des domaines d'environ 150 nm de diamètre, eux même sujets à une diffusion latérale (Daumas et al. 2003). Ces résultats ont été retrouvés par FRAPrv avec la protéine hMOR fusionnée à la Green Fluorescence Protein (GFP), avec des tailles de domaines mesurées supérieures (~700 nm), suggérant que cette classe de protéines pouvait diffuser à longue distance tout en rencontrant des zones de confinement, même lorsque la cellule est à l'état basal (Saulière et al. 2006). D'autres travaux de SPT suggèrent que les domaines observés sont la conséquence de la compartimentation de la membrane plasmique par des éléments liés au cytosquelette (Tomishige et Kusumi 1999; Kusumi et al. 2005).

1.4.3 Les membranes résistantes aux détergents (DRM) et les rafts

Si les causes de la genèse des domaines restent méconnues, la composition de certains d'entre eux commence à émerger. En effet le couplage des approches de dynamique membranaire avec des techniques biochimiques a permis de corréler la présence des confinements (de diverses protéines et lipides) avec la composition lipidique de la membrane. Les techniques utilisées sont principalement axées sur la modification de la teneur en cholestérol et en sphingolipides de la membrane. Ainsi, la protéine Thy-1 et le ganglioside GM1 présentent des confinements dans des nanodomaines (mesurés en SPT sur des fibroblastes) dont la nature (taille et durée de vie) est dépendante de la quantité de cholestérol ou de sphingomyéline dans la membrane. Cela suggère une ségrégation latérale de ces constituants en « cluster » *in vivo* (Sheets et al. 1997; Dietrich et al. 2002). Des mesures de FCS sur des cellules transfectées par une protéine GFP-GPI, couplées à la déplétion membranaire en

cholestérol par des cyclodextrines (*cf.* chapitre 3.1.3) ont abouti à la même conclusion (Nohe et al. 2006). Ces observations sont consistantes avec le fait que les lipides jouent un rôle dans ces processus.

Des approches purement biochimiques ont révélé que l'utilisation de détergents sous certaines conditions permettait de solubiliser de manière différentielle des domaines membranaires aux propriétés physiques spécifiques. Les détergents déstabilisent les membranes lipidiques pour former avec plus ou moins d'efficacité des micelles au contenu hétérogène, qu'il est possible de séparer en différentes fractions par ultracentrifugation dans un gradient de densité (utilisation du sucrose). Certaines fractions correspondent à des parties de membranes peu solubilisées car contenant des lipides en forte interaction les uns les autres, tels ceux composant les phases lo. De part leur fort rapport lipides/protéines, ces dernières ont une densité plus faible que les autres fractions et sont appelées DRM (Detergent Resistant Membranes). Une des méthodes le plus souvent employée pour obtenir des DRMs fait appel à une solubilisation des membranes cellulaires à 4°C avec du Triton X-100, un détergent non ionique. Brown et Rose ont ainsi montré que la phosphatase alcaline, une protéine à ancre GPI, était ségrégé avec des GSLs, la sphingomyéline et le cholestérol au niveau de la membrane apicale de cellules épithéliales (Brown et Rose 1992). Depuis, d'autres études ont révélé que les fractions DRMs contenaient très souvent des composés spécifiques, qu'on appelle désormais des marqueurs DRMs, tels que les protéines Cavéoline ou Flotilline et bien sur les lipides de type lo : le cholestérol, des gangliosides saturés et la sphingomyéline (Rietveld et Simons 1998; Salzer et Prohaska 2001). Ces résultats ont apporté un argument supplémentaire sur le fait que la membrane plasmique est certainement compartimentée en domaines de compositions lipidique et protéique différentes.

Cependant, ces traitements biochimiques soulèvent le problème de la spécificité du détergent vis-à-vis de l'état de phase des lipides de la membrane plasmique. En effet l'action du détergent est dépendante de la force des interactions entre les lipides et de la géométrie de ceux-ci pour la formation des micelles (London et Brown 2000). Des fractions DRM sont observées quand on utilise du Triton X-100 à 4°C mais cela n'est pas vrai à 37°C, ce qui laisse penser que les lipides sont plus fortement associés à basse température. De plus, certaines protéines supposées appartenir à des domaines membranaires riches en cholestérol par d'autres techniques, ne sont pas toujours retrouvées dans les

DRMs (Chamberlain 2004), d'où l'importance de multiplier les approches, y compris au niveau du protocole d'extraction des DRMs. Ainsi diverses méthodes d'extraction des DRMs ont été développées sans l'utilisation de détergent, dont une se basant sur un tampon isotonique contenant du calcium (Macdonald et Pike 2005). La comparaison entre les méthodes avec et sans détergent a été menée par l'équipe de Chattopadhyay pour le récepteur à la sérotonine 5-HT_{1A}, un RCPG, dans des cellules CHO et des cellules de l'hippocampe bovin (partie du lobe temporal du cerveau). Dans les deux cas ils ont obtenu des DRMs enrichis en cholestérol, en sphingomyéline et en sérotonine 5-HT_{1A} dans les mêmes proportions (Kalipatnapu et Chattopadhyay 2007). D'autres travaux utilisant une approche sans détergent sur des cellules CHO ont révélé que le récepteur κ opioïde humain (hKOR) était localisé dans les DRMs avec les marqueurs « classiques » de ces fractions, tels que le cholestérol, la Flotilline-2 et la Cavéoline-1. La déplétion en cholestérol de la membrane plasmique de ces cellules par des MβCD (classe de cyclodextrines particulière, *cf.* chapitre 3.1.3) induit une relocalisation de la protéine hKOR dans des fractions de plus grande densité (non DRMs). Cet effet est réversible par une re-complémentation des membranes en cholestérol (Xu et al. 2006). Il devient alors intéressant de savoir si l'état d'activation d'un récepteur donné a une influence sur sa localisation dans les DRMs ; autrement dit, est-ce qu'un récepteur qui réalise sa fonction (lors de la fixation d'un agoniste) se trouve dans le même environnement lipidique que le même récepteur à l'état basal ? Parmi les travaux qui traitent cette question, citons le cas du récepteur δ aux opioïdes murin (mDOR), un RCPG : un traitement au Triton X-100 de cellules NG108-15 (hybrides de neuroblastomes de souris x gliomes de rat) exprimant mDOR montre que 70 % de ces récepteurs sont localisés dans les fractions DRMs à l'état basal, alors qu'il n'y en a plus que 54 % après un traitement de 30 minutes avec trois agonistes différents. Cependant, comme le propose les auteurs, ces résultats peuvent être la conséquence de l'internalisation des récepteurs suite à leur activation (Huang et al. 2007). Enfin ces auteurs ont rapporté dans les cellules CHO, une co-localisation de la protéine $G_{\alpha i}$ avec mDOR dans les DRMs, dépendante du cholestérol.

On suspecte aujourd'hui que la plupart des protéines de la membrane plasmique sont présentes sous forme d'oligomères (Engelman 2005). Le récepteur à la TSH (une hormone sécrétée par l'hypophyse),

un RCPG, serait ainsi sous forme multimérique à l'état basal, puis se dissocierait en monomères sous l'action de la TSH, son ligand agoniste naturel, rendant possible son interaction avec la protéine $G_{\alpha s}$ au sein de domaines enrichis en cholestérol (Latif et al. 2007). De nombreuses études menées sur cellules vivantes, notamment par des techniques de FRET, montrent que l'activité des récepteurs couplés aux protéines G passe souvent par des mécanismes d'homo/hétérodimérisation (Terrillon et Bouvier 2004). Cela a bien été identifié, par exemple, pour le récepteur 5-HT_{2C} à la sérotonine, dont l'activation peut être inhibée par une co-expression au niveau de la membrane plasmique d'une forme inactivée de ce récepteur (obtenu par mutagenèse dirigée), suggérant donc qu'une homodimérisation de 5-HT_{2C} est nécessaire à l'activité de ce RCPG (Herrick-Davis et al. 2005).

D'autre part, les preuves s'accumulent à propos de l'association préférentielle du cholestérol et de la sphingomyéline au niveau de la membrane plasmique, comme cela a été démontré en milieu modèle (Rietveld et Simons 1998). De plus, Scheek et al. ont rapporté un fort couplage de ces deux lipides dans des cellules CHO en « déplétant » les membranes plasmiques en sphingomyéline grâce à une enzyme spécifique : la sphingomyélinase. Ils ont alors mis en évidence une inhibition du clivage de SREPB-2, une protéine liée à la membrane du REG impliquée dans la régulation de la biosynthèse et de l'endocytose du cholestérol (Scheek et al. 1997). D'autre part, le traitement de fibroblastes humains par la sphingomyélinase cause une diminution de plus de 15 % de la quantité de cholestérol présent dans la membrane plasmique (Porn et Slotte 1995).

Les données collectées grâce à toutes ces techniques ces dix dernières années laissent à penser qu'il existe vraisemblablement des domaines membranaires de tailles nanométriques enrichis en protéines à ancre GPI, gangliosides saturés, sphingomyéline, cholestérol et en RCPGs (Sharma et al. 2004). La convergence de ces résultats avec d'une part les études biochimiques sur les DRMs et d'autre part les propriétés physico-chimiques très particulières des milieux modèles contenant des mélanges cholestérol/sphingomyéline et cholestérol/phospholipides saturés (Silvius 2003) a abouti au concept de microdomaines membranaires fonctionnels appelés « rafts ». Durant la dernière décade, on recense plus de 2200 publications scientifiques contenant le terme « raft » dans leur titre ou leur résumé (source : www.pubmed.gov), montrant l'intérêt que suscite l'idée de l'existence de nanodomaines fonctionnels membranaires. Cette quantité et diversité de résultats ont abouti à un consensus sur les

caractéristiques principales des domaines rafts de la membrane plasmique : les rafts correspondraient à des domaines de 10 à 200 nm de diamètre, hétérogènes, hautement dynamiques, enrichis en cholestérol et en sphingomyéline qui compartimenteraient la membrane (Pike 2006). Les rafts correspondraient aussi à des membranes en phase lo, plus épaisses que les zones membranaires non-rafts (Gandhavadi et al. 2002). Les cavéoles, qui sont également enrichies en cholestérol et en Cavéoline et qui peuvent se retrouver dans les fractions DRMs/rafts, sont considérées comme un sous-ensemble membranaire des rafts (Hooper 1999).

Étant donné de la composition lipidique particulière des rafts, on peut se demander si les détergent ne ségrégent pas uniquement les lipides du feuillet externe de la membrane plasmique dans les DRMs (Pike 2003). Ce feuillet serait alors essentiellement de type raft (Munro 2003; Swamy et al. 2006). Cependant des expériences menées sur des lymphocytes T ont mis en évidence un couplage entre des constituants « raft » du feuillet interne et d'autres du feuillet externe (Gri et al. 2004). Au niveau fonctionnel, il semblerait que certains récepteurs de type RCPG aient besoin d'un environnement lipidique de type raft pour réaliser leur fonction biologique, alors que d'autres suivraient le chemin inverse (Simons et Toomre 2000; Pike 2003). Ainsi les rafts agiraient comme des plateformes de signalisation, permettant le recrutement des partenaires de part et d'autre de la membrane.

1.5 Le criblage des récepteurs membranaires

1.5.1 Présentation

À l'heure actuelle plus de 30 % des nouveaux médicaments mis sur le marché ciblent des RCPGs. De plus, beaucoup de RCPGs sont encore orphelins, c'est-à-dire sans ligand connu, et possèdent donc un fort potentiel pharmacologique. La nécessité de développer la découverte de ces nouveaux ligands à grande échelle a conduit, ces 15 dernières années, au développement de techniques de criblage à haut débit (HTS).

Le criblage à haut débit est une opération qui met en œuvre des robots capables d'accélérer et d'automatiser des étapes de mise en contact de molécules potentiellement actives en pharmacologie

(candidats médicaments) avec un système biologique qui reproduit certains aspects de la vie d'un organisme vivant ou de son dérèglement (maladie). Il permet de tester des centaines de milliers de molécules (naturelles ou synthétiques) avec des cibles pharmacologiques en quelques semaines. C'est une formidable accélération des capacités d'évaluation de l'intérêt de molécules actives. Il faut toutefois ensuite analyser la pertinence de la génération de ces millions de résultats, ce qui demande l'utilisation d'approches biochimiques plus classiques de dosage d'activités protéiques et prend du temps. Cette technologie de criblage à haut débit est issue des progrès de la biologie moléculaire, de l'informatique, de la robotique et de la miniaturisation. Depuis le début des années 90, il est devenu une approche clé de l'industrie pharmaceutique. La mise au point des tests biochimiques ou sur cellules tient compte de la miniaturisation et de la rapidité d'exécution du test imposées par le criblage à haut débit. Les tests doivent donc être rapides, simples à mettre en œuvre et reproductibles. Ils doivent surtout donner une information la plus juste possible et limiter le nombre de faux positifs. Dans le cas de criblage de RCPG *in vivo*, les faux positifs correspondent à une interaction ligand-récepteur qui ne déclenche pas la signalisation cellulaire. Cependant ces faux positifs sont en premier lieu considérés comme des candidats potentiels et ce sont les tests biochimiques complémentaires (plus longs et coûteux) qui révèlent leur vrai nature. Le développement d'un test complémentaire en amont (par exemple dès le test de liaison) permettrait d'améliorer significativement le rendement du criblage à haut débit.

1.5.2 Une approche complémentaire

La présence de domaines hautement dynamiques rafts dans la membrane plasmique implique des hétérogénéités latérales au niveau de son épaisseur. Comme cela a été montré, la déplétion de la membrane plasmique en cholestérol a un impact négatif sur la fonction de la plupart des RCPGs (Chattopadhyay et Paila 2007), suggérant que cet effet est lié à une modification des propriétés physiques de la membrane, notamment à la diminution moyenne de son épaisseur. De plus l'activation des RCPGs ayant un comportement similaire à hDOR, induit un mésappariement hydrophobe à l'origine de la relocalisation des récepteurs dans les rafts ou d'un tri moléculaire des lipides qui les

entourent pour former des rafts. Ainsi le développement d'un nouvel outil capable de rendre compte de l'état de phase de la membrane (raft par rapport à non-raft) en fonction de la liaison d'un agoniste sur un récepteur donné, permettrait de discriminer immédiatement les faux positifs, en confirmant que la liaison du ligand au récepteur a engendré une réponse conformationnelle synonyme d'un effet de type « agoniste ».

1.6 But de l'étude

Le développement d'un tel outil de discrimination des faux positifs *in vivo* a été entrepris et est à l'origine du dépôt d'un brevet (Lopez et Le Roux 2006). Le choix a été fait de développer des sondes fluorescentes de la famille des pyrényl-cholestérol, de bons candidats potentiels dans le sondage de membranes de type raft, et ainsi deux sondes ont été synthétisées. Les travaux que je présente ici portent sur leur caractérisation biophysique en milieux modèles et leur application biologique. Une brève description de la synthèse de ces sondes sera présentée (*cf.* chapitre 2). Les pré-requis des sondes, à savoir leur solubilité dans les membranes modèles et naturelles, leur faible toxicité cellulaire et la sensibilité du pyrène à un paramètre de son environnement lié aux propriétés des rafts ont été validés (*cf.* chapitre 3.1). Dans un deuxième temps les propriétés membranaires d'une des deux sondes vis-à-vis du cholestérol ont été analysées en détail en milieux modèles par DSC, RMN ^{2}H et spectroscopie d'absorption dans le but de renforcer l'idée du choix du motif cholestérol des sondes (*cf.* chapitre 3.2). Puis, toujours en milieu modèle, l'aptitude des sondes à discriminer les membranes de type raft (enrichie en cholestérol) par rapport à des membranes non-raft grâce à leur motif pyrène a été quantifiée par spectroscopie de fluorescence (*cf.* chapitre 3.3). Enfin, sur des membranes plasmiques *in vivo* les propriétés de fluorescence des sondes vis-à-vis des rafts ont été mises à profit dans la détection de la liaison d'agonistes au récepteur mDOR, surexprimés dans des cellules *in vivo*. Dans le cadre de la mise en place d'un test complémentaire de criblage de ligands de RCPGs j'ai réalisé quelques expérimentations sur un montage de microspectrofluorimétrie.

Présentation des sondes Pyrène-cholestérol

2

2.1 Présentation de la famille Pyrène-cholestérol

Le choix des motifs composant les molécules à synthétiser a été dicté par deux types de contraintes : d'une part ces motifs devaient conférer une bonne miscibilité des sondes dans les membranes biologiques, avec une partition préférentielle, comme le cholestérol (**1'**), dans les phases lo (raft) par rapport aux phases ld (non raft), et d'autre part il fallait que les sondes puissent rendre compte des propriétés physiques particulières de ces phases ordonnées, riches en cholestérol. Des études préliminaires menées dans l'équipe avec une sonde commerciale, la 1-pyrèneméthyl-3β-hydroxy-22,23-bisnor-5-cholénate (**2'**) (fig. 2.1), ont montré que cette sonde était capable de rendre compte de l'état ordonné des lipides des membranes grâce aux spectres de fluorescence et d'absorption du groupement pyrène (Lagane et al. 2002). Malheureusement cette sonde est inapte à s'insérer dans la membrane plasmique de cellules *in vivo*, y compris par le biais des MβCD, probablement à cause de la présence d'un groupement ester, introduisant dans la jonction entre le cholestérol et le pyrène une composante trop hydrophile pour être inséré dans une membrane.

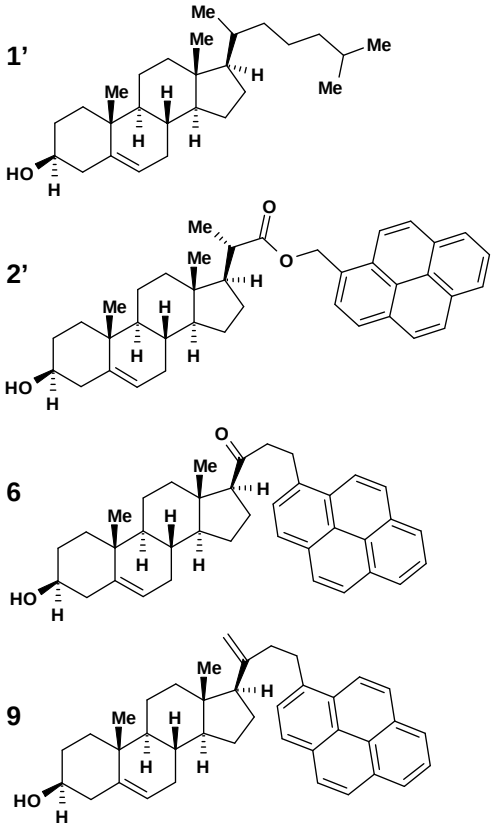


Figure 2.1. (1') cholestérol, (2') 1-pyrèneméthyl-3β-hydroxy-22,23-bisnor-5-cholénate, (6) 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-méthylpyrényl)-20-one et (9) 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-méthylpyrényl)-20-méthylidène.

C'est la raison pour laquelle la synthèse de deux nouvelles sondes a été entreprise, à savoir le 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-méthylpyrényl)-20-one (**6**) et le 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-

méthylpyrényl)-20-méthylidène (**9**) (fig. 2.1) sur la base de la structure de la sonde commerciale. Ces sondes comportent donc un motif pyrène greffé en position 20 du cholestérol (famille des Pyrène-cholestérol), un groupement hydrophobe qui se positionnera au cœur des bicouches lipidiques (Hoff et al. 2005).

2.2 Synthèse chimique des sondes

Les sondes **6** et **9** (fig. 2.2) ont été synthétisées au laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée (LHFA, UMR5069, CNRS-UPS) par Christophe Le Roux et Hafida Gaspard-Iloughmane. Les étapes de cette synthèse sont illustrées dans la figure 2.2 (la description détaillée de la synthèse est portée en annexe, dans le *supplementary material* de la publication, page A26).

Le choix s'est porté sur une hémi-synthèse (fig. 2.2) car la synthèse totale du cholestérol comme précurseur n'était pas envisageable. En effet ce stérol comporte 8 carbones asymétriques, ce qui rend la synthèse très complexe et coûteuse. Le précurseur choisi pour la partie stérol est la pregnénolone (**2**) qui comporte, en plus des carbones asymétriques et de l'hydroxyle en position 3β du stérol, un groupement réactionnel cétonique. De plus cette molécule est peu coûteuse. En ce qui concerne le fluorophore (motif choisi pour rapporter les propriétés de phase liquide-ordonnée des membranes) le choix s'est porté sur motif pyrène fonctionnalisé par un groupement carboxaldéhyde capable de réagir avec la cétone de la prégnénolone par une réaction standard d'aldolisation-crotonisation basique (condensation). On obtient ainsi le produit (**3**), un « pyrène-pregnénolone », portant l'hydroxyle du cholestérol et une cétone conjuguée au niveau de la jonction entre le pyrène et le stérol. Cette jonction étant encore trop polaire par rapport au critère fixé, la suite de la synthèse vise à enlever la fonction cétone. Après une protection fonctionnelle de l'hydroxyle sous forme d'un acétate (**4**) on procède à une réduction de l'énone par Et_3SiH (**5**). Après déprotection on obtient le 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-méthylpyrényl)-20-one ou **Py-céto-chol** (**6**), présentant une jonction moins polaire que **2'**, et qui sera caractérisé par la suite. La silylation de **6** (rendement quantitatif) permet la protection de l'hydroxyle. Une réaction de Wittig permet d'obtenir un dérivé éthylénique (**8**), beaucoup plus satisfaisant au niveau du caractère polaire de la jonction cholestérol-pyrène et dont la résolution de

structure par cristallographie des rayons X est portée en annexe (dans le *supplementary material* de la publication, page A26). La deuxième sonde est alors obtenue après déprotection, c'est le 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-méthylpyrényl)-20-méthylidène ou **Py-met-chol** (**9**).

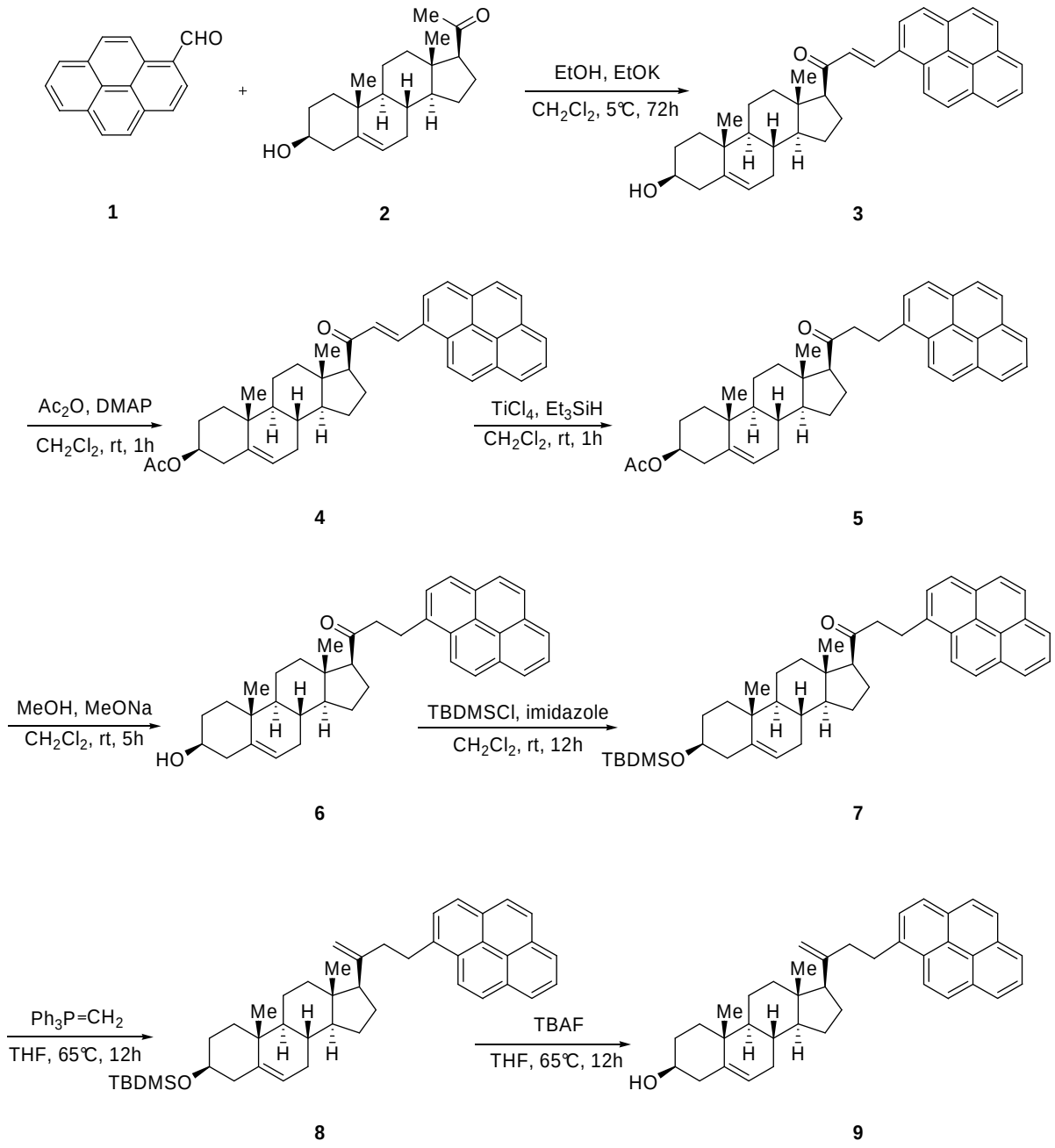


Figure 2.2. Schéma de la synthèse des sondes pyrène-cholestérol : 6 et 9.

Caractérisation des sondes pyrène-cholestérol

3

3.1 Études préliminaires des potentialités des sondes

3.1.1 Rappels sur la spectroscopie d'absorption et d'émission du pyrène

Globalement les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du pyrène monosubstitué (cas du Py-céto-chol et du Py-met-chol) sont comparables à ceux du pyrène (fig. 3.1). Cependant, comme cela a été observé pour le 1-méthyl-pyrène (Lianos et Georghiou 1979) ou pour diverses autres substitutions en position 1 (Yao et al. 2005), ils subissent un léger décalage de longueur d'onde vers le rouge (effet bathochrome). Ce phénomène est exacerbé lors d'une double substitution avec, par exemple, deux chaînes aliphatiques -$C_{21}H_{43}$ en positions 1/6 ou 3/8 (Brown et al. 2003). D'autre part le spectre d'émission de fluorescence de ces dérivés pyréniques a une structure vibronique moins fine que celle du pyrène. Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de la sonde Py-met-chol dans du dioxane sont illustrés dans la figure 3.2 A. Les bandes vibroniques des trois transitions électroniques des états singulets excités (S_0->S_1, S_0->S_2 et S_0->S_3) sont représentées, toutefois l'échelle d'intensité de la transition S_0->S_1 est multipliée par 10 afin de la mettre en évidence. En effet cette transition électronique est interdite pour des raisons de symétrie moléculaire, mais est néanmoins observable car les vibrations moléculaires provoquent des écarts par rapport à la symétrie parfaite. L'intensité des bandes vibroniques de cette transition est d'ailleurs augmentée par les évènements perturbant la symétrie du pyrène, telles les interactions avec des solvants polaires (effet Ham) ou la

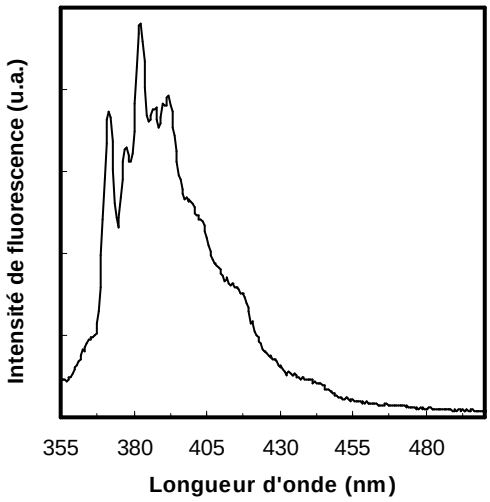


Figure 3.1. Spectre de fluorescence du pyrène à 1 µM dans du cyclohexane à 25°C. Excitation à 330 nm, BP_{ex}: 5 nm, BP_{em}: 2 nm.

substitution d'un groupe fonctionnel (Lianos et Georghiou 1979). Par conséquent le pyrène et ses dérivés sont généralement excités au niveau d'une des bandes vibroniques de la transition S_0->S_2, ce qui donne un déplacement de Stokes d'au moins 30 nm.

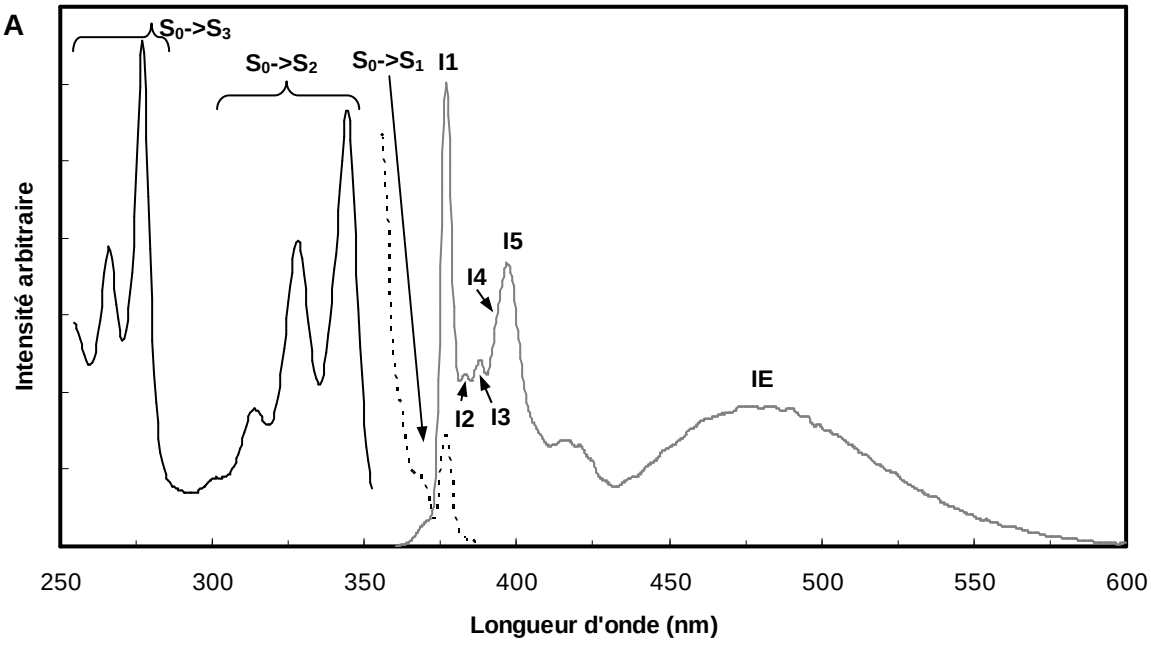


Figure 3.2 A.

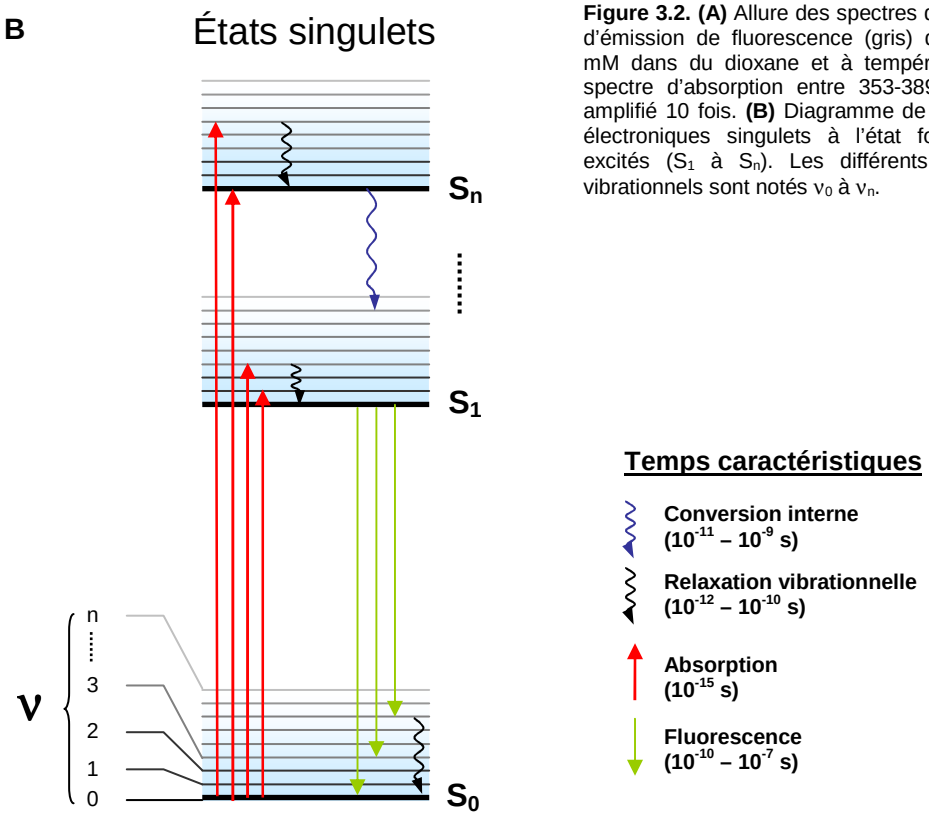


Figure 3.2. (A) Allure des spectres d'absorption (noir) et d'émission de fluorescence (gris) du Py-met-chol à 1 mM dans du dioxane et à température ambiante. Le spectre d'absorption entre 353-389 nm (pointillé) est amplifié 10 fois. **(B)** Diagramme de Jablonski des états électroniques singulets à l'état fondamental (S_0) et excités (S_1 à S_n). Les différents niveaux d'énergie vibrationnels sont notés ν_0 à ν_n.

Le spectre d'émission de fluorescence des sondes Pyrène-cholestérol, au même titre que celui du pyrène, consiste en différentes bandes vibroniques correspondant aux désexcitations radiatives entre le premier état singulet excité et l'état fondamental du monomère de pyrène (S_1->S_0) et ses niveaux d'énergie vibrationnels ν (fig. 3.2 A et B). Plus de 16 bandes ont été recensées dans ce spectres du monomère mais seules quelques unes sont suffisamment résolues et ont été notées de I à V (Kalyanasundaram et Thomas 1976). Dans le cas des sondes Pyrène-cholestérol je parlerai des bandes I1 (~376 nm), I2 (~384 nm), I3 (~388 nm), I4 (~393 nm) et I5 (~399 nm). On remarquera que les spectres d'excitation et d'émission ne sont pas l'image miroir l'un de l'autre comme le prévoit le principe de Franck-Condon, selon lequel une transition électronique se produit sans changement des positions des noyaux dans la molécule et son environnement (une transition électronique est un évènement qui prend 10^{-15} s alors que les vibrations moléculaires se font sur des temps plus longs de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-12} s). Cette exception est due à la longue durée de vie de l'état excité du monomère de pyrène (plusieurs centaines de nanosecondes), ce qui permet des réarrangements géométriques des noyaux pendant l'état excité du pyrène (Lakowicz 1999).

L'intensité de la bande de plus haute énergie en fluorescence I1 (transition radiative $S1^{v=0}$->$S0^{v=0}$ ou 0-0) qui coïncide avec la bande de la plus basse énergie en absorption (Bree et Vilkos 1964), est également sensible à la polarité du microenvironnement (Nakajima 1974, 1976). Kalyanasundaram et al. ont montré que la structure vibronique du spectre de fluorescence subissait des perturbations d'autant plus significatives que le solvant utilisé était polaire (moment dipolaire μ grand). Ils ont noté que la bande I1 subissait la plus grande variation d'intensité alors que la bande I3 (transition radiative $S1^{v=0}$->$S0^{v=2}$ ou 0-2) était relativement insensible à la nature des 39 solvants utilisés. Pour ces auteurs, l'effet dominant ces variations sont les interactions soluté-solvant de type dipôle-dipôle à l'état excité qui perturbent la symétrie de la molécule et donc accroissent l'intensité de la bande I1. Les mêmes comportement spectraux ont été rapportés pour des dérivés du pyrène, tel le 1-méthylpyrène (Lianos et Georghiou 1979a). Depuis il a été montré que ces accroissements d'intensité de la bande I1 étaient la conséquence d'un couplage vibronique entre l'état excité faiblement autorisé S1 et l'état excité fortement permis S2 (Karpovitch et Blanchard 1995). Ainsi la mesure du ratio d'intensité I1/I3 est

utilisée dans de nombreuses études pour rendre compte de la polarité de l'environnement du pyrène ou de ses dérivés dans des solvants ou des membranes biologiques.

Certains fluorophores peuvent s'auto-associer à l'état excité pour former une nouvelle entité, et le pyrène en est un bon exemple. À forte concentration volumique ou surfacique (respectivement en solution ou dans une bicouche lipidique) le pyrène et ses dérivés émettent de la fluorescence aux alentours de 475 nm (fig. 3.2 et 3.3 B). Cette nouvelle bande mal résolue, notée IE, est due à la désexcitation radiative d'un dimère excité. Plus précisément, l'association de deux monomères de pyrène, l'un à l'état excité et l'autre à l'état fondamental forment ce que l'on appelle un excimère (excimère dynamique) : ce terme est l'abréviation de dimère à l'état excité (excited-state dimer) (Birks 1970). L'analyse poussée des durées de vie de fluorescence de l'excimère dans des liposomes de DODAC (chlorure de distearyldimethylammonium) a montré que le processus de formation était assimilable à un phénomène en deux dimensions diffusionnellement contrôlé (Pansu et al. 1993): plus la concentration locale en pyrène augmente, plus la probabilité de former des excimères est grande et plus l'intensité de la bande IE est importante. La mesure du ratio IE/I3 dans des membranes permet donc d'accéder à une information diffusionnelle du pyrène (la bande I3 est uniquement proportionnelle à la concentration en sonde, dans la limite des problèmes de filtre interne). Pour que ce processus ait lieu il faut que les deux molécules de pyrène soient parallèles et à une distance d'environ 0.4 nm l'une de l'autre (Winnik 1993), ce qui explique que les membranes soient un environnement favorisant la formation d'excimères. Par exemple cette propriété a permis de mesurer la diffusion latérale et transversale du 1-palmitoyl-2-pyrènedécanoyl-phosphatidylcholine et de l'acide pyrène-décanoique dans des liposomes de phospholipides ainsi que les températures de transition de phase gel->fluide de ceux-ci (Galla et Hartmann 1980). D'autre part l'excimère montre une certaine sensibilité à la polarité de son environnement, avec un déplacement vers le rouge du spectre d'émission de fluorescence. Ce solvatochromisme évolue linéairement en fonction de la polarité du solvant, mais reste trop faible pour pouvoir travailler dans des environnements plus complexes telles que les membranes biologiques (~7 nm au maximum entre le n-heptane et le diméthylsulfoxide (DMSO)) (Castanheira et Martinho 1994).

3.1.2 Solubilité dans les membranes modèles de phospholipides

Les sondes ont été synthétisées dans le but d'être insérées dans des membranes biologiques naturelles (mais aussi modèles) afin de donner accès à la polarité du cœur de la membrane et dans la mesure du possible, à la distribution latérale du cholestérol. La sonde commerciale Py-ester-chol (Lagane et al. 2002), dont la jonction entre le cholestérol et le pyrène est une liaison ester, était faiblement soluble dans les membranes phospholipidiques (< 7 mol%) et ne pouvait pas être incorporée dans les membranes naturelles. Les jonctions des deux nouvelles sondes contiennent aucun (Py-met-chol) ou un (Py-céto-chol) hétéro-atome (il s'agit d'un oxygène). En fait, comme le cholestérol est amphiphile et le pyrène hydrophobe, on a diminué le caractère « polaire » de la jonction et on a accentué le caractère amphiphile des sondes. Il restait à vérifier ces propriétés de miscibilité dans un milieu structuré en bicouche lipidique.

On a donc commencé par vérifier leurs solubilités en déterminant leurs solubilités maximales respectives dans des vésicules phospholipidiques. Huang et al. ont déterminé que la solubilité maximale du cholestérol dans des membranes phospholipidiques dépendait de la nature de la tête polaire des phospholipides utilisés, mais pas de la longueur des chaînes acyles (Huang et al. 1999). En utilisant la technique de diffraction des rayons X, ils ont pu détecter la présence de cristaux de cholestérol anhydre se formant dans les échantillons où le cholestérol n'est pas totalement incorporé dans les liposomes. Ainsi ils ont trouvé des solubilités maximales de 66 mol% dans des vésicules de POPC et de 51 mol% dans des vésicules de POPE.

Les agrégats de pyrène ou de pyrène monosubstitué (encore appelés agrégats à l'état fondamental ou excimères statiques) ont des signatures spectrales caractéristiques, ce qui permet de les détecter avec une bonne sensibilité. En ce qui concerne la fluorescence, il a été reporté une translation vers le bleu de la bande d'émission mal résolue de l'excimère et une translation vers le rouge du spectre d'excitation lors d'agrégation du Py-ester-chol (Lagane 2001) et du pyrène-hydroxypropyl-cellulose (Winnik 1993) dans l'eau et du pentiptycène-bispyrényl dans le dichlorométhane (Yang et al. 2001). Un décalage vers le rouge du spectre d'émission a également été observé dans le cas du Py-ester-chol dans l'eau, de l'acide 1-pyrènebutyrique dans l'acétonitrile (Prodi et al. 2000) ou encore du 2'-O-(1-

pyrènylméthyl)uridine, un ARN modifié, lors de processus d'hybridation de l'ADN (Nakamura et al. 2005).

Les solubilités maximales des deux sondes ont été déterminées dans des liposomes de POPC (obtenus par sonication) en phase fluide (à température ambiante). La concentration en phospholipides est constante dans les suspensions (10^{-4} M), mais la fraction molaire en sonde croît de 17 mol% à 32 mol% pour le Py-met-chol et de 8 mol% à 28 mol% pour le Py-céto-chol. Avant d'effectuer des mesures d'absorption et de fluorescence, les agrégats de Pyrène-cholestérol présents dans le tampon sont éliminés par une centrifugation de 15 min à 15 000 × g (les agrégats sont plus denses que les

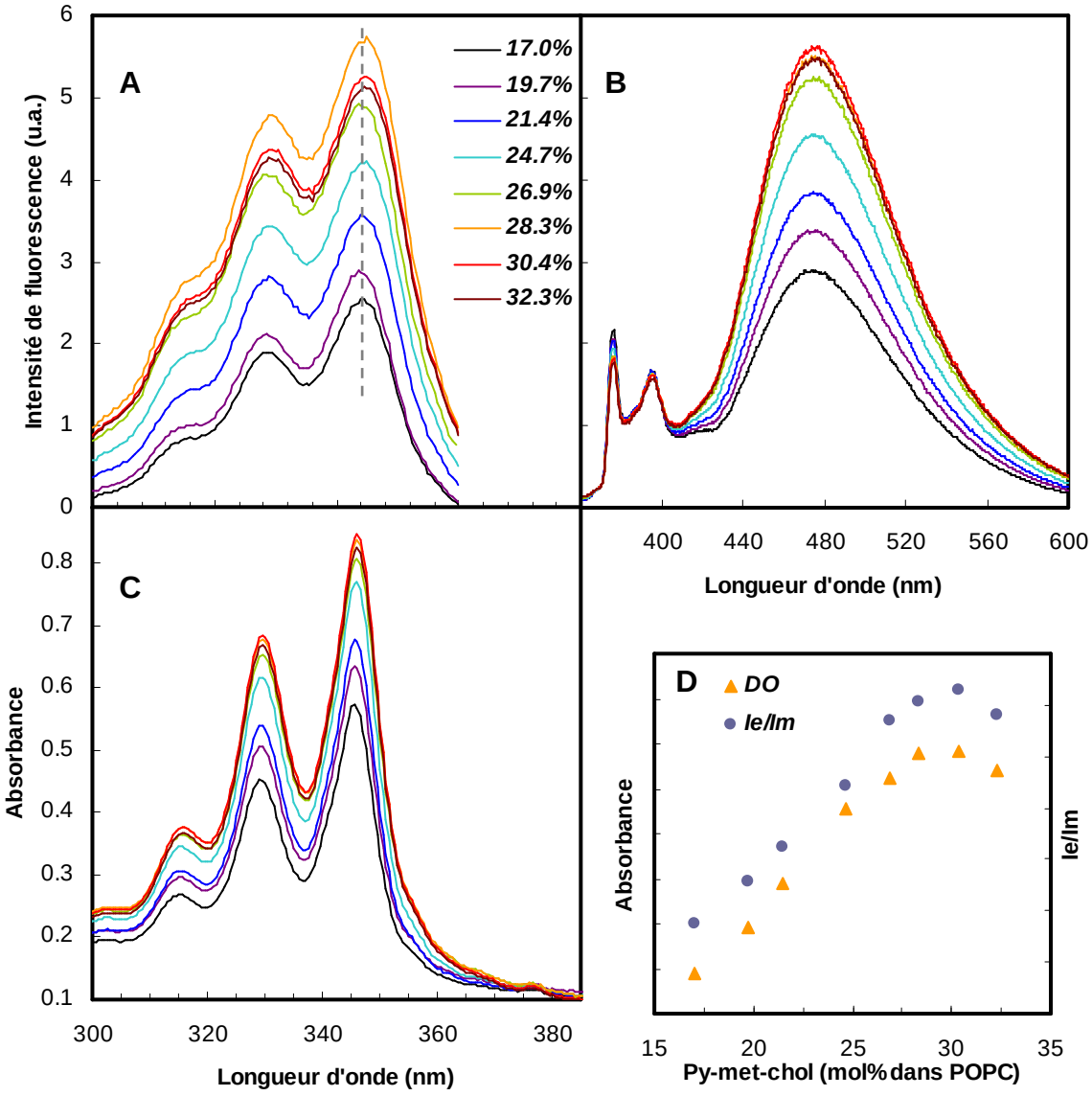


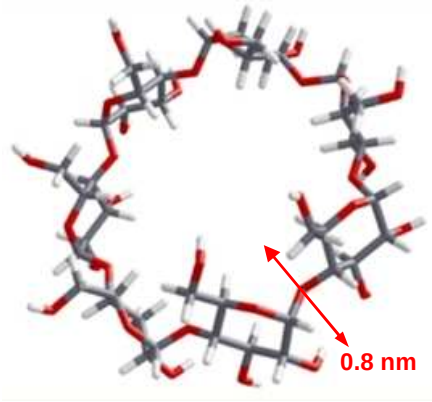
Figure 3.3. Détermination de la solubilité maximale du Py-met-chol dans des LUVs de POPC à température ambiante. (A) Spectres d'excitation (λ_{em} 476 nm), (B) spectres d'émission de fluorescence (λ_{ex} 330 nm) et (C) spectres d'absorption dans des LUVs de POPC contenant des fractions molaires croissantes de sonde. (D) Évolution de l'absorbance à 345 nm et du ratio d'intensité de fluorescence de l'excimère IE (476 nm) sur le monomère I3 (390 nm) en fonction de la fraction molaire de sonde. La bande passante en excitation et en émission est de 2 nm. Les spectres d'émission sont normalisés à 390 nm.

