

## Résumé

Le but de ce travail était de développer une méthodologie de quantification de la microviscosité membranaire en se basant sur la technique de résonance paramagnétique électronique (RPE) associée au marquage de spin. La méthode a consisté à étalonner les spectres RPE d'acides doxylstéariques présentant un groupement nitroxyle à différentes positions de leur chaîne hydrocarbonée dans des mélanges de glycérol/éthanol de viscosité connue. Des courbes étalons, reliant la viscosité au temps de corrélation ( $\tau_c$ ) et au paramètre d'ordre (S), ont ainsi été établies. Elles ont, ensuite, été utilisées pour l'étude de plusieurs systèmes membranaires (micelle, liposome, cellule). En premier lieu, la valeur de la viscosité locale au sein des micelles de détergents synthétiques (SDS, DTAB et CTAB) a été mesurée. L'évolution de cette microviscosité en fonction de la concentration en détergent a permis de donner une approche du phénomène d'agrégation de ces micelles. De la même manière, les micelles de deux sels biliaires, le taurocholate et le taurodeoxycholate de sodium, ont été étudiées. Ces dernières présentent un corps micellaire beaucoup plus visqueux que leur région interfaciale hydrophile. En second lieu, la microviscosité à différentes profondeurs dans la bicouche lipidique des liposomes de DMPC a pu être quantifiée. Elle diminue en allant de la surface hydrophile vers le centre hydrophobe de la bicouche. Les effets de la température, du cholestérol et du propofol (PPF), agent hypnotique utilisé en anesthésie générale, sur la fluidité de la bicouche ont aussi été étudiés. L'incorporation du cholestérol dans la bicouche lipidique la stabilise et atténue, voire fait disparaître, la transition de phase. En revanche, le propofol fluidifie la bicouche lipidique. La technique de mesure de la microviscosité par RPE ne permet de mettre en évidence la fluidification qu'aux fortes concentrations en PPF ( $\geq 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>). La spectroscopie d'absorption de la mérocyanine 540 (MC540) a permis de montrer qualitativement que l'effet existe également aux plus faibles concentrations en PPF ( $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>) qui correspondent aux concentrations atteintes en clinique. L'effet du PPF dans une de ces formulations commerciales "Diprivan<sup>®</sup>" sur la fluidité du DMPC n'a pas pu être étudié en raison de la présence de vésicules d'intralipide dans sa composition. Ces vésicules perturbent à la fois les mesures RPE et celles d'absorption. Enfin, la microviscosité des membranes d'érythrocytes et de cellules neuronales (Neuro-2a) a pu être quantifiée. A la température physiologique (37°C), la valeur de la microviscosité au centre de la membrane avoisine les 100 cP. Le PPF fluidifie les membranes cellulaires surtout au niveau de la surface de la bicouche lipidique. Cet effet est observable à partir d'une concentration en PPF de  $10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup> dans les membranes des érythrocytes, et dès une concentration de  $10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> dans les membranes des cellules Neuro-2a.

## Abstract

Electron spin resonance (ESR) spectroscopy with nitroxide spin probes was used as a method to quantify the local viscosity within several membrane systems. Standard curves of microviscosity were established by calibrating the ESR spectra of three doxyl stearic acids probes in glycerol-ethanol mixtures of known viscosities. These curves of microviscosity versus correlation time ( $\tau_c$ ) or order parameter (S) were used to investigate micelles, liposomes and cells. Firstly, micelle microviscosity of three synthetic surfactants (SDS, DTAB, CTAB) was measured. The variation of the microviscosity as a function of surfactant concentration ( $0 - 5 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ ) was used to study the micellization phenomenon of these surfactants in aqueous media. In the same way, the aggregation process of two bile salts (NaTC, NaTDC) was studied by monitoring their micelle microviscosities in a large bile salt concentration range ( $0 - 5 \times 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$ ). The bile salt micelle core showed to be much more compact and more viscous than the interfacial hydrophilic region. Secondly, the microviscosity at different depths inside the DMPC liposome bilayer was determined. This microviscosity decreased with the increase of the explored bilayer depth. Effects of temperature as well as of the incorporation of cholesterol and/or propofol (PPF), a general anaesthetic agent extensively used in clinical practice, on lipid bilayer fluidity were also studied. The incorporation of cholesterol increased the stability of bilayer membrane and eliminated the phase transition. PPF fluidized the bilayer membrane. The effect could be demonstrated and quantified by ESR method at high PPF concentrations ( $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ). However, absorption spectroscopy of merocyanine 540 (MC540) confirmed qualitatively the PPF fluidizing capacity in liposome membrane even at low PPF concentrations ( $10^{-7} - 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ). The effect of the commercial form of PPF "Diprivan<sup>®</sup>" on membrane fluidity could not be studied because of the ESR and absorption measurements disturbances caused by the intralipids contained in its composition. Finally, microviscosities of erythrocytes and neuronal cells (Neuro-2a) membranes were quantified. At physiological temperature ( $37^\circ\text{C}$ ), the microviscosity at the inner layer of cell membranes was evaluated to 100 cP. PPF fluidized erythrocyte as well as Neuro-2a membranes especially in the outer layer of cell membranes. This effect was observed at PPF concentrations higher than  $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  in erythrocyte membranes and above a concentration of  $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  in neuronal cell membranes.

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : La résonance paramagnétique électronique (RPE) et le marquage de spin .....</b>	<b>7</b>
1. Introduction .....	7
2. Principe .....	7
3. Relaxation de spin et équilibre thermique .....	9
4. Principales caractéristiques d'un spectre RPE .....	11
4.1. <i>Facteur g</i> .....	11
4.2. <i>Structure hyperfine</i> .....	13
4.3. <i>Largeur de raie</i> .....	14
5. Technique de marquage de spin .....	15
5.1. <i>Principe</i> .....	15
5.2. <i>Mouvements du marqueur</i> .....	16
<b>Chapitre 2 : Courbes étalons de microviscosité .....</b>	<b>21</b