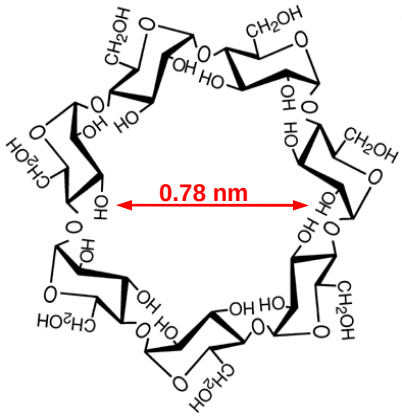
liposomes). Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.3. Les spectres d'absorption et de fluorescence donnent la même indication sur la solubilité maximale du Py-met-chol : l'évolution de l'absorbance à 345 nm du pyrène et du ratio de fluorescence IE/I3 en fonction de la fraction molaire en Py-met-chol est linéaire jusqu'à un plateau se situant à environ 28 mol%. Cela signifie qu'au delà de cette quantité critique, l'excédant de sondes (résultant des molécules qui ne peuvent plus être incorporées dans la membrane des liposomes) forme des agrégats dans le milieu aqueux. Comme les agrégats sont éliminés par centrifugation on observe un plateau à partir du moment où on a atteint la limite de saturation en sonde des liposomes de POPC. Néanmoins les spectres d'excitations du pyrène (fig. 3.3 A) révèlent une faible présence d'agrégats à 30.4 mol% et 32.3 mol% (léger décalage des spectres vers le rouge) ce qui montre d'une part que la centrifugation n'est pas entièrement efficace pour éliminer ces agrégats, et d'autre part que 28 mol% est bien la limite de solubilité du Py-met-chol. On peut également envisager qu'à ces fortes concentrations, des agrégats de sondes soient piégés à l'intérieur des liposomes. Il faut préciser que le coefficient d'absorption molaire (ε) du Py-met-chol dans ces conditions est constant jusqu'à 28 mol%. En ce qui concerne la sonde Py-céto-chol la solubilité maximale, déterminée selon le même protocole, est légèrement supérieure à 16 mol%. On voit ici l'influence de la présence de la fonction carbonyle (entre le cholestérol et le pyrène) au niveau de l'insertion de la sonde dans une bicouche lipidique. En effet les groupements cétone présentent des moments dipolaires importants (car accentués par les doublets d'électrons appariés de l'oxygène) ce qui leur confère une affinité pour l'eau et par conséquent rend la sonde moins hydrophobe. Ce phénomène est encore accentué dans le cas d'une liaison ester, d'où la faible solubilité de la sonde commerciale Py-ester-chol dans les bicouches (< 7 mol%).

3.1.3 Marquage des membranes plasmiques *in vivo*

Comme on vient de le voir les deux sondes pyrène-cholestérol s'insèrent sans problème dans les membranes biologiques lors de la formation des liposomes à partir de solutions chloroformiques de lipides. Mais étant donnée la très faible solubilité des sondes pyrène-cholestérol dans l'eau, cette technique n'est pas applicable quand il s'agit de les insérer directement dans des membranes naturelles

dans un environnement aqueux, telle que la membrane plasmique. Il faut alors faire appel à des méthodes de marquage membranaire indirectes faisant intervenir un « transporteur » de la sonde, entre le milieu d'incubation et la membrane cible. Les transporteurs les plus utilisés à l'heure actuelle sont les cyclodextrines (fig. 3.4). Les cyclodextrines forment une famille d'oligosaccharides cycliques composés de sous unités glucopyranose liées en α-(1,4) résultant de la dégradation de l'amidon par la bactérie *Bacillus macerans*. Trois familles sont principalement utilisées et étudiées : les α-, β- et γ-cyclodextrines selon qu'elles sont formées de 6, 7 ou 8 sous unités glucopyranose. Ces molécules en forme de tore ont une cavité plus hydrophobe que l'extérieur de l'anneau, toutefois sous leur forme naturelle les cyclodextrines sont peu solubles dans l'eau ; ainsi certaines ont été modifiées





MβCD : -OH = -OH ou -OCH3

Figure 3.4. β-cyclodextrine.

industriellement. C'est le cas des méthyl-β-cyclodextrines (MβCD), des β-cyclodextrines méthylées au niveau des groupements hydroxyle en position 2, 3 ou 6 de l'ose. Elles possèdent en moyenne 1.5 à 2 groupements méthyle par molécule de β-cyclodextrine. La taille de la cavité hydrophobe et l'hydrophobicité du lipide à transporter sont les deux caractéristiques qui entrent en jeu dans la capacité des cyclodextrines à incorporer des molécules. Par exemple les α-cyclodextrines ont un diamètre trop faible pour pouvoir transporter du cholestérol ou des phospholipides greffés avec un fluorophore (elles ne peuvent contenir qu'une seule chaîne acyle). Les γ-cyclodextrines ont été utilisées pour marquer des membranes cellulaires à partir de liposomes de POPC contenant des sondes Pyr_{10}-PC ou $diPyr_{10}$-PC (Tanhuanpaa et Somerharju 1999; Tanhuanpaa et al. 2001), cependant elles s'accordent mal au transport du cholestérol. En revanche les méthyl-β-cyclodextrines ont une affinité

plus forte pour le cholestérol que pour les autres lipides (Christian et al. 1997) et elles ont été décrites pour favoriser l'efflux du cholestérol des biomembranes lors d'utilisation à une concentration supérieure à 10 mM (Masserini et al. 2005; Huang et al. 2007). Elles jouent plutôt un rôle de navette (mouvements de cholestérol entre les vésicules et les cellules) si elles sont utilisées à des concentrations de l'ordre de 1 mM (Atger et al. 1997). Il semblerait que les cyclodextrines « capturent » préférentiellement, par un simple mécanisme collisionnel, les molécules de cholestérol membranaire en cours de désorption naturelle (Steck et al. 2002). Enfin, il a été montré qu'il était possible d'enrichir les membranes plasmiques en cholestérol en utilisant une solution de MβCD chargées en cholestérol. En effet la teneur en cholestérol des membranes plasmiques de cellules CHO est augmentée de 17 % en les incubant 1 heure à 37°C avec une solution à 5 mM de MβCD/cholestérol (8:1) (Christian et al. 1997; Lagane 2001). Si le choix s'est porté sur les MβCD pour l'incorporation des sondes pyrène-cholestérol, c'est qu'elles sont également capables d'incorporer les molécules de pyrène (Udachin et Ripmeester 1998; Suzuki et al. 2006), solubilisant alors davantage les sondes dans les milieux aqueux.

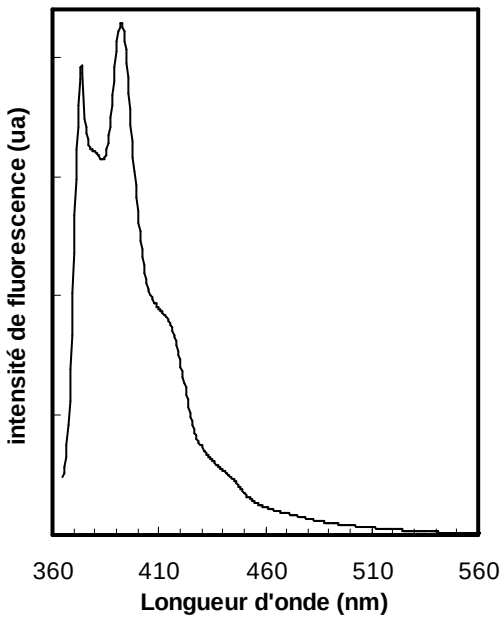


Figure 3.5. Spectre d'émission de fluorescence (λ_{ex} = 330 nm) de la solution de MβCD/Py-met-chol (75 :1) à 70 mM dans de l'eau. BP_{em}: 4 nm / BP_{ex}: 5nm.

La solution de marquage est préparée en dissolvant des MβCD dans de l'eau à 70°C (la haute température permet une meilleure solubilisation des cyclodextrines). Puis on y ajoute lentement une solution de Py-met-chol concentrée dans du DMF (point d'ébullition du DMF >> 70°C). Au final on obtient une solution de MβCD à 70 mM avec un rapport de 75 MβCD pour un Py-met-chol (plus tard ce rapport a été descendu à 60:1 avec une efficacité de marquage identique). Le spectre d'émission de fluorescence de cette solution est montré dans la figure 3.5 : de part l'allure du spectre on voit qu'il n'y a pas d'agrégats ni d'excimères et que le pyrène est complexé au MβCD en tant que monomère

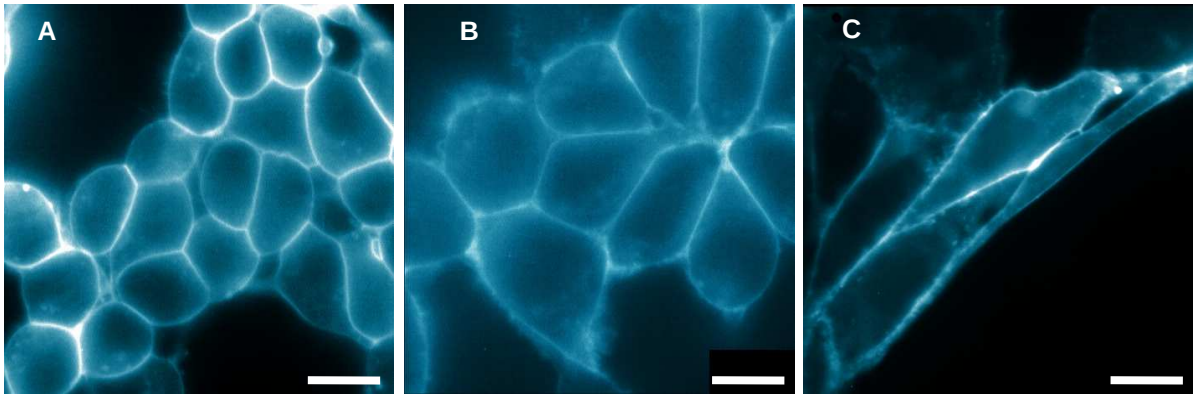


Figure 3.6. Microscopie en épifluorescence (fausse couleur) de différents types cellulaires à température ambiante. Les cellules sont incubées 2 min dans une solution de MβCD/Py-met-chol (75:1) à 2.5 mM dans du PBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+}. (A) Cellules SHSY-5Y-hMOR-GFP (B) HEK-CD4-GFP et (C) CHO-mDOR-GFP. La barre d'échelle fait 10 µm.

(Yorozu et al. 1982). En considérant la longueur théorique du Py-met-chol, on peut imaginer jusqu'à quatre MβCD par molécule de sonde. Par la suite la solution de marquage est diluée 30 fois dans un tampon physiologique (PBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+}) à 37°C pour préserver les cellules : on obtient une concentration finale en MβCD de 2.5 mM et moins de 0.03 % de DMF. Après deux rinçages au PBS, les cellules sont incubées pendant 2 minutes avec la solution de marquage (on est loin des 60 minutes nécessaires à la déplétion des membranes en cholestérol). Le milieu est alors rincé 6 fois avec du PBS. La figure 3.6 montre des images en microscopie en épifluorescence en champ large observées avec un objectif 63× à huile de différents types cellulaires traités selon ce protocole mais avec une incubation de 5 minutes afin d'observer le marquage au microscope (car les jeux de filtres ne sont pas optimisés pour l'observation du pyrène). Les images correspondent à des lignées de cellules SHSY-5Y (lignée de neuroblastomes humains) sur-exprimant le récepteur membranaire µ opioïde fusionné à la Green Fluorescent Protein (GFP), des cellules HEK (lignée de cellules rénales humaines) sur-exprimant le co-récepteur membranaire CD4 et des cellules CHO (lignée de cellules d'ovaires de hamster) sur-exprimant le récepteur membranaire δ opioïde fusionné à la GFP. Dans ces trois systèmes cellulaires très différents le marquage est intense et spécifiquement membranaire, ce qui prouve l'efficacité de la méthode de marquage. À température ambiante très peu d'internalisation est observée, même 45 minutes après l'incubation. La quantité de sondes insérée dans les membranes peut-être contrôlée en modifiant la concentration en MβCD/sonde du milieu d'incubation ou bien en jouant sur le temps d'incubation des cellules. Enfin, le taux de marquage est quantifiable par spectrofluorimétrie (voir

chapitre 3.3.1).

3.1.3.1 Test de toxicité cellulaire

Étant donnée l'utilisation des sondes dans le suivi de processus biologiques sur des cellules vivantes, il a été nécessaire de s'assurer de la non-toxicité cellulaire des molécules de Pyrène-cholestérol au cours du temps. En effet le pyrène, comme tous les hydrocarbures poly-aromatiques, est cytotoxique (*cf.* fiche INERIS DRC-02-25590-02DF51). L'ingestion et l'application cutanée de pyrène ont été étudiées à l'échelle de l'organisme chez de nombreuses espèces aquatiques, un milieu subissant directement les pollutions industrielles. Par exemple chez *Carcinus maenas* (un crabe marin) il s'avère que le pyrène s'accumule dans certains tissus (muscle, épiderme) alors qu'il est dégradé par le foie et le rein, des organes spécialisés dans la détoxification et l'excrétion des toxines. Cette accumulation (sur plusieurs jours) aboutie à la mort des crabes exposés (Dam et al. 2006). Des résultats similaires ont été obtenus chez *Palaemonotes pugio*, la crevette des estuaires (Oberdorster et al. 2000). Chez l'homme, et au niveau cellulaire, le pyrène est hydrolysé en 1-hydroxypyrène par les différents cytochromes P450 (hydroxylases localisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et des mitochondries) puis en 1,6-, 1,8-dihydroxy et 4,5-dihydrodiolpyrène. Ces dérivés hydroxylés sont des composés hydrosolubles plus facilement excrétés par les cellules via des protéines membranaires spécialisées comme la P-glycoprotéine. Ces enzymes de détoxification sont présentes et actives à des degrés variables dans les différents tissus.

Mais si le pyrène est capable de traverser les différentes membranes cellulaires, la nature amphiphile des sondes Pyrène-cholestérol leur permet d'être mieux ancrées dans la membrane plasmique. Ainsi on peut supposer que ce sont principalement les voies métaboliques classiques de recyclage membranaire qui sont susceptibles d'amener les sondes vers les différentes organelles cellulaires. En ce qui concerne le cholestérol, on connaît relativement bien les principales voies d'internalisation constitutive qui sont dépendantes des vésicules lipidiques cytoplasmiques (vésicules golgiennes et endosomes). Cependant l'inhibition des ces voies (par l'utilisation de drogues bloquant le cytosquelette) n'empêche pas complètement l'internalisation du cholestérol membranaire, ce qui

suggère d'autres modes de recyclage, encore méconnus aujourd'hui. Dans tout les cas ces voies convergent vers le réticulum endoplasmique où le cholestérol est estérifié et stocké dans des gouttelettes lipidiques (Soccio et Breslow 2004). L'estérification est effectuée par une acyl-coenzyme A:cholestérol acyltransférase (ACAT) qui catalyse la réaction entre l'acide d'une chaîne acyle saturée d'une phosphatidylcholine et l'hydroxyle en position 3β du cholestérol. Ce processus permet d'empêcher l'accumulation cytosolique de cholestérol libre, toxique pour la cellule. On sait par exemple que l'inhibition de l'ACAT dans des macrophages induit une accumulation de cholestérol libre dans la cellule et la libération de lactate déshydrogénase et d'adénine, des marqueurs de l'apoptose (Warner et al. 1995). Parmi les conséquences de la dérégulation des mouvements rétrogrades du cholestérol, on observe généralement un déséquilibre membranaire du rapport cholestérol/phospholipides (ce qui altère les propriétés physiques de la membrane plasmique et donc ses nombreuses fonctions) et l'apparition de cristaux de cholestérol provoquant des dommages physiques aux organelles et favorisant la formation d'oxystérols toxiques (Tabas 2002).

S'il reste difficile de prévoir le catabolisme des sondes Pyrène-cholestérol dans les cellules, il est clair qu'il y a peu d'internalisation des ces sondes à température ambiante dans les cellules eucaryotes à l'état basal, même 45 minutes après leur incorporation dans les membranes plasmiques. Néanmoins nous avons menés des tests de survie cellulaire à court et moyen termes sur des cellules CHO à l'aide de bleu Trypan, un colorant traversant les membranes cellulaires qui est expulsé par les cellules viables et accumulé par les cellules en apoptose. Brièvement, différents lots de cellules (un lot par condition) cultivés à 37°C dans du milieu de culture, subissent un traitement de 5 minutes avec une solution de MβCD/Pyrène-cholestérol (75:1) à 2.5 mM dans du PBS ; les cellules sont alors rincées et remises en culture. Pendant la première heure, un lot de cellules est incubé avec une solution de bleu Trypan toutes les 10 minutes puis rincé de nouveau. On compte alors le nombre de cellules ayant incorporé le colorant dans leur noyau et on compare avec un lot témoin non incubé avec les MβCD/Pyrène-cholestérol. Ensuite le test se poursuit 5, 24 et 48 heures plus tard. Les résultats n'ont montré strictement aucune différence entre les cellules traitées et les témoins au niveau du nombre de cellules totales, du nombre de cellules en apoptose ou encore de la forme des cellules, les critères

classiques dans ce genre d'approche. On peut ainsi conclure que les sondes Pyrène-cholestérol ne sont pas toxiques pour les cellules à court ou à moyen terme.

3.1.4 Sensibilité du groupement pyrène à la polarité de l'environnement

3.1.4.1 Qu'est ce que la polarité ? Les différentes échelles de mesure.

Il est bien connu que le solvant a une grande influence sur la vitesse des réactions, la position d'un équilibre chimique ou encore les bandes spectrales mesurées par diverses techniques spectroscopiques (UV-visible, infrarouge, RMN, déplacements solvatochromiques…). Ces phénomènes sont la conséquence des interactions soluté-solvant, mettant en jeu des interactions de type Van der Waals ou des interactions spécifiques comme les liaisons hydrogène (Valeur 2004). Ainsi l'état fondamental ou excité d'un chromophore/fluorophore est plus ou moins stabilisé par les molécules de solvants qui l'entourent. Mais que représente la polarité d'un solvant ? Pour répondre à cette question il faut considérer les interactions non-spécifiques telles que celles générées par les moments dipolaires (somme vectorielle de tous les moments dipolaires des liaisons d'une molécule). En solution, les interactions résultent non seulement des moments dipolaires permanents des molécules de soluté ou de solvant (interaction dipôle-dipôle), mais aussi de leurs polarisabilités (interaction dipôle-dipôle induit). La polarisabilité correspond à l'induction d'un moment dipolaire « temporaire » d'une molécule par une autre molécule ayant un moment dipolaire non nul. De plus le caractère donneur/accepteur de liaisons hydrogène est une composante à prendre en compte pour certains solvants/solutés. Par conséquent le terme polarité reflète toutes les interactions soluté-solvant spécifiques et non spécifiques et ne peut être caractérisé par un seul paramètre. Ainsi il existe une multitude d'échelles de mesure de la polarité d'un solvant, selon que le critère choisi caractérise le solvant (par exemple la constante diélectrique, le moment dipolaire des molécules de solvants, la polarisabilité réorientationnelle…) ou l'influence du solvant sur une propriété physique d'un soluté particulier (cas du solvatochromisme). On va s'intéresser plus particulièrement à la deuxième approche, qui a permit aujourd'hui de

construire différentes échelles empiriques de polarité se basant sur des paramètres d'absorption et de fluorescence de chromophores.

Le paramètre Z de Kosower par exemple (Kosower 1958, 1958a) correspond à l'énergie de la transition électronique (kcal·mol^{-1}) de la bande d'absorption maximale du 1-alkyl-pyridinium. En effet cette énergie est proportionnelle au degré de complexation de ce composé avec l'ion iodure dans les solvants ou les mélanges solvant/eau. Cette échelle reflète principalement le potentiel d'ionisation du solvant sur le complexe.

Une autre échelle communément utilisée est l'échelle basée sur le paramètre $E_T(30)$. Ce paramètre représente l'énergie de transition électronique (kcal·mol^{-1}) de la première bande d'absorption d'une bétaïne (à 25°C, 100 kPa) dont le déplacement solvatochromique négatif est exceptionnellement grand (Reichardt et al. 1988). Cela s'explique par un moment dipolaire très élevé à l'état fondamental (forme zwitterionique) et quasi nul à l'état excité du fait d'un transfert d'électron intramoléculaire. Depuis, d'autres bétaïnes plus hydrophobes ont été synthétisées dans le but d'être utilisées dans des solvants non polaires (Reichardt 1998, 2004) et ainsi d'augmenter le nombre de références $E_T(30)$. Selon les auteurs cette échelle reflète préférentiellement la polarité/polarisabilité et la capacité à céder un hydrogène du solvant.

Une autre échelle qui reste une référence en la matière, est l'échelle linéaire multiparamétrique π^* de Kamlet et Taft (Kamlet et al. 1981; Kamlet et al. 1983). Cette échelle a la particularité d'avoir été établie à partir de la moyenne d'un très grand nombre de composés et de données spectrales et prend en compte les interactions spécifiques et non spécifiques entre le soluté et le solvant. La variation d'une quantité observable XYZ en fonction de la polarité peut être mise sous la forme générale suivante :

$$XYZ = XYZ_0 + s \cdot (\pi^* + d \cdot \delta) + a \cdot \alpha + b \cdot \beta \quad \textbf{Eq.1}$$

où π^* exprime les effets de polarité/polarisabilité du solvant ; α et β reflètent respectivement les caractères donneur et accepteur de liaisons hydrogène et δ est un terme de correction de polarisabilité égal à 0 pour les solvants aliphatiques non chlorés, 0.5 pour les chlorés aliphatiques et 1 pour les

aromatiques. Enfin s, a, b et d sont des coefficients décrivant l'importance relative de chaque contribution. La quantité observable XYZ peut être en particulier l'intensité ou la longueur d'onde d'une bande d'absorption ou d'émission de fluorescence, ce qui permet de construire de nouvelles échelles. Ainsi Dong et Winnik ont mesuré la valeur du rapport d'intensité de fluorescence I1/I3 du pyrène dans 94 solvants et établi une nouvelle échelle de polarité appelée « échelle Py » (Dong et Winnik 1984). Ces valeurs ont alors été comparées aux échelles Z et $E_T(30)$ citées précédemment et il s'avère que les corrélations sont excellentes si l'on considère deux populations distinctes de solvants : les solvants protiques et aprotiques. De même les auteurs ont obtenu de bonnes corrélations avec le paramètre π^* en introduisant le caractère aromatique des solvants. Enfin ils ont pu établir une relation linéaire entre la valeur de I1/I3 et la nature des solvants grâce à l'échelle multiparamétrique de Kamlet et Taft.

3.1.4.2 Sensibilité de la sonde Py-met-chol à différents solvants

Avant toute chose il est nécessaire de préciser que la mesure du ratio I1/I3 doit être réalisée de manière à éviter certains artefacts expérimentaux. Pour commencer les solutions de Py-met-chol ont une concentration d'au plus 1 µM (absorbance < 0.05) pour éviter les problèmes de filtres internes (en excitation et en émission) dus au soluté s'il est présent en trop grande quantité. Ensuite le solvant doit avoir la même absorption au niveau des longueurs d'onde de I1 et I3 pour éviter une réabsorption

Solvants	I1/I3	polaire	protique	hétérocyclique	$E_T(30)$	Z	π^*
Cyclohexane	**1.59**	-	-	-	30.9	60.1	0
1-butanol	**1.90**	++	++	-	49.7	77.7	0.47
Chloroforme	**2.02**	-	-	-	37.4	63.2	0.58
Éthanol	**2.03**	++	++	-	51.9	79.6	0.54
Méthanol	**2.11**	++	++	-	55.4	83.6	0.6
Acétate d'éthyle	**2.12**	-	-	-	38.1	64	0.55
1,4 Dioxane	**2.15**	-	-	+	36	64.6	0.55
Tétrahydrofurane (THF)	**2.22**	-	-	+	37.4	58.8	0.58
Diméthyl Formamide (DMF)	**2.38**	++	-	-	43.2	68.5	0.88
Acétone	**2.45**	++	-	-	42.2	65.7	0.71
Acétonitrile	**2.49**	++	-	-	45.6	71.3	0.75
Diméthyl Sulfoxide (DMSO)	**2.59**	++	-	-	45.1	70.2	1

Tableau 3.1. Valeurs dans un ordre croissant des rapports de fluorescence I1/I3 du Py-met-chol dans différents solvants. Pour chaque solvant sont donnés les caractères protique, aprotique et aromatique ainsi que leurs valeurs sur les échelles $E_T(30)$, Z et π^*.

différentielle (filtre interne du solvant) de la fluorescence du pyrène. Ainsi tous les solvants utilisés dans mon étude sont dédiés à la spectroscopie UV-vis. La largeur de la fente d'émission (BP_{em}) du spectrofluorimètre à également une incidence sur la valeur du rapport I1/I3: en règle générale en spectroscopie de fluorescence, pour acquérir un spectre finement résolu il faut une largeur de BP_{em} égale au dixième de la largeur à mi-hauteur du pic considéré. Pour la bande I1 la largeur recommandée, tout en gardant un bon rapport signal/bruit, est de l'ordre de 1 à 2 nm (Street et Acree 1986). Enfin le pyrène est excité à 330 nm pour éviter la mesure d'une bande Raman (déplacement Stokes) au niveau de la bande I1 du spectre d'émission de fluorescence dont la contribution serait trop grande comparée à la fluorescence du pyrène à ces faibles concentrations.

Nous avons contrôlé la sensibilité du pyrène monosubstitué du Py-met-chol à la nature de quelques solvants protiques, aprotiques et hétérocycliques. Les rapports I1/I3 ainsi calculés sont rassemblés dans le tableau 3.1. Une première analyse révèle que les rapports I1/I3 sont les plus faibles dans les solvants apolaires avec une exception pour les solvants protiques (éthanol, butanol et méthanol) pour lesquels les rapports sont assez faibles. On observe d'ailleurs que $I1/I3_{butanol} < I1/I3_{ethanol} < I1/I3_{methanol}$ ce qui montre que pour les alcools la sonde Py-met-chol est sensible au caractère acide du solvant puisque ce caractère est inversement proportionnel à la longueur de la chaîne aliphatique de l'alcool (Lianos et Georghiou 1979). Ce résultat est cohérent avec le fait que le pyrène est une base faible et par conséquent la perturbation de la symétrie de la molécule est plus grande avec le méthanol ce qui engendre une plus grande augmentation de l'intensité de la bande I1. De plus on remarque que les deux solvants hétérocycliques (dioxane et THF) sont les solvants apolaires pour lesquels les

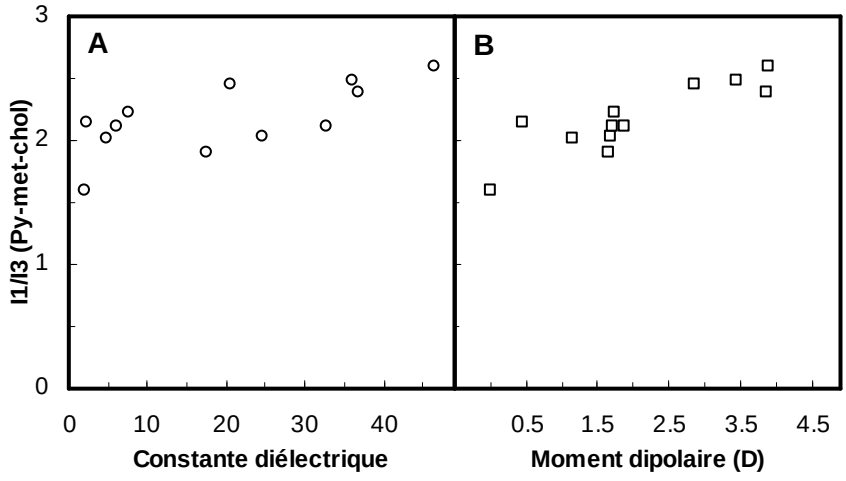


Figure 3.7. Évolution des rapports de fluorescence I1/I3 du Py-met-chol à température ambiante dans différents solvants en fonction de la constante diélectrique (A) et du moment dipolaire (B).

valeurs I1/I3 sont les plus grandes. Ces résultats sont en parfait accord avec les mesures de Dong et Winnik pour le pyrène comme nous le montre la figure 3.8 C. On a d'ailleurs une relation linéaire entre les valeurs de I1/I3 du Py-met-chol (échelle Py^{chol}) et l'échelle Py du pyrène ($r^2 = 0.95$):

$$Py^{chol} = 0.73 \cdot Py + 1.15 \quad \textbf{Eq.2}$$

En traçant l'évolution du rapport I1/I3 en fonction de la constante diélectrique ou du moment dipolaire du solvant (fig. 3.7 A et B) on s'aperçoit que I1/I3 a tendance à augmenter lorsque ces deux paramètres croissent, bien qu'il soit difficile d'établir une corrélation nette. Donc ces deux paramètres jouent un rôle non négligeable dans la sensibilité du spectre d'émission de fluorescence du Py-met-chol à la nature des solvants, comme l'avaient déjà remarqué Kalyanasundaram et al. pour le pyrène.

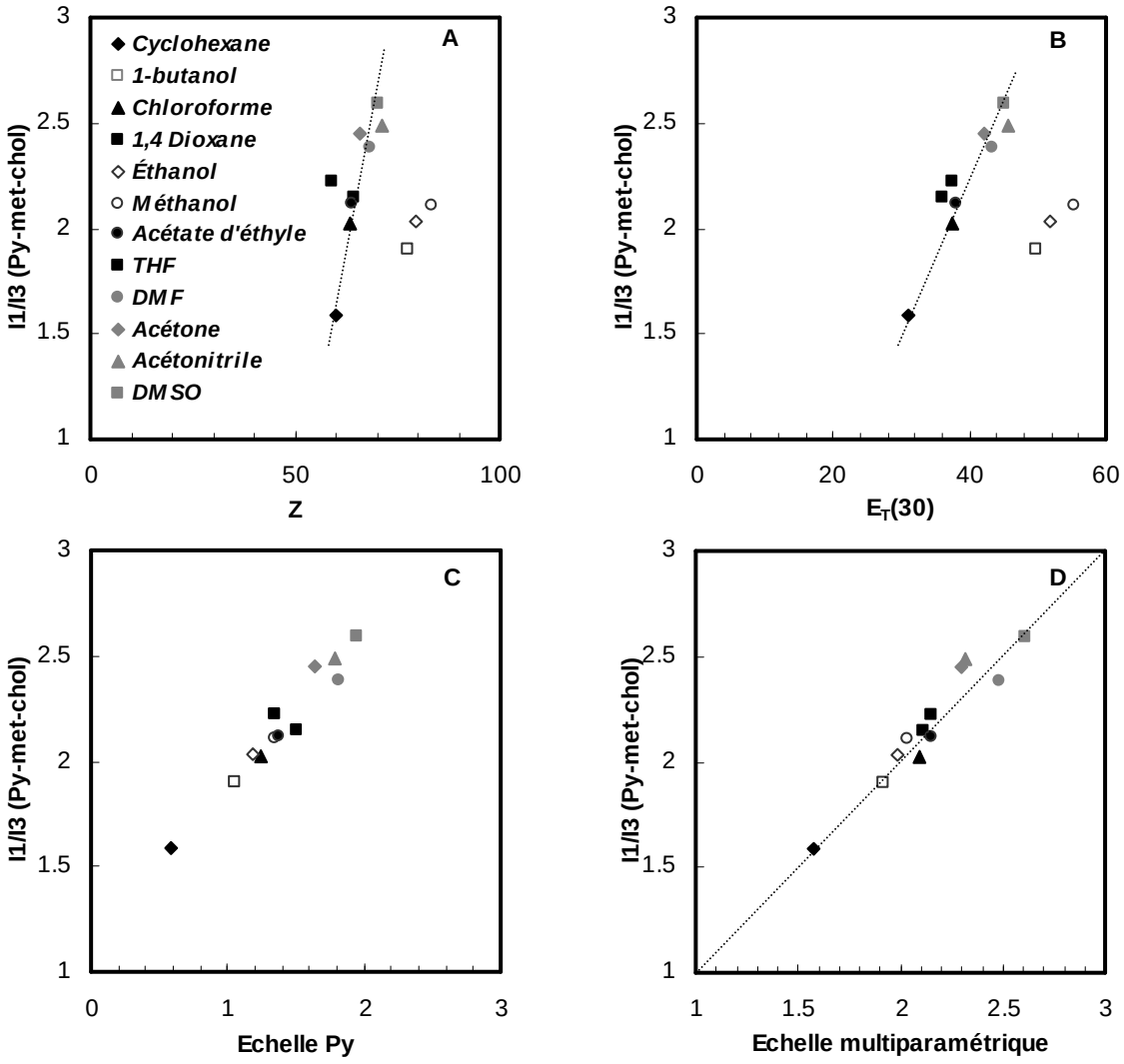


Figure 3.8. Évolution du rapport d'intensité de fluorescence I1/I3 du Py-met-chol dans 12 solvants organiques à température ambiante en fonction de l'échelle Z (A), de l'échelle $E_T(30)$ (B), de la valeur I1/I3 du pyrène selon Dong & Winnik (C) et de l'échelle multiparamétrique π^* (D). Solvants polaires protiques (blancs) ; solvants polaires aprotiques (gris) ; solvants apolaires (noirs) ; solvants apolaires aromatiques (carrés noirs)

Maintenant si l'on s'intéresse à l'évolution du rapport I1/I3 en fonction des échelles de polarité usuelles telles que celle de Kosower ou de Reichardt, on voit que l'influence du solvant sur la fluorescence du Py-met-chol est bien fonction de sa nature (fig. 3.8 A et B). On détecte ainsi trois groupes : les solvants protiques, aprotiques et aromatiques, ce qui est consistant avec la littérature. L'influence des solvants protiques a déjà été discutée et très peu de données sont disponibles sur les interactions spécifiques entre le groupement pyrène et les composés hétérocycliques d'autant que dans notre cas précis les conséquences sur la valeur de I1/I3 sont faibles. De plus Zou et al. ont observé une bonne corrélation entre les valeurs I1/I3 et les échelles Z et $E_T(30)$ en prenant en compte les solvants aromatiques (Zou et al. 2001). De même les solvants polychlorés (ici le chloroforme) ont été décrits comme corrélant mal ces deux échelles (Dong et Winnik 1984; Catalan 1997), ce qui n'est pas détecté ici. Ces différents résultats montrent bien qu'on ne peut pas caractériser un solvant en fonction d'un unique paramètre et qu'il est nécessaire d'utiliser une approche multiparamétrique (prise en compte des interactions spécifiques et non spécifiques) afin d'établir une relation linéaire entre l'échelle Py^{chol} (I1/I3 du Py-met-chol) et les caractéristiques des solvants. Pour cela on prend comme point de départ la bonne corrélation observée entre les valeurs Py^{chol} et le paramètre π^* pour les solvants aprotiques ($r^2 = 0.87$), ainsi on obtient:

$$Py^{chol} = 1.03 \cdot \pi^* + 1.58 \qquad \textbf{Eq.3}$$

Il suffit alors d'intégrer les autres termes de l'échelle de Kamlet et Taft prennant en compte d'une part le caractère accepteur de liaisons hydrogènes des solvants (α) et d'autre part leur caractère aromatique (δ) (dans notre cas hétérocyclique). Le pyrène n'étant pas un donneur de liaisons hydrogène, la variable *b* de l'équation (**1**) est donc égale à zéro. Ainsi on peut obtenir une relation linéaire entre ces trois paramètres et construire une échelle de polarité apparentée à l'échelle Py déjà existante. Les valeurs optimales calculées nous donnent la relation suivante :

$$Py^{chol} = 1.58 + 1.03 \cdot (\pi^* - 0.03 \cdot \delta) - 0.18 \cdot \alpha \qquad \textbf{Eq.4}$$

Cette relation est représentée sur la figure 3.8 D et améliore le coefficient de corrélation ($r^2 = 0.91$). Les valeurs respectives des variables *d* et *a* (**1**) caractérisent bien la faible sensibilité du Py-met-chol pour les solvants aromatiques/hétérocycliques et la grande sensibilité pour les solvants protiques. Ces résultats concordent avec ceux de Dong et Winnik, bien que ces auteurs trouvent une valeur de *d* supérieure.

Enfin il faut considérer le cas d'un dernier solvant : l'eau. Si le pyrène a une solubilité relative dans l'eau, au voisinage de 4×10^{-7} M (Stepanek et al. 1998) les sondes Pyrène-cholestérol y sont quasiment insolubles, ce qui n'autorise pas de mesures quantitatives en fluorescence (formation d'agrégats). On doit alors se baser sur la valeur de l'échelle Py en utilisant la relation linéaire (**2**) afin d'obtenir une valeur calculée de 2.51 pour l'eau sur l'échelle Py^{chol}, ce qui place ce solvant entre l'acétonitrile et le DMSO, conformément aux observations de Dong et Winnik.

La sonde Py-met-chol a donc la réponse adéquate pour sonder le cœur des membranes biologiques (chaînes hydrocarbonées des acides gras des phospholipides) correspondant à un environnement apolaire aliphatique dans lequel on trouve les valeurs de I1/I3 les plus faibles et contenant plus ou moins de molécules d'eau (l'eau donne une des plus fortes valeurs de I1/I3). Par conséquent le Py-met-chol devrait être très sensible à la perméabilité à l'eau des membranes biologiques.

Pour terminer, un point important qu'il faut aborder est la question de l'influence de la température sur le rapport I1/I3. En effet il a été rapporté que la valeur de I1/I3 du pyrène diminuait quand la température augmentait. Ce phénomène semble plus prononcé avec les solvants polaires, avec une légère diminution de I1/I3 entre 25°C et 37°C (température physiologique) de l'ordre de 2 % dans

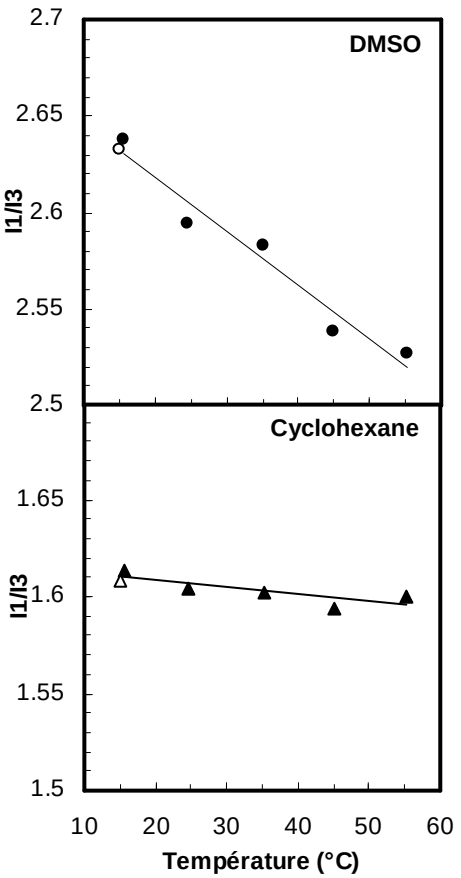


Figure 3.9. Évolution du rapport I1/I3 du Py-met-chol à 1 µM dans du DMSO et du cyclohexane en fonction de la température. Les symboles blancs représentent les mesures à 15°C après passage à 55°C.

du DMSO et 1.4 % dans du dibutyle éther (Waris et al. 1988). L'influence de la température sur la fluorescence du Py-met-chol a donc été menée dans un solvant polaire (DMSO) et dans un solvant apolaire (cyclohexane): le rapport I1/I3 du Py-met-chol à une concentration de 1 µM en solution est mesuré en augmentant la température de 15 à 55°C puis de nouveau à 15°C pour vérifier la réversibilité du processus (fig. 3.9). On retrouve la tendance observée par Waris et al. avec une diminution plus importante du rapport I1/I3 dans le DMSO (-1.15 % entre 25 et 37°C) que dans un solvant apolaire comme le cyclohexane (seulement -0.3 % entre 25°C et 37°C). On peut considérer que l'augmentation de la température de l'échantillon diminue quantitativement les interactions entre le groupement pyrène et les molécules de solvants, se traduisant par une diminution de l'intensité de fluorescence de la bande I1. Ce phénomène a alors une amplitude plus grande dans les solvants où I1/I3 est grand. La diminution de la constante diélectrique des solvants avec la température peut aussi expliquer ces observations : la constante diélectrique du cyclohexane étant déjà faible ($\varepsilon = 2.02$) on comprend pourquoi le rapport I1/I3 du Py-met-chol diminue très peu dans ce solvant.

3.2 Comportement des sondes vis-à-vis du cholestérol dans des milieux modèles

Il est évident que la présence même de molécules de sonde Pyrène-cholestérol dans les membranes phospholipidiques perturbe les propriétés physico-chimiques de celles-ci et le fait que les sondes soient solubles dans de tels milieux ne donne pas d'indication sur la nature des interactions Pyrène-cholestérol-phospholipides, autrement dit sur la perturbation qu'elles induisent. Une façon d'appréhender ce phénomène est de faire des études comparatives entre les sondes et le cholestérol, dont le comportement dans les membranes est très étudié, notamment dans des travaux sur des monocouches lipidiques, de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ou de RMN-^{2}H dans des mélanges binaires avec des phospholipides. Ainsi ces deux dernières techniques ont été utilisées avec la sonde Py-met-chol (la plus soluble des deux sondes) dans des suspensions multilamellaires (MLV) de DPPC. De plus l'analyse de la distribution latérale des deux sondes dans la membrane a été menée dans des suspensions unilamellaires (LUV) composées de différents phospholipides selon une

approche originale mise au point par l'équipe d'André Lopez et utilisée dans l'étude de la sonde Py-ester-chol (Lagane et al. 2002). Les différents résultats obtenus sont présentés dans la partie qui suit.

3.2.1 Mesure de la perturbation de phase du DPPC induite par la sonde Py-met-chol

L'influence du cholestérol sur les différents états de phase du DPPC a été intensivement décrite ces vingt-cinq dernières années, c'est la raison pour laquelle ce phospholipide a été utilisé pour l'étude comparative Py-met-chol et du cholestérol en DSC et RMN-^{2}H.

3.2.1.1 Étude par calorimétrie différentielle à balayage

La DSC est une technique thermodynamique non invasive très utilisée dans la détermination des diagrammes de phase des lipides dans les membranes modèles et naturelles. On trouve ainsi beaucoup de données sur des mélanges binaires stérols/phospholipides. D'un point de vue général, la température de transition de phase rend compte de l'énergie qu'il faut fournir pour rompre la cohésion moléculaire caractéristique d'un système membranaire dans un état ordonné tel que la phase lβ (phase gel). Cette cohésion est entre autre assurée par les liaisons de faibles énergies au niveau des chaînes hydrophobes (liaisons de Van der Waals). Brièvement, un échantillon d'une suspension de MLVs d'un phospholipide donné est placé dans une capsule scellée et mise dans un des deux fours du calorimètre. Une capsule de référence contenant de l'air et placée dans l'autre four et les deux fours sont maintenus à la même température. Ainsi lorsque qu'une transformation exothermique ou endothermique (c'est le cas de la transition de phase gel-fluide ou lβ-lα, une transition du premier ordre correspondant à la fusion des phospholipides) se produit dans l'échantillon, la chaleur du four est ajustée afin de compenser la variation d'énergie. La différence de chaleur apportée (ΔT), proportionnelle à l'énergie de fusion des phospholipides (ΔH_f), est alors directement recueillie en fonction de la température. On obtient ainsi des endothermes tels que ceux présentés dans la figure 3.10 pour des MLVs de DPPC contenant différentes fractions molaires de cholestérol ou de Py-met-chol. En ce qui concerne les

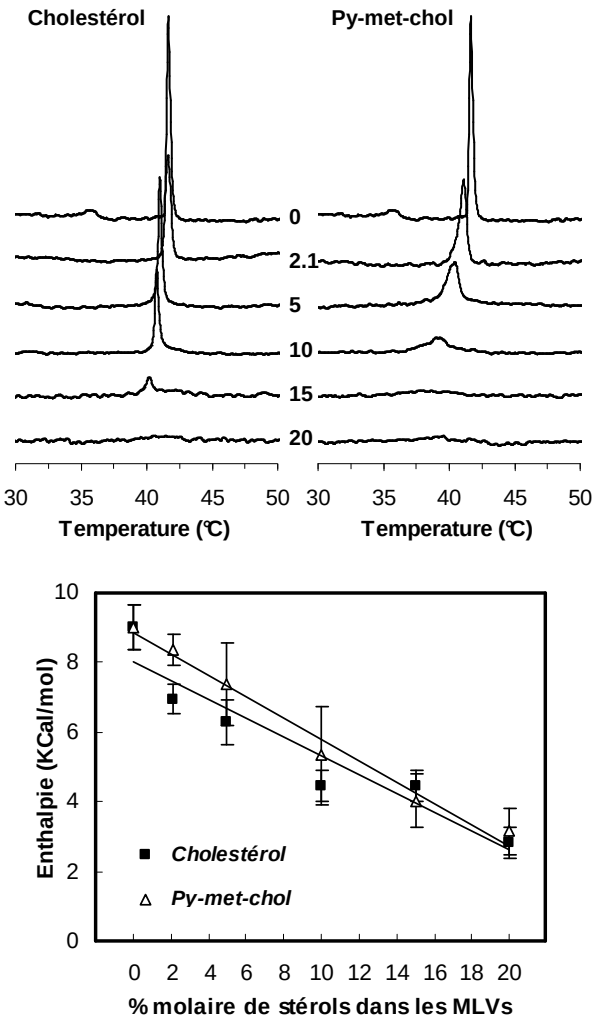


Figure 3.10. Étude comparative de DSC sur des suspensions de MLVs de DPPC contenant 0, 2.1, 5, 10, 15 et 20 mol% de cholestérol ou de Py-met-chol. En haut : thermogrammes, en bas : évolution de l'enthalpie de la transition gel-fluide du DPPC.

suspensions multilamellaires de DPPC et de DPPC/cholestérol, les endothermes enregistrés sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature (McMullen et McElhaney 1995; Mannock et al. 2006) et présentent une pré-transition à 36°C et une transition de phase gel-fluide vers 41.7°C pour le DPPC seul. Cependant le manque de sensibilité de l'appareil fait que la transition de phase semble disparaître à 20 mol% en cholestérol alors qu'on devrait encore l'observer. Néanmoins la comparaison relative entre le cholestérol et le Py-met-chol par cette technique reste pertinente.

Les résultats montrent que l'augmentation de la concentration en stérols provoque une diminution de la température de transition et la disparition de la pré-transition (fig. 3.10). Cet effet est plus marqué dans le cas du Py-met-chol, avec une température de transition observée à 39.3°C contre 40.3°C pour le cholestérol (à 10 mol% en stérols). Cela s'explique par le fait que ces deux molécules sont plus miscibles dans la phase fluide que dans la phase gel. D'autre part la transition disparaît plus tôt dans le cas de la sonde Py-met-chol (à 15 mol% contre 20 mol% pour le cholestérol) ce qui montre qu'elle favorise légèrement plus la fusion des chaînes acyles. Enfin les deux stérols diminuent l'enthalpie de la transition de manière similaire bien que la coopérativité soit diminuée plus significativement dans le cas de l'ajout progressif de Py-met-chol (élargissement plus important de la transition).

Ces résultats montrent que la sonde Py-met-chol et le cholestérol ont des effets assez comparables sur les différents états de phase du DPPC, mais que la sonde perturbe légèrement plus la membrane en

inhibant plus efficacement la transition de phase que ne le fait le cholestérol. Par conséquent on peut dire que la présence de la double liaison en position 20 du cholestérol et du groupement pyrène ne perturbe pas autant qu'on pourrait le penser l'influence du cœur stéroïde sur les bicouches lipidiques. Des résultats similaires ont été trouvés en DSC avec le stigmastérol, un stérol naturel différant du cholestérol de part la présence d'une double liaison dans la queue aliphatique (Wu et al. 2006). On peut ainsi conclure que le cholestérol et le Py-met-chol ont un comportement membranaire très proche pour des concentrations faibles (typiquement en-dessous de 5 mol%).

3.2.1.2 Étude par RMN ^2H

Les phospholipides peuvent être sélectivement deutérés sur une ou plusieurs positions le long de l'une ou des deux chaînes hydrocarbonées. La résonance magnétique nucléaire du deutérium (RMN-^2H) de ces lipides marqués fournit des informations sur le degré d'organisation moléculaire des chaînes acyles via les éclatements quadrupolaires et le paramètre d'ordre. Il a été montré que l'introduction de ^2H le long des chaînes ne perturbe pas la structure et la dynamique des phospholipides et augmente l'intensité du signal, étant donné la très faible abondance naturelle du ^2H (0.016%).

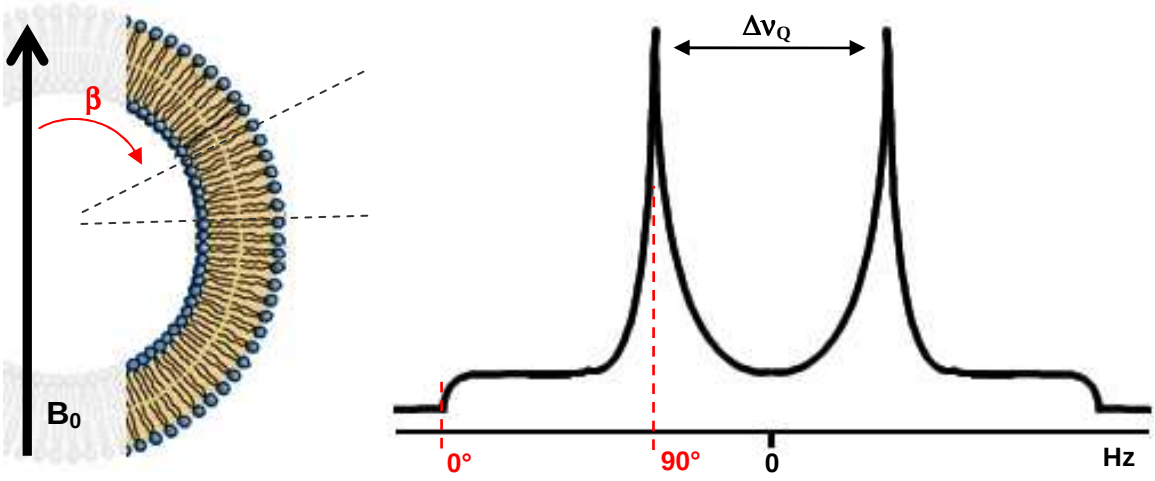


Figure 3.11. Principe de l'éclatement quadrupolaire d'atome de spin 1 tel que les ^2H incorporés dans des phospholipides organisés en liposomes. B_0 représente le champ magnétique de l'aimant du spectromètre, $\Delta\nu_Q$ est l'éclatement quadrupolaire et β l'angle entre les chaînes acyles des phospholipides et le champ B_0.

Le deutérium a un spin nucléaire égal à 1, par conséquent l'application d'un champ magnétique sur celui-ci donne naissance à 3 niveaux énergétiques équidistants non dégénérés (-1, 0, +1), autorisant ainsi 2 transitions (+1 ↔ 0 et 0 ↔ -1). Les atomes de ^2H possèdent un moment quadrupolaire dû à la distribution asymétrique (non sphérique) des charges dans le noyau. L'interaction quadrupolaire, qui est prédominante, correspond à l'interaction entre ce moment et le gradient de champ électrique local au niveau du noyau. Il en résulte que les trois niveaux d'énergie ne sont plus équidistants et on observe ainsi deux raies de résonances dans le spectre RMN. L'écartement de ce doublet est appelé écartement quadrupolaire ($\Delta\nu_Q$) (fig. 3.11).

Dans une suspension de liposomes, les noyaux de ^2H des phospholipides sont orientés selon une distribution sphérique et leur spectre RMN, dit « spectre de poudre » (fig. 3.12), résulte de la superposition de paires de raies de résonance, chacune provenant d'une orientation donnée des noyaux par rapport à la direction du champ magnétique B_0 imposé par le spectromètre (angle β). L'intensité d'une paire de raies de résonance donnée est proportionnelle au nombre de noyaux disposés à l'angle correspondant, et son écartement quadrupolaire est minimal à $\beta = 90°$ (condition explorée). Dans les membranes modèles multilamellaires en phase fluide, les phospholipides exécutent des mouvements locaux à symétrie axiale telle qu'une rotation autour de l'axe

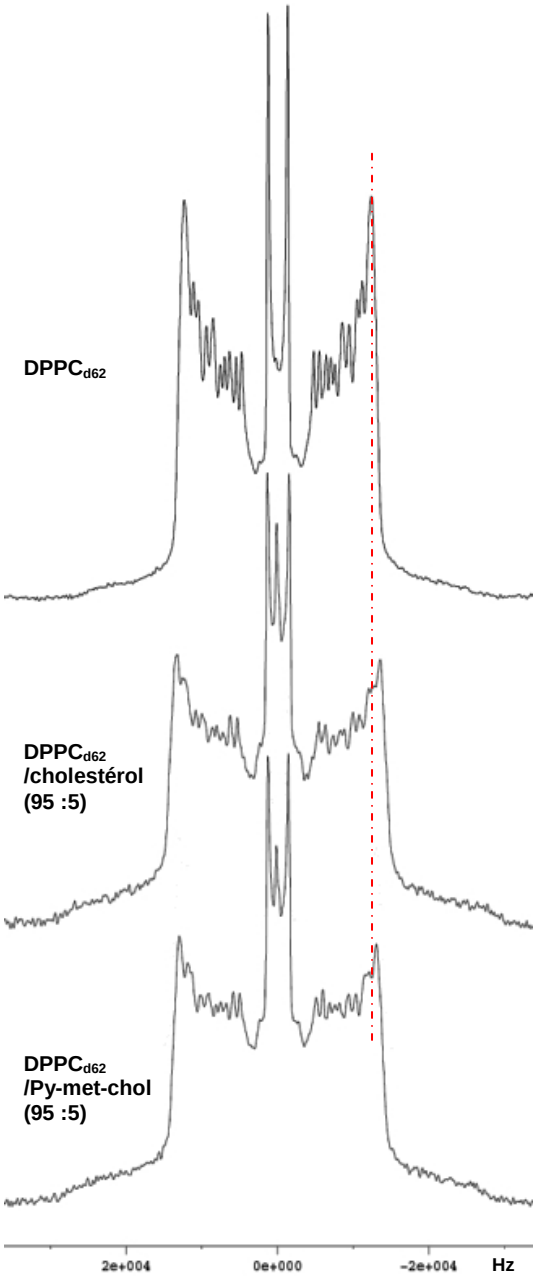


Figure 3.12. Spectres RMN-^2H de MLVs de DPPC$_{d62}$, DPPC$_{d62}$/5 mol% de cholestérol et DPPC$_{d62}$/5 mol% de Py-met-chol en phase fluide (50℃). Chaque échantillon contient 10 mg de phospholipides. Les MLVs sont dans du tampon MOPS préparé avec de l'eau déplétée en deutérium.

long de la molécule et une oscillation de cet axe autour de la normale de la bicouche. Ces mouvements affectent les écarts quadrupolaires. La diffusion latérale n'intervient pas dans la réorientation moléculaire pour ce genre de vésicules (diamètre supérieur à 200 nm). La grandeur de ces écarts dépend de la mobilité de liens C-^{2}H : ils sont faibles pour les liens mobiles en bout de chaînes et plus grands pour les lipides à mobilité restreinte situés prés de la tête polaire.

La figure 3.12 montre les spectres RMN-^{2}H acquis à 50°C de MLVs de $DPPC_{d62}$ (les deux chaînes acyles sont deutérées) et de $DPPC_{d62}$ contenant 5 mol% de cholestérol ou de Py-met-chol. À cette température les MLVs sont en phase fluide puisque le $DPPC_{d62}$ a une température de transition de phase inférieure au DPPC, soit d'environ 36°C (Klump et al. 1981). On sait que le cholestérol a la propriété d'ordonner les chaînes acyles des phospholipides, ce qui se traduit par un élargissement du spectre RMN (Sankaram et Thompson 1990; Vist et Davis 1990) car la mobilité des liaisons C-^{2}H d'une partie des chaînes acyles diminue. Dans notre cas cet effet est visible (et du même ordre) aussi bien avec 5 mol% de cholestérol qu'avec 5 mol% de Py-met-chol (fig. 3.12) ce qui montre qu'à ce taux d'incorporation dans les membranes phospholipidiques la sonde influe sur son environnement de la même manière que le cholestérol. Un tel effet a déjà été observé par RMN-^{2}H dans le cas de l'ergostérol, un analogue naturel du cholestérol présentant des différences au niveau du cœur stéroïde et de la queue aliphatique (présence de doubles liaisons), dans du $POPC_{d31}$ (Hsueh et al. 2007) ce qui montre la « robustesse » de ce genre de châssis moléculaire dans l'organisation des chaînes acyles.

3.2.2 Effet du taux d'insaturation des chaînes acyles des phospholipides sur la distribution latérale des sondes dans des LUVs.

Connaître la distribution latérale de l'ensemble des constituants des membranes naturelles, et notamment des lipides, reste un enjeu de taille aujourd'hui. En effet les distributions des différentes espèces dans le plan de la membrane résultent d'un ensemble de contraintes dont certaines sont bien identifiées, comme les mésappariements hydrophobes, les liaisons hydrogènes, la température, la ségrégation latérale de phase et dans le cas de membranes cellulaires, les processus dynamiques tels que les interactions protéines-lipides, l'intervention du cytosquelette... Malheureusement il est à

l'heure actuelle impossible d'appréhender la distribution de la totalité des constituants membranaires compte tenu de la très grande quantité et diversité des molécules présentes dans les membranes naturelles. Même en ne considérant que les lipides on doit souvent se restreindre à l'étude simultanée d'un ou deux composés dans des contextes bien définis. En ce qui concerne la distribution latérale des lipides présents dans les membranes d'eucaryotes, en particulier les phospholipides, la sphingomyéline et le cholestérol, les études menées jusqu'à présent sont basées sur des approches macroscopiques utilisant les propriétés de miscibilité des lipides en membrane modèle, telles que : les études de DSC montrant l'existence de phases fluides enrichies ou non en cholestérol (McMullen et McElhaney 1995) ou encore l'association préférentielle du cholestérol avec la sphingomyéline plutôt qu'avec les phosphatidylcholines (Demel et al. 1977); l'utilisation d'imagerie en fluorescence dans des GUVs montrant la préférence du cholestérol pour des phases dites « rafts » (sphingomyéline/phospholipides saturés) plutôt que « non raft » (phospholipides insaturés) (Bacia et al. 2005) ; ou enfin les premières études de monocouches phospholipides/cholestérol montrant des structurations latérales ordonnées du cholestérol (Weis 1985). Cependant peu d'informations sont disponibles sur l'organisation latérale à une échelle nanométrique. D'autres approches utilisant des sondes fluorescentes dérivées du cholestérol (DHE) (Chong 1994; Chong et Sugar 2002) ou de phospholipides (diPyr-PC) (Somerharju et al. 1985; Virtanen et al. 1995) ou encore des simulations numériques (Huang et Feigenson 1999; Huang 2002) ont révélé que le cholestérol se répartissait dans une membrane phospholipidique en un maillage hexagonal dit « super-réseau ». Il semble que le cholestérol ait la capacité de s'auto-organiser dans les membranes d'autant plus que cette molécule, de part son cœur stéroïde, peut s'empiller pour former des cristaux (Norton et Ohrt 1966). Cette distribution du cholestérol est très dépendante de l'environnement lipidique et notamment du degré de saturation des chaînes d'acides gras des phospholipides. En effet le cholestérol se répartit de manière d'autant plus hétérogène (formation d'ilôts) dans une membrane phospholipidique que les chaînes d'acide gras sont insaturées (Pasenkiewicz-Gierula et al. 1991). Cependant la plupart de ces études ne donnent accès qu'à un état à l'équilibre de la distribution des lipides. Il est néanmoins possible, en ce qui concerne le cholestérol dans des environnements simples, d'accéder à la dynamique de sa distribution latérale.

L’étude de la distribution latérale du cholestérol dans différents environnements lipidiques a été menée en utilisant la sonde commerciale Py-ester-chol (Lagane et al. 2002) dans des liposomes en faisant appel à la propriété hypochromique du groupement aromatique lors d’un processus d’auto-association (Rodriguez 1995) de cette sonde dans le plan de la bicouche. Cependant l’extension des résultats au cholestérol est limité par la relativement faible miscibilité de cette sonde dans les membranes (<7 %mol), due en partie à la présence de la liaison ester. C’est la raison pour laquelle nous avons étudié la distribution latérale des sondes Py-met-chol et Py-céto-chol, beaucoup plus soluble que le Py-ester-chol. Pour cela j’ai réalisé des LUVs par sonication en utilisant différentes phosphatidylcholines (tête polaire neutre à pH physiologique) au degré de saturation des chaînes d’acide gras croissant : mon choix s’est porté sur le DMPC (C14:0), le POPC (C18:1, C16:0) et le DOPC (C18:2) contenant des fractions molaires croissantes de sondes Py-met-chol ou Py-céto-chol (de 0.1 à 5 mol% de sondes par rapport au nombre de moles total de phospholipides). Afin d’avoir accès à l’absorption des très faibles fractions molaires de sondes j’ai utilisé des suspensions de LUVs à trois concentrations lipidiques différentes (0.1, 0.5 et 1 mM) et au total plus d’une trentaine de suspensions par condition ont été utilisées afin d’optimiser les calculs de régression (décrits plus loin) et d’obtenir les valeurs de paramètres les plus fines. Les spectres d’absorption ont été enregistrés entre 280 et 500 nm pour permettre une bonne extraction de l’absorption du groupement pyrène et à 30°C (au-dessus de la température de transition de phase des phospholipides utilisés).

3.2.2.1 Mesures de l'absorbance du chromophore pyrène dans des LUVs

Pour avoir accès à l'absorption propre des sondes Pyrène-Cholestérol dans des LUVs il a fallu pallier la contribution de la diffusion de la lumière générée par les suspensions de liposomes lors des mesures (turbidité). En effet la lumière est fortement diffusée dans la gamme de longueurs d'onde d'absorption du pyrène (300-380 nm), ce qui se traduit par une augmentation de l'absorption apparente de l'échantillon à mesure que la longueur d'onde de la lumière incidente diminue et rend difficile l'exploitation des résultats. La diffusion de la lumière par de tels échantillons est principalement liée à la taille des particules et à la concentration en lipides (Pozharski et al. 2001). On estime généralement la turbidité d'une suspension de LUVs par une mesure au-delà de 500 nm afin de se placer dans des conditions de régime de Rayleigh, lorsque la longueur d'onde de la lumière incidente (λ) est supérieure à la taille des objets observés, soit lorsque le paramètre de taille $\alpha = (2\pi \cdot r)/\lambda$ << 1 (Matsuzaki et al. 2000) avec r le rayon moyen des vésicules. Dans ce cas, l'absorption apparente $A(\lambda)$, due à la diffusion de la lumière par l'échantillon, est inversement proportionnelle à la puissance quatrième de la longueur d'onde de la lumière incidente et est communément décrite par la loi :

$$A(\lambda) = A(1) \cdot \frac{1}{\lambda^4} + A(0)\ ,\ A(n) \in \Re \quad \textbf{Eq.5}$$ (Bullova et Balgavy 2005).

Où $A(\lambda)$ est la turbidité et A(1) et A(0) sont des constantes. Cependant dans mon étude l'estimation de la turbidité a été nécessaire à une longueur d'onde de 346 nm (longueur d'onde d'absorption maximale du pyrène de la transition S0→S2). Sachant que dans mes suspensions le rayon moyen des LUVs (obtenu par sonication et après relaxation) mesuré par la technique de DLS est de 77 ± 6 nm, on a α = 1.63, ce qui nous place dans un régime de diffusion de Mie où la relation (**5**) n'est plus valable. Ainsi j'ai dû adapter de manière empirique l'équation (**5**) pour représenter plus correctement la diffusion de la lumière par les suspensions de LUVs. On aboutit à la relation suivante :

$$A(\lambda) = A(1) \cdot \frac{1}{\lambda^{A(2)}} + A(0)\ ,\ A(n) \in \Re \quad \textbf{Eq.6}$$

Où A(λ) est la turbidité et A(0), A(1) et A(2) sont des constantes. J'ai développé un programme en Visual Basic sous Microsoft Excel permettant l'ajustement des paramètres A(n) des équations (**5**) et (**6**). Il est basé sur l'algorithme de Levenberg-Marquardt (Levenberg 1944; Marquardt 1963) nécessitant que les équations soient dérivables, ce qui est le cas ici. La figure 3.13 illustre la qualité des ajustements des équations (**5**) et (**6**) lorsqu'on y injecte les valeurs expérimentales d'absorption de suspensions de LUVs de POPC pour trois concentrations lipidiques différentes : 0.1, 0.5 et 1 mM (courbes vertes). On voit clairement que l'équation (**6**) donne les meilleurs ajustements des données expérimentales quelle que soit la concentration en phospholipides de l'échantillon (courbes noires). Le programme développé a donc permis de calculer la composante diffusionnelle de toutes les suspensions de liposomes contenant une certaine fraction molaire de sonde Pyrène-cholestérol en se basant sur les valeurs d'absorbance en dehors de la gamme d'absorption du pyrène, soit à 290 nm (entre les 2 spectres d'absorption correspondant aux transitions électroniques $S_0 \rightarrow S_2$ et $S_0 \rightarrow S_3$) et de 385 à 500 nm. S'étant auparavant assuré que l'on a pas de décalage de la longueur d'onde d'absorption maximum du pyrène en fonction de l'échantillon et connaissant la concentration de sonde Pyrène-cholestérol dans l'échantillon, on extrait l'absorbance du pyrène à 346 nm, afin de calculer le coefficient d'absorption molaire ε ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) grâce à la loi de Beer-Lamber : $\varepsilon_{meas} = A_{\lambda=346} / C \times l$ où C est la

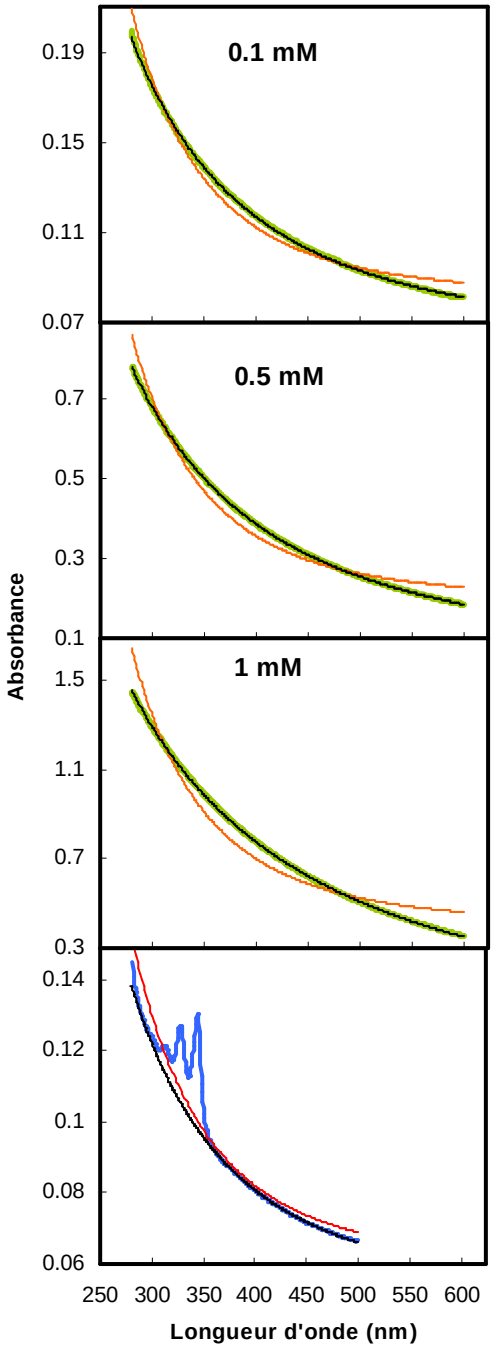


Figure 3.13. Représentations des ajustements des spectres d'absorption de suspensions de liposomes de POPC à 0.1, 0.5 et 1 mM (courbes vertes) et de POPC/Py-met-Chol (99:1) à 0.1 mM (courbe bleu) par le programme de minimisation basé sur l'équation (5) (courbes rouges) ou (6) (courbes noires).

concentration en sonde de l'échantillon (mol·L^{-1}), l le chemin optique de la cuve (cm), et $A_{\lambda=346}$ l'absorbance du pyrène dans l'échantillon à 346 nm.

3.2.2.2 Présentation du modèle isodesmique.

Dans le cas d'un phénomène d'agrégation multiple, le modèle le plus simple consiste en un schéma additif : un monomère donné A_1 peut s'associer à n'importe lequel des complexes déjà formés parmi les A_i molécules présentes. Les espèces A_1, A_2, A_3… A_n correspondent aux différents états d'agrégation des molécules de l'espèce chimique A, soit : des monomères, dimères, trimères… n-mères (on parlera de stack ou d'empillement à partir du dimère).

Chaque équilibre est décrit par une constante d'équilibre thermodynamique (d'association) K_1, K_2, K_3 … K_n. Étant donné le nombre important de paramètres utilisés dans ce modèle d'agrégation moléculaire, il est nécessaire d'introduire une simplification : c'est la raison pour laquelle le modèle dit « isodesmique » a été utilisé (Rodriguez 1995): c'est un modèle auto-associatif qui pose le postulat que l'association des molécules entre elles (dans notre cas les sondes Pyrène-cholestérol) se fait de manière linéaire et indéfinie. Chaque évènement d'association est caractérisé par la même constante d'association K (M^{-1}). Trois contributions sont suffisantes pour prendre en compte l'ensemble des propriétés d'absorption des sondes Pyrène-cholestérol : le coefficient d'absorption molaire des monomères

$$\begin{aligned} A_1 + A_1 &\overset{K_2}{\rightleftharpoons} A_2 \\ A_1 + A_2 &\overset{K_3}{\rightleftharpoons} A_3 \\ A_1 + A_2 &\overset{K_4}{\rightleftharpoons} A_3 \\ \vdots \quad &\quad \vdots \\ A_1 + A_{n-1} &\overset{K_n}{\rightleftharpoons} A_n \end{aligned} \qquad [A_n] = n \cdot K^{n-1} \cdot [A1]^n$$

Eq.7

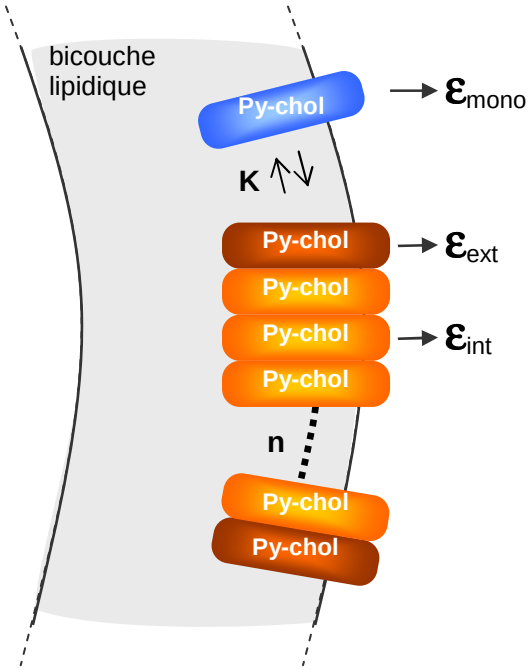


Figure 3.14. Modèle d'auto-association des sondes Pyrène-cholestérol dans des membranes de LUVs.

libres (ε_{mono}) et les coefficients d'absorption molaires des molécules qui constituent les stacks, à savoir les n-2 sondes à l'intérieur d'un stack (ε_{int}) et les 2 sondes (ε_{ext}) aux extrémités du stack (fig. 3.14). En considérant les fractions molaires respectives α de ces trois entités, on a la relation suivante :

$$\varepsilon_{meas} = \alpha_{mono} \cdot \varepsilon_{mono} + \alpha_{ext} \cdot \varepsilon_{ext} + \alpha_{int} \cdot \varepsilon_{int} \quad \textbf{Eq.8}$$

$$\text{avec } \alpha_{mono} + \alpha_{ext} + \alpha_{int} = 1 \quad \textbf{Eq.9}$$

Soit C_T la concentration molaire totale en sondes dans l'échantillon (cf. chapitre 3.2.2.3 sur l'unité de C_T), selon la loi de conservation de masse on peut écrire :

$$C_T = \sum_{i=1}^{n} [A_i] \cdot i \quad \textbf{Eq.10}$$

où $[A_i]$ est la concentration en n-mères constitués de i molécules de sonde Pyrène-Cholestérol. Ainsi, si $[A_1]$ est la fraction molaire en monomères, on a :

$$\alpha_{mono} = \frac{[A_1]}{C_T} \quad \textbf{Eq.11} \quad , \quad \alpha_{ext} = \sum_{i=2}^{n} \frac{2 \cdot [A_i]}{C_T} \quad \textbf{Eq.12} \quad \text{et} \quad \alpha_{int} = \sum_{i=2}^{n} \frac{(i-2) \cdot [A_i]}{C_T} \quad \textbf{Eq.13}$$

À partir des équations (**7**) et (**10**) on tire une équation reliant C_T, K et $[A_1]$:

$$[A_1] = \frac{1}{K} + \frac{1 - \sqrt{4C_T \cdot K + 1}}{2K^2 \cdot C_T} \quad \textbf{Eq.14}$$

Alors on injecte les relations (**7**) et (**14**) dans les équations (**11**) à (**13**) et on obtient les expressions des fractions molaires des trois entités décrites par le modèle:

$$\alpha_{mono} = \frac{1}{K \cdot C_T} + \frac{1 - \sqrt{4C_T \cdot K + 1}}{2K^2 \cdot C_T^2} \quad \textbf{Eq.15}$$

$$\alpha_{int} = -\frac{C_T - [A_1]}{C_T} + \frac{2K \cdot [A_1]^2}{C_T \cdot (1 - K \cdot [A_1])^2} \quad \textbf{Eq.16}$$

$$\alpha_{ext} = 2 \cdot \frac{C_T - [A_1]}{C_T} - \frac{2K \cdot [A_1]^2}{C_T \cdot (1 - K \cdot [A_1])^2} \quad \textbf{Eq.17}$$

Ainsi, connaissant la concentration totale C_T en sonde Pyrène-cholestérol de chaque suspension de LUVs et leur coefficient d'absorption molaire respectif à 346 nm, on aboutit à une relation à quatre inconnues : $\varepsilon_{meas} = f$ K, ε_{mono}, ε_{ext}, ε_{int} (C_T). J'ai pu déterminer ces paramètres en utilisant une méthode de calcul de régression non linéaire itérative basée sur l'algorithme VA0A4 (Powell 1964) implémenté

dans une macro en Visual Basic sous Microsoft Excel. Pour limiter l'impact des erreurs expérimentales dues à la manipulation de très faibles concentrations de lipides introduisant une plus grande incertitude sur la quantité de sonde présente dans ces échantillons, la somme des carrés des écarts (SCE) est pondérée en $1/Y^2$, soit en $1/(\varepsilon_{meas})^2$. Les bornes de chaque paramètre sont calculées comme suit : on fixe la valeur de trois des paramètres à la solution et on fait varier le quatrième pour détecter les valeurs limites (bornes supérieure et inférieure) pour lesquelles on ne s'écarte pas de plus de 5 % ($\alpha = 0.05$) de la somme des carrés des écarts de la solution (SCE_{sol}). On se base pour cela sur la loi de Fisher-Snedecor (comparaison des variances):

$$SCE_{borne} = SCE_{sol} \cdot \left[\left(\frac{f \cdot q}{N - k} \right) + 1 \right] \quad \textbf{Eq.18}$$

où N est le nombre de points expérimentaux (les ε_{meas}), k le nombre d'inconnues (k = 1), q le nombre de combinaisons linéaires indépendantes reliant les paramètres (q = 1), et f le paramètre de Fisher (*cf.* table de Fisher avec $\alpha = 0.05$, $ddl_1 = q$ et $ddl_2 = N-k$).

3.2.2.3 Présentation du modèle dimérique

Le modèle dimérique peut être vu comme un cas particulier (et restreint) du modèle isodesmique. En effet, on considère dans ce modèle que l'association des monomères aboutit uniquement à la formation de dimères. La philosophie générale de ce modèle étant très similaire à celle du modèle isodesmique, les équations ne seront pas développées. On a ainsi :

$$\varepsilon_{meas} = \alpha_{mono} \cdot \varepsilon_{mono} + \alpha_{dim} \cdot \varepsilon_{dim} \quad \textbf{Eq.19}$$

$$\text{avec } \alpha_{mono} + \alpha_{dim} = 1 \quad \textbf{Eq.20}$$

$$\alpha_{mono} = \frac{\sqrt{8C_T \cdot K + 1} - 1}{4K \cdot C_T} \quad \textbf{Eq.21}$$

Toutes les données expérimentales présentées ici ont été analysées selon les deux modèles. La comparaison des valeurs des SCE_{sol} entre les deux modèles a montré dans tous les cas que le modèle isodesmique était le plus apte à décrire l'évolution du coefficient d'absorption molaire lors de l'auto-association des sondes Pyrène-cholestérol dans les membranes. Le tableau 3.2 met en évidence la

moins bonne efficacité du modèle dimérique à rendre compte de l'auto-association du Py-met-chol dans trois environnements lipidiques différents. On voit que SCE_{sol} -iso est toujours inférieur à SCE_{sol} -dim, ce qui montre que le modèle isodesmique décrit mieux la réalité expérimentale que le modèle dimérique. De plus, dans le cas de ce dernier modèle, les valeurs calculées pour certains paramètres n'ont pas de réalité biologique, c'est notamment le cas du ε_{mono} dans des LUVs de DMPC ou de DOPC ou encore de K dans les LUVs de DMPC.

		SCE_{sol} -iso	SCE_{sol} -dim	$K\ (M^{-1})$	ε_{mono}	ε_{dim}	n
Py-met-chol	***DOPC***	$2.246\ 10^{-2}$	$2.647\ 10^{-2}$	**2448**	**247280**	**31330**	*33*
	POPC	$3.557\ 10^{-2}$	$3.962\ 10^{-2}$	**821**	**145430**	**31700**	*31*
	DMPC	$1.155\ 10^{-2}$	$1.291\ 10^{-2}$	**210620**	**1406550**	**31180**	*66*

Tableau 3.2. Comparatif entre les sommes des carrés des écarts solutions calculées en fonction du modèle isodesmique (SCE_{sol} -iso) et dimérique (SCE_{sol} -dim) et des paramètres issus des régressions non linéaires des données d'absorption de la sonde Py-met-chol dans des LUVs de phospholipides. n correspond au nombre de données expérimentales.

3.2.2.4 Analyse des résultats

Pour les sondes Py-met-chol et Py-céto-chol les coefficients d'absorption molaires (ε_{meas}) diminuent de manière non linéaire lorsque la fraction molaire en sonde augmente, et ce dans les trois environnements lipidiques, pour finalement atteindre des valeurs plus stables de l'ordre de 32000 $cm^{-1} \cdot M^{-1}$ à partir de 1 mol% (fig. 3.15 et 3.16). Ces évolutions non linéaires, caractéristiques de l'empillement des chromophores dans les différentes suspensions, révèlent un hypochromisme du chromophore qui est la signature d'un processus auto-associatif du pyrène, comme cela a été révélé par l'étude du comportement d'absorption du poly(1-vinylpyrene) dans du tétrahydrofurane (Todesco et al. 1986) ou du pyrene-hydroxypropyl-cellulose dans l'eau (Winnik 1993). Ces comportements auto-associatifs avaient également été mis en évidence grâce au Py-ester-chol dans des LUVs d'egg-PC et de DOPC (Lagane et al. 2002) alors qu'ils ne sont pas observés lorsque l'on utilise des sondes pyrène-PC ou pyrène-PG dans des LUVs d'egg-PC (Mazères et al. 2001). Cela laisse à penser que

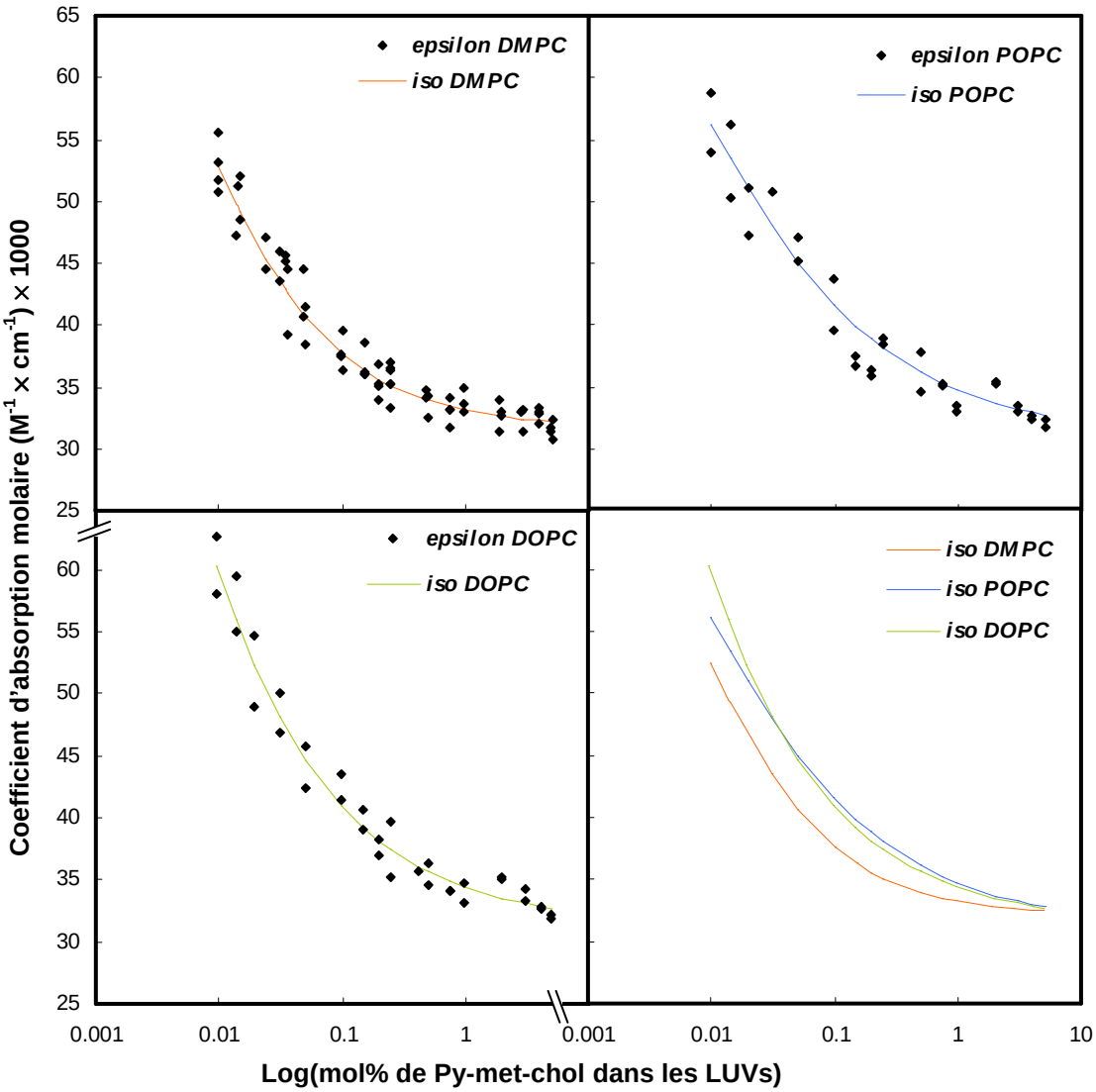


Figure 3.15. Évolution du coefficient d'absorption molaire du Py-met-chol en fonction de sa fraction molaire dans des LUVs de DMPC (n = 66), POPC (n = 31) et DOPC (n = 33) à 30°C. Les courbes représentent les régressions non linéaires calculées selon le modèle d'auto-association isodesmique dont les valeurs des paramètres sont récapitulées dans le tableau 3.3.

c'est la moitié cholestérol des sondes Pyrène-cholestérol qui est à l'origine de l'auto-association de ces sondes dans les membranes et non le groupement pyrène.

Lorsque l'on compare les valeurs de ε_{meas} pour les plus faibles quantités de sondes (0.1-0.15 mol%) dans les LUVs on se rend compte qu'elles sont toujours plus grandes dans les LUVs aux phospholipides les moins saturés : $\varepsilon_{meas}(DOPC) > \varepsilon_{meas}(POPC) > \varepsilon_{meas}(DMPC)$. Des études menées sur des sondes ayant un noyau azote (avec un électron non apparié) greffé à différents niveaux ont révélé, par résonance de spin électronique, que les membranes constituées de phospholipides insaturés avaient un cœur plus hydrophobe que celles constituées d'espèces saturées (Subczynski et al. 1994). Cela est

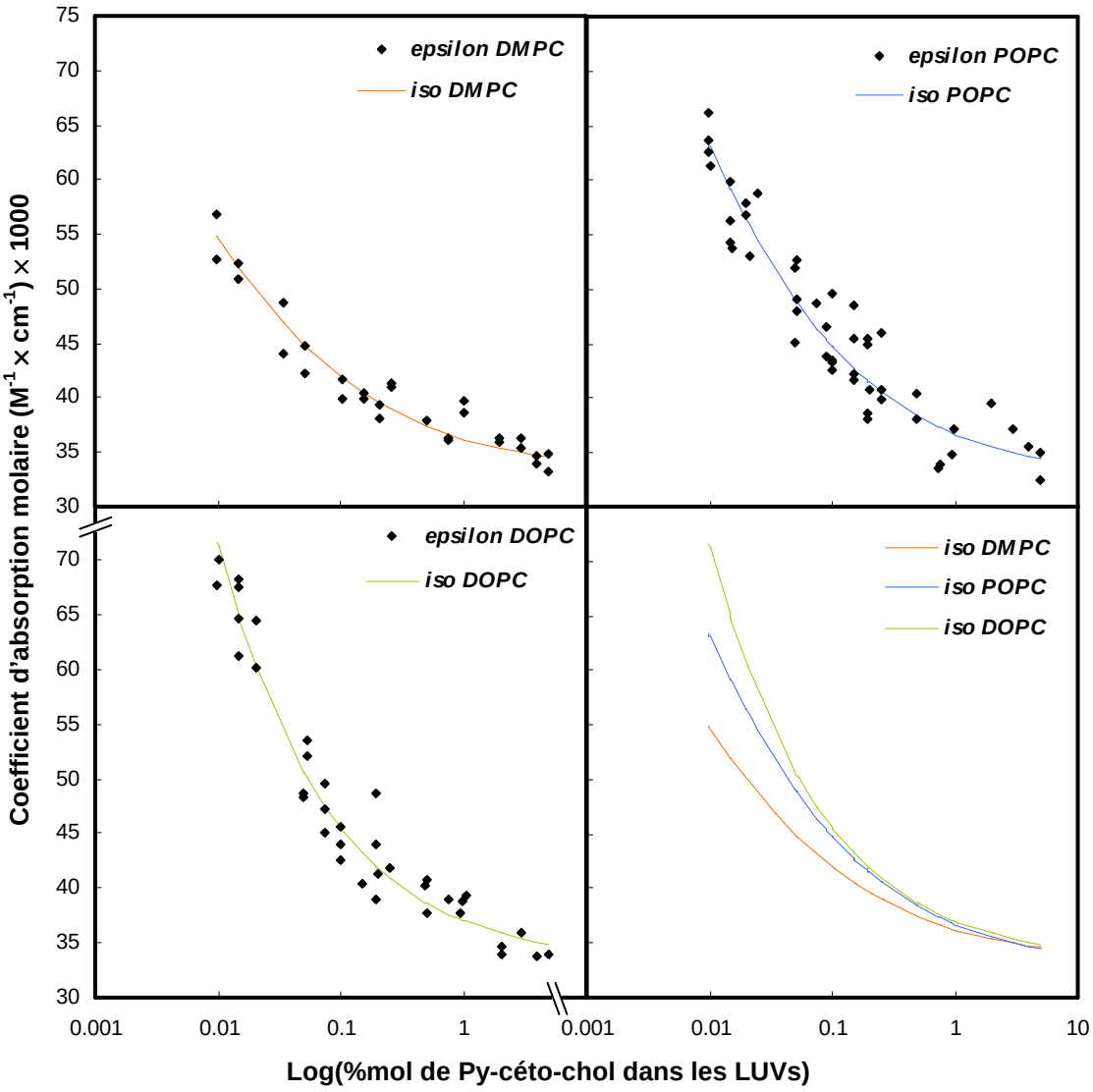


Figure 3.16. Évolution du coefficient d'absorption molaire du Py-céto-chol en fonction de sa fraction molaire dans des LUVs de DMPC (n = 30), POPC (n = 47) et DOPC (n = 37) à 30°C. Les courbes représentent les régressions non-linéaires calculées selon le modèle d'auto-association isodesmique dont les valeurs des paramètres sont récapitulées dans le tableau 3.3.

du à la présence des doubles liaisons en configuration *cis* qui limitent la pénétration de l'eau à travers la membrane. Nos observations pourraient alors s'expliquer par un effet de solvatation (ici les chaînes d'acide gras) jouant sur la structure vibronique du groupement pyrène et aboutissant à une plus grande absorption dans les LUVs les plus hydrophobes. Dans tous les cas, à mesure que la fraction molaire en sondes augmente, les ε_{meas} convergent vers des valeurs très proches (~32000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) ce qui indique que l'auto-association des sondes est plus importante dans les environnements aux phospholipides insaturés.

Les données ont été analysées plus finement en utilisant le modèle isodesmique afin de déterminer les constantes d'association des deux sondes dans les trois types d'environnements phospholipidiques ainsi que les contributions d'absorption ε_{mono}, ε_{ext} et ε_{int}. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 3.3. Les valeurs des constantes d'association K confirment que le processus d'auto-association des sondes Pyrène-cholestérol est plus efficace dans les environnements insaturés avec $K_{DOPC} > K_{POPC} > K_{DMPC}$ et avec des constantes d'association supérieures dans le cas de la sonde Py-céto-chol. Ce dernier résultat est cohérent avec le fait que cette sonde est celle qui a la plus faible miscibilité. Les constantes d'association du Py-ester-chol, dont la miscibilité est encore plus faible, étaient supérieures

			epsilon ($M^{-1} \times cm^{-1}$)			
		K *(M^{-1}) [$K \pm SD$]*	***ε mono*** *[$\varepsilon_{mono} \pm SD$]*	***ε ext*** *[$\varepsilon_{ext} \pm SD$]*	***ε int*** *[$\varepsilon_{int} \pm SD$]*	***n***
Py-met-chol	***DOPC***	***669*** *[609-739]*	***143510*** *[126700-160310]*	***70750*** *[68260-73240]*	***31360*** *[30850-31860]*	*33*
	POPC	***281*** *[230-346]*	***77270*** *[64080-90470]*	***61860*** *[58710-65010]*	***31020*** *[30140-31910]*	*31*
	DMPC	***93*** *[84 to 103]*	***77470*** *[74260 to 80690]*	***37960*** *[36750 to 39170]*	***31550*** *[31030 to 32070]]*	*66*
Py-céto-chol	***DOPC***	***785*** *[712-868]*	***127410*** *[109870-144960]*	***95470*** *[92310-98630]*	***31590*** *[30760-32420]*	*37*
	POPC	***338*** *[268-435]*	***93770*** *[69230-118310]*	***72570*** *[67430-77720]*	***30180*** *[28470-31880]*	*47*
	DMPC	***89*** *[79-100]*	***92590*** *[87730-97450]*	***41080*** *[39270-42880]*	***32950*** *[32240-33660]*	*30*

Tableau 3.3. Récapitulatif des paramètres issus des régressions non linéaires des données d'absorption des sondes Pyrène-cholestérol dans des LUVs de phospholipides calculés selon le modèle isodesmique. Les écarts types sont calculés comme décrit dans la section 3.2.2.2. n correspond au nombre de données expérimentales.

et elles aussi fonction des phospholipides utilisés (avec $K_{DOPC} > K_{egg\text{-}PC} > K_{DMPC}$). On peut donc supposer que le cholestérol a des constantes d'association légèrement inférieures à celles appréhendées par la sonde la plus miscible : le Py-met-chol. Ces résultats prouvent donc que les sondes Pyrène-cholestérol sont plus idéalement miscibles (distribution latérale plus homogène) dans les phospholipides aux chaînes d'acide gras saturées que dans les espèces insaturées, comme cela a été montré dans de nombreuses études pour le cholestérol (Pasenkiewicz-Gierula et al. 1991; Brzustowicz et al. 2002). En d'autres termes les sondes Pyrène-cholestérol ont plus d'affinité pour les chaînes acyles en configuration *trans-gauche* que pour elles-mêmes, ce qui n'est pas vrai pour les chaînes acyles présentant une double liaison en configuration *cis*. Ce phénomène est une conséquence directe

de la capacité du cholestérol à condenser les chaînes acyles saturées (Silvius 2003; Aittoniemi et al. 2006). D'autre part on obtient toujours $\varepsilon_{mono} > \varepsilon_{ext} > \varepsilon_{int}$, indiquant que l'on a bien formation d'empillements de sondes où le pyrène absorbe d'autant moins les photons à 346 nm que ses électrons π sont impliqués dans les associations avec un (ε_{ext}) ou deux (ε_{int}) autres groupements pyrène. D'ailleurs plus les sondes s'auto-associent et plus la proportion de chromophores ayant une contribution ε_{int} est importante, d'où les valeurs de ε_{meas} qui tendent vers celles de ε_{int} pour des fractions molaires supérieures à 1 mol%.

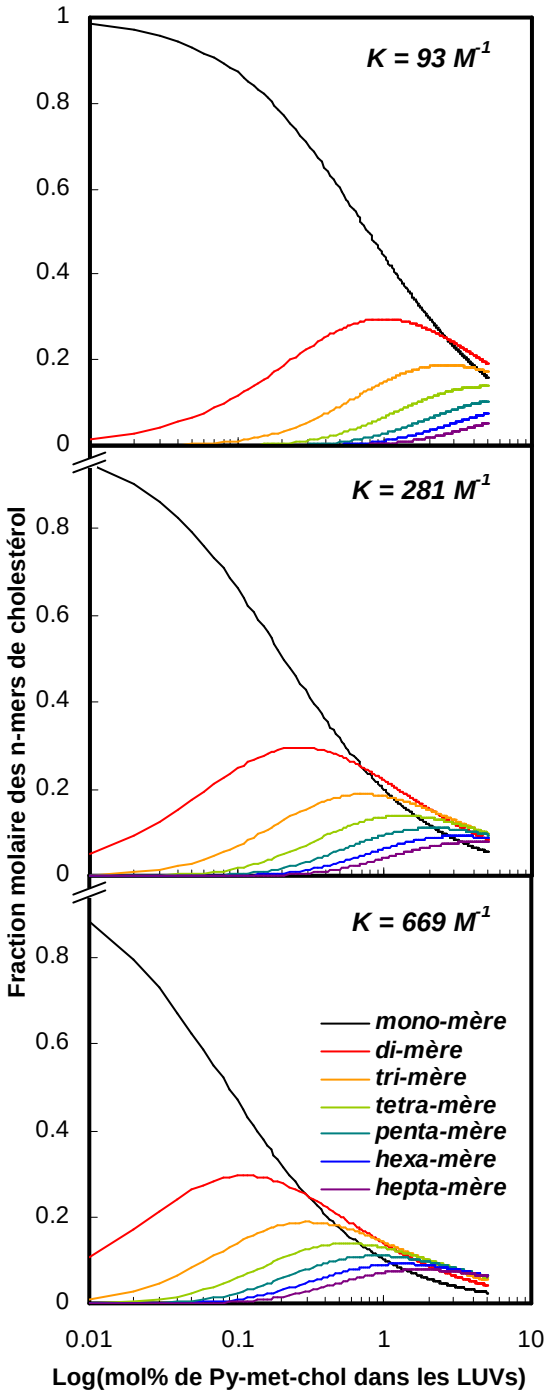


Figure 3.17. Évolution de la distribution des n-mères de Py-met-chol dans des LUVs (jusqu'à l'hepta-mère), selon le modèle isodesmique, pour des constantes d'association de 93 M^{-1}, 281 M^{-1} et 669 M^{-1} correspondant à celles calculées dans des membranes de DMPC POPC et DOPC.

Le modèle isodesmique permet également, après avoir expérimentalement déterminé les constantes d'association, de prédire l'évolution de la distribution et de la taille des n-mères en fonction de la fraction molaire de sondes présentes dans la membrane (Rodriguez 1995). Ainsi différentes distributions sont représentées pour les n-mères (jusqu'à l'hepta-mère) avec les constantes d'association du Py-met-chol de 93 M^{-1}, 281 M^{-1} et 669 M^{-1} correspondant respectivement aux valeurs mesurées dans des LUVs de DMPC, de POPC et de DOPC (fig. 3.17). Etant donné que le processus d'auto-association des sondes est dominé par la partie cholestérol, ces distributions sont transposables dans la gamme étudiée (entre 0.1 mol% et 5 mol%) à la distribution latérale du cholestérol lui-même dans les membranes. Comme le montre le modèle isodesmique, pour une

fraction molaire en Py-met-chol donnée (ou en cholestérol), plus la constante d'association est grande et plus on est en présence de n-mères de grandes tailles, au détriment des monomères. Ainsi à 5 mol% en sonde il faut tenir compte des [1 à 7]-mères dans le DMPC, [1 à 15]-mères dans le POPC et [1 à 24]-mères dans le DOPC pour décrire le comportement d'au-moins 90 % de la population de sondes dans ces membranes. Cette description est donc en accord avec le fait que le cholestérol a tendance à former des oligomères en présence de phospholipides ayant des doubles liaisons en configuration *cis* (Pasenkiewicz-Gierula et al. 1991; Miao et al. 2002). De plus il est connu que le cholestérol forme des complexes « condensés » avec les phospholipides saturés (ce que l'on observe avec le Py-met-chol en RMN-^{2}H) pour générer des phases lo au sein des phases ld, ce qui explique la distribution hétérogène de la sonde même dans le DMPC (Silvius et al. 1996). Néanmoins ces résultats ne sont pas compatibles avec une distribution homogène dans un super-réseau hexagonal. Cela s'explique simplement par le fait que dans ce modèle les interactions cholestérol-cholestérol sont considérées comme inexistantes. Enfin on verra que la connaissance de la distribution du Py-met-chol dans les membranes est une information utile dans l'analyse des mesures de fluorescence dans des membranes modèles ou naturelles.

3.3 Mesure de l'influence du cholestérol sur les propriétés physiques des membranes

3.3.1 Distribution latérale des sondes en fonction de la fraction molaire de cholestérol

Dans la continuité des résultats précédents, l'influence de la présence de cholestérol dans la membrane des LUVs sur la dynamique d'auto-association du Py-met-chol a été mesurée. Cela a été réalisé en phase fluide (37°C) dans des liposomes de DMPC contenant 0, 15 ou 30 mol% de cholestérol soit respectivement, considérant le diagramme de phase du DMPC (Almeida et al. 1992), dans des membranes en phase liquide désordonnée, des membranes présentant une coexistence de phase ld-lo et enfin dans des membranes entièrement en phase liquide ordonnée. L'intérêt d'une telle démarche est de déterminer la miscibilité relative du Py-met-chol en fonction de l'état de phase de la membrane, grâce à la mesure de la constante d'association K et ainsi de connaître la partition de la

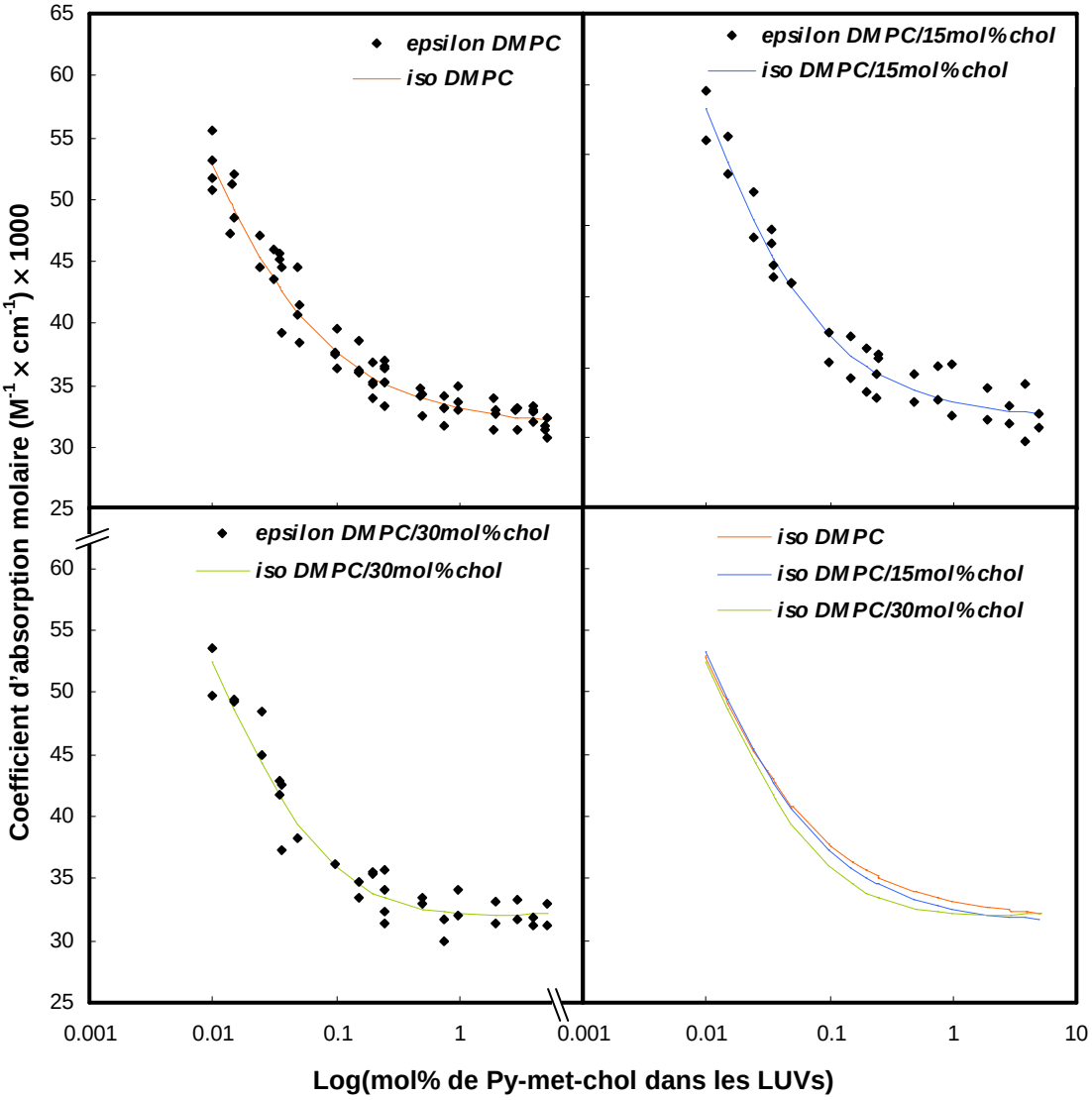


Figure 3.18. Évolution du coefficient d'absorption molaire du Py-met-chol en fonction de sa fraction molaire dans des LUVs de DMPC (n = 66), DMPC contenant 15 mol% de cholestérol (n = 36) et DMPC contenant 30 mol% de cholestérol (n = 34) à 30°C. Les courbes représente nt les régressions non linéaires calculées selon le modèle d'auto-association isodesmique dont les valeurs des paramètres sont récapitulées dans le tableau 3.4.

sonde lorsque différentes phases coexistent.

Les résultats d'absorption sont présentés dans la figure 3.18 et les valeurs des paramètres calculés sont rassemblées dans le tableau 3.4.

L'analyse des données d'absorption par le modèle isodesmique a révélé que $K_{DMPC} > K_{DMPC\ 15mol\%\ chol} > K_{DMPC\ 30mol\%\ chol}$ (*cf.* tableau 3.4). Cela démontre que le processus d'auto-association du Py-met-chol est d'autant plus faible que la quantité de cholestérol est grande, avec une diminution significative de 53% de la valeur de K entre un environnement phospholipidique saturé (donc en phase ld) et le même environnement contenant 30 mol% de cholestérol (donc en phase lo). Plus la valeur de K est

			epsilon ($M^{-1} \times cm^{-1}$)			
		K *(M^{-1}) [$K \pm SD$]*	***ε mono*** *[$\varepsilon_{mono} \pm SD$]*	***ε ext*** *[$\varepsilon_{ext} \pm SD$]*	***ε int*** *[$\varepsilon_{int} \pm SD$]*	***n***
Py-met-chol	***DMPC***	***93*** *[84 to 103]*	***77470*** *[74260 to 80690]*	***37960*** *[36750 to 39170]*	***31550*** *[31030 to 32070]]*	*66*
	DMPC/chol (85:15)	***68*** *[61 to 75]*	***74450*** *[71800 to 77090]*	***34940*** *[33800 to 36080]*	***31220*** *[30660 to 31780]*	*36*
	DMPC/chol (70:30)	***43*** *[38 to 49]*	***73070*** *[71350 to 73780]*	***33080*** *[32300 to 33870]*	***30790*** *[29360 to 31200]*	*34*

Tableau 3.4. Récapitulatif des paramètres issus des régressions non linéaires des données d'absorption du Py-met-chol dans des LUVs de DMPC avec 0, 15 et 30 mol% de cholestérol calculés selon le modèle isodesmique. Les écarts types sont calculés comme décrit dans la section 3.2.2.2. n correspond au nombre de données expérimentales.

faible et plus la sonde est distribuée de manière homogène dans la membrane. Ceci montre clairement que la sonde Py-met-chol est davantage solvatée lorsqu'elle est dans un environnement enrichie en cholestérol. On peut ainsi conclure que le Py-met-chol est plus idéalement miscible dans les phases lo que dans les phases ld. C'est un résultat très important qui montre la justesse du choix de l'utilisation (et de la synthèse) des sondes de la famille Pyrène-cholestérol comme rapporteur de phases lo. D'autre part, le fait d'obtenir une valeur intermédiaire de K dans le mélange DMPC/15 mol% chol est cohérent avec la notion d'une coexistence de phases ld et lo dans ce type de membrane, comme cela a déjà été suggéré (Vist et Davis 1990; Sankaram et Thompson 1991; McMullen 1996). Les différents paramètres ε_{mono}, ε_{int} et ε_{ext} sont quasiment invariants dans ces trois environnements, ce qui souligne la finesse et la robustesse de cette approche.

Le modèle isodesmique permet aussi d'avoir accès à la distribution latérale théorique des sondes au sein de la membrane des LUVs pour une concentration en sonde donnée. On peut alors connaître la quantité de monomères, le n-mère présent en plus grande quantité ou encore le n-mère le plus long présent dans la membrane (*cf.* tableau 3.5). L'intérêt de connaître cette répartition est double : d'une part on peut estimer la quantité de monomères de Py-met-chol dans une membrane lipidique donnée, ce qui est une information nécessaire si l'on veut mener des études de spectrofluorimétrie (*cf.* chapitre 3.3.2) et d'autre part on peut corréler ces données à la distribution du cholestérol dans les membranes. Par exemple pour 2 mol% de Py-met-chol dans la membrane, on voit que l'on trouve la plus grande proportion de monomères dans les phospholipides saturés (DMPC) contenant ou non du cholestérol. D'ailleurs dans ces conditions le monomère est toujours l'espèce majoritaire avec des empillements de

	K (M^{-1})	Py-met-chol (mol %)				
		2		5	20	30
		monomère (%)	[n-mères majoritaire* /plus grand n-mères**]			
DOPC	***669***	***5.7***	*[4 /14]*	*[6 /22]*	*[12 /45]*	*[14 /55]*
POPC	***281***	***12***	*[2 /9]*	*[4 /14]*	*[8 /29]*	*[9 /36]*
DMPC	***93***	***26***	*[1 /5]*	*[2 /8]*	*[4 /16]*	*[5 /21]*
DMPC/chol (85:15)	***68***	***68***	*[1 /4]*	*[2 /7]*	*[4 /14]*	*[5 /17)*
DMPC/chol (70:30)	***43***	***93***	*[1 /3]*	*[2 /5]*	*[3 /11]*	*[4 /14]*

Tableau 3.5. Calcul théorique selon le modèle isodesmique et à partir des constantes d'association, de la distribution des n-mères de Py-met-chol dans des LUVs de différentes compositions. * le n-mères majoritaire correspond à l'espèce ayant la plus grande fraction molaire parmi les différents n-mères présents dans la membrane. ** Le plus grand n-mères représente le plus long empilement de sondes que l'on peut trouver dans la membrane pour une concentration donnée en sonde.

sondes ne dépassant pas 5-mères. Dans le POPC, un phospholipide entrant dans la composition de la membrane plasmique, on est majoritairement en présence de dimères (12 % de monomères) et dans une membrane de DOPC la sonde est principalement sous forme de tétramères avec seulement 5.7 % de monomères. Sachant que la partie cholestérol est à l'origine de l'auto-association du Py-met-chol dans les membranes, les données confirment que le cholestérol est capable de former des stacks, comme cela a été montré dans différentes études (Subczynski et Kusumi 2003) et l'approche isodesmique nous permet de déterminer finement la taille et la quantité de ces stacks. Ainsi une phase lo (ici DMPC/30 mol% cholestérol à 37°C) comporterait majoritairement des pentamères de cholestérol, ce qui va à l'encontre d'un modèle de distribution régulière du cholestérol dans les membranes phospholipidiques proposé par certains auteurs (Chong et Sugar 2002).

Les différents résultats d'absorption des sondes Pyrène-cholestérol et notamment du Py-met-chol nous montrent : d'une part que ces sondes sont de bons rapporteurs de la distribution latérale du cholestérol au niveau moléculaire dans les membranes biologiques modèles et d'autre part le Py-met-chol partitionne est plus miscible dans les phases lo. Cumulés avec les données de RMN-^{2}H et de DSC, les résultats montrent que la sonde Py-met-chol a un comportement dans les membranes très similaire à celui du cholestérol. Cependant, si l'on considère les valeurs des constantes d'association pour les trois sondes Py-met-chol, Py-céto-chol et Py-ester-chol (pour cette dernière *cf.* (Lagane et al.

2002)) on se rend compte que la nature des atomes qui composent la liaison entre le cholestérol et le pyrène a un impact non négligeable. Par conséquent, l'utilisation d'une sonde avec une simple liaison en position 20, plus proche de la structure du cholestérol, permettrait d'appréhender encore plus finement la distribution du cholestérol dans les membranes modèles. La synthèse d'une telle sonde est cependant délicate car il faut réduire la double liaison de manière à obtenir la bonne chiralité (vis-à-vis du cholestérol).

3.3.2 Évolution de la polarité membranaire en fonction de la fraction molaire de cholestérol

Comme on l'a vu au chapitre 3.1.4, la fluorescence du pyrène et de ses dérivés en solution donne accès à une information sur la polarité de son microenvironnement d'une part (ratio I1/I3) et sur sa concentration (ratio IE/I3) d'autre part. Ces résultats sont transposables aux bicouches lipidiques en termes de perméabilité membranaire, puisque la quantité de molécules d'eau dans le cœur hydrophobe en fonction de la quantité de cholestérol est corrélée à la polarité (Klymchenko et al. 2004). Ainsi il devient possible de discriminer un environnement lo (peu polaire) d'un environnement ld (plus polaire) par spectrofluorimétrie sur des membranes contenant une sonde Pyrène-cholestérol. Enfin la mesure du ratio d'intensité IE/I3 nous renseigne sur la distribution latérale (concentration surfacique) des sondes Pyrène-cholestérol au sein d'une membrane d'une composition lipidique donnée.

Ces deux paramètres ont été mesurés dans des LUVs en phase fluide (contenant du Py-met-chol) afin de caractériser spectroscopiquement la phase ld et la phase lo. Au niveau des phospholipides, le choix s'est porté sur des membranes de phospholipides aux chaînes acyles plus ou moins saturées (DOPC, POPC et DMPC) mais contenant des quantités croissantes de cholestérol de manière à générer une phase lo.

3.3.2.1 Détermination du taux de marquage des membranes

Quand on augmente la concentration molaire de sondes dans la membrane, le modèle isodesmique prédit que le monomère devient minoritaire au détriment des autres n-mères. Par conséquent, dans

l'optique de faire des mesures de fluorescence, les données d'absorption nous montrent qu'il faut se placer dans des conditions où la concentration molaire en sonde est faible (classiquement au voisinage de 1 mol%). Cependant, pour avoir accès à la fluorescence de l'excimère il faut une quantité minimale de pyrène dans la membrane. Afin de déterminer cette quantité critique, différentes fractions molaires de Py-met-chol (0.2, 0.5, 2 et 4 mol%) ont été insérées dans des LUVs de DMPC contenant 0 à 55 mol% de cholestérol (incrément de 5 mol%). Les évolutions des ratios de fluorescence I1/I3 et IE/I3 en fonction de la fraction molaire de cholestérol sont rapportés dans les figures 3.19 A et B, respectivement. Pour 0.2 mol% et 0.5 mol% de Py-met-chol dans les LUVs, on voit que le ratio I1/I3 diminue de manière continue, montrant que la sonde permet de détecter la diminution de la polarité de la bicouche induite par l'augmentation de la quantité de cholestérol (génération d'une phase lo). Malheureusement aucune variation de IE/I3 n'est observée pour ces deux concentrations, très probablement parce que la concentration surfacique en sonde est trop faible. En utilisant 4 mol% de sonde on observe que l'intensité du spectre d'émission de fluorescence est plus faible que pour des concentrations inférieures en Py-met-chol, ce qui traduit un phénomène de quenching (*cf.* figure 3.19 C). Le meilleur compromis a été obtenu en utilisant 2 mol% de Py-met-chol dans les LUVs. En premier lieu on observe dans ces conditions la plus forte amplitude dans la diminution de I1/I3 lorsque l'on augmente la quantité de cholestérol, ce qui garantie la meilleure sensibilité dans la détection d'une modification de l'état de phase de la membrane. On voit en effet que jusqu'à 30 mol% de cholestérol, soit lorsque que l'on génère une membrane entièrement en phase lo, I1/I3 diminue. Cependant pour des concentrations plus fortes en cholestérol, ce ratio augmente (*cf.* chapitre 3.2.2.2 pour les interprétations). On observe également dans ces conditions une variation significative du ratio IE/I3, ce qui donne accés à des informations complémentaires (par rapport aux données d'absorption) sur la distribution de la sonde en fonction de la quantité de cholestérol dans la membrane. La figure 3.19 D montre l'évolution de l'intensité des bandes I3 (monomère) et IE (excimère) dans des LUVs de DMPC en fonction de la quantité de sonde Py-met-chol. On voit que dans cet environnement les deux ratios évoluent de manière linéaire en fonction de la concentration en sonde jusqu'à 1 mol%. Au-delà (dès 2 mol% de Py-met-chol) on mesure l'apparition d'excimères et le comportement spectroscopique du pyrène est différent. Par conséquent en choisissant de marquer les membranes avec 2 mol% de Py-

met-chol on se place à la limite des conditions spectroscopiques idéales tout en ayant accès à l'information apportée par l'excimère.

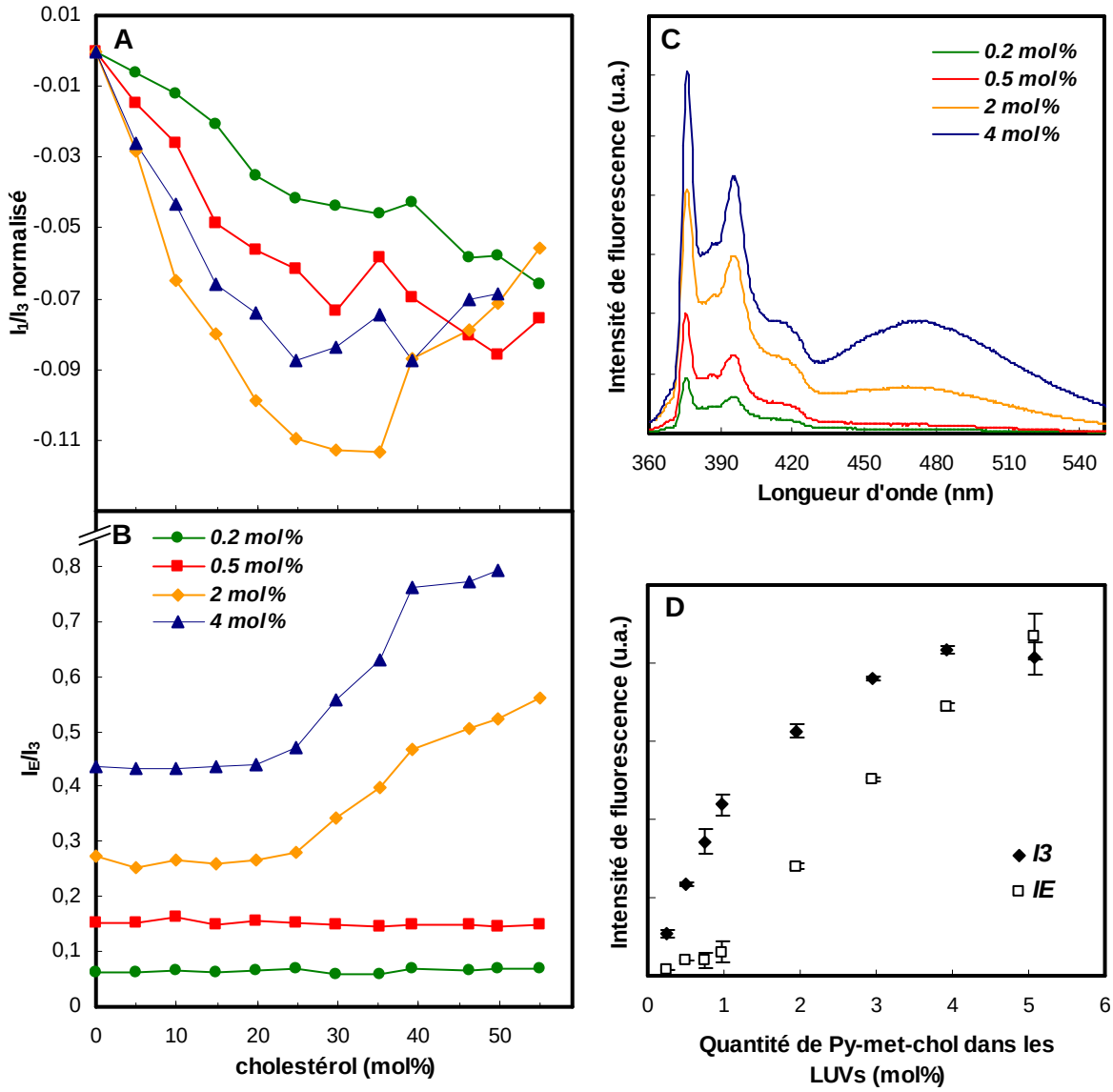


Figure 3.19. Évolution du ratio normalisé I1/I3 (A) et du ratio IE/I3 (B) du Py-met-chol incorporé à 0.2, 0.5, 2 et 4 mol% dans des LUVs de DMPC contenant des fractions croissantes de cholestérol. (C) Spectres d'émission de fluorescence du Py-met-chol à 0.2, 0.5, 2 et 4 mol% dans des LUVs de DMPC. (D) Évolution des intensités de fluorescence I3 (387 nm) et IE (472 nm) en fonction du taux d'incorporation de la sonde dans des LUVs de DMPC. Les mesures ont été effectuées à 37°C.

3.3.2.2 Résultats

Les ratios de fluorescence I1/I3 et IE/I3 ont été mesurés à 37°C dans des LUVs de DMPC, de POPC et de DOPC contenant 2 mol% de Py-met-chol en fonction de la fraction molaire de cholestérol

(de 0 à 55 mol%). L'évolution de ces ratios doit permettre de discriminer une phase ld d'une phase lo induite par le cholestérol. Les résultats sont présentés dans la figure 3.20. Dans les LUVs de DMPC, I1/I3 diminue jusqu'à 35 mol% de cholestérol, puis augmente jusqu'à 55 mol%. Dans ces mêmes membranes, le ratio IE/I3 est constant jusqu'à 30 mol% de cholestérol puis augmente de manière significative jusqu'à 55 mol%.

Considérant le diagramme de phase du DMPC (Almeida et al. 1992) on sait qu'à 30-35 mol% de cholestérol la membrane est totalement en phase liquide ordonnée. Ainsi entre 0 et 30-35 mol% de cholestérol dans le DMPC, le Py-met-chol voit progressivement la membrane passer dans un état ordonnée (avec la diminution de polarité qui y est corrélée) tandis que l'invariance de la quantité d'excimères nous renseigne sur le fait que la sonde ne subie pas de redistribution latérale. En revanche au-delà de 35 mol% de cholestérol la quantité d'excimère augmente, ce qui montre que la sonde se retrouve distribuée en îlots (augmentation locale de la concentration surfacique) ou bien que les rencontres entre les molécules de sondes se fassent plus efficacement (processus collisionnel). D'après les résultats d'absorption (*cf.* tableau 3.5) le Py-met-chol est plus miscible dans les environnements contenant du cholestérol où il forme davantage de

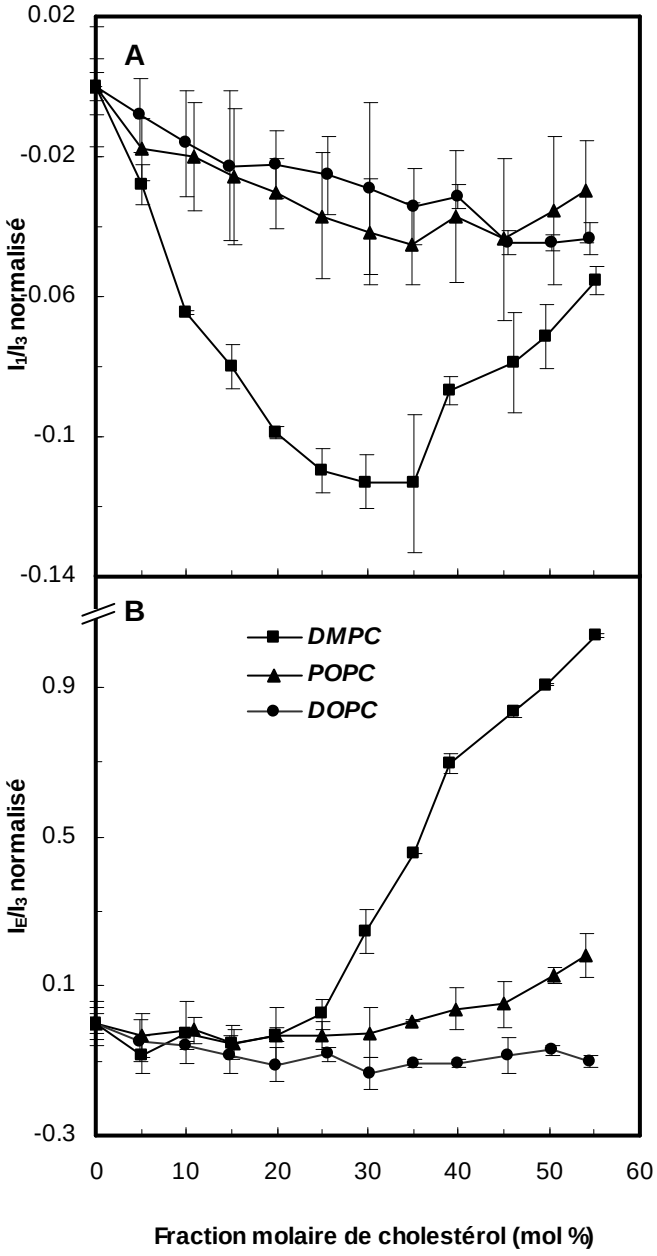


Figure 3.20. Évolution des ratios normalisés I1/I3 (A) et IE/I3 (B) du Py-met-chol incorporé à 2 mol% dans des LUVs de DMPC, POPC et DOPC contenant des fractions croissantes de cholestérol. I1 (377 nm), I3 (387 nm) et IE (472 nm). Normalisation : pour une fraction donnée n en cholestérol, on a $I1/I3 = [(I1/I3_n - I1/I3_0) / I1/I3_0]$. Mesures effectuées à 37°C.

monomères. Cela montre que l'augmentation d'excimères observée est une conséquence de l'augmentation de la dynamique du système, c'est-à-dire qu'il y a plus de monomères disponibles pour former des excimères. En d'autres termes, les excimères statiques (ou stacks) ne participent pas efficacement à l'émission de fluorescence du pyrène, comme cela a déjà été observé (Pansu et al. 1993).

Dans une membrane de phospholipides semi-saturés comme le POPC, il faut au moins 45 mol% de cholestérol pour qu'une phase lo soit générée (Tauc et al. 1998; de Almeida et al. 2003). Les résultats de fluorescence du Py-met-chol dans ce type de membrane montrent une diminution significative du ratio I1/I3 entre 0 et 35 mol% de cholestérol suivi d'une légère remontée à partir de 45 mol%. L'incertitude sur les mesures ne permet pas de distinguer clairement les limites de transition de phase dans cet environnement, mais on peut néanmoins conclure que la sonde se comporte également comme dans le DMPC, c'est-à-dire comme un rapporteur de phase lo complète. Le ratio IE/I3 est constant jusqu'à 35-40 mol% de cholestérol puis augmente significativement lors qu'on est dans une phase lo.

Le DOPC a été choisi comme milieu modèle car le cholestérol n'y induit pas de changement d'état de phase vers une phase strictement lo, bien qu'il puisse augmenter légèrement l'ordre des chaînes acyles (Warschawski et Devaux 2005b). Les résultats de fluorescence du Py-met-chol vont dans ce sens, puisque le ratio I1/I3 diminue faiblement en fonction de la quantité de cholestérol présente. D'autre part le ratio IE/I3 est constant quelle que soit la quantité de cholestérol, cela montre bien qu'aucune phase lo ne se forme dans ces mélanges lipidiques.

3.4 Conclusion

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre montrent que les sondes Pyrène-cholestérol, et notamment le Py-met-chol, ont un comportement suffisamment proche de celui du cholestérol dans les membranes pour pouvoir être utilisés comme rapporteur de celui-ci. On peut dire que les résultats d'absorption confirment que le Py-met-chol est une molécule de choix pour l'étude de la distribution latérale du cholestérol dans les membranes modèles et naturelles, de part sa meilleure miscibilité dans

les phases lo que dans les phases ld. Son utilisation a permis de mettre clairement en évidence le processus auto-associatif du cholestérol dans les membranes lipidiques, une molécule dont la distribution latérale a une incidence importante sur les propriétés physiques de la membrane et qui joue ainsi un rôle prépondérant dans les fonctions des protéines tels que les RCPGs. Ce processus auto-associatif a d'ailleurs été finement quantifié grâce à l'utilisation de l'approche isodesmique, développée auparavant dans l'équipe. Enfin l'auto-association du cholestérol est dépendante du taux de saturation des chaînes acyles des phospholipides dans lequel il évolue.

En ce qui concerne la spectroscopie de fluorescence du Py-met-chol dans les membranes modèles, les mesures des ratios de fluorescence permettent de suivre l'évolution d'une membrane en phase ld vers une membrane en phase lo, de part la diminution de la polarité de la bicouche induite par le cholestérol et par la distribution latérale différente de la sonde dans les phases lo.

Application : détection de l'activation de récepteurs opioïdes

4

4.1 Études sur des suspensions cellulaires par spectrofluorimétrie

Les propriétés spectroscopiques du Py-met-chol ont été mises à profit pour détecter les modifications des propriétés physiques de la membrane plasmique de cellules eucaryotes *in vivo*, lors de l'achèvement d'une fonction biologique. Le choix s'est porté sur la fonction de signalisation accomplie par une famille particulière de RCPGs, les récepteurs opioïdes. Certaines de ces protéines transmembranaires, comme le récepteur humain δ opioïde (hDOR), sont capables d'induire une augmentation de l'épaisseur de la bicouche lipidique qui les entoure lors de leur activation, c'est-à-dire lors de la liaison d'un agoniste (Salamon et al. 2000). Ce genre de perturbation mène à un système hors équilibre qui engendre très probablement une modification de la composition lipidique autour du récepteur, que ça soit par des processus de tri moléculaire ou de relocalisation de la protéine. Dans tous les cas la protéine activée va se retrouver dans un environnement lipidique à l'épaisseur plus adéquate, tel que peut le proposer par exemple une membrane de type « raft », comme le montre l'étude menée sur le récepteur hDOR dans des membranes modèles phospholipidiques plus ou moins enrichies en sphingomyéline (Alves et al. 2005). En effet le récepteur hDOR se relocalise préférentiellement dans la phase enrichie en sphingomyèline (phase lo) lors de la liaison d'un agoniste.

Sur la base d'une modification de l'environnement lipidique entourant la protéine (passage vers une membrane plus « raft »), le Py-met-chol a été incorporé dans la membrane plasmique de cellules eucaryotes sur-exprimant le récepteur mDOR (de type murin) ou hMOR (récepteur μ opioïde humain) et les ratios I1/I3 et IE/I3 ont été mesurés au cours du temps en fonction de l'ajout de solutions d'agonistes ou d'antagonistes. Le but des travaux qui suivent est donc la détection de la liaison de l'agoniste sur le récepteur par la diminution du ratio I1/I3 (diminution globale de la polarité de la membrane corrélée à un déplacement de l'équilibre vers un état de phase davantage liquide-ordonné). Les résultats sont présentés dans les sections suivantes.

4.1.1 Présentation du système

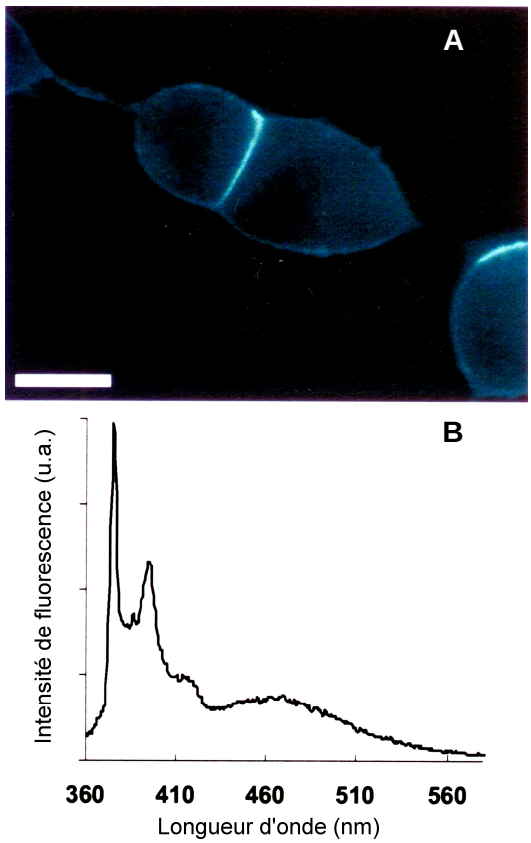


Figure 4.1. (A) Image de microscopie photonique en champs large de cellules CHO sur-exprimant de manière stable mDOR et dont la membrane plasmique est marquée par la sonde Py-met-chol. Barre d'échelle : 10 µm. (B) Spectre d'émission de fluorescence du Py-met-chol dans les mêmes cellules, mais en suspension dans un tampon hepes (λ_{ex} : 330 nm).

Afin d'acquérir des spectres d'émission de fluorescence avec une bonne résolution (*cf.* fig. 4.1 B) et garantir la meilleure sensibilité, il a été choisi dans un premier temps d'utiliser un spectrofluorimètre classique, et de placer les échantillons dans des cuves de mesures en quartz. Ainsi les données ont été acquises sur des suspensions cellulaires (environ 500.000 cellules par cuve) à 37°C dans un tampon physiologique. Le Py-met-chol a été inséré dans la membrane plasmique de cellules CHO grâce à un protocole basé sur l'utilisation de MβCD décrit au chapitre 3.1.3. La figure 4.1 A montre une image de microscopie de fluorescence en champ large du marquage obtenu. On voit dans la figure 4.1 B que les spectres ainsi mesurés ont une résolution comparable à celle obtenue dans les membranes modèles. L'intensité de la bande de l'excimère (et IE/I3) est comparable à celle mesurée dans les LUVs contenant 2 mol% de Py-met-chol, ce qui est un critère de contrôle de la quantité de sonde insérée dans la membrane plasmique. Nos tests préliminaires ont montré que l'intensité des spectres d'émission de fluorescence du Py-met-chol dans la membrane plasmique à l'état basal se stabilise quatre minutes après le marquage de la membrane plasmique. Cependant, une vingtaine de minutes plus tard on observe une déviation significative de l'allure des spectres (formation d'agrégats, perte de la résolution fine du spectre) due à la mort des cellules (testé au bleu Trypan) provoquée par l'excitation de l'échantillon dans l'UV. Par conséquent les stimulations (ajout de solutions d'agoniste, d'antagoniste, de tampon…) commencent quatre minutes après le marquage (t = 0 min) et le spectre d'émission de fluorescence de la suspension est acquis toutes les minutes jusqu'à t = 10 min.

4.1.2 Effet de ligands sur des cellules sur-exprimant le récepteur δ opioïde murin

4.1.2.1 Effet du NaCl sur la liaison d'agonistes

Les mesures préliminaires des ratios de fluorescence au cours du temps ont été effectuées sur des cellules CHO sur-exprimant de manière stable mDOR (CHO-δ) après ajout de Deltorphine II, un agoniste peptidique. Le tampon de mesure est un tampon Hepes classique contenant du sodium. Les résultats sont illustrés dans la figure 4.2. En ce qui concerne le ratio IE/I3 (fig. 4.2 B) on observe une diminution lente et progressive montrant que la sonde Py-met-chol est de plus en plus diluée dans l'échantillon. À moins qu'il ne s'agisse d'un effet spécifique de l'agoniste (*cf.* conditions contrôles, paragraphe 4.1.2.2), ce phénomène peut s'expliquer par les mécanismes permanents de recyclage de la membrane plasmique qui internalisent des portions de la membrane plasmique et qui provoquent la fusion de nouvelles vésicules lipidiques avec celle-ci. Lors de l'ajout de la solution de Deltorphine II dans la suspension cellulaire (1µM, conditions saturantes) on n'observe aucune variation significative du ratio I1/I3 dans la fenêtre d'observation (fig. 4.2 A). Le fait de ne pas observer de diminution de I1/I3 laisse supposer que la liaison de l'agoniste sur le récepteur ne perturbe pas la membrane plasmique ou alors que cette

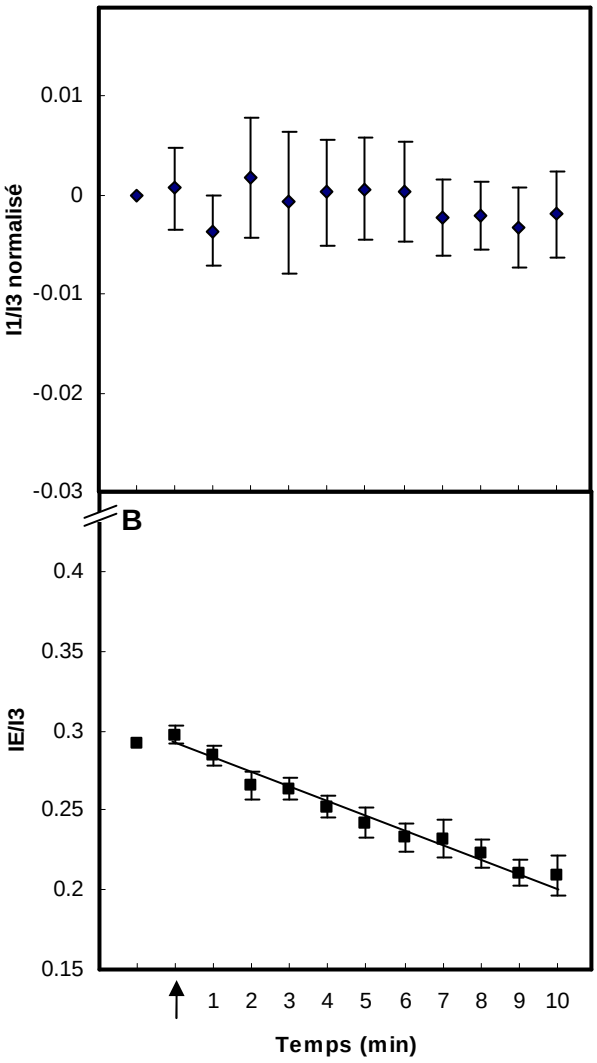


Figure 4.2. Evolution des ratios I1/I3 normalisé (A) et IE/I3 bruts (B) sur des cellules CHO-δ en suspension après l'ajout (*flèche*) de Deltorphine II (agoniste). Mesures effectuées à 37°C dans du tampon Hepes contenant 137 mM de NaCl. Les barres d'erreur correspondent à la SEM. Les ratios I1/I3 sont normalisés par rapport à la valeur avant l'ajout des différentes solutions. La ligne est là pour guider les yeux.

perturbation n'est pas détectée par la sonde. Certaines données de la littérature montrent que le sodium peut se comporter comme un inhibiteur compétitif de la liaison d'un agoniste au récepteur hMOR (Yabaluri et Medzihradsky 1997; Lagane 2001) et est capable d'augmenter l'affinité d'agonistes inverses pour les récepteurs κ, δ et μ opioïdes (Statnick et al. 2003). Par conséquent les ratios I1/I3 et IE/I3 ont été suivi sur le même système mais en l'absence de sodium, remplacé par du chlorure de choline (Yabaluri et Medzihradsky 1997) afin d'optimiser l'efficacité de liaison de la Deltorphine II sur mDOR et ainsi d'augmenter l'effet de l'augmentation d'épaisseur de mDOR sur la membrane plasmique.

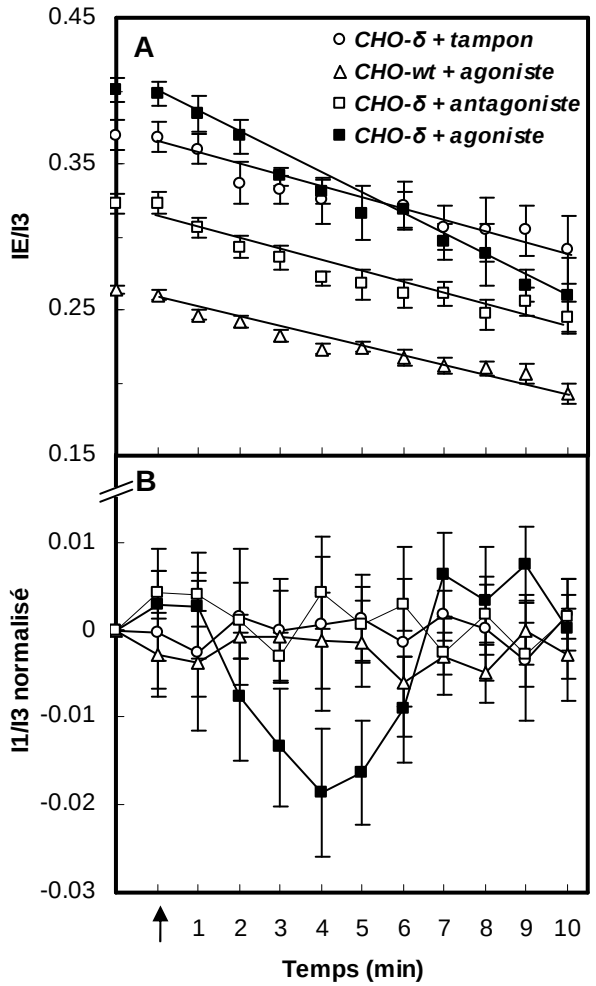


Figure 4.3. Évolution des ratios de fluorescence IE/I3 bruts (A) et I1/I3 normalisés (B) du Py-met-chol dans la membrane plasmique de cellules CHO-δ et CHO-wt en suspension. La flèche indique l'addition dans les suspensions de CHO-δ d'une solution tampon (n=9), de Diprénorphine (n=10) et de Deltorphine II (n=11) et dans la suspension de CHO-wt d'une solution de Deltorphine II (n=10). Les ratios I1/I3 sont normalisés par rapport à la valeur avant l'ajout des différentes solutions. Les barres d'erreur correspondent aux SEM de n échantillons. Les mesures ont été faites à 37°C. Les lignes sont là p our guider les yeux.

4.1.2.2 Résultats

L'évolution des ratios I1/I3 et IE/I3 a donc été suivie sur des suspensions de cellules CHO sur-exprimant ou non mDOR. Différentes conditions ont été testées, à savoir l'activation du récepteur par la liaison de la Deltorphine II, et trois contrôles négatifs : l'effet de la Diprénorphine (un antagoniste alcaloïdique) et l'effet d'une solution tampon sur des cellules CHO-δ et l'effet de la Deltorphine II sur des cellules CHO sauvages n'exprimant pas le récepteur mDOR (CHO-wt). Les résultats sont présentés dans la figure 4.3.

En ce qui concerne les rapports IE/I3 (fig. 4.3 A), on mesure des valeurs initiales moyennes de 0.33±0.05 comparables aux valeurs obtenues dans les LUVs contenant 2

mol% de Py-met-chol, ce qui est en accord avec le critère de marquage fixé. D'autre part on observe que quelles que soient les conditions, les valeurs de IE/I3 diminuent de manière linéaire au cours du temps. Cela montre que cette diminution n'est pas spécifique, mais correspond bien à une dilution membranaire de la sonde Py-met-chol, probablement provoquée par les mécanismes de recyclage de la membrane plasmique (exocytose et endocytose). Une autre explication à cette dilution pourrait être le passage de la sonde sur le feuillet interne de la membrane plasmique, vu que l'utilisation des MβCD permet de marquer uniquement le feuillet externe. Cependant dans le cas de l'ajout de l'agoniste la diminution de IE/I3 est plus prononcée, ce qui montre qu'un processus supplémentaire a lieu au niveau de la membrane plasmique. Ce processus est probablement l'internalisation du récepteur mDOR provoqué par la liaison de la Deltorphine II (Chu et al. 1997). La désensibilisation du récepteur, intervenant dans des temps très court après la liaison d'un agoniste, peut être une autre explication.

En ce qui concerne les ratios I1/I3 (fig. 4.3 B), les valeurs brutes moyennes mesurées sont comprises entre 2.15 et 2.30, ce qui est supérieur aux valeurs obtenues dans les LUVs (typiquement entre 1.75 et 1.95 pour les membranes phospholipidiques contenant 30 mol% de cholestérol). Cela montre que l'environnement à l'intérieur de la membrane plasmique est plus polaire qu'à l'intérieur des LUVs. Cela peut être la conséquence de la présence dans la membrane plasmique d'atomes polaires au niveau des segments transmembranaires des protéines.

La cinétique des ratios I1/I3 révèle des comportements différents en fonction de la stimulation cellulaire (fig. 4.3 B). Lorsque l'on ajoute l'agoniste dans la suspension de CHO-δ, on observe une diminution significative du ratio I1/I3 pendant les quate premières minutes puis un retour progressif pour atteindre les valeurs initiales après sept minutes suivi d'un plateau. On peut déjà conclure sur la base des expériences précédentes qu'en l'absence de sodium dans le tampon de mesure et en présence d'agoniste, on observe une variation du ratio I1/I3. Cela montre l'effet inhibiteur de cet ion sur la famille des récepteurs opioïdes. De plus dans les trois conditions contrôles, aucune variation significative n'est observée, ce qui montre la spécificité de l'effet de la liaison de la Deltorphine II sur mDOR. Ces résultats permettent de conclure que la membrane plasmique, vue par la sonde, devient globalement moins polaire lors de l'activation de mDOR (c'est-à-dire un changement d'épaisseur de la protéine) qui semble être une force suffisante pour induire une variation locale du contenu lipidique

autour des protéines activées, et notamment du cholestérol. L'aspect biphasique de cette cinétique, et en particulier la remontée du ratio est compatible avec les mécanismes de recyclage membranaire de mDOR (Marie et al. 2003) qui vont modifier l'environnement de la sonde, au point de ne plus détecter la liaison de l'agoniste. On note que l'amplitude de la diminution du ratio I1/I3 est inférieure d'un facteur cinq à celle mesurée dans les membranes modèles. Cela peut se comprendre part le fait que les régions de la membrane plasmique qui subissent une réorganisation lipidique ne recouvrent pas la totalité de la surface cellulaire, mais correspondent uniquement aux zones ou mDOR est exprimé. De plus les variations de la concentration locale surfacique en cholestérol dans la membrane plasmique ne sont pas aussi importantes que celles que l'on a générées dans les milieux modèles. On peut ainsi se demander quelle est l'influence du taux d'expression de mDOR sur l'amplitude de la variation du ratio I1/I3.

4.1.2.3 Effet du taux d'expression du récepteur δ sur l'amplitude du signal mesuré

Les ratios I1/I3 et IE/I3 ont alors été mesurés selon le même paradigme, après ajout d'agoniste (Deltorphine II) ou d'antagoniste (Diprénorphine) dans la suspension cellulaire, mais sur des cellules HEK sur-exprimant de manière stable le récepteur mDOR (HEK-δ). Le taux d'expression a été évalué au préalable à ~4 picomoles de récepteurs par mg de protéines. Il était de l'ordre de ~18 picomoles de récepteurs par mg de protéines pour les cellules CHO-δ. Les résultats des mesures sont illustrés dans la figure 4.4. Concernant l'évolution des ratios IE/I3 (fig. 4.4 A), on observe toujours une diminution constante des valeurs, avec une diminution plus prononcée en présence d'agoniste que d'antagoniste montrant que la liaison de l'agoniste déclenche des évènements biologiques particuliers (internalisation). Pour les ratios I1/I3 (fig. 4.4 B), l'ajout d'antagoniste ne provoque aucune variation alors que l'ajout d'agoniste provoque la même variation biphasique que celle observée pour les cellules CHO-δ, avec également un minimum atteint quatre minutes après la stimulation suivie d'un retour vers des valeurs stables proches des valeurs initiales dés la septième minute. L'amplitude de cette variation est 1.8 fois plus faible que pour les CHO-δ. On remarque qu'il n'y a pas de stricte

proportionnalité entre le taux d'expression de mDOR et l'amplitude du signal observé. Cependant, bien que la composition des membranes plasmiques de ces deux types cellulaires soit différente, ces observations laisse penser que la sensibilité de détection de la liaison de l'agoniste au récepteur mDOR est dépendante du taux d'expression de ce dernier. En effet plus il y a de récepteurs potentiellement activables dans la membrane et plus il y a de régions de la membrane plasmique (et donc plus de molécules de Py-met-chol) qui « verront » les effets de la liaison de l'agoniste sur mDOR. Néanmoins, considérant les barres d'erreur sur les ratios I1/I3, on se trouve dans ce cas à la limite de sensibilité de cette approche pour comparer l'effet de l'agoniste par rapport au contrôle. On peut supposer qu'une étude sur des systèmes cellulaires sans sur-expression d'un récepteur d'intérêt (avec des taux d'expression moyen de récepteurs endogènes de l'ordre de 0.5 pmoles/mg de protéines) nécessiterait une amélioration du protocole.

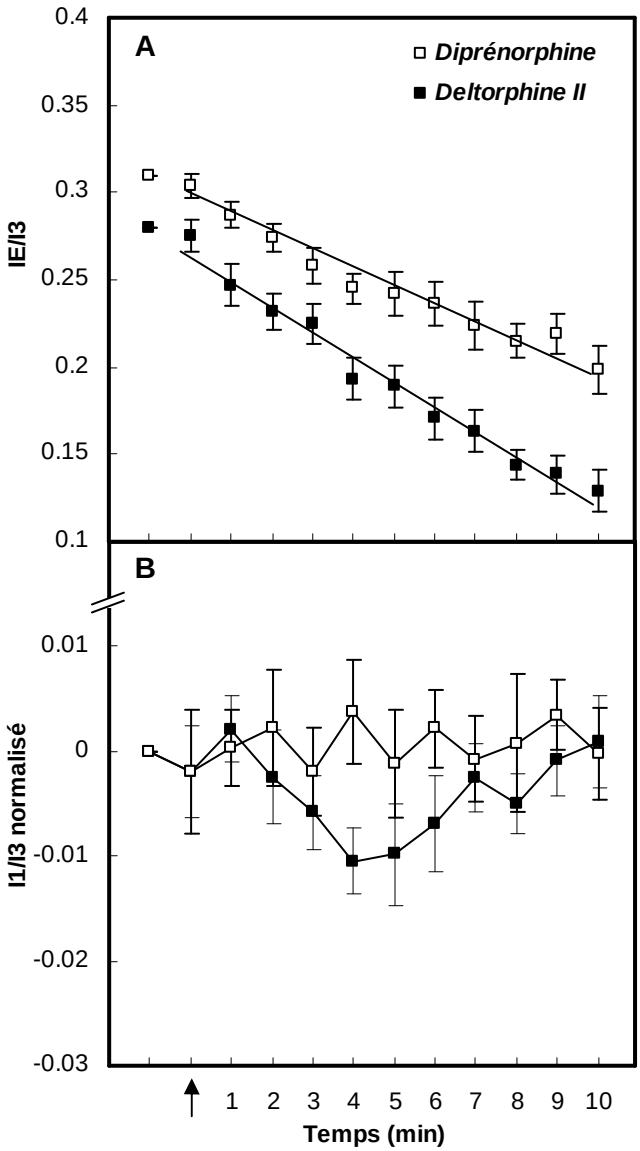


Figure 4.4. Évolution des ratios de fluorescence IE/I3 bruts (A) et I1/I3 normalisés (B) du Py-met-chol dans la membrane plasmique de cellules HEK-δ en suspension. La flèche indique l'addition dans les suspensions d'une solution de Diprénorphine (n=10) ou de Deltorphine II (n=11). Les ratios I1/I3 sont normalisés par rapport à la valeur avant l'ajout des différentes solutions. Les barres d'erreur correspondent au SEM de n échantillons. Les mesures ont été faites à 37℃. Les lignes sont là pour guider les yeux.

4.1.3 Effet de ligands sur des cellules sur-exprimant le récepteur μ opioïde

Le comportement de hMOR, un autre récepteur de la famille des récepteurs opioïdes proche structurellement de mDOR, a été analysé par la même approche. Ce RCPG n'est pas connu pour

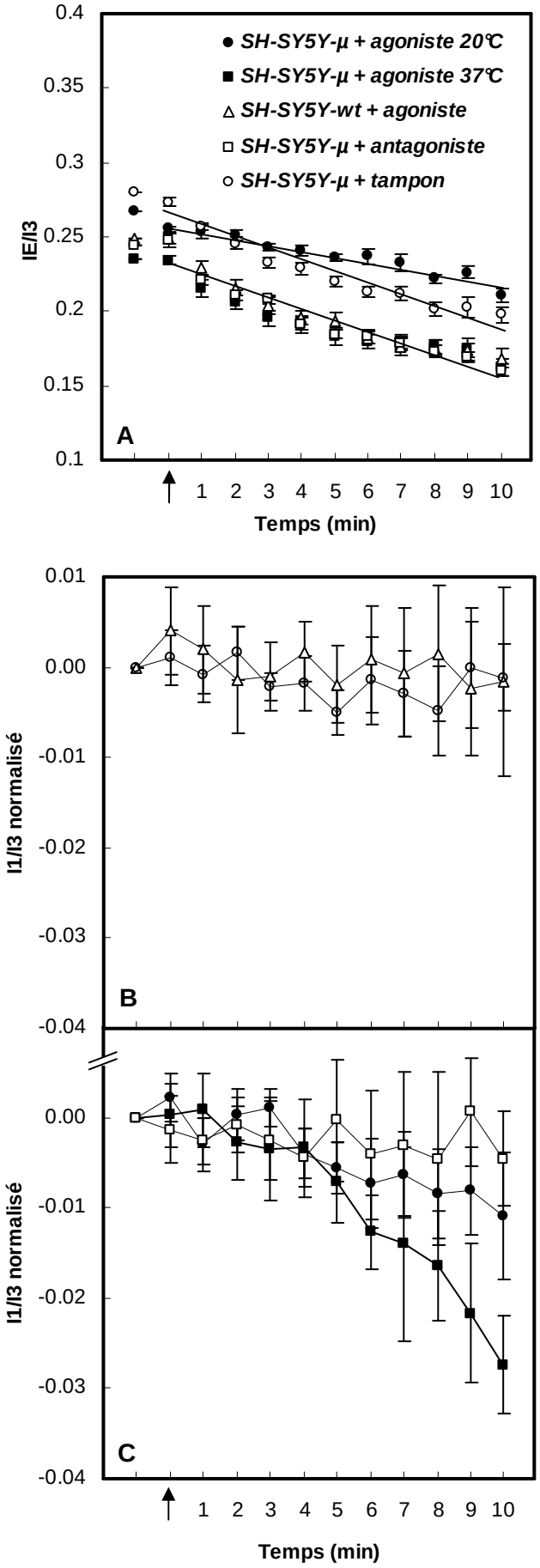


Figure 4.5. Évolution des ratios de fluorescence IE/I3 bruts (A) et I1/I3 normalisés (B et C) du Py-met-chol dans la membrane plasmique de cellules SH-SY5Y-δ et SH-SY5Y-wt en suspension. La flèche indique l'addition dans les suspensions de SH-SY5Y-δ d'une solution tampon (n=10), de DAGO (n=10) ou de CTAP (n=10) et dans la suspension de SH-SY5Y-wt d'une solution de DAGO (n=10). Les ratios I1/I3 sont normalisés par rapport à la valeur avant l'ajout des différentes solutions. Les barres d'erreur correspondent aux SEM de n échantillons. Les mesures ont été faites à 37℃, sauf pour une des conditions avec l'agoniste sur les cellules SH-SY5Y-δ (rond plein) qui a été faite à 20℃. Les lignes sont là pour guider les yeux. Les ratios I1/I3 sont présentés dans deux figures distinctes pour une plus grande clarté.

modifier sa conformation ou ségréger dans les régions membranaires de type « raft » lors de son activation, bien qu'il se relocalise dans des domaines de tailles de plusieurs centaines de nanomètres de diamètre lors de la liaison d'agoniste, tel que le DAGO (Saulière et al. 2006).

L'étude comparée de ce récepteur avec mDOR est donc intéressante. Le système utilisé est une lignée de neuroblastomes sur-exprimant de manière stable le récepteur hMOR (SH-SY5Y-µ) avec un taux d'expression de l'ordre de 3 picomoles de récepteurs par mg de protéines. Les suspensions cellulaires marquées avec le Py-met-chol ont été stimulées avec un agoniste de hMOR (DAGO), un antagoniste (CTAP) et une solution tampon. Une lignée de SH-SY5Y sauvages (SH-SY5Y-wt) ne possédant que le récepteur hMOR endogène (0.2 picomoles de récepteurs par mg de protéines) et stimulée avec l'agoniste a été utilisée comme témoin négatif supplémentaire. Les résultats sont présentés dans la figure 4.5.

Les évolutions des ratios IE/I3 ont la même allure que pour les lignées cellulaires CHO et HEK marquées au Py-met-chol, à savoir une diminution constante des valeurs, synonyme d'une dilution de la sonde dans la membrane plasmique, provoqué par les processus de recyclages de cette membrane. Pour toutes les conditions mesurées à 37°C, les vitesses de décroissance sont les mêmes (fig. 4.5 A). La liaison de l'agoniste sur hMOR ne provoque pas une accélération de la dilution de la sonde comme c'était le cas pour le récepteur mDOR (HEK et CHO). Peut-être que les processus d'internalisation de hMOR sont différents de ceux de mDOR dans ce cas, et passent majoritairement par les puits de clathrine (Daumas et al. 2003) dont l'environnement lipidique est différent. Néanmoins on observe que les valeurs brutes initiales sont comparables à celle mesurées pour les deux autres lignées et sont conformes au critère de marquage fixé.

En ce qui concerne les évolutions des ratios I1/I3 (fig. 4.5 B et C) pour les trois conditions témoins (ajout d'antagoniste ou de tampon sur les suspensions de SH-SY5Y-µ et ajout d'agoniste sur les SH-SY5Y-wt) les valeurs des ratios restent constantes après la stimulation. Par contre la liaison de l'agoniste au récepteur hMOR provoque une diminution significative de I1/I3 au bout de six minutes. Cette diminution d'une grande amplitude est monophasique et se poursuit jusqu'à dix minutes. En dehors de la fenêtre d'observation les mesures ont montré que les valeurs continuent de fortement diminuer, montrant que le processus suivi ne peut pas être seulement dû à la liaison du ligand sur le

récepteur μ (d'autant plus que les cellules commencent à rentrer en apoptose). Le DAGO étant connu pour faire internaliser le récepteur μ au bout de quelques minutes seulement (Saulière et al. 2006), le suivi des ratios de fluorescence a été effectué à 20°C afin de ralentir drastiquement ce processus. La figure 4.5 A montre que la dilution de la sonde au cours du temps est bien ralentie par l'abaissement de la température (diminution plus lente du ratio IE/I3). En ce qui concerne le ratio I1/I3, on voit sur la figure 4.5 C que les valeurs restent constantes pendant le temps d'observation (considérant les barres d'erreur), ce qui montre bien que la diminution observée à 37°C est principalement due à l'internalisation du récepteur, par un processus probablement différent que celui du récepteur mDOR. Il est difficile de savoir précisément dans quel type d'environnement membranaire se trouve la sonde Py-met-chol quelques minutes après la stimulation, mais les puits de clathrine sont un candidat potentiel.

Pour conclure, on a montré que la sonde Py-met-chol, lorsqu'elle est insérée dans la membrane plasmique de cellules eucaryotes en suspension, permet d'appréhender le comportement de phase de celle-ci dans différentes conditions. Cela nous a permis de détecter l'activation du récepteur mDOR par spectrofluorimétrie. Dans tous les cas il est difficile de décrire davantage les mécanismes membranaires qui provoquent les variations des valeurs des ratios, et on doit se limiter à faire des hypothèses, et le but de ces expérimentations est avant tout d'observer une différence significative de l'évolution des ratios I1/I3 entre l'agoniste et l'antagoniste (ou autre condition témoin). Ainsi on peut dire que dans le cas de hMOR, on est à même de détecter l'activation du récepteur puisque l'on peut « voir » l'internalisation provoqué par l'agoniste, le critère de détection restant le même que dans le cas de mDOR (diminution du ratio I1/I3).

4.2 Microspectrofluorimétrie sur des cellules sur-exprimant le récepteur δ opioïde

4.2.1 Présentation de la chaîne de mesure

Dans le but de développer un système de criblage de ligands à plus haut débit, pouvant par exemple être appliqué sur des plaques multi-puits contenant des cellules adhérentes, des essais d'acquisition du

spectre d'émission de fluorescence du Py-met-chol dans la membrane plasmique de cellule isolée *in vivo* ont été entrepris. Un avantage à utiliser des cellules adhérentes est qu'il devient possible d'utiliser un nombre plus important de lignées cellulaires, est ainsi de pouvoir étudier une plus grande diversité de récepteurs. Le système est basé sur un microscope utilisant une source d'excitation laser (excitation de la sonde par des bandes multiples entre 333.6-363.8 nm) et sur lequel est branché un détecteur commercial, à savoir un monochromateur et une caméra CCD (*cf.* chapitre 6 pour plus de détails). Les premières mesures de calibration ont révélé une excellente sensibilité du système sur des échantillons de Py-met-chol dissous dans du chloroforme entre lame et lamelle (temps d'acquisition d'une seconde) et montré la faisabilité de cette approche (fig. 4.6). Les bandes vibroniques I1 et I3 sont aussi bien définies avec le microspectrofluorimètre qu'avec le spectrofluorimètre. Cependant l'ensemble du système n'est pas très sensible en intensité en-dessous de 390 nm, ce qui engendre une plus faible intensité enregistrée au niveau de la bande I1. On ne pourra donc pas strictement comparer les ratios II/I3 avec les expérimentations effectuées sur les cellules en suspension. On remarque également un léger décalage en longueur d'onde vers le rouge de l'ordre de 1.5 à 2 nm du spectre acquis au microspectrofluorimètre (les mesures des ratios se feront à ces nouvelles longueurs d'onde).

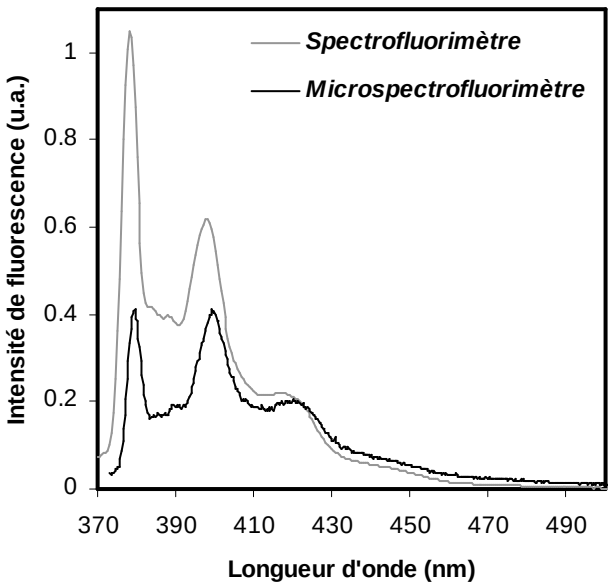


Figure 4.6. Spectres d'émission de fluorescence du Py-met-chol à 20 µM dans du chloroforme acquis en cuve avec un spectrofluorimètre (gris) et entre lame et lamelle au microspectrofluorimètre (noir). Mesures effectuées à température ambiante. L'intensité des spectres est arbitraire.

Dans des conditions de marquage membranaire identiques à celles utilisées pour les campagnes de mesures en suspension, les spectres d'émission de fluorescence du Py-met-chol ont été acquis sur des cellules CHO-δ et CHO-wt isolées et adhérentes. La source d'excitation laser garantissait l'illumination que d'une partie de la membrane plasmique de chaque cellule excitée. La figure 4.7 compare un spectre d'émission acquis dans ces conditions et un autre acquis précédemment pour les

cellules en suspension. On voit que comme dans le cas de la solution chloroformique de Py-met-chol, les résolutions vibroniques des deux spectres sont comparables (on retrouve un léger décalage de longueur d'onde vers le rouge), ce qui va permettre par la suite de suivre l'évolution du ratio I1/I3 au cours du temps après stimulation par différents ligands de ces cellules. Cependant les bandes I3 et I4 sont très rapprochées. La courbe noire en pointillé correspond au spectre d'émission de fluorescence d'une cellule CHO-δ (non marquée au Py-met-chol) acquis au microspectrofluorimètre, et représente l'auto-fluorescence cellulaire. On se rend compte que la lecture de la bande d'émission de fluorescence des excimères est rendue difficile dans cette campagne de mesure, car comprise dans le bruit de fond. Ainsi les ratios IE/I3 ne seront pas analysés par microspectrofluorimétrie.

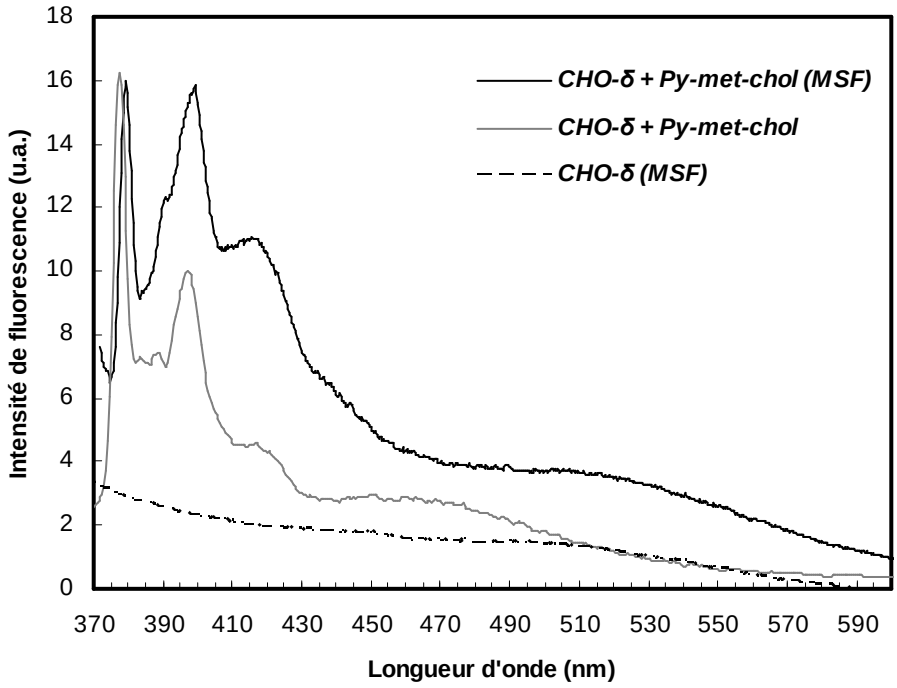


Figure 4.7. Spectres d'émission du Py-met-chol dans la membrane plasmique d'une suspension de cellules CHO-δ acquis au spectrofluorimètre en cuve (gris) ou d'une cellule CHO-δ isolée adhérente acquis au microspectrofluorimètre (MSF) (noir). La courbe noire en pointillé correspond au spectre d'émission de fluorescence d'une cellule CHO-δ isolée adérente non marquée au Py-met-chol acquis au MSF. Les mesures ont été effectuées à température ambiante. L'intensité des spectres est arbitraire.

4.2.2 Effet de ligands

L'effet de l'ajout de différents ligands sur les cellules CHO-δ adhérentes a été suivi par microspectrofluorimétrie. La membrane plasmique des cellules est marquée avec le Py-met-chol en utilisant le protocole décrit précédemment. Les cellules sont alors montées entre lame et lamelle sur un

microscope droit. Les spectres sont acquis rapidement les uns à la suite des autres sur des cellules différentes. Les ratios I1/I3 sont alors calculés pour chacun des spectres et moyennés environ toutes les minutes. Il y a ainsi une incertitude d'une vingtaine de secondes pour chaque valeur. Les ligands choisis sont deux agonistes de mDOR (la Deltorphine II et le DPDPE) et un antagoniste, la Diprénorphine. Chaque condition est reproduite six fois (2 fois 3 lames sur 2 jours différents). L'ensemble des résultats est illustré dans la figure 4.8.

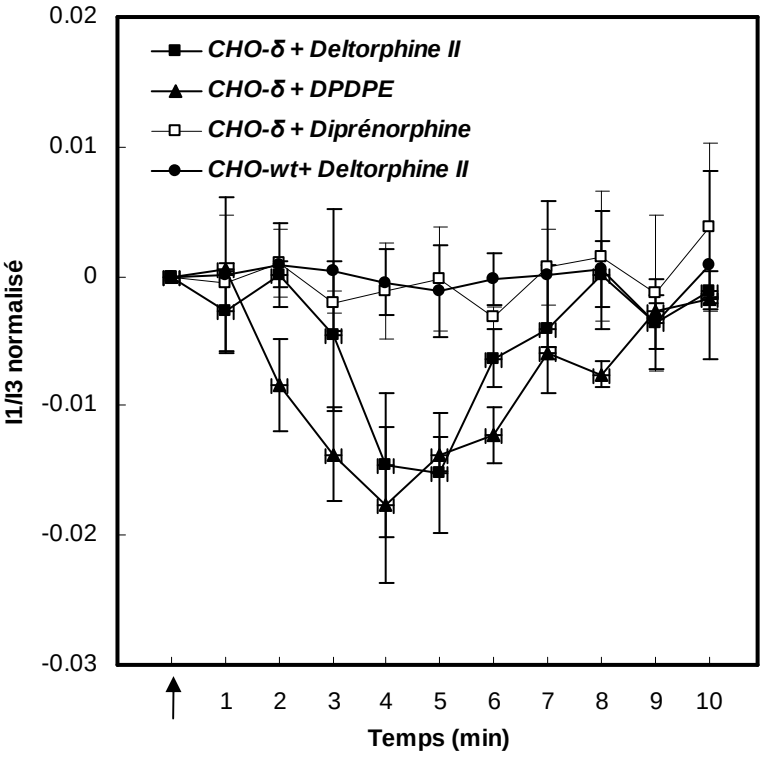


Figure 4.8. Évolution des ratios I1/I3 mesurés au microspectrofluorimètre de cellules CHO-wt après l'ajout de Deltorphine II (agoniste) et de cellules CHO-δ après l'ajout de Deltorphine II, de DPDPE (agoniste) et de Diprénorphine (antagoniste). La flèche marque l'ajout des différents ligands. Les mesures sont effectuées à température ambiante. Chaque point correspond à une moyenne d'environ 25 spectres sur 25 cellules différentes. Les barres d'erreur en Y correspondent aux SEM. Les barres d'erreur en X sont représentées pour les courbes Deltorphine II et DPDPE sur CHO-δ seulement.

Dans le cas de l'ajout de l'antagoniste, on n'observe aucune variation significative du ratio I1/I3 au cours du temps, comme cela était le cas pour les cellules en suspension, ce qui montre que l'antagoniste n'induit pas de perturbation de la membrane par le biais du récepteur. On n'observe également aucune variation pour l'autre témoin négatif, à savoir l'ajout d'agoniste sur des cellules qui n'expriment pas le récepteur mDOR (CHO-wt). En revanche la Deltorphine II et le DPDPE provoquent tous les deux une diminution spécifique transitoire du ratio I1/I3, dont la cinétique et l'amplitude sont proches de celles observées pour les cellules CHO-δ en suspension. Après la stimulation, les valeurs de I1/I3 diminuent jusqu'à la 4-5ème minute puis remontent un peu plus lentement vers les valeurs initiales. La cinétique de la courbe de la Deltorphine II semble retardée par

rapport à celle du DPDPE, mais les incertitudes sur X et Y ne permettent pas la comparaison fine de ces deux comportements. D'ailleurs ces deux agonistes ne sont pas connus pour engendrer des cinétiques de liaison et d'internalisation différentes sur le récepteur hDOR (Marie et al. 2003).

4.3 Conclusion

La mesure des ratios I1/I3 du Py-met-chol, qui nous renseigne sur les changements de propriétés physiques de la membrane plasmique (variation de la polarité du cœur de la bicouche lipidique), est une méthode directe et non invasive efficace pour la détection de la réalisation de fonctions biologiques *in vivo* au niveau de la membrane plasmique. On a ainsi vu que suite à la liaison d'un agoniste, les récepteurs mDOR et hDOR provoquent une variation de la polarité membranaire après seulement quelques minutes. Si dans les deux cas les mécanismes membranaires engendrés semblent différents, la détection de l'activation du récepteur est efficace. Cependant cette approche ne permet pas de connaitre avec exactitude les mécanismes moléculaires qui se produisent au niveau de cette membrane (tri moléculaire, génération de raft…).

De plus il est possible de faire ces mesures ratiométriques du Py-met-chol cellule par cellule avec une bonne sensibilité (intensité et résolution du signal suffisantes). Cela est rendu possible par le fait que cette technique permet de mieux cibler la membrane plasmique de la cellule. Il est néanmoins nécessaire de moyenner les ratios d'une vingtaine de mesures pour obtenir un bon rapport signal sur bruit, ce qui expérimentalement se fait de manière très rapide (environ un spectre toutes les trois secondes).

Conclusion et perspectives

5

L'objectif de cette thèse a été d'évaluer le comportement dans les membranes lipidiques des deux sondes Pyrène-cholestérol synthétisées et d'évaluer le potentiel de ces sondes sur le plan spectroscopique. Tout d'abord, les résultats d'absorption ont permis de mieux comprendre la distribution latérale des sondes, et par extension du cholestérol, dans les membranes modèles. Par la suite les propriétés uniques de fluorescence d'une des deux sondes, le Py-met-chol, ont été mises à profit pour développer un nouvel outil de criblage de ligands sur deux récepteurs aux opioïdes, des RCPGs.

Pour mener à bien ces travaux les sondes devaient avoir quelques pré-requis, qui ont influencés le choix de la synthèse, et qui devaient être validés. Tout d'abord ces sondes montrent une bonne miscibilité dans les membranes lipidiques composées de phosphatidylcholines (16 mol% pour le Py-céto-chol et 28 mol% pour le Py-met-chol) ce qui a permis d'effectuer les études de spectroscopie d'absorption en milieu modèle et de fluorescence sur les cellules. Ce paramètre faisait partie du « cahier des charges » de la synthèse des deux nouvelles sondes, afin d'améliorer la miscibilité de ce type de molécule. Rappelons que la sonde commerciale Py-ester-chol a une miscibilité maximale de seulement 7 mol% dans les membranes de phosphatidylcholines, ce qui est probablement la raison pour laquelle elle ne peut pas être incorporée dans les membranes plasmiques *in vivo*. La synthèse d'une nouvelle sonde, sans double liaison entre les motifs cholestérol et pyrène, permettrait très probablement d'augmenter davantage la solubilité dans les membranes lipidiques et de mimer encore mieux le cholestérol. Néanmoins les données de RMN-^{2}H et de DSC montrent que ces sondes ont une influence sur les propriétés collectives des phospholipides déjà proche de celle du cholestérol, une condition nécessaire au sondage de membranes modèles en phase liquide-ordonnée ou des domaines de la membrane plasmique de type « raft ».

L'utilisation des propriétés hypochromiques du pyrène dans les membranes lipidiques dans l'analyse de l'absorption des sondes par le modèle isodesmique s'est révélée une approche sensible et robuste dans la mesure de la distribution latérale des sondes Pyrène-cholestérol. Plus la sonde est miscible dans les membranes de phosphatidylcholines, moins elle s'auto-associe. Ainsi c'est le Py-met-chol qui se distribue de la manière la plus homogène dans la membrane, avec les constantes d'association les plus faibles quelle que soit la composition phospholipidique de la membrane. Cela montre encore une fois l'intérêt de synthétiser une nouvelle sonde, encore plus proche structurellement du cholestérol. Les valeurs des constantes d'association montrent que la nature des chaînes acyles des phospholipides a une influence sur la distribution des sondes. En effet pour une tête polaire donnée, plus les chaînes acyles des phospholipides sont saturées et moins les sondes s'auto-associent. Ce résultat est comparable à ceux trouvés dans la littérature pour le cholestérol (Pasenkiewicz-Gierula et al. 1991). De plus, Sachant que des travaux antérieures (Lagane et al. 2002) ont montré que les sondes Pyrène-PC n'avaient pas ce comportement auto-associatif dans ce type de membrane, on peut conclure que c'est uniquement la partie cholestérol des sondes qui est à l'origine de l'auto-association. Cela montre encore une fois que ces sondes gardent toutes les propriétés du cholestérol. Ainsi, par extension, l'analyse fine des données d'absorption nous a renseigné sur la distribution latérale du cholestérol dans les membranes modèles : le cholestérol s'auto-associe, même quand il est présent en faible quantité dans des phospholipides saturés. Par exemple on observe seulement 26% de monomères lorsque l'on a 2 mol% de Py-met-chol dans le DMPC. Un autre résultat très important pour la sonde Py-met-chol est le fait que la valeur de la constante d'association diminue en fonction de la quantité de cholestérol présent dans la membrane, montrant sans équivoque que cette sonde est plus miscible dans les membranes en phase liquide-ordonnée. Cela justifie le choix du motif cholestérol de ces sondes pour pouvoir sonder des membranes de type raft. Une étude du comportement du Py-met-chol dans du DMPC contenant du cholestérol et différentes quantités de sphingomyéline permettrait d'apprécier le comportement associatif de ces deux dernières molécules, qui est encore sujet à débat à l'heure actuelle.

Dans un deuxième temps, ces sondes ont été utilisées afin de caractériser par spectroscopie de fluorescence l'état de phase des membranes lipidiques grâce au groupement pyrène. Comme le pyrène, le spectre d'émission de fluorescence de ces sondes s'est révélé sensible à la polarité de l'environnement de part la variation de l'intensité de la bande I1 (377 nm) et l'invariance de celle de la bande I3 (388 nm) dans différents solvants. Un résultat important est le fait que la valeur du ratio de fluorescence I1/I3 de la sonde Py-met-chol évolue selon une relation linéaire principalement en fonction de la polarité de l'environnement. Ainsi les mesures de polarité ont été effectuées dans des membranes modèles en fonction de la quantité de molécules d'eau présente au sein de la bicouche, phénomène corrélé à la quantité de cholestérol formant cette bicouche. L'évolution des ratios I1/I3 du Py-met-chol permet de caractériser spectroscopiquement les membranes en phase liquide-désordonnée (polaire) et les membranes en phase liquide-ordonnée (moins polaire) dans différents mélanges binaires. Les résultats les plus significatifs ont été obtenus dans le DMPC où le cholestérol a le plus grand effet d'ordre sur les chaînes acyles. La mesure des ratios IE/I3, représentatif de la distribution de la sonde, a également permis de discriminer les phases liquide-désordonnée des phases liquide-ordonnée, avec une forte augmentation des valeurs dans ces dernières. Corrélée aux résultats d'absorption, on se rend compte que cette augmentation est en fait due à un plus grand nombre de monomères dans la phase liquide-ordonnée, qui sont donc disponibles pour la formation dynamique d'excimères. Ces résultats obtenus dans les membranes modèles montrent qu'il est possible de sonder des membranes biologiques avec la sonde Py-met-chol en terme de phase lo et ld. Il serait intéressant de mesurer les ratios de fluorescence du pyrène dans des membranes modèles « raft » plus pertinentes, tels que les mélanges ternaires DOPC/DPPC/cholestérol ou DOPC/sphingomyéline/cholestérol afin de mieux caractériser la réponse de la sonde dans les phases lo que l'on est susceptible de retrouver dans la membrane plasmique (domaines « raft »). D'autre part des mesures de durée de vie du pyrène sur nos membranes modèles apporteraient une meilleure compréhension de la distribution de la sonde Py-met-chol (identification des différentes populations de sonde) quand on passe d'une membrane en phase ld à une membrane en phase lo.

Enfin, l'utilisation de MβCD chargées en Py-met-chol s'est révélée un moyen très efficace pour marquer la membrane plasmique des cellules tout en étant sain pour celles-ci. On a vu que l'intensité de fluorescence de la bande de l'excimère permet de quantifier la quantité de sonde incorporée dans la membrane. Ce marquage a permis le suivi par spectroscopie de l'évolution des ratios I1/I3 du Py-met-chol sur les cellules CHO-δ *in vivo* en suspension. Les résultats ont révélé une variation de la polarité de la membrane plasmique synonyme d'une perturbation membranaire engendrée par la liaison d'un agoniste sur le récepteur mDOR. Cette diminution de la polarité est compatible avec un processus de tri moléculaire (recrutement de cholestérol) autour des récepteurs activés pour générer une membrane (de type raft) ajustée à la nouvelle épaisseur de mDOR. En ce qui concerne le récepteur hMOR, le suivi des ratios de fluorescence permet de détecter spécifiquement la liaison de l'agoniste, bien que les mécanismes cellulaires mis en jeu soient différents. Ces résultats sont très prometteurs dans l'optique de développer un système de criblage de ligands sur des récepteurs de ce type et montrent que la liaison de l'agoniste sur le récepteur d'intérêt est détectée en quelques minutes seulement. Les mesures de I1/I3 menées sur des cellules adhérentes au microspectrofluorimètre confirment le comportement de mDOR avec deux agonistes différents, et sont un pas supplémentaire vers un système efficace de criblage de ligands utilisant la spectroscopie du Py-met-chol.

Sur la base de ces travaux, une collaboration a été initiée pour étudier la variation de la polarité de la membrane plasmique de macrophages lors de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*, un phénomène qui serait dépendant du cholestérol.

Enfin, si les sondes Pyrène-cholestérol présentent un fort potentiel en spectroscopie, elles se révèlent moins intéressantes en microscopie photonique, de part leur longueur d'onde d'excitation et d'émission dans l'UV. Ainsi la synthèse d'une nouvelle sonde Pyrène-cholestérol, présentant un groupement cétone conjugué au pyrène, a été débutée. Une telle sonde devrait avoir un spectre d'émission de fluorescence fortement décalé vers les plus grandes longueurs d'onde, comme c'est le cas pour les sondes céto-anthracéniques par rapport à l'anthracène. Un autre moyen de pallier le problème de l'excitation de ces sondes en imagerie est d'utiliser la microscopie biphotonique, idéalement en utilisant un laser configuré autour de 690 nm (ce qui correspond à une excitation réelle autour de 345 nm, le maximum d'absorption du pyrène). Des travaux préliminaires d'imagerie

biphotonique ont déjà démarré en collaboration avec une équipe de physiciens de la National Taiwan University. J'ai pu me rendre sur place pendant deux mois afin de réaliser les premières mises au point d'un microscope confocal bi-photonique capable de faire de l'imagerie ratiométrique du pyrène au niveau des bandes I1 et I3.

Matériels & Méthodes

6

6.1 Produits chimiques.

Les phospholipides 1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DMPC), 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC) et 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (POPC) proviennent de chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Le 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DPPC), le 1,2-Dipalmitoyl-D62-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine ($DPPC_{d62}$) et le cholestérol proviennent de chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al, USA). Ces composés (en poudre) sont stockés à -20°C. Les solutions sont préparées en pesant les lipides au millionième de gramme (Sartorius super-micro balance) qui sont ensuite dissous dans un mélange chloroforme/méthanol (9:1) et stockés à 4°C. La concentration des solutions est également vérifiée par un dosage du phosphore pour les phospholipides (dans une solution sulfurique les ions orthophosphates forment avec les ions molybdates l'acide phosphomolybdique. Celui-ci est réduit par l'acide ascorbique en bleu de phosphomolybdène qui est dosé par photométrie (Rouser et al. 1970)) et un dosage colorimétrique pour les stérols (Zak et al. 1954). La pureté des solutions est testée par chromatographie sur couche mince de silice (Merck, Darmstadt, Germany) avec un mélange chloroforme/méthanol/eau (65:25:4, v/v/v) comme éluant. La détection est basée sur la révélation au réactif de Dittmer (Dittmer et Lester 1964) pour les lipides phosphorés (tâches bleues) puis la plaque est chauffée pour détecter les stérols (tâches noires). L'agoniste [D-Ala^2, N-Me-Phe^4, Gly^5-ol]-Enkephalin (DAMGO) et l'antagoniste H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH_2 (CTAP) du récepteur μ opioïde proviennent de chez Sigma. Les agonistes Deltorphine II et [Tyr-D-Pen-Gly-p-Chloro-Phe-D-Pen]-Enkephalin (DPDPE) et l'antagoniste Diprénorphine du récepteur δ opioïde proviennent de chez Reckitt & Coleman (UK).

6.2 Préparation de liposomes.

Les liposomes sont préparés en mélangeant les volumes appropriés de solutions mères chloroformiques de lipides dans des tubes à hémolyse en verre de ∅ = 13 mm (6.8 mL). Le solvant est évaporé à température ambiante sous flux d'azote (via une pipette pasteur introduite dans le tube) et en agitant le tube à la main de manière à déposer un film lipidique sur les parois du tube. L'évaporation est complétée en plaçant les tubes sous vide (dessiccateur relié à une pompe à palette ; 1 Torr) pendant au moins 2 heures. Les lipides sont ensuite hydratés avec 3 mL de tampon MOPS (10 mM 3-morpholino-propanesulfonic acid, 100 mM NaCl, 0.02% m/v NaN_3, pH 7.4 ajusté avec une solution de NaOH à 1 M) pendant 30 minutes à une température au-delà de la température de transition de phase (*Tm*) des phospholipides utilisés. Les tubes sont alors agités avec un vortex pendant 4 minutes pour former des MLVs (Multilamellar Vesicles). Pour les études de calorimétrie différentielle à balayage (DSC) ou de spectroscopie RMN ces MLVs (à une concentration finale de 30 mM et 12 mM respectivement) sont homogénéisés par 3 cycles de congélation (-4°C) / décongélation (>*Tm °C).* Pour les études d'absorption et de fluorescence on forme des SUVs (Small Unilamellar Vesicles) en immergeant une sonde à ultrasons en titane dans les échantillons (>*Tm °C)*. La sonication (Vibracell) délivre 12.5 watts pendant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 20000 × g pendant 20 minutes pour culoter les résidus de titane relargués par la sonde (Lorin et al. 2004). En effet ces résidus sont des éléments qui diffusent fortement la lumière et sont des quenchers de la fluorescence (Lakowicz 1999). Les échantillons sont stockés pendant 36 heures (à 4°C) afin de permettre la fusion des vésicules entre elles. Après relaxation, la taille des liposomes est mesurée par DLS (dynamic light scattering) sur un appareil Dynapro Protein Solution (Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA): 100 µL de suspension de liposomes sont prélevés est centrifugés à base vitesse (5000 × g) pendant 5 minutes pour enlever toute bulle d'air de l'échantillon. La suspension est alors placée dans une cuve de mesure thermostatée à 20°C. Les diamètres obtenus pour les liposomes, et ce quel que soit les mélanges lipidiques utilisés, sont de l'ordre de 160 nm ce qui correspond bien à des LUVs (Large Unilamellar Vesicles) plus stables dans le temps en terme de taille (entre 4 et 5 semaines selon mon

expérience). La concentration en lipides totaux des LUVs utilisés oscille entre 10^{-4} et 10^{-3} M pour les études de stacking et est de 10^{-3} M pour les études de polarité dans différents phospholipides.

6.3 Calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

On dépose 45 mg de chaque suspension de MLVs (DPPC) dans des capsules scellées en acier inoxydable que l'on place dans un calorimètre Pyris-1 (Perkin Elmer Corporation, Santa Barbara, CA, USA) sous un flux constant d'azote pour éviter toute réaction de l'échantillon avec l'atmosphère du four. Les mesures se font en montée et descente en température (sur la plage 5-60°C) à des vitesses de 600, 300, 150, 105, 60, 45, 30 et 15°C/h. Cela permet de mesurer les transitions et pré-transitions de phase et les enthalpies de chaque échantillon en fonction de la vitesse de mesure et ainsi d'extrapoler ces valeurs pour une vitesse nulle.

6.4 Spectroscopie RMN ^{2}H.

Les suspensions de MLVs de $DPPC_{d62}$, $DPPC_{d62}$/cholestérol et $DPPC_{d62}$/Py-met-chol sont centrifugées 5 min à 4000 × g et les culots sont re-suspendus dans 200 µL d'eau déplétée en D_2O et placés dans des tubes en verre de 20 mm de long et 5 mm de diamètre fermés aux extrémités par des bouchons en caoutchouc recouverts d'un film de téflon. Les acquisitions sont faites à 50°C (au-dessus de la température de transition de phase du $DPPC_{d62}$) sur un spectromètre Avance 500 DMX (Bruker-Biospin, Wissembourg, France) à une fréquence de résonnance de 76.77 MHz avec une sonde solénoïde statique simple résonance de 5 mm. Les échos quadrupolaires ont été obtenus avec la séquence suivantes: on génère deux pulses de 3.75 µsec à 90° à 40 µsec d'intervalle puis l'acquisition est effectuée 20 µsec après sur une fenêtre de 500 kHz. Le temps de répétition est de 1 sec pour éviter l'échauffement de l'échantillon. Un millier de spectres RMN-^{2}H sont ainsi accumulés pour chaque mélange lipidique.

6.5 Préparation de la solution de méthyl-β-cyclodextrine/Py-met-chol.

Les membranes plasmiques des cellules sont marquées grâce à une solution de méthyl-β-cyclodextrines (MβCD) (Sigma, Steinheim, Germany) chargées en sonde Py-met-chol (Christian et al. 1997; Lagane 2001). 10.9 mg de Py-met-chol sont dissous dans 150 µL de DiméthylFormamide (DMF) et chauffé à 70 °C. 683 mg de MβCD sont dissous dans 7 mL d'eau milliQ dans un erlenmeyer puis chauffée à 70 °C et mis sous agitation. On a une valeur moyenne de 542 µmoles de MβCD dans la solution. En effet, le poids moléculaire d'une MβCD, du fait du nombre variable de méthylations (de 10.5 à 14.7 par molécule), oscille entre 1232 et 1290 $g \cdot mol^{-1}$. Pour obtenir une solubilisation optimale du Py-met-chol il faut un ratio molaire MβCD/Py-met-chol au voisinage de 75:1. Ainsi on ajoute lentement 50 µL de la solution de Py-met-chol/DMF dans la solution de MβCD avec une seringue en verre. Le ratio molaire réel est alors compris entre 73.2:1 et 76.7:1. On laisse la solution revenir à température ambiante et on obtient une solution translucide. On obtiendra une solution d'autant plus laiteuse que la solubilisation est incomplète (formation d'agrégats de Py-met-chol). Pour enlever les éventuels agrégats de Py-met-chol qui se seraient formés, on passe la solution à travers un filtre (pores de 0.22 µm) sur lequel les agrégats insolubles se déposent. Cela permet aussi de stériliser la solution. La solution de MβCD/Py-met-Chol est stockée à 4 °C dans des vials opaques vissés. La solution est utilisée au plus tard dans le mois qui suit. Ultérieurement le ratio MβCD/Py-met-Chol a été ramené à 60 :1 avec une efficacité de marquage accrue.

6.6 Lignées cellulaires utilisées et conditions de culture.

Les cellules CHO-wt (Chinese Hamster Ovary - wild type) utilisées sont issues des souches cellulaires CHO-K1 qui n'expriment pas de récepteurs aux opioïdes de manière endogène. Les cellules CHO-δ sont des cellules CHO-wt transfectées de manière stable afin de sur-exprimer le récepteur delta aux opioïdes murin (expression ultérieurement évaluée à 18 picomoles de récepteurs/mg de protéines). Les cellules SH-SY5Y-µ sont des cellules SH-SY5Y-wt (neuroblastomes) transfectées de manière

stable afin de sur-exprimer le récepteur μ aux opioïdes humain fusionné à la Green Fluorescent Protein (à hauteur de 3 picomoles de récepteurs/mg de protéines). Ces cellules expriment naturellement le récepteur μ aux opioïdes humain avec un taux d'expression de l'ordre 0.23 picomoles de récepteurs/mg de protéines. Les cellules HEK-δ sont des cellules issues des souches cellulaires HEK 293T transfectées de manière stable afin de sur-exprimer le récepteur δ aux opioïdes humain fusionné à la GFP et au tag T7 en C-terminal (à hauteur de 4 picomoles de récepteur/mg de protéines). Les étiquettes GFP et T7 n'ont pas eu d'utilité dans les expériences menées. Les cellules sont cultivées dans des boîtes de petri de ∅ = 60 mm à 37 °C sous une atmosphère saturée en eau et à 5% de CO_2. Pour les CHO-wt, le milieu de culture consiste en du milieu Ham F12 (Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10%), du glutamate de sodium (2 mM), un mélange pénicilline/streptomycine (50 U/mg) comme antibiotiques et, uniquement pour les cellules transfectées, de la généticine (0.8% v/v) pour sélectionner les cellules exprimant le récepteur δ. Pour les HEK-δ et les lignées SH-SY5Y, le milieu de culture est du Dulbecco's Modified Eagle Medium supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10%), du glutamate de sodium (2 mM), de la gentamycine (0.5% v/v) comme antibiotique et de la généticine (0.8% v/v) pour sélectionner les cellules exprimant le récepteur δ. Tous les constituants nommés ci-dessus ont été achetés chez Gibco (Invitrogen, Germany).

6.7 Marquage des membranes plasmiques *in vivo*.

Toutes les solutions utilisées sont préparées extemporanément et placées dans une étuve pour être utilisées à 37°C. On prépare une solution de marquage en diluant une solution de MβCD/Py-met-Chol au 1/30° dans du Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco) sans Ca^{2+}/Mg^{2+}. On utilise des cellules adhérentes et au moins à 90% confluentes pour limiter les éventuelles fixations non spécifiques de sondes Py-met-chol sur le fond de la boîte et/ou la lamelle en verre. Pour les mesures en cuve au spectrofluorimètre on utilisera du PBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} pour favoriser le décollement des cellules alors que pour les mesures sur lame de verre au microspectrofluorimètre on utilisera du PBS avec

Ca^{2+}/Mg^{2+}. Le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées avec 2 × 1 mL de PBS ± Ca^{2+}/Mg^{2+} puis incubées 2 minutes avec 1 mL de solution de marquage. Les cellules sont alors lavées 6 fois avec 1 mL de PBS ± Ca^{2+}/Mg^{2+} et mises en suspension avec 600 µL (ou montées sur lame dans 60 µL) de tampon Hepes sans sodium (20 mM Hepes, 118 mM choline chloride, 10 mM glucose, 3mM $MgSO_4$, 1.5 mM $CaCl_2$, pH 7.4 ajusté avec du KOH).

6.8 Test de toxicité cellulaire du Py-met-chol.

Les cellules sont cultivées dans des plaques 24 puits, de Ø=12mm (surface=113 mm²). Le comptage des cellules se fait au microscope à fond clair équipé d'un objectif ×32 et d'un réticule, ce qui donne un champ de 0.05 mm². On compte 5 carrés/puits (2 puits par condition). Après une incubation de 2 ou 5 min avec 400 µL d'un mélange MβCD/Py-met-chol (75:1) au 1/30° dans du PBS sans Ca^{2+}/Mg^{2+} (même protocole que le marquage des membranes plasmiques), on rince avec 400 µL de PBS puis on incube dans 400 µL d'une solution de Bleu Trypan 0.4% (Sigma) diluée 2 fois dans du PBS pendant au moins 5 minutes: le Bleu Trypan traverse la membrane plasmique. On rince 2 fois avec du PBS et on compte les noyaux bleus, correspondant aux cellules en apoptose qui ne peuvent plus expulser le Bleu Trypan du cytoplasme, lui permettant de traverser l'enveloppe nucléaire. Ce test permet de dénombrer les cellules mortes, en place, mais il faut également observer la dissociation des cellules (espaces intercellulaires plus importants) et la perte de cellules par décollement (diminution du nombre total de cellules).

6.9 Spectroscopie d'absorption.

Les spectres d'absorption mesurés afin de déterminer les coefficients d'absorption molaire des sondes Pyrène-cholestérol ont été acquis sur deux spectrophotomètres différents, un Uvikon 923 (Kontron Instrument, Milan, Italy) et un Specord 205 (Analytik Jena, Jena, Germany) tous les deux thermostatés à 30°C.

6.10 Spectroscopie de fluorescence.

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence des sondes Pyrène-cholestérol ont tous été enregistrés sur un spectrofluorimètre Quanta Master-4 (Photon Technology International, Birmingham, NJ, USA) thermostaté à 37°C. Pour les suspensions de liposomes la longueur d'onde d'excitation est de 346 nm, le temps d'intégration de 100 ms et les bandes passantes pour l'excitation et l'émission sont respectivement de 5 nm et 2 nm. Les spectres sont enregistrés entre 300 et 360 nm pour l'excitation (émission à 390 nm pour les monomères ou 470 nm pour les excimères) et entre 365 et 600 nm pour l'émission. Pour les suspensions cellulaires la longueur d'onde d'excitation est de 330 nm afin de ne pas mesurer la bande Raman du tampon Hepes dans le spectre d'émission des sondes Pyrène-cholestérol (elle apparait 35 nm décalée vers le rouge par rapport à la longueur d'onde d'excitation), le temps d'intégration de 200 ms et les bandes passantes pour l'excitation et l'émission sont respectivement de 5 nm et 2 nm. Les spectres d'excitation sont enregistrés entre 300 et 360 nm et les spectres d'émission entre 370 et 480 nm.

6.11 Microspectrofluorimétrie.

Le microspectrofluorimètre a été mis en place par Serge Mazères, ingénieur de recherche. Il consiste en un microscope Axioplan (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Germany) équipé d'un objectif à contraste de phase au grossissement de ×40 et d'ouverture numérique 1.3. D'autre part il est relié à une source d'excitation laser Innova 90C-A4 à argon (Coherent, Santa Clara, CA, USA) configuré, par un jeu de miroirs interne, en mode UV pour exciter le pyrène (bandes multiples entre 333.6-363.8 nm). Le laser délivre une puissance moyenne de 55 mW atténuée 100 fois par un filtre neutre placé directement à la sortie du faisceau. Une lentille amovible est positionnée à l'entrée du microscope afin de permettre, le cas échéant, une illumination en champ large de l'échantillon (illumination d'environ 80% du champ). L'acquisition des spectres d'émission de fluorescence se fait par un système (Horiba Jobin-Yvon, Longjumeau, France) placé sur la sortie caméra au-dessus du microscope et est composé d'un monochromateur de la série microHR, d'une caméra CCD série

Synapse et du contrôleur Symphony piloté par le logiciel SynerJY installé sur un PC. Le monochromateur est configuré pour utiliser le réseau de diffraction d'une résolution de 600 gr/mm qui permet l'éclatement d'un spectre (jusqu'à 280 nm de large) sur le capteur CCD de la caméra (refroidie par un système Peltier couplé au capteur CCD) ayant une résolution de 1024 × 256 pixels et une efficacité quantique de 40% sur la plage 200-900 nm. Finalement on a une résolution spectrale de 0.6 nm. Les spectres sont enregistrés de 372 à 600 nm avec un temps d'exposition de 1 sec et un gain de 4%.

6.12 Microscopie photonique.

Les images des différents marquages des membranes plasmiques ont été acquises sur un microscope Axioplan II (Carl Zeiss) équipé d'un objectif ×63 à immersion à huile au d'une lampe à vapeur de mercure à température ambiante. Les blocs filtres utilisés sont le bloc DAPI (ex. BP365-12 / dic. FT395 / em. LP 397) pour les sonde Pyrène-cholestérol et FITC (ex. BP450-490 / dic. FT510 / em. LP 515) pour les récepteurs membranaires fusionnés à la Green Fluorescent Protein. Les images sont acquises via une caméra CCD C2400-75i (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu city, Japan) pilotée par Labview.

Références 7

-A-

Aittoniemi J, Rog T, Niemela P, Pasenkiewicz-Gierula M, Karttunen M, Vattulainen I (2006) Tilt: major factor in sterols' ordering capability in membranes. J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys 110:25562-4

Albert AD, Young JE, Yeagle PL (1996) Rhodopsin-cholesterol interactions in bovine rod outer segment disk membranes. Biochim Biophys Acta 1285:47-55

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular Biology of The Cell. Garland Science, New York

Almeida PF, Vaz WL, Thompson TE (1992) Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. Biochemistry 31:6739-47

Alves ID, Salamon Z, Hruby VJ, Tollin G (2005) Ligand modulation of lateral segregation of a G-protein-coupled receptor into lipid microdomains in sphingomyelin/phosphatidylcholine solid-supported bilayers. Biochemistry 44:9168-78

Atger VM, de la Llera Moya M, Stoudt GW, Rodrigueza WV, Phillips MC, Rothblat GH (1997) Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. J Clin Invest 99:773-80

Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. Biophys J 16:1055-69

-B-

Bacia K, Scherfeld D, Kahya N, Schwille P (2004) Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes. Biophys J 87:1034-43

Bacia K, Schwille P, Kurzchalia T (2005) Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. Proc Natl Acad Sci U S A 102:3272-7

Barenholz Y (2002) Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". Prog Lipid Res 41:1-5

Barenholz Y, Thompson TE (1999) Sphingomyelin: biophysical aspects. Chem Phys Lipids 102:29-34

Barrow DA, Lentz BR (1985) Membrane structural domains. Resolution limits using diphenylhexatriene fluorescence decay. Biophys J 48:221-34

Beck A, Heissler D, Duportail G (1993) New Diphenylhexatriene Derivatives as Fluorescent Membrane Probes: Partitioning Properties. Journal of Fluorescence 3:145-147

Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF (1999) Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. Biochim Biophys Acta 1439:317-30

Birks JB (1970) Photophysics of aromatic molecules. Wiley, New York, NY

Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. Embo J 18:1723-9

Botelho AV, Huber T, Sakmar TP, Brown MF (2006) Curvature and hydrophobic forces drive oligomerization and modulate activity of rhodopsin in membranes. Biophys J 91:4464-77

Bowie JU (2005) Solving the membrane protein folding problem. Nature 438:581-9

Bree A, Vilkos VVB (1964) Assignment of the two lowest singlet states of pyrene. J. Chem. Phys 40:3125

Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell 68:533-44

Brown GO, Guardala NA, Price JL, Weiss RG (2003) Selectivity and efficiency of pyrene attachment to alkanes induced by broadband X-rays. An Acad Bras Cienc 75:33-8

Brzustowicz MR, Cherezov V, Caffrey M, Stillwell W, Wassall SR (2002) Molecular organization of cholesterol in polyunsaturated membranes: microdomain formation. Biophys J 82:285-98

Bullova H, Balgavy P (2005) Turbidimetric study of unilamellar extruded egg phosphatidylcholine liposomes. Acta Facultatis Pharmaceuticae universitatis comenianae tomus II

-C-

Castanheira EMS, Martinho JMG (1994) Solvatochromic shifts of naphtalene and pyrene excimers. J. Photochem. Photobiol. A: Chem 80:151-156

Catalan J (1997) On the E(T) (30), pi, P(y), S', and SPP Empirical Scales as Descriptors of Nonspecific Solvent Effects. J Org Chem 62:8231-8234

Chamberlain LH (2004) Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts. FEBS Lett 559:1-5

Chattopadhyay A, Paila YD (2007) Lipid-protein interactions, regulation and dysfunction of brain cholesterol. Biochem Biophys Res Commun 354:627-33

Chiantia S, Ries J, Kahya N, Schwille P (2006) Combined AFM and two-focus SFCS study of raft-exhibiting model membranes. Chemphyschem 7:2409-18

Cho H, Kim YA, Ho WK (2006) Phosphate number and acyl chain length determine the subcellular location and lateral mobility of phosphoinositides. Mol Cells 22:97-103

Chong PL (1994) Evidence for regular distribution of sterols in liquid crystalline phosphatidylcholine bilayers. Proc Natl Acad Sci U S A 91:10069-73

Chong PL, Sugar IP (2002) Fluorescence studies of lipid regular distribution in membranes. Chem Phys Lipids 116:153-75

Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. J Lipid Res 38:2264-72

Chu P, Murray S, Lissin D, von Zastrow M (1997) Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist. J Biol Chem 272:27124-30

-D-

Dam E, Styrishave B, Rewitz KF, Andersen O (2006) Intermoult duration affects the susceptibility of shore crabs Carcinus maenas (L.) to pyrene and their ability to metabolise it. Aquat Toxicol 80:290-7

Damodaran KV, Merz KM, Jr., Gaber BP (1995) Interaction of small peptides with lipid bilayers. Biophys J 69:1299-308

Danielli JF, Davson H (1935) A contribution to the theory of permeability of thin films. J. Cell Comp. Physiol. 5:495-508

Daumas F, Destainville N, Millot C, Lopez A, Dean D, Salome L (2003) Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking. Biophys J 84:356-66

de Almeida RF, Fedorov A, Prieto M (2003) Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. Biophys J 85:2406-16

de Planque MR, Killian JA (2003) Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. Mol Membr Biol 20:271-84

Demel RA, Jansen JW, van Dijck PW, van Deenen LL (1977) The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. Biochim Biophys Acta 465:1-10

Devaux PF, Morris R (2004) Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. Traffic 5:241-6

Dietrich C, Yang B, Fujiwara T, Kusumi A, Jacobson K (2002) Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking. Biophys J 82:274-84

Dittmer JC, Lester RL (1964) A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-Layer Chromatograms. J Lipid Res 15:126-7

Dong DC, Winnik MA (1984) The Py scale of solvent polarities. Can. J. Chem. 62:2560

Dumas F, Lebrun M, Peyron P, Lopez A, Tocanne J (1999) The transmembrane protein bacterioopsin affects the polarity of the hydrophobic core of the host lipid bilayer. Biochim Biophys Acta 1421:295-305

-E-

Engelman DM (2005) Membranes are more mosaic than fluid. Nature 438:578-80

Epand RM, Epand RF (2004) Non-raft forming sphingomyelin-cholesterol mixtures. Chem Phys Lipids 132:37-46

Erilov DA, Bartucci R, Guzzi R, Shubin AA, Maryasov AG, Marsh D, Dzuba SA, Sportelli L (2005) Water concentration profiles in membranes measured by ESEEM of spin-labeled lipids. J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys 109:12003-13

Eyster KM (2007) The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. Adv Physiol Educ 31:5-16

-F-

Feigenson GW, Buboltz JT (2001) Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. Biophys J 80:2775-88

Felton CV, Stevenson JC, Godsland IF (2004) Erythrocyte-derived measures of membrane lipid composition in healthy men: associations with arachidonic acid at low to moderate but not high insulin sensitivity. Metabolism 53:571-7

Forstner MB, Yee CK, Parikh AN, Groves JT (2006) Lipid lateral mobility and membrane phase structure modulation by protein binding. J Am Chem Soc 128:15221-7

Frazier ML, Wright JR, Pokorny A, Almeida PF (2007) Investigation of domain formation in sphingomyelin/cholesterol/POPC mixtures by fluorescence resonance energy transfer and Monte Carlo simulations. Biophys J 92:2422-33

-G-

Galla HJ, Hartmann W (1980) Excimer-forming lipids in membrane research. Chem Phys Lipids 27:199-219

Gambin Y, Lopez-Esparza R, Reffay M, Sierecki E, Gov NS, Genest M, Hodges RS, Urbach W (2006) Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. Proc Natl Acad Sci U S A 103:2098-2102

Gandhavadi M, Allende D, Vidal A, Simon SA, McIntosh TJ (2002) Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. Biophys J 82:1469-82

Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H, Kobilka BK (1997) Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. Embo J 16:6737-47

Gorter E, Grendel F (1925) On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. J. Exp. Med 41:439-443

Greenwood AI, Tristram-Nagle S, Nagle JF (2006) Partial molecular volumes of lipids and cholesterol. Chem Phys Lipids 143:1-10

Gri G, Molon B, Manes S, Pozzan T, Viola A (2004) The inner side of T cell lipid rafts. Immunol Lett 94:247-52

-H-

Helies-Toussaint C, Gambert S, Roller P, Tricot S, Lacour B, Grynberg A (2006) Lipid metabolism in human endothelial cells. Biochim Biophys Acta 1761:765-74

Herrick-Davis K, Grinde E, Harrigan TJ, Mazurkiewicz JE (2005) Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine2c receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. J Biol Chem 280:40144-51

Hoff B, Strandberg E, Ulrich AS, Tieleman DP, Posten C (2005) 2H-NMR study and molecular dynamics simulation of the location, alignment, and mobility of pyrene in POPC bilayers. Biophys J 88:1818-27

Holopainen JM, Metso AJ, Mattila JP, Jutila A, Kinnunen PK (2004) Evidence for the lack of a specific interaction between cholesterol and sphingomyelin. Biophys J 86:1510-20

Hooper NM (1999) Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains, lipid rafts and caveolae (review). Mol Membr Biol 16:145-56

Hsueh YW, Chen MT, Patty PJ, Code C, Cheng J, Frisken BJ, Zuckermann M, Thewalt J (2007) Ergosterol in POPC Membranes: Physical Properties and Comparison with Structurally Similar Sterols. Biophys J 92:1606-15

Huang J (2002) Exploration of molecular interactions in cholesterol superlattices: effect of multibody interactions. Biophys J 83:1014-25

Huang J, Buboltz JT, Feigenson GW (1999) Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. Biochim Biophys Acta 1417:89-100

Huang J, Feigenson GW (1999) A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. Biophys J 76:2142-57

Huang P, Xu W, Yoon SI, Chen C, Chong PL, Liu-Chen LY (2007) Cholesterol reduction by methyl-beta-cyclodextrin attenuates the delta opioid receptor-mediated signaling in neuronal cells but enhances it in non-neuronal cells. Biochem Pharmacol 73:534-49

-I-

Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y (2006) Lipid Asymmetry of the eukaryotic Plasma Membrane: Functions and Related Enzymes. Biol. Pharm. Bull. 28:1542-1546

Ipsen JH, Karlstrom G, Mouritsen OG, Wennerstrom H, Zuckermann MJ (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. Biochim Biophys Acta 905:162-72

-K-

Kahya N, Schwille P (2006) How phospholipid-cholesterol interactions modulate lipid lateral diffusion, as revealed by fluorescence correlation spectroscopy. J Fluoresc 16:671-8

Kalipatnapu S, Chattopadhyay A (2007) Membrane Organization of the Serotonin(1A) Receptor Monitored by a Detergent-Free Approach. Cell Mol Neurobiol 27:463-74

Kalyanasundaram K, Thomas JK (1976) Environmental effects on vibronic band intensities in pyrène monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. J. Am. Chem. Soc 99:2039-2044

Kamlet MJ, Abboud J-LM, Abraham M, Taft RW (1983) Linear Solvatation Energy Relationship. 23. A Comprehensive Collection of the solvatochromism Parameters, pi*, alpha and beta, and some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation. J. Org. Chem. 48:2877-2887

Kamlet MJ, Abboud J-LM, Taft RW (1981) An examination of linear solvatation energy relationship. Prog. Phys. Org. Chem. 13:485-630

Karpovitch DS, Blanchard GJ (1995) Relating the polarity-dependent fluorescence response of pyrene to vibronic coupling. Achieving a fundamental understanding of the py polarity scale. J. Phys. Chem. 99:3951-3958

Killian JA (1998) Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. Biochim Biophys Acta 1376:401-15

Kiselev MA, Zemlyanaya EV, Aswal VK, Neubert RH (2006) What can we learn about the lipid vesicle structure from the small-angle neutron scattering experiment? Eur Biophys J 35:477-93

Klump HH, Gaber BP, Peticolas WL, Yager P (1981) Thermodynamic properties of mixtures of deuterated and undeuterated dipalmitoyl phosphatidylcholines (differential scanning calorimetry/lipid bilayers/membranes). Thermochim. Acta 48:361-366

Klymchenko AS, Mely Y, Demchenko AP, Duportail G (2004) Simultaneous probing of hydration and polarity of lipid bilayers with 3-hydroxyflavone fluorescent dyes. Biochim Biophys Acta 1665:6-19

Kosower E (1958) The effect of solvent on spectra. I. A new empirical measure of solvent polarity: Z-Values. J. Am. Chem. Soc 80:3253-3261

Kosower E (1958a) The effect of solvent on spectra. II. Correlation of spectral absorption data with Z-Values. J Am Chem Soc 80:3261-3267

Kremmer T, Wisher MH, Evans WH (1976) The lipid composition of plasma membrane subfractions originating from the three major functional domains of the rat hepatocyte cell surface. Biochim Biophys Acta 455:655-64

Kusumi A, Ike H, Nakada C, Murase K, Fujiwara T (2005) Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. Semin Immunol 17:3-21

-L-

Lagane B (2001) De la Distribution Latérale du Cholestérol dans les Membranes Biologique à son Rôle dans le Contrôle de l'Activité des Protéines Membranaires: cas du Récepteur mu aux Opioïdes. thèse: Université Paul Sabatier, Toulouse

Lagane B, Mazères S, Le Grimellec C, Cezanne L, Lopez A (2002) Lateral distribution of cholesterol in membranes probed by means of a pyrene-labelled cholesterol: effects of acyl chain unsaturation. Biophys Chem 95:7-22

Lakowicz JR (1999) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Publishers, New York

Lange Y, Ramos BV (1983) Analysis of the distribution of cholesterol in the intact cell. J Biol Chem 258:15130-4

Lange Y, Ye J, Steck TL (2007) Scrambling of phospholipids activates red cell membrane cholesterol. Biochemistry 46:2233-8

Langmuir I (1917) the constitution and fundamental properties of solids and liquids. II Liquids. J. Am. Chem. Soc 39:1848-1906

Latif R, Ando T, Davies TF (2007) Lipid Rafts Are Triage Centers for Multimeric and Monomeric Tsh Receptor Regulation. Endocrinology

Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, Kobayashi T, Salles JP, Perret B, Bonnerot C, Record M (2004) Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. Biochem J 380:161-71

Lee AG (2004) How lipids affect the activities of integral membrane proteins. Biochim Biophys Acta 1666:62-87

Lee GM, Ishihara A, Jacobson KA (1991) Direct observation of brownian motion of lipids in a membrane. Proc Natl Acad Sci U S A 88:6274-8

Leonenko ZV, Finot E, Ma H, Dahms TE, Cramb DT (2004) Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. Biophys J 86:3783-93

Levenberg K (1944) A method for the solution of a certain non-linear problems in least squares. Q Appl Math 2:164-168

Lianos P, Georghiou S (1979) Complex formation between alcohols and the aromatic hydrocarbons pyrene and 1-methylpyrene. Photochem. Photobiol. 29:843-846

Lianos P, Georghiou S (1979a) Solute-solvent interaction and its effect on the vibronic and vibrational structure of pyrene spectra. Photochem. Photobiol. 30:355-362

London E, Brown DA (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). Biochim Biophys Acta 1508:182-95

Lopez A, Dupou L, Altibelli A, Trotard J, Tocanne JF (1988) Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments under conditions of uniform disk illumination. Critical comparison of analytical solutions, and a new mathematical method for calculation of diffusion coefficient D. Biophys J 53:963-70

Lopez A, Le Roux C (2006) Caractérisation par spectrofluorimétrie de l'état de phase des lipides de membranes de cellules in vivo au moyen de sondes pyréniques mimant le cholestérol : application au screening informatif, Brevet international, France

Lorin A, Flore C, Thomas A, Brasseur R (2004) Les liposomes: description, fabrication et applications. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 8:163-176

-M-

Macdonald JL, Pike LJ (2005) A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. J Lipid Res 46:1061-7

Mannock DA, Lewis RN, McElhaney RN (2006) Comparative calorimetric and spectroscopic studies of the effects of lanosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. Biophys J 91:3327-40

Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. Embo J 25:3446-57

Marie N, Lecoq I, Jauzac P, Allouche S (2003) Differential sorting of human delta-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists. J Biol Chem 278:22795-804

Marquardt D (1963) An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters. SIAM J Appl Math 11:431-441

Martinez P, Morros A (1996) Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. Front Biosci 1:d103-17

Masserini M, Pitto M, Raimondo F, Cazzaniga E, Sesana S, Bellini T (2005) Methyl-beta-cyclodextrin treatment affects the thermotropic behaviour of membranes and detergent-resistant membrane fractions of cultured A431 cells. Biol Pharm Bull 28:2185-8

Matsuzaki K, Murase O, Sugishita K, Yoneyama S, Akada K, Ueha M, Nakamura A, Kobayashi S (2000) Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. Biochimica Et Biophysica Acta Biomembranes 1467:219-226

Mazères S, Lagane B, Welby M, Tregou V, Lopez A (2001) Probing the lateral organization of membranes: fluorescence repercussions of pyrene probe distribution. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 57:2297-311

McConnell H (2005) Complexes in ternary cholesterol-phospholipid mixtures. Biophys J 88:L23-5

McConnell HM, Radhakrishnan A (2003) Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. Biochim Biophys Acta 1610:159-73

McLaughlin S, Murray D (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. Nature 438:605-11

McMahon HT, Gallop JL (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. Nature 438:590-6

McMullen TP, McElhaney RN (1995) New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry. Biochim Biophys Acta 1234:90-8

McMullen TPWM, R.N. (1996) Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. Current Opinion in Colloid & Interface Science 1:83-90

Meilhac N, Le Guyader L, Salome L, Destainville N (2006) Detection of confinement and jumps in single-molecule membrane trajectories. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys 73:011915

Miao L, Nielsen M, Thewalt J, Ipsen JH, Bloom M, Zuckermann MJ, Mouritsen OG (2002) From lanosterol to cholesterol: structural evolution and differential effects on lipid bilayers. Biophys J 82:1429-44

Milon A, Lazrak T, Albrecht AM, Wolff G, Weill G, Ourisson G, Nakatani Y (1986) Osmotic swelling of unilamellar vesicles by the stopped-flow light scattering method. Influence of vesicle size, solute, temperature, cholesterol and three <alpha>,<omega>-dihydroxycarotenoids. Biochimica-et-biophysica-acta 859:1-9

Mitchell DC, Litman BJ (1998) Effect of cholesterol on molecular order and dynamics in highly polyunsaturated phospholipid bilayers. Biophys J 75:896-908

Mouritsen OG (2005) Life, As a matter of fat. The emerging science of lipidomics. Springer, Heidelberg

Mukherjee S, Maxfield FR (2004) Membrane domains. Annu Rev Cell Dev Biol 20:839-66

Munro S (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? Cell 115:377-88

Murari R, Murari MP, Baumann WJ (1986) Sterol orientations in phosphatidylcholine liposomes as determined by deuterium NMR. Biochemistry 25:1062-7

-N-

Nagle JF, Zhang R, Tristram-Nagle S, Sun W, Petrache HI, Suter RM (1996) X-ray structure determination of fully hydrated L alpha phase dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. Biophys J 70:1419-31

Nakajima A (1974) Solvent enhancement in the first singlet-singlet transition of pyrene-d_{10}. Spectrochimica Acta 30a:860-862

Nakajima A (1976) Fluorescence spectra of pyrene in chlorinated aromatic solvents. J. Lumin. 11:429-432

Nakamura M, Fukunaga Y, Sasa K, Ohtoshi Y, Kanaori K, Hayashi H, Nakano H, Yamana K (2005) Pyrene is highly emissive when attached to the RNA duplex but not to the DNA duplex: the structural basis of this difference. Nucleic Acids Res 33:5887-95

Nezil FA, Bloom M (1992) Combined influence of cholesterol and synthetic amphiphillic peptides upon bilayer thickness in model membranes. Biophys J 61:1176-83

Nishimura SY, Vrljic M, Klein LO, McConnell HM, Moerner WE (2006) Cholesterol depletion induces solid-like regions in the plasma membrane. Biophys J 90:927-38

Nohe A, Keating E, Fivaz M, van der Goot FG, Petersen NO (2006) Dynamics of GPI-anchored proteins on the surface of living cells. Nanomedicine 2:1-7

Norton DA, Ohrt JM (1966) Introduction to steroid molecular stacking. J Theor Biol. 11:140-149

-O-

Oberdorster E, Brouwer M, Hoexum-Brouwer T, Manning S, McLachlan JA (2000) Long-term pyrene exposure of grass shrimp, Palaemonetes pugio, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females. Environ Health Perspect 108:641-6

Ohvo-Rekila H, Ramstedt B, Leppimaki P, Slotte JP (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. Prog Lipid Res 41:66-97

-P-

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. Science 289:739-45

Pansu RB, Yoshihara K, Arai T, Tokumaru K (1993) Convolution analysis of the pyrene excimer formation in membranes. Journal-of-physical-chemistry-1952 97:1125-1133

Parasassi T, Loiero M, Raimondi M, Ravagnan G, Gratton E (1993) Absence of lipid gel-phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types. Biochim Biophys Acta 1153:143-54

Parente RA, Lentz BR (1985) Advantages and limitations of 1-palmitoyl-2-[[2-[4- (6-phenyl-trans-1,3,5-hexatrienyl)phenyl]ethyl]carbonyl]-3- sn-phosphatidylcholine as a fluorescent membrane probe. Biochemistry 24:6178-85

Pasenkiewicz-Gierula M, Subczynski WK, Kusumi A (1991) Influence of phospholipid unsaturation on the cholesterol distribution in membranes. Biochimie 73:1311-6

Pencer J, Nieh MP, Harroun TA, Krueger S, Adams C, Katsaras J (2005) Bilayer thickness and thermal response of dimyristoylphosphatidylcholine unilamellar vesicles containing cholesterol, ergosterol and lanosterol: a small-angle neutron scattering study. Biochim Biophys Acta 1720:84-91

Pike LJ (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. J Lipid Res 44:655-67

Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. J Lipid Res 47:1597-8

Piknova B, Perochon E, Tocanne JF (1993) Hydrophobic mismatch and long-range protein/lipid interactions in bacteriorhodopsin/phosphatidylcholine vesicles. Eur J Biochem 218:385-96

Porn MI, Slotte JP (1995) Localization of cholesterol in sphingomyelinase-treated fibroblasts. Biochem J 308 (Pt 1):269-74

Powell MJD (1964) An efficient method for finding the minimum of a function of several variables without calculating derivatives. Computer Journal 7:155-162

Pozharski EV, McWilliams L, MacDonald RC (2001) Relationship between turbidity of lipid vesicle suspensions and particle size. Anal Biochem 291:158-62

Prodi L, Ballardini R, Gandolfi MT, Roversi R (2000) A simple fluorescent chemosensor for alkaline-earth metal ions. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 136:49-52

Pucadyil TJ, Mukherjee S, Chattopadhyay A (2007) Organization and dynamics of NBD-labeled lipids in membranes analyzed by fluorescence recovery after photobleaching. J Phys Chem B 111:1975-83

-R-

Rappoport JZ, Simon SM, Benmerah A (2004) Understanding living clathrin-coated pits. Traffic 5:327-37

Rege TA, Hagood JS (2006) Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. Biochim Biophys Acta 1763:991-9

Reichardt C (1998) Syntheses and UV-vis spectroscopic properties of new lipophilic tert-butyl- and 1-adamantyl substituted, negatively solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes. Can. J. Chem. 76:686-694

Reichardt C (2004) Pyridinium N-phenolate betaine dyes as empirical indicators of solvent polarity: Some new findings. Pure and Applied Chemistry 76:1903-1919

Reichardt C, Harbusch Gornert E, Schafer G (1988) Uber Pyridinium-N-phenolat-Betaine und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polaritat von Losungsmitteln. XI: Herstellung und UV/VIS-spektroskopische Eigenschaften eines wasserloslichen Carboxylat-substituierten Pyridinium-N-phenolat-Betainfarbstoffs. Liebigs-Annalen-der-Chemie (9):839-844

Rietveld A, Simons K (1998) The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. Biochim Biophys Acta 1376:467-79

Rocks O, Peyker A, Kahms M, Verveer PJ, Koerner C, Lumbierres M, Kuhlmann J, Waldmann H, Wittinghofer A, Bastiaens PI (2005) An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. Science 307:1746-52

Rodriguez FT, JF.;Lopez,A. (1995) Self-association processes Involving Anthracene Labeled Phosphatidylcholines in Model Membrane. Biophys Chem 53:169-180

Rog T, Pasenkiewicz-Gierula M (2001a) Cholesterol effects on the phosphatidylcholine bilayer nonpolar region: a molecular simulation study. Biophys J 81:2190-202

Rog T, Pasenkiewicz-Gierula M (2001b) Cholesterol effects on the phospholipid condensation and packing in the bilayer: a molecular simulation study. FEBS Lett 502:68-71

Rosenbaum DM, Cherezov V, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Yao XJ, Weis WI, Stevens RC, Kobilka BK (2007) GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. Science 318:1266-73

Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A (1970) Two dimensional thin-layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. Lipids 5:494-6

-S-

Salamon Z, Cowell S, Varga E, Yamamura HI, Hruby VJ, Tollin G (2000) Plasmon resonance studies of agonist/antagonist binding to the human delta-opioid receptor: new structural insights into receptor-ligand interactions. Biophys J 79:2463-74

Salamon Z, Wang Y, Soulages JL, Brown MF, Tollin G (1996) Surface plasmon resonance spectroscopy studies of membrane proteins: transducin binding and activation by rhodopsin monitored in thin membrane films. Biophys J 71:283-94

Salomé L, Cazeils JL, Lopez A, Tocanne JF (1998) Characterization of membrane domains by FRAP experiments at variable observation areas. Eur Biophys J 27:391-402

Salzer U, Prohaska R (2001) Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. Blood 97:1141-3

Sankaram MB, Thompson TE (1990) Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state 2H nuclear magnetic resonance study. Biochemistry 29:10676-84

Sankaram MB, Thompson TE (1991) Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. Proc Natl Acad Sci U S A 88:8686-90

Saulière A, Gaibelet G, Millot C, Mazeres S, Lopez A, Salome L (2006) Diffusion of the mu opioid receptor at the surface of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is restricted to permeable domains. FEBS Lett 580:5227-31

Saxton MJ (1993) Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion. Biophys J 64:1766-80

Saxton MJ, Jacobson K (1997) Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. Annu Rev Biophys Biomol Struct 26:373-99

Scheek S, Brown MS, Goldstein JL (1997) Sphingomyelin depletion in cultured cells blocks proteolysis of sterol regulatory element binding proteins at site 1. Proc Natl Acad Sci U S A 94:11179-83

Scheffer L, Solomonov I, Weygand MJ, Kjaer K, Leiserowitz L, Addadi L (2005) Structure of cholesterol/ceramide monolayer mixtures: implications to the molecular organization of lipid rafts. Biophys J 88:3381-91

Schuler I, Milon A, Nakatani Y, Ourisson G, Albrecht AM, Benveniste P, Hartman MA (1991) Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. Proc Natl Acad Sci U S A 88:6926-30

Schwille P (2001) Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. Cell Biochem Biophys 34:383-408

Sharma P, Varma R, Sarasij RC, Ira, Gousset K, Krishnamoorthy G, Rao M, Mayor S (2004) Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. Cell 116:577-89

Sharom FJ, Lehto MT (2002) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Biochem Cell Biol 80:535-49

Sheets ED, Lee GM, Simson R, Jacobson K (1997) Transient confinement of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in the plasma membrane. Biochemistry 36:12449-58

Shi J, Yang T, Kataoka S, Zhang Y, Diaz AJ, Cremer PS (2007) GM1 clustering inhibits cholera toxin binding in supported phospholipid membranes. J Am Chem Soc 129:5954-61

Silvius JR (2003) Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. Biochim Biophys Acta 1610:174-83

Silvius JR, del Giudice D, Lafleur M (1996) Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipids of differing acyl chain length. Biochemistry 35:15198-208

Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol 1:31-9

Simson R, Sheets ED, Jacobson K (1995) Detection of temporary lateral confinement of membrane proteins using single-particle tracking analysis. Biophys J 69:989-93

Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175:720-31

Smaby JM, Brockman HL, Brown RE (1994) Cholesterol's interfacial interactions with sphingomyelins and phosphatidylcholines: hydrocarbon chain structure determines the magnitude of condensation. Biochemistry 33:9135-42

Smondyrev AM, Berkowitz ML (2001) Molecular dynamics simulation of the structure of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers with cholesterol, ergosterol, and lanosterol. Biophys J 80:1649-58

Soccio RE, Breslow JL (2004) Intracellular cholesterol transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24:1150-60

Somerharju PJ, Virtanen JA, Eklund KK, Vainio P, Kinnunen PK (1985) 1-Palmitoyl-2-pyrenedecanoyl glycerophospholipids as membrane probes: evidence for regular distribution in liquid-crystalline phosphatidylcholine bilayers. Biochemistry 24:2773-81

Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A (2007) Gangliosides as components of lipid membrane domains. Glycobiology 17:1R-13R

Sparr E, Hallin L, Markova N, Wennerstrom H (2002) Phospholipid-cholesterol bilayers under osmotic stress. Biophys J 83:2015-25

Spiegel AM (1996) Defects in G protein-coupled signal transduction in human disease. Annu Rev Physiol 58:143-70

Statnick MA, Suter TM, Gackenheimer SL, Emmerson PJ, Quimby SJ, Gehlert DR, Wheeler WJ, Mitch CH (2003) Na+-dependent high affinity binding of [3H]LY515300, a 3,4-dimethyl-4-(3-hydroxyphenyl)piperidine opioid receptor inverse agonist. Eur J Pharmacol 482:139-50

Steck TL, Ye J, Lange Y (2002) Probing red cell membrane cholesterol movement with cyclodextrin. Biophys J 83:2118-25

Stepanek M, Krijtova K, Prochcizka K, Teng Y, Webber SE, Munk P (1998) Solubilization and release of hydrophobic compounds from block copolymer micelles. I. Partitioning of pyrene between polyelectrolyte micelles and the aqueous phase. Acta-polymerica 49:96-102

Stottrup BL, Keller SL (2006) Phase behavior of lipid monolayers containing DPPC and cholesterol analogs. Biophys J 90:3176-83

Straume M, Litman BJ (1987) Influence of cholesterol on equilibrium and dynamic bilayer structure of unsaturated acyl chain phosphatidylcholine vesicles as determined from higher order analysis of fluorescence anisotropy decay. Biochemistry 26:5121-6

Street KWJ, Acree WEJ (1986) Experimental artifacts and determination of accurate Py values. Analyst-London 111:1197-1201

Subczynski WK, Kusumi A (2003) Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. Biochim Biophys Acta 1610:231-43

Subczynski WK, Wisniewska A, Yin JJ, Hyde JS, Kusumi A (1994) Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol. Biochemistry 33:7670-81

Sugahara M, Uragami M, Regen SL (2002) Selective sterol-phospholipid associations in fluid bilayers. J Am Chem Soc 124:4253-6

Suzuki I, Ui M, Yamauchi A (2006) Supramolecular probe for bicarbonate exhibiting anomalous pyrene fluorescence in aqueous media. J Am Chem Soc 128:4498-9

Swamy MJ, Ciani L, Ge M, Smith AK, Holowka D, Baird B, Freed JH (2006) Coexisting domains in the plasma membranes of live cells characterized by spin-label ESR spectroscopy. Biophys J 90:4452-65

-T-

Tabas I (2002) Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. J Clin Invest 110:905-11

Tang D, Dean WL, Borchman D, Paterson CA (2006) The influence of membrane lipid structure on plasma membrane Ca2+ -ATPase activity. Cell Calcium 39:209-16

Tanhuanpaa K, Cheng KH, Anttonen K, Virtanen JA, Somerharju P (2001) Characteristics of pyrene phospholipid/gamma-cyclodextrin complex. Biophys J 81:1501-10

Tanhuanpaa K, Somerharju P (1999) gamma-cyclodextrins greatly enhance translocation of hydrophobic fluorescent phospholipids from vesicles to cells in culture. Importance of molecular hydrophobicity in phospholipid trafficking studies. J Biol Chem 274:35359-66

Tauc P, Mateo CR, Brochon JC (1998) Pressure effects on the lateral distribution of cholesterol in lipid bilayers: a time-resolved spectroscopy study. Biophys J 74:1864-70

Terrillon S, Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. EMBO Rep 5:30-4

Todesco RV, Basheer RA, Kamat PV (1986) Photophysical and photochemical behavior of poly(1-vinylpyrene). Evidence for dual excimer fluorescence. Macromolecules 19:2390-2397

Tomishige M, Kusumi A (1999) Compartmentalization of the erythrocyte membrane by the membrane skeleton: intercompartmental hop diffusion of band 3. Mol Biol Cell 10:2475-9

-U-

Udachin KA, Ripmeester JA (1998) A novel mode of inclusion for pyrene in beta-cylodextrin compounds: the crystal structures of beta-cyclodextrin with cyclohexanol and pyrene, and with n-octanol and pyrene. J. Am. Chem. Soc 120:1080-1081

-V-

Valeur B (2004) Invitation à la fluorescence moléculaire. De Boeck, Bruxelles

Valsecchi M, Mauri L, Casellato R, Prioni S, Loberto N, Prinetti A, Chigorno V, Sonnino S (2007) Ceramide and sphingomyelin species of fibroblasts and neurons in culture. J Lipid Res 48:417-24

van Meer G (2005) Cellular lipidomics. Embo J 24:3159-65

VanTeeffelen JW, Brands J, Stroes ES, Vink H (2007) Endothelial Glycocalyx: Sweet shield of Blood Vessels. Trends Cardiovasc Med 17:101-105

Vaz WL, Clegg RM, Hallmann D (1985) Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phase phosphatidylcholine multibilayers. A comparison of experiment with theory. Biochemistry 24:781-6

Virtanen JA, Ruonala M, Vauhkonen M, Somerharju P (1995) Lateral organization of liquid-crystalline cholesterol-dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. Evidence for domains with hexagonal and centered rectangular cholesterol superlattices. Biochemistry 34:11568-81

Vist MR, Davis JH (1990) Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. Biochemistry 29:451-64

-W-

Waris R, Acree WE, Jr., Street KW, Jr. (1988) Py and BPe solvent polarity scales: effect of temperature on pyrene and benzo[ghi]perylene fluorescence spectra. Analyst 113:1465-7

Warner GJ, Stoudt G, Bamberger M, Johnson WJ, Rothblat GH (1995) Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. J Biol Chem 270:5772-8

Warschawski DE, Devaux PF (2005a) 1H-13C polarization transfer in membranes: a tool for probing lipid dynamics and the effect of cholesterol. J Magn Reson 177:166-71

Warschawski DE, Devaux PF (2005b) Order parameters of unsaturated phospholipids in membranes and the effect of cholesterol: a 1H-13C solid-state NMR study at natural abundance. Eur Biophys J 34:987-96

Weis RMM, H.M. (1985) Cholesterol Stabilizes the Cristal-Liquid Interface in Phospholipid Monolayers. J. Phys. Chem. 89:4453-4459

Winnik FM (1993) Photophysics of preassociated pyrenes in aqueous polymer solutions and in other organized media. Chem. Rev. 93:587-614

Wolf G (1999) The function of cholesterol in embryogenesis. J Nutr Biochem 10:188-92

Worthman LA, Nag K, Davis PJ, Keough KM (1997) Cholesterol in condensed and fluid phosphatidylcholine monolayers studied by epifluorescence microscopy. Biophys J 72:2569-80

Wu R, Chen L, Yu Z, Quinn PJ (2006) Phase diagram of stigmasterol-dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures dispersed in excess water. Biochim Biophys Acta 1758:764-71

-X-

Xu W, Yoon SI, Huang P, Wang Y, Chen C, Chong PL, Liu-Chen LY (2006) Localization of the kappa opioid receptor in lipid rafts. J Pharmacol Exp Ther 317:1295-306

-Y-

Yabaluri N, Medzihradsky F (1997) Regulation of <mu>-opioid receptor in neural cells by extracellular sodium. Journal-of-neurochemistry 68:1053-1061

Yang JS, Lin CS, Hwang CY (2001) Cu2+-induced blue shift of the pyrene excimer emission: A new signal transduction mode of pyrene probes. Organic Letters 3:889-892

Yao CX, Kraatz HB, Steer RPCAU-N-E-P-E (2005) Photophysics of pyrene-labelled compounds of biophysical interest. Photochemical and Photobiological Sciences 4:191-199

Yeagle PL (1985) Cholesterol and the cell membrane. Biochim Biophys Acta 822:267-87

Yeung T, Terebiznik M, Yu L, Silvius J, Abidi WM, Philips M, Levine T, Kapus A, Grinstein S (2006) Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. Science 313:347-51

Yorozu T, Hoshino M, Imamura M (1982) Fluorescence studies of pyrene inclusion complexes with alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins in aqueous solutions. Evidence for formation of pyrene dimer in gamma-cyclodextrin cavity. J. Phys. Chem. 86:4426-4429

Yuan C, Johnston LJ (2002) Phase evolution in cholesterol/DPPC monolayers: atomic force microscopy and near field scanning optical microscopy studies. J Microsc 205:136-46

-Z-

Zaccai G (2000) How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. Science 288:1604-7

Zak B, Dickenman RC, White EG, Burnett H, Cherney PJ (1954) Rapid estimation of free and total cholesterol. Am J Clin Pathol 24:1307-15

Zhang J, Cao H, Regen SL (2007) Cholesterol-phospholipid complexation in fluid bilayers as evidenced by nearest-neighbor recognition measurements. Langmuir 23:405-7

Zou J, Yu Q, Shang Z (2001) Correlation between empirical solvent polarity scales and computed quantities derived from molecular surface electrostatic potentials. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2:1439-1443

Annexes

8

Publication dans *The Biophysical Journal*

Protocole de synthèse des sondes Pyrène-cholestérol (publié en fichier supplémentaire dans *The Biophysical Journal*)

Changes of the Membrane Lipid Organization Characterized by Means of a New Cholesterol-Pyrene Probe

Laurent Le Guyader,* Christophe Le Roux,† Serge Mazères,* Hafida Gaspard-Iloughmane,† Heinz Gornitzka,† Claire Millot,* Christophe Mingotaud,‡ and André Lopez*

*Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France; and †Laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée, and ‡Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

ABSTRACT We synthesized 3β-hydroxy-pregn-5-ene-21-(1-methylpyrenyl)-20-methylidene (Py-met-chol), consisting of cholesterol steroid rings connected to a pyrene group via a linker without polar atoms. This compound has interesting spectroscopic properties when probing membranes: 1), The pyrene has hypochromic properties resulting from probe self-association processes in membranes. Using liposomes of various lipid compositions, we determined the association constants of the probe (K): $K_{DOPC} \gg K_{POPC} \gg K_{DMPC} > K_{DMPC/15\ mol\ \%\ Chol} > K_{DMPC/30\ mol\ \%\ Chol}$. This indicates a better probe solvation in saturated than in unsaturated lipids, and this effect is enhanced as the cholesterol concentration increases. 2), The pyrene fluorophore is characterized by monomer (I_1–I_5) and excimer (I_E) emission bands. In model membranes, I_1/I_3 and I_E/I_3 ratios revealed a correlation between the polarity of the lipid core of the membrane and the amount of cholesterol. 3), Using this probe, we monitored the first steps of the signaling pathway of the mouse δ-opioid receptor, a G-protein-coupled receptor. The thickness of the membrane around this receptor is known to change after agonist binding. Fluorescence spectra of living Chinese hamster ovary cells overexpressing mouse δ-opioid receptor specifically revealed the agonist binding. These results indicate that Py-met-chol may be useful for screening ligands of this family of receptors.

INTRODUCTION

The plasma membrane is a complicated mixture of lipids and proteins, organized into various specialized microdomains (1), which differ in their composition, their physical properties, and, consequently, their biological functions (2,3). These distinct microdomains cannot be directly identified in living cells by noninvasive approaches. However, numerous studies of detergent-resistant membrane fractions and of reconstituted model membranes of comparable lipid compositions (4,5) indicate that some lipids have the propensity to associate with each other and to promote lateral segregation (6). This is the case for mixtures of cholesterol, sphingolipids, and saturated glycerophospholipids, which generate a liquid-ordered (lo) fluid phase (2). This phase is characterized by more tightly packed hydrophobic moieties, lipids having a weaker translational diffusion and no rotational diffusion (2,3,7,8), and a thicker membrane than the liquid-disordered (ld) phase composed of unsaturated glycerophospholipids with the same acyl chain lengths (9). Such lipid effects may occur in plasma membrane; indeed, some G-protein-coupled receptors (GPCRs) change the thickness of the membrane after ligand binding, as reported by Salamon et al. for the mouse δ-opioid receptor (mDOR) in reconstituted membranes (10).

All of the biophysical approaches for quantifying these general properties use model membranes with simple lipid mixtures, whereas investigations on in vivo cell membranes require indirect methods. Various fluorescent membrane probes, for example, the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene derivatives (11) or prodan/laurdan probes (12), have been used to determine membrane structure and lipid molecular organization. Another family of probes based on pyrene allows the investigation of the lateral distribution and the dynamics of membrane compounds (13). Indeed, the monomer (M) and the excimer (E) species have different fluorescence signals (I_M and I_E, respectively) (13), and the ratio of fluorescence intensities (I_E/I_M) is directly related to the probe distribution in the lipid membrane network (14). Moreover, pyrene is an effective spectroscopic sensor of the polarity of the membrane's hydrophobic core (15): the monomer fluorescence spectrum consists of five emission bands, where I_1 is a function of the polarity of the probe's surroundings and I_3 is mainly proportional to the probe's concentration. Thus, the ratio I_1/I_3 is of particular interest for membrane studies, because an increase in the mole fraction of cholesterol is correlated with a decrease of the membrane's permeability to water (16). Since the polarity within a lipid membrane is mostly determined by the number of internal water molecules present (17), the pyrene probe should report the cholesterol-induced lo phase with respect to the ld phase.

In a previous study (18) of a cholesterol-pyrene-based probe (1-pyrenemethyl-(3β)-3-hydroxy-22,23-bisnor-5-cholenate (Py-ester-chol)), we identified several interesting properties

Submitted May 15, 2007, and accepted for publication August 14, 2007.

Address reprint requests to André Lopez, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex, France. Tel.: 33(0)-561-175-945; Fax: 33(0)-561-175-994; E-mail: andre.lopez@ipbs.fr.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons-Attribution Noncommercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/), which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Editor: Thomas J. McIntosh.

© 2007 by the Biophysical Society

0006-3495/07/12/4462/12 $2.00

doi: 10.1529/biophysj.107.112821

of this probe family, but its low miscibility in lipid bilayers made labeling living cell plasma membranes impossible. This low miscibility was attributed to the polar atoms present in the linker between the cholesterol moiety and the pyrene moiety. To avoid this problem, we synthesized 3β-hydroxy-pregn-5-ene-21-(1-methylpyrenyl)-20-methylidene (Py-met-chol), a new probe designed without polar atoms in the linker. We first characterized its membrane behavior, and then used absorbance measurements to study its lateral distribution in model membranes. The fluorescence experiments, carried out with model membranes of various compositions, allowed us to characterize changes in the core polarity and lipid organization, since both of these features are correlated with changes in the membrane thickness. Finally, we used the probe to label living cell plasma membranes and their fluorescence properties to detect the first steps of a cell signaling pathway, triggered by the thickness change associated with mDOR binding its agonist (10).

MATERIALS AND METHODS

Organic synthesis of Py-met-chol

The scheme and the detailed description of the chemical synthesis, the infrared, NMR ^{1}H and ^{13}C characteristics, the analytical characterizations, and the RX molecular structure of tert-butyldimethylsilyl-(Py-met-chol) are described in the Supplementary Material.

Lipids and other reagents

Cholesterol, 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), and 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) were purchased from Sigma (St Louis, MO), and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The purity of phospholipids and sterols was confirmed by thin-layer chromatography on silica-gel (Merck, Darmstadt, Germany) using chloroform/methanol/water (65:25:4, v/v) as the elution solvent. The detections were performed with the Dittmer's reagent for phosphorus compounds (19) and then heated to detect sterols. Lipids, dissolved in chloroform/methanol (9:1, v/v) were stored at 4°C before use. The concentrations of phospholipid solutions were determined by a classical phosphate assay and by a colorimetric method (20) for cholesterol and Py-met-chol. A gravimetric approach using a Sartorius (Goettingen, Germany) super microbalance (10^{-7} g) was also used. Diprenorphin and Deltorphin II were purchased from Sigma. Water was purified through a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

Preparation of lipid vesicles

Liposomes were prepared by mixing appropriate volumes of the stock solutions of phospholipids, cholesterol, or Py-met-chol (mole fractions were calculated according to the total quantity of lipids in a given suspension). Solvent was evaporated under a nitrogen stream and samples were desiccated under vacuum for 2 h (1 Torr). The dried lipid samples were hydrated in MOPS buffer (10 mM 3-morpholino-propanesulfonic acid, 100 mM NaCl, and 0.02% w/v NaN_3, pH 7.4) and heated to 60°C for 20 min (this temperature is higher than the gel-to-liquid transition temperature (T_m)). We immediately vortexed the sample for 4 min to allow the formation of multilamellar vesicles (MLVs). For absorbance and fluorescence experiments, MLVs (at final concentrations of 0.1–1 mM) were sonicated for 10 min at a temperature above the T_m using a VibraCell sonicator (Sonics & Materials, Newtown, CT) with a titanium-plated tip delivering 12.5 W. The samples, constituted of small unilamellar vesicle suspensions, were immediately centrifuged for 25 min at 20,000 $\times$ *g* (5408R centrifuge, Eppendorf, Hamburg, Germany) to remove any titanium particles. Small unilamellar vesicle suspensions were stored for 36 h to allow vesicle fusion. The sizes of relaxed large unilamellar vesicles (LUVs) were measured by dynamic light scattering using a Dynapro device (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA). The LUVs in this study had a mean radius of 77 $\pm$ 6 nm.

Differential scanning calorimetry

MLVs (at a final concentration of 30 mM) were subjected to three cycles of freezing and heating to 60°C for 10 min for MLV homogenization. The samples were stored at 4°C for at least 24 h and then loaded into the sample cell of the calorimeter; ~45 mg of each MLV suspension was sealed into a stainless steel high-pressure capsule and scanned at rates of 600, 300, 150, 105, 60, 45, 30, and 15°C/h from 5°C to 60°C and from 60°C to 5°C on a Pyris-1 calorimeter (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) (the reference was an empty capsule). The amount of probe was maintained below its maximum solubility in all cases. For all samples, we analyzed the scans to assess the maximum temperature and the enthalpy of the gel-to-liquid phase transition for each scanning rate. By extrapolation to 0°C/h, we obtained the exact melting enthalpy.

Absorption spectrometry

Absorption spectra were measured from 500 to 280 nm in a 1-cm path length quartz cuvette using a Uvikon 923 spectrophotometer (Kontron Instruments, Milan, Italy) equipped with a thermostated cuvette holder at 30 $\pm$ 0.1°C (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). We used air as the reference to calibrate a zero baseline. The molar absorption coefficients of the probe ε_{meas} were calculated from the absorbance at 345 nm of each liposome suspension. This corresponds to the lowest energy-absorption band of the monosubstituted pyrene. To eliminate the effect of liposome light scattering at this wavelength, we used a homemade program calculating the contribution of the turbidity ($T(\lambda)$) to the absorbance spectrum of each sample. This program is based on an equation (Eq. 1) modified from that described previously (21):

$$T(\lambda) = A \times \frac{1}{\lambda^{B}} + C, \quad (1)$$

where λ is the wavelength and A, B, and C are the parameters that have to be fitted. Using nonlinear regression, we determined the parameter values from experimental measurements of absorbance at 290 nm and from 385 nm to 500 nm in a given sample. Thus, the turbidity value at 345 nm was calculated and allowed accurate measurement of the probe absorbance. We used the Beer-Lambert law and these absorbance values to determine ε_{meas} values for all samples.

Fluorescence spectrometry

Emission spectra were recorded on a QuantaMaster-4 spectrofluorimeter (Photon Technology International, Birmingham, NJ) monitored by FeliX32 software. The excitation wavelength (bandwidth 5 nm) was set to 330 nm to avoid the Raman peak of water. The fluorescence emission (bandwidth 2 nm) was measured from 365 to 600 nm in 0.5-nm increments. The signal integration time was set to 100 ms for vesicle suspensions and to 200 ms for cell suspensions. Fluorescence spectra were recorded in 1-cm quartz cuvettes thermostated at 37 $\pm$ 0.1°C (Fisher Bioblock Scientific) for LUVs and labeled Chinese hamster ovary (CHO) cells. I_1, I_3, and I_E were measured at 376, 388, and 475 nm, respectively.

Determination of the maximum solubility of Py-met-chol in liposomes

We prepared POPC liposomes at a final concentration of 0.1 mM with a series of mole fractions of the probe (0.15–0.35 mol %). All probe molecules not incorporated into liposomes formed aggregates in the buffer with a specific spectral response. These aggregates were eliminated by centrifugation for 25 min at 20,000 × *g* (5408R, Eppendorf). We then measured (at 20°C) the absorbance of each suspension at 345 nm as a function of the mole fraction of the probe. The Py-met-chol mole fraction for which the absorbance reached a plateau was taken as the maximum solubility.

Isodesmic model

Calculations were performed using the isodesmic model (18) described in the Appendix. This model accounts for changes in the absorption (hypochromism) of the probe's pyrene moiety due to a self-association process in membranes where the association constants, K, are equivalent for each association step. The pyrene probe absorbs light as a monomer (ε_{mono}) and as n-mers, where the two pyrene molecules at the ends absorb light as half-stacked mers (ε_{ext}) and n-2 pyrene molecules inside an n-mer absorb light as fully stacked mers (ε_{int}). For a given liposome suspension, the overall absorption (ε_{calc}) corresponds to the sum of these three contributions weighted by their respective mole fractions. Parameter fitting (K, ε_{mono}, ε_{ext}, ε_{int}) is performed by minimizing the sum of the squares of weighted residuals ($1/\varepsilon^2_{meas}$) between ε_{meas} and ε_{calc} to account for the increased experimental error as the probe concentration decreases.

Labeling mixture preparation

Methyl-β-cyclodextrin (MβCD, Sigma) was dissolved in water (683 mg in 7 mL) and heated to 70°C under agitation. To obtain a 1:75 molar ratio (Py-met-chol/MβCD), 50 μL of a solution of Py-met-chol in dimethylformamide (138 mM) was added slowly. This solution was sterilized through a 0.22-μm-pore filter and stored for up to several weeks at 4°C. The incubation medium consisted of 1 mL of this solution diluted (1:30, v/v) in phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, France) and warmed to 37°C. The final dimethylformamide concentration was <0.05%. The final concentration of MβCD was 2.5 mM.

Cell culture and in vivo plasma membrane labeling

We used CHO cells stably transfected (CHO-δ) with the gene for the mouse δ-opioid 7-transmembrane receptor (mDOR), which was produced at a rate of 10 ± 1 pmol receptor/mg protein. CHO wild-type cells (CHO-wt) were used as controls. Cells were grown in culture flasks in supplemented HAM-F12 nutrient mixture (10% fetal calf serum, 2 mM sodium glutamate, 50 μg/mL penicillin and streptomycin) at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere. Geneticin (0.8%, v/v) was added for selection of transfected cells. The cells were plated on coverslips, washed twice with 1 mL of PBS without calcium at 37°C, and incubated with 1 mL of labeling mixture for 2 min at 37°C. The inoculum was removed and cells were washed six times with PBS without calcium and then suspended in HEPES buffer (20 mM HEPES, 118 mM choline chloride, 10 mM glucose, 3 mM $MgSO_4$, 1.5 mM $CaCl_2$, pH 7.4). Four minutes later, we added an mDOR agonist (Deltorphin II) or antagonist (Diprenorphin) to a final concentration of 1 μM to the CHO or CHO-δ cell suspensions. All products were purchased from Gibco-BRL, Invitrogen.

Fluorescence imaging

Cells were covered with 60 μL of HEPES buffer and mounted on the microscope. A Carl Zeiss Axioplan II microscope (Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Germany) equipped with a 63× magnification oil-immersion objective lens and a CCD camera C2400-75i (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) was used for wide-field fluorescence imaging. The Zeiss Filterblock No. 01 (UV) was used. All measurements were carried out at room temperature.

RESULTS

Py-met-chol was obtained by the condensation of 1-pyrenecarboxaldehyde and pregnenolone according to Scheme 1 in the Supplementary Material, which also describes the organic synthesis and characteristics of all intermediary products, as well as the crystal data for tert-butyldimethylsilyl-(Py-met-chol) (Supplementary Material, Fig. S1). The structure and the emission and excitation fluorescence spectra of Py-met-chol are shown in Fig. 1. All emission spectra recorded during this study were similar to the spectrum shown in Fig. 1 *b*. The resolution and the wavelengths were unchanged: I_1 = 376 nm, I_3 = 388 nm and I_E = 475 nm, respectively.

To characterize the behavior of the pyrene probe in membranes, we studied vesicles composed of phosphatidylcholines (PC) with different acyl chains (DMPC, POPC, DOPC), mixed with a series of mole fractions of cholesterol.

Py-met-chol maximum solubility

We measured the maximum solubility of Py-met-chol in LUVs composed of POPC at room temperature and compared it to

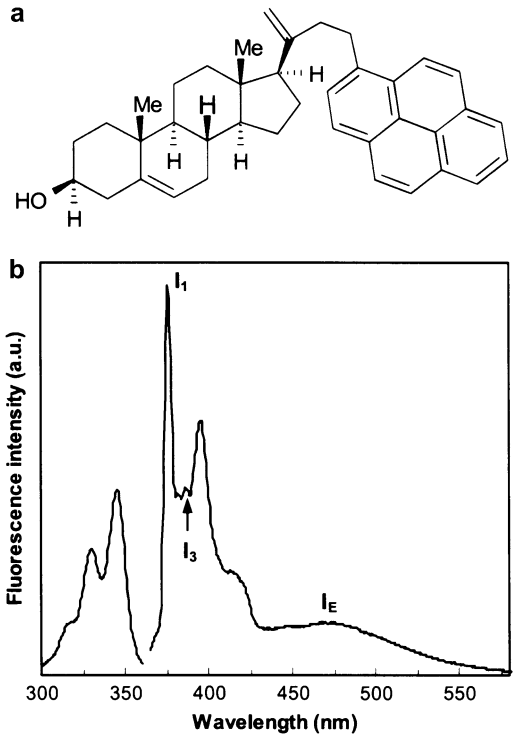


FIGURE 1 (*a*) Chemical structure of Py-met-chol (3β-hydroxy-pregn-5-ene-21-(1-methylpyrenyl)-20-methylidene). (*b*) Emission (*right*) (λ_{Em} = 330 nm, bandwidth 2 nm) and excitation (*left*) (λ_{Ex} = 388 nm, bandwidth 2 nm) fluorescence spectra in a bilayer: I_1, I_3, and I_E were measured at 376, 388, and 475 nm, respectively.

Py-ester-chol solubility and published results for cholesterol (22). The saturation of phospholipids with Py-met-chol was detected in absorption and fluorescence spectra: Py-met-chol aggregates in the buffer and leads to red-shifted absorption and excitation spectra (23,24) (data not shown). These aggregates were easily removed by centrifugation. Py-met-chol inserted into POPC LUVs was thus quantified by absorption measurements. We found that POPC LUVs are saturated with 28 ± 2 mol % of Py-met-chol at 20°C, a much higher value than for Py-ester-chol (~6 ± 1 mol %) (18).

Comparison of the effects of cholesterol and Py-met-chol on DPPC endotherms

We investigated by differential scanning calorimetry (DSC) the effect of cholesterol and Py-met-chol on the modification of the phase physical properties of saturated-PC MLVs. Representative DSC heating scans of aqueous multilamellar suspensions of DPPC containing 0, 2.1, 5, 10, 15, and 20 mol % of cholesterol or Py-met-chol are shown in Fig. 2, *a* and *b*. Pure DPPC exhibited a classical endotherm similar to that described in the literature (25): an endothermic pre-transition at 36°C followed by the main transition at 41.5°C. The main transition was abolished by 20 mol % of cholesterol and by 15 mol % of Py-met-chol. The variations of the main transition melting enthalpies as a function of sterol contents (0–20 mol %) revealed that the disturbance of the DPPC melting enthalpy was similar for the two sterols (Fig. 2 *c*).

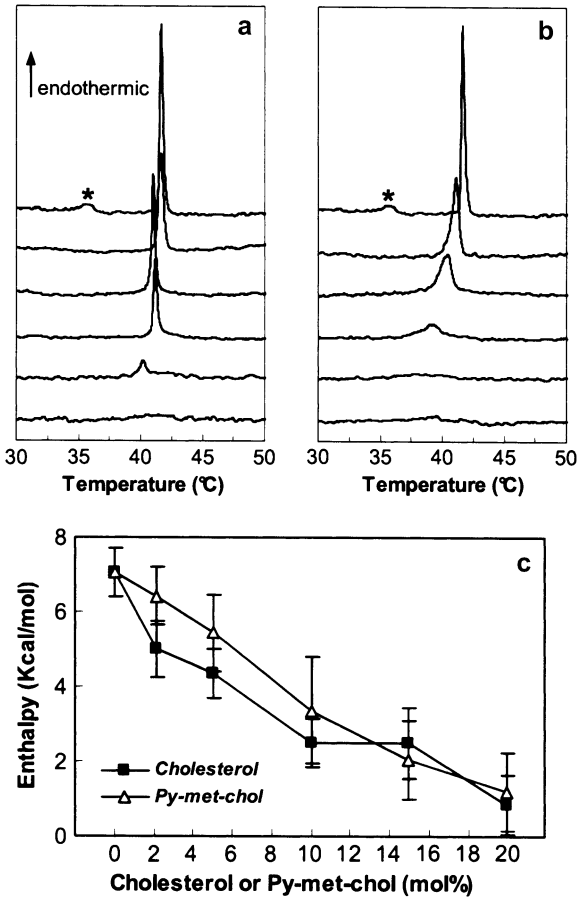


FIGURE 2 (*a* and *b*) Representative raw DSC scans at 30°C/h of DPPC MLVs with various cholesterol (*a*) or Py-met-chol (*b*) mole fractions. DPPC vesicles contained, from top to bottom, 0, 2.1, 5, 10, 15, and 20 mol %. The stars indicate the pretransition peak of the pure DPPC MLVs. (*c*) Effect of increasing amounts of cholesterol or Py-met-chol on the main-transition chain melting enthalpy.

Self-association of Py-met-chol in model membranes

We exploited the hypochromic behavior of pyrene to determine the lateral distribution of the ground-state Py-met-chol in fluid-phase LUVs according to the isodesmic self-associative model (see Appendix) (18). The molar absorption coefficients ε_{meas} were determined from the maximum absorption wavelength (corresponding to the lowest-energy band of the allowed $S_0 \rightarrow S_2$ pyrene transition: 345 nm) as a function of the probe to host lipid mole fraction (0.01–5 mol %). Measurements were made at 30°C in DMPC, POPC, and DOPC vesicles (characterized by different degrees of acyl-chain unsaturation) and LUVs constituted by two DMPC/cholesterol mixtures (85:15 and 70:30). Data and isodesmic fits are illustrated in Fig. 3. The ε_{meas} values for all liposome suspensions were ~32,000 M^{-1} cm^{-1} at 1 mol % of Py-met-chol and were little different at a probe mole fraction of 5 mol %. However, when we lowered the probe mole fraction the ε_{meas} values increased, indicating a hypochromic effect of the probe. This effect was observed more sharply in LUVs composed of unsaturated phospholipids. No shift of the maximum wavelength of pyrene absorption was detected.

To quantify this phenomenon, we used the generic Eq. A12 of the isodesmic model to fit the data and then determined the self-association constant, K (M^{-1}) and the molar absorption coefficients ε_{mono}, ε_{int}, and ε_{ext} (M^{-1} cm^{-1}) corresponding to the overall absorption process of these LUV suspensions (Table 1). In each case, the self-association process led to the formation of oligomers (*n*-mers) whose distribution and size were calculated according to Eqs. A7 and A8 for a given K value and various probes to host lipid mole fractions (C_T). This is illustrated in Fig. 4 using an association constant of 93 M^{-1}, corresponding to LUVs composed of pure DMPC: the calculated distributions for *n*-mers up to heptamers are shown. In Table 2 are reported, for the LUV suspensions studied, 1), the calculated size of the most abundant *n*-mer and the largest *n*-mer size (90% of probe molecules are expected to be in *n*-mers of this size or smaller), for 2, 5, 20, and 30 mol % of Py-met-chol; and 2), the percentages of the monomers for 2 mol % Py-met-chol. We noticed that the more the phospholipids are saturated, the more the probe was distributed as monomer. Similarly, the amount of monomer increased with the amount of cholesterol in DMPC.

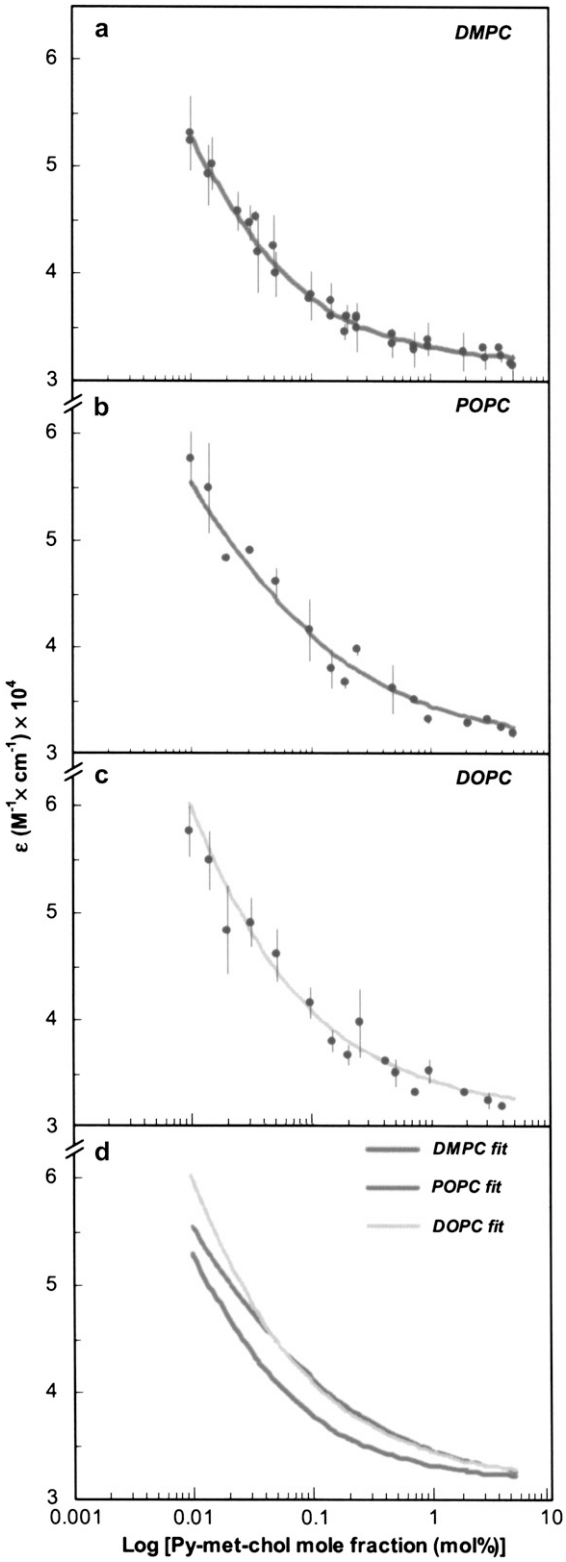


FIGURE 3 (*a–c*) Experimental data (*dots*) and corresponding isodesmic-based fits (*lines*) of Py-met-chol molar absorption coefficient as a function of probe mole fraction in LUVs of DMPC (*a*), POPC (*b*), and DOPC (*c*). (*d*) Superimposition of fitting curves. All measurements were performed above T_m (30°C). Error bars represent standard deviations of two independent experiments.

Fluorescence of Py-met-chol in model membranes

As cholesterol is able to induce a lo phase in some lipid membranes, thereby increasing the membrane thickness, we measured the fluorescence emission spectra of Py-met-chol in LUVs composed of DMPC, POPC, or DOPC with a series of amounts of cholesterol.

The percentage of probe labeling

Fig. 5 *a* shows I_3 and I_E intensities as a function of the probe mole fraction. A linear correlation between the probe quantity and I_3 was found in the concentration range of 0–1 mol % when there were few excimers. For LUVs containing >1 mol %, I_3 diverged from the linearity as I_E increased. We then tested 0.2, 0.5, or 2 mol % of Py-met-chol in DMPC with 0–55 mol % of cholesterol. The fluorescence intensities I_1, I_3, and I_E were measured and the ratios I_1/I_3 and I_E/I_3 calculated (Fig. 5, *b* and *c*). The sample with 2 mol % of Py-met-chol exhibited the maximum decrease of I_1/I_3 (30–35 mol % of cholesterol; Fig. 5 *b*), greater than that found for higher probe concentrations (data not shown). Above this mole fraction, I_1/I_3 increased with increasing cholesterol mole fractions and joined the other I_1/I_3 values (0.2–0.5 mol %). Similarly, I_E/I_3 only showed changes with the 2 mol % sample (Fig. 5 *c*): a constant and low value of I_E/I_3 was measured for mole fractions of cholesterol <30 mol %, but a steep continuous increase was observed between 30 and 55 mol %. The sudden variations of I_1/I_3 and I_E/I_3 at probe concentrations >30 mol % are due to the efficiency of the excimer's formation (see below). As excimer species are only detected at >1 mol % of probe, 2 mol % of Py-met-chol was used in the following experiments.

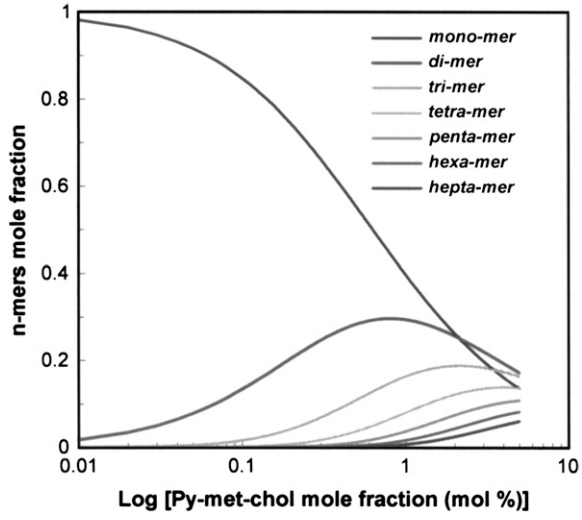


FIGURE 4 Calculated evolution of monomer to heptamer species as a function of Py-met-chol concentration in LUVs. We used an association constant value of 93 M^{-1}, which corresponds to a DMPC environment. Calculations were performed using the isodesmic model (see Appendix).

TABLE 1 Parameter values determined after data fitting according to the isodesmic model

		ε (M^{-1} cm^{-1})			
	K (M^{-1}) (95% CI)*	ε_{mono} (95% CI)*	ε_{ext} (95% CI)*	ε_{int} (95% CI)*	*n*
DOPC	669 (609–739)	143,510 (126,700–160,310)	70,750 (68,260–73,240)	31,360 (30,850–31,860)	33
POPC	281 (230–346)	77,270 (64,080–90,470)	61,860 (58,710–65,010)	31,020 (30,140–31,910)	31
DMPC	93 (84–103)	77,470 (74,260–80,690)	37,960 (36,750–39,170)	31,550 (31,030–32,070)	66
DMPC/chol (85:15)	68 (61–75)	74,450 (71,800–77,090)	34,940 (33,800–36,080)	31,220 (30,660–31,780)	36
DMPC/chol (70:30)	43 (38–49)	73,070 (71,350–73,780)	33,080 (32,300–33,870)	30,790 (29,360–31,200)	34

*Values in parentheses represent the 95% confidence intervals (CI), calculated as follows: for a given parameter (K, ε_{mono}, ε_{int}, or ε_{ext}), with all others fixed equal to the solution. Consequently, the 95% CI value corresponds to the range where the given parameter reduces the error by <5% (according to Fisher's test) on the $1/Y^2$-weighted residual sum of squares compared with the solution. ε values are rounded to the nearest tenth. *n*, number of samples.

Comparative study of DMPC, POPC, and DOPC LUVs with various concentrations of cholesterol and 2 mol % of Py-met-chol

In model membranes, cholesterol induces various lipid organizations (lo versus ld phases), so we verified that the probe was sensitive to these distinct membrane organizations. The normalized fluorescence ratios I_1/I_3 and I_E/I_3 are plotted against the mole fraction of cholesterol in Fig. 6, *a* and *b*. Only DMPC showed a significant decrease of I_1/I_3 until the mole fraction of cholesterol reached 30–35 mol %; this was followed by a partial recovery for higher concentrations of cholesterol. In DOPC and POPC there was less of a decrease. I_E/I_3 was unchanged in a range of 0–25 mol % of cholesterol (Fig. 6 *b*), but showed a considerable increase from 30 mol % in DMPC, a small increase from 45 mol % in POPC, and no variation in DOPC. The main difference between these LUVs containing 2 mol % of probe was that at 30 mol % of cholesterol and beyond, only DMPC is in lo phase, whereas >45 mol % of cholesterol is needed for POPC to display a lo phase. The lo lipid phase, its polarity decrease (due to its being less permeable to water than the ld phase), and the thickness increase were correlated (see below).

Fluorescence of Py-met-chol in plasma membranes

Py-met-chol was introduced into the plasma membrane of living CHO cells using a MβCD-based protocol. This protocol is easy to use, fast, and minimally disruptive. Trypan blue was used to measure cell viability from 2 to 24 h after cell labeling. Control and labeled cells multiplied and survived similarly (data not shown), indicating that Py-met-chol displayed no significant toxicity for living cells. Fig. 7 *a* shows a wide-field microscope image of Py-met-chol-labeled CHO-δ cells. The corresponding cell suspension fluorescence spectrum is illustrated in Fig. 7 *b* and shows a resolution comparable to that of LUV spectra. As deduced from model membranes, a qualitative analysis of the amount of inserted probe in the membrane is possible by considering I_E and I_E/I_3 values. Hence, the incubation time was adapted to give cell fluorescence spectra similar to those of liposomes composed of POPC/30 mol % cholesterol and containing 2 mol % of Py-met-chol. Indeed, the initial I_E/I_3 value measured was 0.33 $\pm$ 0.05 for all cell suspensions (Fig. 8 *a*) close to the 0.30 $\pm$ 0.01 obtained with POPC/30 mol % of cholesterol LUVs (see Fig. 6 legend for other data values).

We monitored the plasma membrane thickness change induced by agonist activation of mDOR (10). Fig. 8, *a* and *b*, shows the variations of I_E/I_3 and I_1/I_3 for CHO-wt and CHO-δ cells as a function of time after addition of buffer, Deltorphin II (mDOR agonist), or Diprenorphin (mDOR antagonist). With CHO-δ, a transient decrease of I_1/I_3 was observed 2 min after agonist addition, reaching a maximum magnitude after 4 min. Then, 2 min later, it had returned to its initial value and remained constant. I_1/I_3 did not change either in CHO-δ cells after addition of antagonist or buffer in CHO-wt (without mDOR) after agonist addition, showing the specific Deltorphin II-induced effect. This result is

TABLE 2 Calculated *n*-mer distributions for various probe mole fractions and association constants in liposomes

		Probe mole percentage (mol %)				
	K (M^{-1})	2	2	5	20	30
		Monomer (%)	(Majority *n*-mer*/largest *n*-mer†)			
DOPC	669	5.7	(4/14)	(6/22)	(12/45)	(14/55)
POPC	281	12	(2/9)	(4/14)	(8/29)	(9 36)
DMPC	93	26	(1/5)	(2/8)	(4/16)	(5/21)
DMPC/chol (85:15)	68	68	(1/4)	(2/7)	(4/14)	(5/17)
DMPC/chol (70:30)	43	93	(1/3)	(2/5)	(3/11)	(4/14)

*The majority *n*-mer is the one with the highest mole fraction in the liposome.
†The largest *n*-mer size, describing 90% of probe molecules.

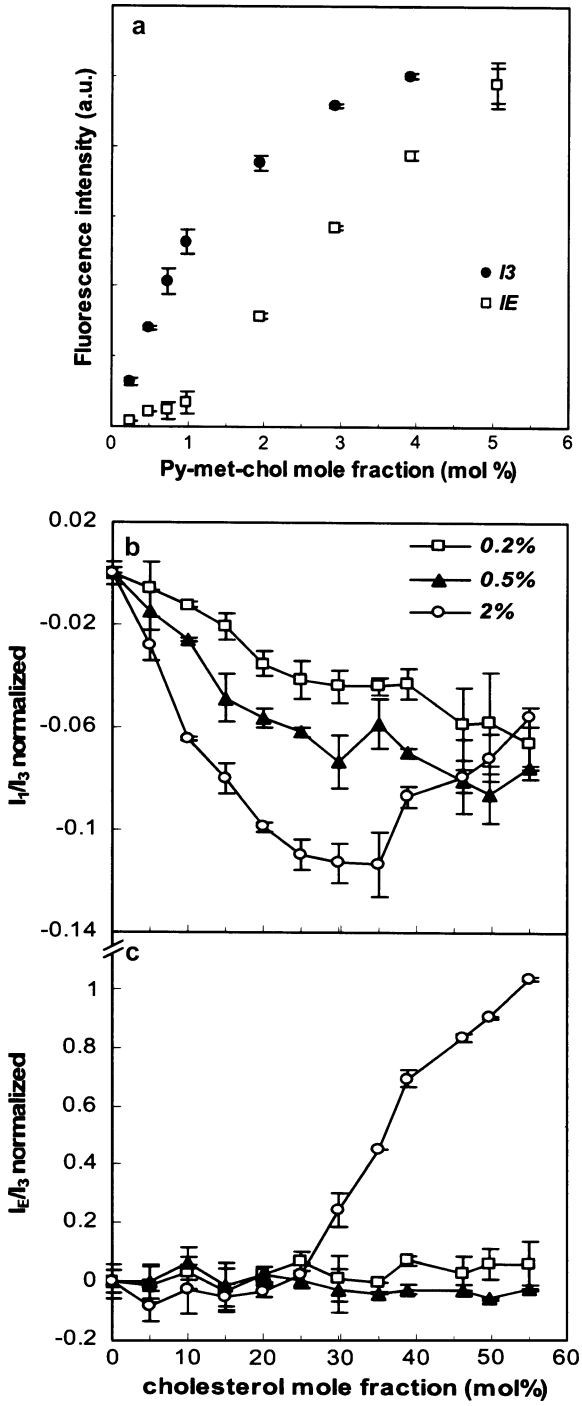


FIGURE 5 (*a*) Fluorescence intensities of the monomer (I_3, 388 nm) and the excimer (I_E, 475 nm) as a function of Py-met-chol mole fraction, in LUVs of DMPC. Fluorescence ratios I_1/I_3 (*b*) and I_E/I_3 (*c*) of Py-met-chol incorporated at 0.2, 0.5, or 2 mol % in LUVs composed of DMPC as a function of cholesterol mole fraction. Ratios are normalized taking ratio values for suspensions without cholesterol as the reference, which corresponded to I_1/I_3 and I_E/I_3 values of: 1.82 and 0.06 with 0.2 mol % of Py-met-chol, 1.89 and 0.15 with 0.5 mol %, and 1.99 and 0.27 with 2 mol %. Error bars represent standard deviations of two independent experiments. In all cases, the temperature was 37°C.

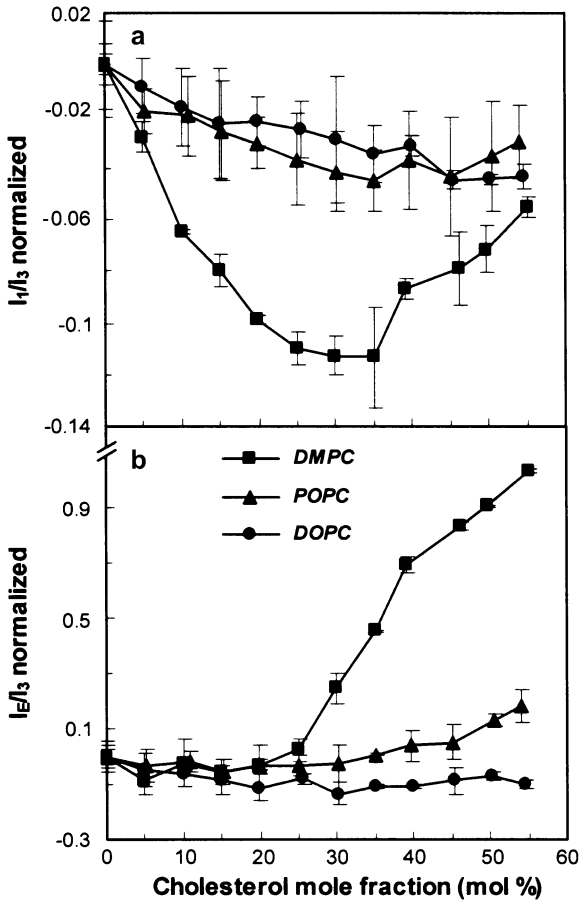


FIGURE 6 Fluorescence of Py-met-chol incorporated at 2 mol % in LUVs of DMPC, POPC, and DOPC as a function of cholesterol mole fraction. Evolution of I_1/I_3 (*a*) and I_E/I_3 (*b*) ratios of Py-met-chol are shown. All measurements were performed at 37°C. Ratios are normalized taking ratio values for suspensions without cholesterol as the reference, which corresponded to the following values for I_1/I_3 and I_E/I_3: 1.98 ± 0.01 and 0.27 ± 0.01 in DMPC, 1.99 ± 0.01 and 0.30 ± 0.01 in POPC, and 2.02 ± 0.01 and 0.35 ± 0.01 in DOPC.

strengthened by the observation of an absence of change of I_1/I_3 and I_E/I_3 after addition of 1 μM of these ligands in LUV suspensions of DMPC containing 0 or 30 mol % of cholesterol and labeled with 2 mol % of Py-met-chol.

DISCUSSION

We report that Py-met-chol, owing to its structure, is much more soluble than Py-ester-chol in model membranes. Although this solubility is lower than that of cholesterol in POPC (66 mol % (22)), our probe is able to label natural membranes using MβCD. The low MβCD concentration used (2.5 mM) is not sufficient to induce cholesterol depletion from the plasma membrane (26). Moreover, the labeling conditions (only 2 min at 37°C) are safe for living cells. First, we compared the behavior of Py-met-chol and cholesterol.

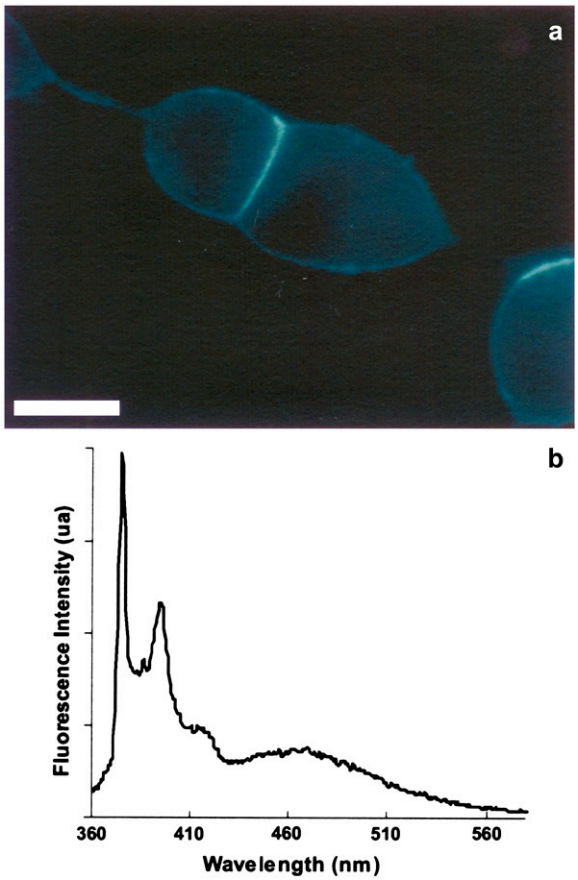


FIGURE 7 Fluorescence of Py-met-chol in living cells. (*a*) Wide-field microscope fluorescence image of plasma membranes of CHO-δ cells incubated with Py-met-chol/MβCD for 2 min at 37°C. The samples were observed at room temperature. Scale bar, 10 μm. (*b*) Emission spectrum of a CHO-δ cell suspension at 37°C labeled with Py-met-chol.

Biophysical behavior and absorbance properties of Py-met-chol in model membranes

The effects of cholesterol and Py-met-chol on saturated phosphatidylcholine MLV endotherms were determined. DPPC was selected for the abundance and diversity of the data in the literature. T_m (Fig. 2, *a* and *b*) changed slightly when Py-met-chol replaced cholesterol ($\Delta T \approx -4$°C and -1°C, respectively, at 10 mol %). These decreases indicated better sterol solubility in the fluid phase than in the gel phase. The broadening of the main transition peak revealed a lesser DPPC melting cooperativity for Py-met-chol than for cholesterol. The melting enthalpies of this transition decreased in a comparable way to, and linearly with, the mole fractions of both cholesterol and Py-met-chol. These results suggest that Py-met-chol/DPPC interactions are likely to be determined by the cholesterol moiety of the probe. The DPPC endotherms with 2.1 mol % of Py-met-chol were comparable to those of DPHpPC, a probe known for its limited disruptive effect on saturated PC (27). These various findings indicate that the pyrene moiety has a little effect on lipid membranes, especially if its concentration does not exceed 2 mol %.

We determined the lateral distribution of Py-met-chol at 30°C in the ground state by measuring the molar absorption coefficients, ε_{meas}, at the maximum absorption wavelength of the $S_0 \rightarrow S_2$ pyrene transition, as a function of the probe concentration (18). A hypochromic effect was observed in all LUV suspensions as the Py-met-chol concentration increased. According to Todesco et al. (28), this suggests that stacking of pyrene chromophore occurs and is a function of the probe concentration. We used an isodesmic model to estimate the self-association constants, K, and the theoretical molar absorption coefficients ε_{mono}, ε_{int}, and ε_{ext}. We found that $\varepsilon_{mono} > \varepsilon_{ext} > \varepsilon_{int}$, and for the five distinct classes of LUVs studied, ε_{int} values are in the same range. This leads to converging ε_{meas} values (close to ε_{int}) in LUVs when the probe concentration is >1 mol % (Fig. 3). The contribution of ε_{mono} is higher when the probe concentration is lower, but ε_{meas} never reached values close to ε_{mono} because this would correspond to LUVs containing too few probe molecules to be detected (i.e., probe concentration <0.01 mol %). Moreover, we report that $K_{DOPC} > K_{POPC} > K_{DMPC}$, corresponding to increased probe self-association as the degree of acyl-chain unsaturation increases. This effect is comparable to the cholesterol interaction with phosphatidylcholines, which is favored when acyl chains are saturated (29). The calculations of n-mer distributions for various percentages of Py-met-chol reveal the efficiency of this self-associative process as assessed from the stack sizes: at 2 mol % of probe, monomers were prevalent in DMPC, whereas tetramers were the majority form in DOPC. Our findings with DMPC liposomes containing 2 mol % of Py-met-chol and mixed with 0, 15, or 30 mol % of cholesterol (Table 1) show that K decreases as the cholesterol mole fraction increases. This can be explained by better probe solvation in DMPC/cholesterol than in pure DMPC LUVs. Indeed, we found that for 2 mol % of probe, 93% of Py-met-chol molecules were monomeric in DMPC/cholesterol (70:30) LUVs, but only 26% were monomers in pure DMPC.

Previous studies analyzing cholesterol solubility in various types of lipids have arrived at the same conclusion. Effectively, the phase behavior of binary mixtures containing cholesterol and phospholipids indicated nonideal mixing of cholesterol and the presence of ld/lo immiscibility regions (30–32), and cholesterol promotes the lo domain (33). Furthermore, the acyl-chain structure is known to affect cholesterol interaction with lipids (34), causing variations in cholesterol distribution and membrane dynamics. Radhakrishnan et al. (35) reported that there is less evidence for cholesterol complex formation with unsaturated than with saturated PC. This suggests that cholesterol is better solvated in saturated than in unsaturated lipid environments where it is partially excluded, implying formation of cholesterol oligomers rather than monomers (34).

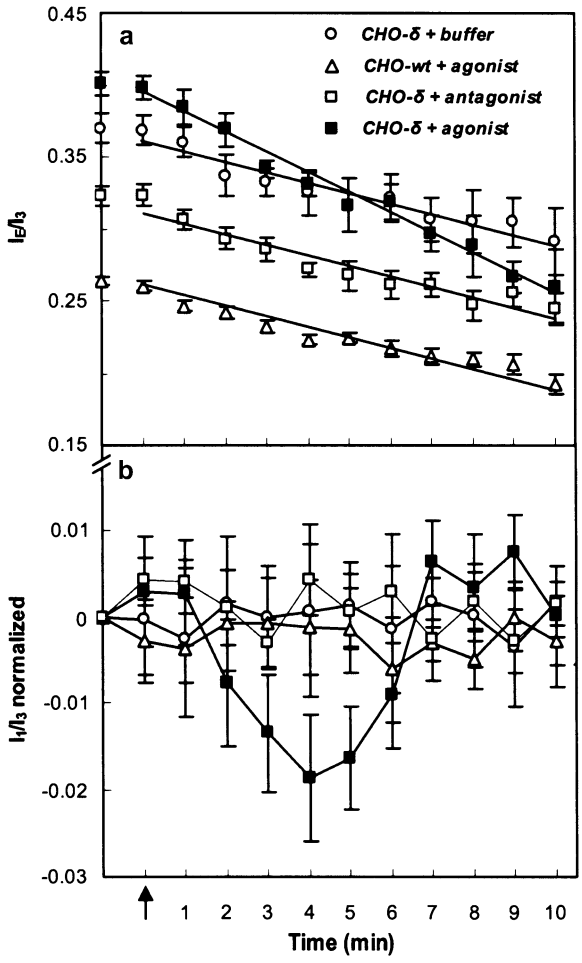


FIGURE 8 Fluorescence I_E/I_3 values of one set of various conditions (*a*) and normalized I_1/I_3 values for all experiments (*b*) involving Py-met-chol with living CHO-δ and CHO-wt cell suspensions. The arrow indicates the addition to the CHO-δ cell suspension of a solution of buffer (HEPES, $n = 9$), antagonist (Diprenorphin, $n = 10$), or agonist (Deltorphin II, $n = 11$), or addition of a solution of agonist to the CHO-wt cell suspension ($n = 10$). I_1/I_3 ratios are normalized taking ratio values measured before ligand addition. Error bars correspond to mean ± SE of n experiments. Agonist and antagonist were used at final concentrations of 1 μM. All measurements were carried out at 37°C. Lines are provided to facilitate reading.

Our results with Py-met-chol after absorption measurements and isodesmic fitting confirm these findings for cholesterol, with, in addition, a quantification of the lateral distribution of the probe. It may be possible to extrapolate this lateral distribution to that of cholesterol. Similar patterns for the lateral distribution of cholesterol were proposed after dynamic simulations of particular lipid/cholesterol mixtures (36). Mazères et al. (37) used a similar experimental approach based on pyrene-labeled phospholipids and reported weaker K values (<1 M^{-1}) than those determined with Py-ester-chol (18) or Py-met-chol (Table 1). These various results suggest that the cholesterol moiety induces the stacking of cholesterol-pyrene probe.

Fluorescence properties of Py-met-chol in model membranes

Fluorescence measurements justified the choice of 2 mol % for optimum labeling, because 1), this is near the limit of the linear relationship between the fluorescence monomer intensity and the Py-met-chol concentration (Fig. 5); 2), it generates the largest amplitude of I_1/I_3 variations (Figs. 5 *b* and 6 *a*); and 3), it allows an accurate quantification of the excimer (Fig. 5). Furthermore, absorbance findings show that the most abundant n-mer is the monomer in DMPC samples at 2 mol % of probe (Fig. 4 and Table 2), allowing an assessment of membrane polarity (15,38).

We carried out fluorescence studies of Py-met-chol incorporated into DMPC, POPC, and DOPC LUVs with a series of concentrations of cholesterol (Fig. 6, *a* and *b*). A correlation between the probe fluorescence and the physical properties of the membrane was observed. Note that at >30 mol % of cholesterol in DMPC, a full lo phase is present (39); hence, the thickness of the membrane is maximum (9), and the molecular protrusion of lipids is reduced (0.7 Å with 30 mol % of cholesterol and 2.7 Å in pure DMPC) (40). This leads to a much lower polarity of the lipid core than the ld phase, because the restricted conformational and rotational motions do not allow the water to cross the membrane with the same efficiency as in an ld lipid phase (41). This explains our results with DMPC, where biphasic behavior is observed: a decrease of I_1/I_3 until a full lo phase occurs, followed by a recovery toward the POPC and DOPC I_1/I_3 values. These I_1/I_3 changes were not found with POPC or DOPC. For DOPC, cholesterol is known not to promote a lo phase but can induce only higher-order acyl chains (42). In contrast, for POPC, a single lo phase should be present above ~45 mol % of cholesterol (43). Perhaps the small increase of I_1/I_3 above 45 mol % of cholesterol (Fig. 6 *a*) reflects this phenomenon. The same biphasic behavior is clearly observed for I_E/I_3 with DMPC, whereas I_E/I_3 remains constant in DOPC and increases very slightly in POPC (Fig. 6 *b*). In all LUVs, from 0 to 25 mol % of cholesterol, I_E/I_3 values are comparable but when the full lo phase is reached, an increase is observed. This is a consequence of an increasing number of monomers, as revealed by absorbance data (93% of monomers versus 26% without cholesterol (see Table 2)), inducing a more effective excimer formation (44). Indeed, as reported in many studies, excimer formation is a dynamic process and excimers are not formed from ground-state oligomers in a bilayer (45). The increase of I_E/I_3 in the DMPC lo phase as the cholesterol concentration increases supports this statement. However, this effect is probably slowed because the diffusion coefficient of the lo phase is smaller than that of the ld phase (46).

These various findings confirm that 1), the probe has better miscibility in the lo phase than in the ld phase; 2), the I_E/I_3 ratio can be used as an indicator to distinguish ld from full lo phase in model membranes; and 3), I_1/I_3 is a sensitive

indicator of membrane polarity when fluid ld and lo phases coexist.

Fluorescence properties of Py-met-chol in the plasma membrane of living cells

The fluorescence spectra of Py-met-chol in living cell membranes (Fig. 7 *b*) showed a resolution comparable to those of LUVs (Fig. 1 *b*). An initial I_E/I_3 value of 0.33 ± 0.05 confirmed that the Py-met-chol quantity inserted into cell plasma membranes was in accordance with our labeling criterion. Nevertheless, initial I_1/I_3 values were in the range of 2.15–2.30, and thus different from initial I_1/I_3 values of LUVs containing 30 mol % of cholesterol (1.75–1.95). This indicates that the probe environment inside the plasma membrane is more polar than that inside model membranes. This could be the result of polar atoms brought by transmembrane proteins into cell membranes.

Unlike LUVs, decreases of I_E/I_3 in living cells were observed during the observation time. Indeed, in living cells, endocytosis and exocytosis exchanges occur, leading to a permanent efflux from the plasma membrane. However, this decrease was greater in the CHO-δ incubated with the agonist (Fig. 8 *a*) than in controls, because a supplementary process takes place: the internalization of the mDOR to regulate its function (47).

The kinetics of I_1/I_3 variations revealed different behaviors according to cell stimulation (Fig. 8 *b*). Various findings and concepts have to be considered to interpret these results. Some GPCRs modify the thickness of the surrounding membrane as part of their signaling function: rhodopsin and DOR specifically change their transmembrane conformation after agonist binding, as revealed by surface plasmon resonance studies (10,48), inducing an increase in the transmembrane thickness. These changes may induce a hydrophobic mismatch between the protein and the surrounding lipids (49,50), which could be a driving force for variations of local concentrations of particular lipids (including cholesterol), and for thickness adaptations of lipid acyl chains (51). This thickness increase inevitably reduces the water permeability and the correlated intrinsic membrane polarity. By measuring Py-met-chol I_1/I_3 fluorescence, we observed a transient and specific change with mDOR after agonist binding. The timing of this biphasic I_1/I_3 change (a signal diminution for 4 min followed by a recovery to the initial value after 10 min), is consistent with the characteristic times of two opposite processes, the internalization (47) and recycling (52) mechanisms of mDOR. Note that with respect to the I_1/I_3 and I_E/I_3 variations in LUVs, which account for the entire membrane, the variation in cells corresponded to membrane subfractions occupied by the mDOR transmembrane protein.

We point out that our results were observed in living cells. Furthermore, mDOR has been inserted in LUVs of defined compositions, but we were never able to reconstitute it in a high-affinity state to observe the binding of agonists, even though this GPCR was characterized as inserted into the lipid phase of these LUVs (data not shown). This underlines the great difficulties encountered in reconstructing active GPCRs in model membranes.

However, our observations confirmed that Py-met-chol fluorescence measurements in living cells can be used as a sensitive indicator to follow induced lipid organization changes.

In conclusion, we have synthesized a new fluorescent probe derived from cholesterol and have demonstrated that, in membranes, it can 1), report on the lateral distribution of cholesterol; 2), from I_1/I_3, measure polarity changes in the hydrophobic core of model membranes; 3), from I_E/I_3, characterize the lo phase in model membranes; and 4), reveal lipid organization changes specifically induced by agonist binding to mDOR. This new cholesterol-pyrene probe could be used for screening analyses of new GPCR ligands in living cells (53), when the transmembrane protein conformational changes induced by their activation are comparable to that of mDOR.

APPENDIX

Self-associative model (18): Assuming an infinite linear self-association scheme in which each step is characterized by the same equilibrium constant K, only three kinds of contribution are expected to account for the absorption properties of pyrene probes: the molar extinction coefficients of free monomers (ε_{mono}), and, in a stack of n-mers, the contributions of both (n-2) internal (ε_{int}) and the two external (ε_{ext}) units. The calculated molar absorption coefficient ε_{calc} for a given probe concentration is:

$$\varepsilon_{calc} = \alpha_{mono} \times \varepsilon_{mono} + \alpha_{ext} \times \varepsilon_{ext} + \alpha_{int} \times \varepsilon_{int}, \tag{A1}$$

$$\text{with} \quad \alpha_{mono} + \alpha_{ext} + \alpha_{int} = 1 \tag{A2}$$

where α_{mono}, α_{ext}, and α_{int} are the molar fractions of free monomers and those of probes at the extremities and inside the stacks, respectively, and correspond to

$$\alpha_{mono} = \frac{[Py_1]}{C_T}; \tag{A3}$$

$$\alpha_{ext} = \sum_{i=2}^{\infty} \frac{2 \times [Py_i]}{C_T}; \tag{A4}$$

and

$$\alpha_{int} = \sum_{i=2}^{\infty} \frac{(i-2) \times [Py_i]}{C_T}, \tag{A5}$$

where $[Py_i]$ is the molar fraction of n-mers consisting of i pyrene-probe molecules, $[Py_1]$ is the molar fraction of monomer, and C_T the probe/host lipid mole fraction. Applying mass conservation, we have

$$C_T = \sum_{i=1}^{\infty} [Py_i] \times i. \tag{A6}$$

Accordingly, the equation used to calculate individual molar concentrations of n-mers is

$$[Py_i] = i \times K^{i-1} \times [Py_1]^i, \tag{A7}$$

and so the relationship between C_T, $[Py_1]$, and K can be interpreted as

$$[\mathrm{Py}_1] = \frac{1}{K} + \frac{1 - \sqrt{4C_\mathrm{T} \times K + 1}}{2K^2 \times C_\mathrm{T}}, \quad \text{(A8)}$$

and we can then write

$$\alpha_\mathrm{mono} = \frac{1}{K \times C_\mathrm{T}} + \frac{1 - \sqrt{4C_\mathrm{T} \times K + 1}}{2K^2 \times C_\mathrm{T}^2}; \quad \text{(A9)}$$

$$\alpha_\mathrm{int} = -\frac{C_\mathrm{T} - [\mathrm{Py}_1]}{C_\mathrm{T}} + 2 \times \frac{K \times [\mathrm{Py}_1]^2}{C_\mathrm{T} \times (1 - K \times [\mathrm{Py}_1])^2}; \quad \text{(A10)}$$

and

$$\alpha_\mathrm{ext} = 2 \times \frac{C_\mathrm{T} - [\mathrm{Py}_1]}{C_\mathrm{T}} - \frac{2K \times [\mathrm{Py}_1]^2}{C_\mathrm{T} \times (1 - K \times [\mathrm{Py}_1])^2}. \quad \text{(A11)}$$

The generic equation of the isodesmic model is obtained by introducing the Eqs. A8–A11 into Eq. A1, giving

$$\varepsilon_\mathrm{calc} = {}^f K, \varepsilon_\mathrm{mono}, \varepsilon_\mathrm{int}, \varepsilon_\mathrm{ext}^{(C_\mathrm{T})}. \quad \text{(A12)}$$

Knowing C_T and using the above equations, we were able to calculate, by an iterative process, α_mono, α_ext, and α_int and determine the best values for the various parameters—K, $\varepsilon_\mathrm{mono}$, ε_ext, and ε_int—shown in Table 1. Equations A7 and A8 led to descriptions of n-mer distributions as a function of the host lipid/probe molar fractions shown in Fig. 4.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

To view all of the supplemental files associated with this article, visit www.biophysj.org.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Association pour la Recherche contre le Cancer. L.G. was supported by a grant from Fonds Social Européen.

REFERENCES

1. Pike, L. J. 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44: 655–667.
2. Brown, D. A., and E. London. 1998. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J. Membr. Biol.* 164:103–114.
3. Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:31–39.
4. London, E., and D. A. Brown. 2000. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta.* 1508:182–195.
5. Schuck, S., M. Honsho, K. Ekroos, A. Shevchenko, and K. Simons. 2003. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:5795–5800.
6. Brown, D. A., and E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275: 17221–17224.
7. Brown, D. A., and E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:111–136.
8. Ikonen, E. 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:470–477.
9. Gandhavadi, M., D. Allende, A. Vidal, S. A. Simon, and T. J. McIntosh. 2002. Structure, composition, and peptide binding properties of detergent soluble bilayers and detergent resistant rafts. *Biophys. J.* 82:1469–1482.
10. Salamon, Z., V. J. Hruby, G. Tollin, and S. Cowell. 2002. Binding of agonists, antagonists and inverse agonists to the human δ-opioid receptor produces distinctly different conformational states distinguishable by plasmon-waveguide resonance spectroscopy. *J. Pept. Res.* 60: 322–328.
11. Barrow, D. A., and B. R. Lentz. 1985. Membrane structural domains. Resolution limits using diphenylhexatriene fluorescence decay. *Biophys. J.* 48:221–234.
12. Nyholm, T., M. Nylund, A. Soderholm, and J. P. Slotte. 2003. Properties of palmitoyl phosphatidylcholine, sphingomyelin, and dihydrosphingomyelin bilayer membranes as reported by different fluorescent reporter molecules. *Biophys. J.* 84:987–997.
13. Duportail, G., and P. Lianos. 1996. Fluorescence probing of lipid vesicles using pyrene and pyrene derivatives. M. Rosoff, editor. Surfactant Science series, New York.
14. Barenholz, Y., T. Cohen, E. Haas, and M. Ottolenghi. 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.
15. L'Heureux, G. P., and M. Fragata. 1987. Micropolarities of lipid bilayers and micelles. 4. Dielectric constant determinations of unilamellar phosphatidylcholine vesicles. *J. Colloid Interface Sci.* 117:513–522.
16. Subczynski, W. K., A. Wisniewska, J. J. Yin, J. S. Hyde, and A. Kusumi. 1994. Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol. *Biochemistry.* 33:7670–7681.
17. Pérochon, E., A. Lopez, and J. F. Tocanne. 1992. Polarity of lipid bilayers. A fluorescence investigation. *Biochemistry.* 31:7672–7682.
18. Lagane, B., S. Mazères, C. Le Grimellec, L. Cézanne, and A. Lopez. 2002. Lateral distribution of cholesterol in membranes probed by means of a pyrene-labelled cholesterol: effects of acyl chain unsaturation. *Biophys. Chem.* 95:7–22.
19. Dittmer, J. C., and R. L. Lester. 1964. A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.* 15:126–127.
20. Zak, B., R. C. Dickenman, E. G. White, H. Burnett, and P. J. Cherney. 1954. Rapid estimation of free and total cholesterol. *Am. J. Clin. Pathol.* 24:1307–1315.
21. Bullova, H., and P. Balgavy. 2005. Turbidimetric study of unilamellar extruded egg phosphatidylcholine liposomes. *Acta Fac. Pharm. Univ. Comen.* 52:66–71.
22. Huang, J., J. T. Buboltz, and G. W. Feigenson. 1999. Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 1417:89–100.
23. Prodi, L., R. Ballardini, M. T. Gandolfi, and R. Roversi. 2000. A simple fluorescent chemosensor for alkaline-earth metal ions. *J. Photochem. Photobiol. Chem.* 136:49–52.
24. Yang, J. S., C. S. Lin, and C. Y. Hwang. 2001. Cu^{2+}-induced blue shift of the pyrene excimer emission: a new signal transduction mode of pyrene probes. *Org. Lett.* 3:889–892.
25. McMullen, T. P., and R. N. McElhaney. 1995. New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta.* 1234:90–98.
26. Christian, A. E., M. P. Haynes, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat. 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid Res.* 38:2264–2272.
27. Parente, R. A., and B. R. Lentz. 1985. Advantages and limitations of 1-palmitoyl-2-[[2-[4- (6-phenyl-trans-1,3,5-hexatrienyl)phenyl]ethyl]-carbonyl]-3-*sn*-phosphatidylcholine as a fluorescent membrane probe. *Biochemistry.* 24:6178–6185.
28. Todesco, R. V., R. A. Basheer, and P. V. Kamat. 1986. Photophysical and photochemical behavior of poly(1-vinylpyrene). Evidence for dual excimer fluorescence. *Macromolecules.* 19:2390–2397.
29. Ohvo-Rekila, H., B. Ramstedt, P. Leppimaki, and J. P. Slotte. 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 41:66–97.

30. Sankaram, M. B., and T. E. Thompson. 1990. Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state 2H nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*. 29:10676–10684.

31. Vist, M. R., and J. H. Davis. 1990. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*. 29:451–464.

32. McMullen, T. P. W., and R. N. McElhaney. 1996. Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1:83–90.

33. Silvius, J. R., D. del Giudice, and M. Lafleur. 1996. Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipids of differing acyl chain length. *Biochemistry*. 35:15198–15208.

34. Kusumi, A., W. K. Subczynski, M. Pasenkiewicz-Gierula, J. S. Hyde, and H. Merkle. 1986. Spin-label studies on phosphatidylcholine-cholesterol membranes: effects of alkyl chain length and unsaturation in the fluid phase. *Biochim. Biophys. Acta*. 854:307–317.

35. Radhakrishnan, A., and H. M. McConnell. 2000. Chemical activity of cholesterol in membranes. *Biochemistry*. 39:8119–8124.

36. Subczynski, W. K., and A. Kusumi. 2003. Dynamics of raft molecules in the cell and artificial membranes: approaches by pulse EPR spin labeling and single molecule optical microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*. 1610:231–243.

37. Mazères, S., B. Lagane, M. Welby, V. Trégou, and A. Lopez. 2001. Probing the lateral organization of membranes: fluorescence repercussions of pyrene probe distribution. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. 57:2297–2311.

38. L'Heureux, G. P., and M. Fragata. 1988. Micropolarities of lipid bilayers and micelles. 5. Localization of pyrene in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles. *Biophys. Chem.* 30:293–301.

39. Almeida, P. F., W. L. Vaz, and T. E. Thompson. 1992. Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry*. 31: 6739–6747.

40. Douliez, J. P., A. Leonard, and E. J. Dufourc. 1996. Conformational order of DMPC *sn*-1 versus *sn*-2 chains and membrane thickness: an approach to molecular protrusion by solid-state 2H-NMR and neutron diffraction. *J. Phys. Chem*. 100:18450–18457.

41. Corvera, E., O. Mouritsen, M. Singer, and M. Zuckermann. 1992. The permeability and the effect of acyl-chain length for phospholipid bilayers containing cholesterol: theory and experiment. *Biochim. Biophys. Acta*. 1107:261–270.

42. Warschawski, D. E., and P. F. Devaux. 2005. Order parameters of unsaturated phospholipids in membranes and the effect of cholesterol: a ^{1}H-^{13}C solid-state NMR study at natural abundance. *Eur. Biophys. J*. 34: 987–996.

43. de Almeida, R. F., A. Fedorov, and M. Prieto. 2003. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. *Biophys. J*. 85:2406–2416.

44. Galla, H. J., and W. Hartmann. 1980. Excimer-forming lipids in membrane research. *Chem. Phys. Lipids*. 27:199–219.

45. Pansu, R. B., K. Yoshihara, T. Arai, and K. Tokumaru. 1952. 1993. Convolution analysis of the pyrene excimer formation in membranes. *J. Phys. Chem.* 97:1125–1133.

46. Kahya, N., and P. Schwille. 2006. How phospholipid-cholesterol interactions modulate lipid lateral diffusion, as revealed by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Fluoresc*. 16:671–678.

47. Chu, P., S. Murray, D. Lissin, and M. von Zastrow. 1997. Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist. *J. Biol. Chem.* 272:27124–27130.

48. Salamon, Z., S. Cowell, E. Varga, H. I. Yamamura, V. J. Hruby, and G. Tollin. 2000. Plasmon resonance studies of agonist/antagonist binding to the human δ-opioid receptor: new structural insights into receptor-ligand interactions. *Biophys. J*. 79:2463–2474.

49. Epand, R. M. 2004. Do proteins facilitate the formation of cholesterol-rich domains? *Biochim. Biophys. Acta*. 1666:227–238.

50. Dumas, F., J. F. Tocanne, G. Leblanc, and M. C. Lebrun. 2000. Consequences of hydrophobic mismatch between lipids and melibiose permease on melibiose transport. *Biochemistry*. 39:4846–4854.

51. Dumas, F., M. C. Lebrun, and J. F. Tocanne. 1999. Is the protein/lipid hydrophobic matching principle relevant to membrane organization and functions? *FEBS Lett*. 458:271–277.

52. Marie, N., I. Lecoq, P. Jauzac, and S. Allouche. 2003. Differential sorting of human δ-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists. *J. Biol. Chem*. 278:22795–22804. *Epub*. 22003: 22792.

53. Lopez, A., and C. Le Roux. 2006. Characterization of the lipid membrane state of living cells using a pyrene probe mimicking the cholesterol: application to protein screening. International reference: WO2006/100388 A2; Patent France No. 05/02884.

Changes of the membrane lipid organization characterized by means of a new cholesterol-pyrene probe

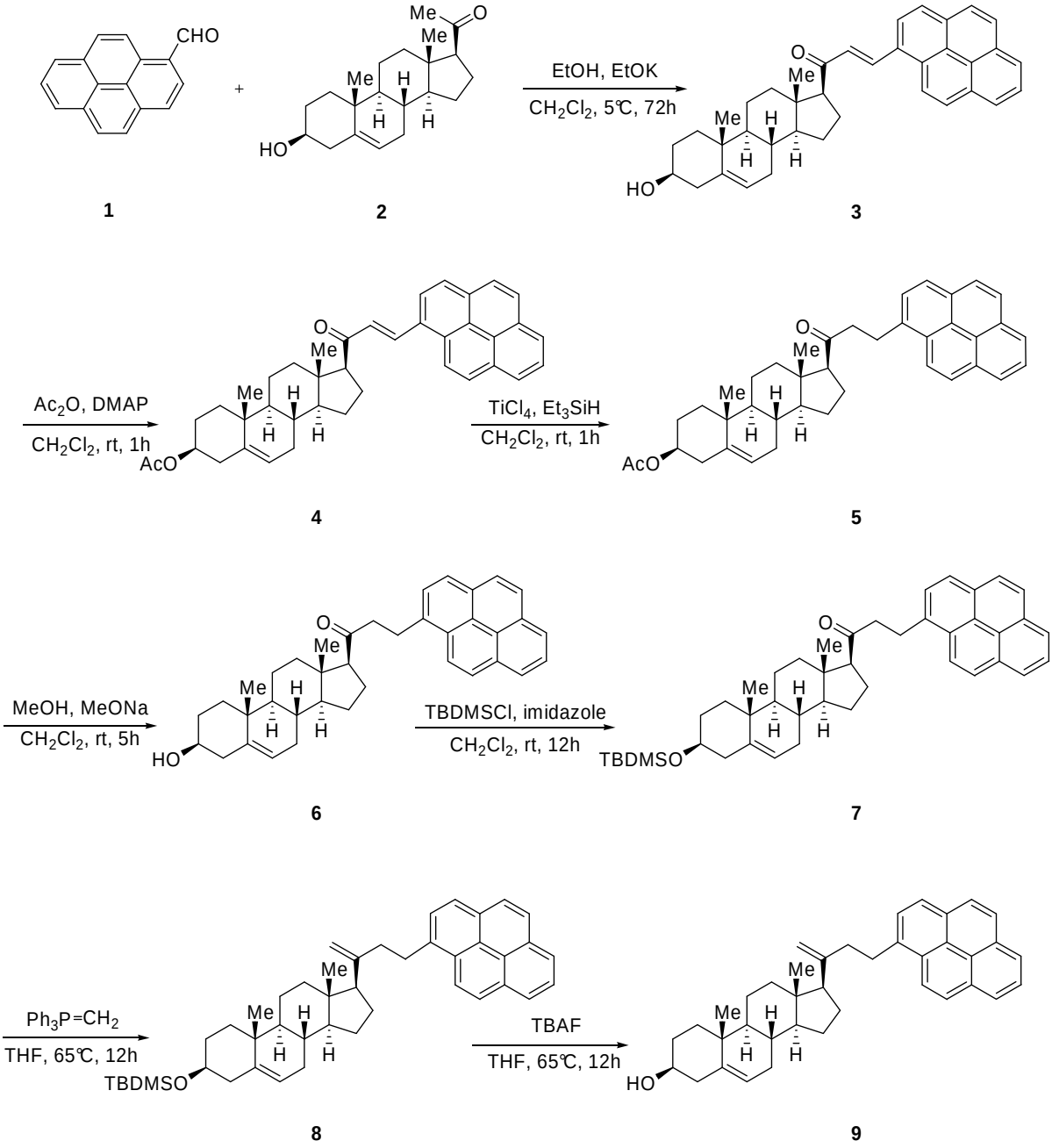
Laurent Le Guyader[*], Christophe Le Roux[†], Serge Mazères*, Hafida Gaspard-Iloughmane[†], Heinz Gornitzka[†], Claire Millot[*], Christophe Mingotaud[‡] and André Lopez*.*

*Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse Cedex, France. [†]Laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée, UMR 5069 and [‡]Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, UMR 5623, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 4, France.

Correspondence: André Lopez: Tel: +33(0) 561 175 945, Fax: +33(0) 561 175 994, E-mail: andre.lopez@ipbs.fr

Supplementary Materials

Scheme 1. Organic synthesis of cholesterol-pyrene probe.



Synthesis procedures, spectral and analytical characterizations of cholesterol probe in Scheme 1:

(21E)-3β-hydroxy-pregna-5,21-diene-22-(1-pyrenyl)-20-one (3). Fifteen mL of dry ethanol and then 25 mL of a 24 wt. % solution of potassium ethanolate in ethanol were added to a solution of 1-pyrenecarboxaldehyde (**1**) (3.2 g, 14 mmol) and pregnenolone (**2**) (4 g, 12.64 mmol) in 30 mL of dry CH_2Cl_2. The resulting solution was stirred for 72 h at +5°C, 200 mL of water was added and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). The combined organic extracts were washed with saline solution, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated on a rotatory evaporator. The crude product was purified by flash chromatography on silica G60 (0.040-0.063 mm), eluting with ethyl acetate in CH_2Cl_2 (2/98) then with ethyl acetate in CH_2Cl_2 (15/85) to give 6.12g (91%) of **3** as a bright yellow solid; mp: 153°C; TLC (CH_2Cl_2/AcOEt 15:85) R_f 0.5; IR (KBr, cm^{-1}) 3300m, 2932s, 1676m, 1590s, 1436w, 1370w, 1352w, 1315w, 1234w, 1192w, 1102m, 1052m, 973w, 848s, 709w; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.59 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.70-2.38 (m, 22H), 2.73 (t, J = 8.7 Hz, 1H), 3.42 (sept, J = 4.8 Hz, 1H) 3.55 (t, J = 9 Hz, 2H), 5.24 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.87-8.17 (m, 8H), 8.36 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 8.58 (d, J = 15.6 Hz, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 200.2, 140.8, 138.0, 132.7, 131.3, 130.7, 130.2, 128.7, 128.6, 128.5, 127.3, 126.3, 126.0, 125.8, 125.0, 124.9, 124.6, 124.0, 122.5, 121.4, 71.7, 62.5, 57.1, 53.5, 50.0, 45.1, 42.3, 39.2, 37.3, 36.5, 32.0, 31.8, 31.6, 24.7, 22.8, 21.1, 19.4, 13.5; MS (CI, NH_3) m/z 529 (100, $[M + H]^+$); optical rotation $[\eta]^{20}_D$ +34.0 (c 1.1, $CHCl_3$).

(21E)- 3β-acetoxy-pregna-5,21-diene-22-(1-pyrenyl)-20-one (4). Acetic anhydride (1 mL, 5.28 mmol) 4-(dimethylamino)pyridine (30 mg, 246 µmol) and triethylamine (343 µL, 2.46 mmol) were successively added to a solution of **3** (1.3 g, 2.46 mmol) in 20 mL of CH_2Cl_2. The resulting solution was stirred for 3h at RT then 150 mL water was added and the organic products were extracted with CH_2Cl_2 (3 x 80 mL). The combined extracts were dried over sodium sulfate, concentrated on a rotatory evaporator and subjected to column chromatography (CH_2Cl_2/AcOEt 98/2) to give 1.16 g (83%) of **4** as a bright yellow solid; mp 99°C; TLC (AcOEt/CH_2Cl_2 2:98) R_f 0.9; IR (KBr, cm^{-1}) 2938s, 1728s, 1676w, 1590s, 1371m, 1242s, 1102m, 1126m, 845s; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.58 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 0.70-2.36 (m, 21H), 2.71 (t, J = 9 Hz, 1H), 4.52 (m, 1H), 5.24 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.87-8.17 (m, 8H), 8.36 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.56 (d, J = 15.9 Hz, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 200.1, 170.6, 139.6, 137.9, 132.7, 131.3, 130.7, 130.2, 128.7, 128.6, 128.5, 127.3, 126.3, 126.0, 125.8, 125.0, 124.9, 124.6, 124.0, 122.5, 122.4, 73.9, 62.4, 57.0, 49.9, 45.0, 39.1, 38.1, 37.0, 36.6, 31.9, 31.8, 27.8, 24.7, 22.8, 21.5, 21.1, 19.3, 13.5 (only 39 of the 40 expected resonances were observed); MS (CI, NH_3) m/z 571 (100, $[M + H]^+$); optical rotation $[\eta]^{20}_D$ +63.6 (c 0.86, $CHCl_3$).

3β-acetoxy-pregn-5-ene-21-(1-methylpyrenyl)-20-one (5). To an iced cooled solution of **4** (1 g, 1.75 mmol) in 20 mL of CH_2Cl_2, 4.2 mL of a 1M solution of $TiCl_4$ in CH_2Cl_2 was added and the resulting deep brown solution was stirred for 10 min. Et_3SiH (419 µL, 2.63 mmol) was added all at once and the solution was warmed to room temperature and stirred for 45 min. The solution was poured into 150 mL of a saturated solution of $NaHCO_3$ and the organic products were extracted with CH_2Cl_2 (3 x 80 mL). The combined extracts were dried over sodium sulfate, concentrated on a rotatory evaporator and subjected to column chromatography (CH_2Cl_2/AcOEt 98:2) to give 601 mg (60%) of **5** as a pale yellow solid; mp 91°C; TLC (CH_2Cl_2 /AcOEt 98:2) R_f 0.9; IR (KBr, cm^{-1}) 2938s, 2902s, 1729s, 1701s, 1456w, 1436w, 1362m, 1246s, 1095w, 1031m, 906w, 845m, 731m; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.49 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 0.6-2.4 (m, 20H), 2.77 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 3.51 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 4.49 (m, 1H), 5.23 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 7.76-8.14 (m, 9H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 210.5, 170.5, 139.6, 135.6, 131.4, 130.9, 130.0, 128.5, 127.6, 127.5, 127.3, 126.7, 125.9, 125.1, 125.0, 124.9, 124.8, 123.0, 122.3, 73.8, 63.1, 56.7, 49.7, 46.1, 44.2, 38.8, 38.1, 36.9, 36.5, 31.7, 31.6, 27.7, 27.4, 24.5, 23.0, 21.4, 20.9, 19.2, 13.4 (only 39 of the 40 expected resonances were observed); MS (CI, NH_3) m/z 590 (100, $[M + NH_4]^+$), 573 (98, $[M + H]^+$); optical rotation $[\eta]^{20}_D$ -9.0 (c 1.37, $CHCl_3$).

3β-hydroxy-pregn-5-ene-21-(1-methylpyrenyl)-20-one (6). We successively added 5 mL of dry methanol and 5 mL of a 30 wt. % solution of sodium methanolate in methanol to a solution of **5** (600 mg, 1 mmol) in 10 mL of CH_2Cl_2 and stirred the solution for 4 h at room temperature. We added 200ml water and extracted the organic products with CH_2Cl_2 (3 x 100 mL). The combined organic extracts were washed with saline solution, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated on a rotatory evaporator. Purification by flash chromatography on silica G60 (0.040-0.063 mm), eluting with CH_2Cl_2 in AcOEt (85/15) gave 302 mg (95%) of **6** as an off-white solid; mp 199°C (dec.); TLC (CH_2Cl_2/AcOEt 85:15) R_f 0.5; IR (KBr, cm^{-1}) 3428m, 2930s, 1700s, 1458w, 1436w, 1357w, 1108w, 1054m, 845s, 755s; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.55 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.70-2.24 (m, 19H), 2.40 (t, J = 9 Hz, 1H), 2.84 (t, J = 6 Hz, 2H), 3.42 (m, 1H) 3.55 (t, J = 9 Hz, 2H), 5.24 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 7.80-8.18 (m, 9H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 210.5, 140.7, 135.7, 131.4, 130.9, 130.0, 128.5, 127.6, 127.5, 127.3, 126.8, 125.9, 125.1, 125.0, 124.9, 124.8, 123.0, 121.4, 71.7, 63.2, 56.9, 49.9, 46.1, 44.3, 42.2, 38.9, 37.2, 36.5, 31.8, 31.7, 31.6, 27.4, 24.5, 23.0, 21.0, 19.3, 13.5 (only 37 of the 38 expected resonances were observed); MS (CI, NH_3) m/z 548 (100, $[M + NH_4]^+$), 531 (17, $[M + H]^+$); optical rotation $[\eta]^{20}_D$ -12.1 (c 0.74, $CHCl_3$).

3β-tert-butyldimethylsilyloxy-pregn-5-ene-21-(1-methylpyrenyl)-20-one (7). We added via a syringe, a solution of tert-butyldimethylsilyl chloride (68 mg, 452 mmol) in 2 mL of CH_2Cl_2 to a solution of **6** (200 mg, 377 µmol) and imidazole (51 mg, 754 mmol) in 5 mL of CH_2Cl_2. After 12h stirring at RT, 50 mL water was added and the organic products were extracted with dichloromethane

(3 x 50 mL). The combined organic extracts were washed with saline solution, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated on a rotatory evaporator. Purification by flash chromatography on silica G60 (0.040-0.063 mm), eluting with dichloromethane, gave 231 mg (95%) of **7** as an off-white solid; mp 100°C; TLC (CH_2Cl_2) R_f 0.9; IR (KBr, cm^{-1}) 2929s, 2852s, 1703s, 1461m, 1381m, 1359m, 1250m, 1183w, 1091s, 843s, 773m; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.00 (s, 6H), 0.47 (s, 3H), 0.60-2.22 (m, 32H), 2.72 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.39 (m, 1H) 3.49 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 5.17 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 7.73-8.12 (m, 9H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 210.4, 141.4, 135.7, 131.4, 130.9, 130.0, 128.5, 127.6, 127.5, 127.3, 126.8, 125.9, 125.1, 125.0, 124.9, 124.8, 123.1, 120.9, 72.6, 63.0, 56.7, 49.9, 46.0, 44.2, 42.8, 38.8, 37.3, 36.5, 32.1, 31.8, 31.7, 27.4, 26.2, 26.0, 25.8, 24.5, 23.0, 21.0, 19.4, 18.3, 13.4, -4.5 (only 42 of the 44 expected resonances were observed); MS (CI, CH_4) m/z 645 (100, $[M + H]^+$); optical rotation $[\eta]^{20}_D$ -4.3 (c 0.84, $CHCl_3$).

3β-tert-butyldimethylsilyloxy-pregn-5-ene-21-(1-methylpyrenyl)-20-methylidene (8). NaH (48 mg, 2 mmol) was added to 3 mL of dry DMSO and the suspension was stirred and warmed to 65°C until all the sodium hydride dissolved. The solution was cooled at RT and methyl triphenylphosphonium bromide (715 mg, 2 mmol) was added in aliquots over a period of 5 min. The reaction was slightly exothermic and the solution was stirred for an additional 45 min. This solution was mixed with a solution of **7** (645 mg, 1 mmol) in 5 mL of THF and the resulting solution was stirred and warmed at 70°C for 12h. After cooling the mixture, we added 50 mL water and the organic products were extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were washed with saline solution, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated on a rotatory evaporator. Purification by flash chromatography on silica G60 (0.040-0.063 mm), eluting with pentane in CH_2Cl_2 (75/25), gave 514 mg (80%) of **8** as an off-white solid; mp 63°C; TLC (pentane/CH_2Cl_2 75:25) R_f 0.85; IR (KBr, cm^{-1}) 2928s, 2851s, 1636w, 1460m, 1434m, 1380w, 1249m, 1088s, 888m, 842s, 773m; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.00 (s, 6H), 0.54 (s, 3H), 0.83 (s, 9H), 0.91 (s, 3H), 0.75-2.30 (m, 32H), 2.47 (m, 2H), 3.40 (m, 3H), 4.85 (s, 1H), 5.01 (s, 1H), 5.24 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.77-8.20 (m, 9H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 149.1, 141.6, 136.8, 133.9, 133.6, 131.5, 131.0, 129.8, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 127.6, 127.3, 127.2, 126.6, 125.6, 125.1, 124.9, 124.7, 123.4, 121.1, 110.1, 72.7, 56.7, 56.3, 50.3, 43.3, 42.9, 39.9, 38.8, 37.4, 36.7, 32.9, 32.3, 32.1, 31.9, 26.0, 24.3, 21.2, 19.5, 18.3, 12.9, -4.5 (only 44 of the 45 expected resonances were observed); MS (CI, NH_3) m/z 660 (10, $[M + NH_4]^+$), 511 (100); optical rotation $[\eta]^{20}_D$ -35.0 (c 0.76, $CHCl_3$).

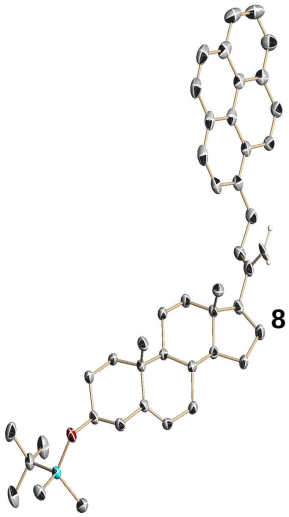
3β-hydroxy-pregn-5-ene-21-(1-methylpyrenyl)-20-methylidene (9). We added TBAF (2.5 mL of a 1M solution in THF) to a solution of **8** (300 mg, 466 µmol) in THF (5 mL), and the solution was stirred and warmed at 65°C for 12h. After cooling, 100 mL of water was added

and the organic products were extracted with dichloromethane (3 x 50 mL). The combined organic extracts were washed with saline solution, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated on a rotatory evaporator. Purification by flash chromatography on silica G60 (0.040-0.063 mm), eluting with CH_2Cl_2 in AcOEt (98/2), gave 209 mg (85%) of **9** as an off-white solid; mp 84°C; TLC (CH_2Cl_2/AcOEt 98:2) R_f 0.4; IR (KBr, cm^{-1}) 3364m, 2929s, 1636w, 1458w, 1434w, 1375w, 1182w, 1056m, 888m, 843s, 712w; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.52 (s, 3H), 0.65-2.25 (m, 32H), 2.3-2.6 (m, H), 3.27-3.44 (m, H), 4.83 (s, 1H), 4.99 (s, 1H), 5.24 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 7.75-8.18 (m, 9H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 149.1, 140.8, 136.8, 131.5, 130.9, 129.8, 128.6, 127.5, 127.3, 127.2, 126.6, 125.8, 125.1, 124.9, 124.7, 123.4, 121.6, 110.1, 71.8, 56.6, 56.3, 50.2, 43.2, 42.3, 39.9, 38.8, 37.3, 36.6, 32.9, 32.3, 31.8, 31.7, 29.7, 26.0, 24.3, 21.1, 19.4, 12.9 (only 38 of the 39 expected resonances were observed); MS (CI, NH_3) m/z 546 (38, $[M + NH_4]^+$), 529 (89, $[M + H]^+$), 217 (100); optical rotation $[\eta]^{20}_D$ -46.8 (c 1.23, $CHCl_3$).

X-ray Crystallography.

Structural data presented was collected at low temperature using an oil-coated shock-cooled crystal on a Bruker-AXS CCD 1000 diffractometer with MoKα radiation (λ = 0.71073 Å). The structure was solved by direct methods (Sheldrick 1990) and all non-hydrogen atoms were refined anisotropically using the least-squares method (Sheldrick 1997) on F^2.

Figure S1: Molecular structures of **8** with thermal ellipsoids at the 50% probability level.



Crystal data. $C_{45}H_{58}OSi$, M = 643.00, monoclinic, $P2_1$, a = 13.273(1) Å, b = 7.966(1) Å, c = 17.590(1) Å, β = 101.502(1)°, V = 1822.5(3) $Å^3$, Z = 2, T = 133(2) K. 10706 reflections (5635 independent, R_{int} = 0.0265) were collected. Largest electron density residue: 0.309 e $Å^{-3}$, R_1 (for I>2(I)) = 0.0412 and wR_2 = 0.1028 (all data).

1. Sheldrick, G. M. 1990. Phase annealing in SHELX-90 : direct methods for larger structures. Acta crystallographica, Section A, Foundations of crystallography 46:467-473.

2. Sheldrick, G. M. 1997. Program for Crystal Structure Refinement.

AUTEUR : Laurent LE GUYADER

TITRE : Utilisation de sondes pyréniques *in vivo* pour caractériser l'état de phase global de la membrane plasmique de cellules eucaryotes. Application à la détection de la liaison d'agonistes au récepteur delta opioïde murin.

DIRECTEURS DE THÈSE : André LOPEZ et Christophe LE ROUX

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 9 Novembre 2007, Université Toulouse III

RÉSUMÉ : Le développement d'outils de criblage de nouvelles molécules capables d'induire une réponse cellulaire identique à celle d'un ligand (agoniste, antagoniste…) est un enjeu important pour la recherche pharmaceutique. Les principales cibles utilisées aujourd'hui sont les récepteurs trans-membranaires couplés aux protéines G (RCPG) dont l'activation déclenche une cascade de réactions intracellulaires (signalisation).

L'objectif de ce travail de thèse est la détection de l'initiation de la signalisation cellulaire par spectrométrie de fluorescence pour le récepteur δ opioïde murin (mDOR) qui induit un changement conformationnel responsable d'un épaississement de sa partie transmembranaire lors de la signalisation, au niveau de la membrane plasmique de cellules eucaryotes *in vivo*. Ce changement est supposé générer des modifications de phase lipidique de la membrane plasmique lors de cette interaction RCPG/agoniste, avec des redistributions locales de certains lipides comme le cholestérol, conduisant à la génération d'une phase liquide-ordonnée (lo).

Pour cela deux nouvelles sondes fluorescentes membranaires de la famille des Pyrène-cholestérol ont été synthétisées, le 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-méthylpyrényl)-20-one **1** et le 3β-hydroxy-pregn-5-ène-21-(1-méthylpyrényl)-20-méthylidène **2**.

Dans un premier temps la comparaison du comportement de ces sondes vis-à-vis du cholestérol a été analysée dans différentes membranes modèles phospholipidiques. Les données de microcalorimétrie et de RMN-^{2}H indiquent que ces composés induisent des perturbations des lipides comparables à celle du cholestérol. Les données d'absorption, combinées à la propriété hypochromique du chromophore pyrène ont permis de mettre en évidence un comportement auto-associatif du cholestérol dépendant du degré de saturation des chaînes acyles. De plus ces sondes sont plus idéalement miscibles dans les phases lo. Dans un deuxième temps la sensibilité du spectre d'émission de fluorescence à la polarité de l'environnement a été vérifiée et mise à profit dans des membranes modèles pour discriminer les membranes en phase ld de celles en phase lo (où la polarité du cœur de la membrane est plus faible). Enfin, l'incorporation de la sonde **2** dans la membrane plasmique de cellules vivantes CHO qui sur-expriment mDOR, a permit le suivi dans le temps, par spectrofluorimétrie de la perturbation de phase induite par un agoniste.

MOTS-CLÉS : organisation latérale membranaire, pyrène, spectroscopie de fluorescence et d'absorption, cholestérol, membranes plasmique et modèles, lipides, RCPG, cellules, phase liquide-ordonnée.

DISCIPLINE : Chimie-Biologie-Santé

LABORATOIRE : IPBS, 205 rte de Narbonne 31077 Toulouse Cedex 4 – LHFA, 118 rte de Narbonne 31062 Toulouse Cedex 9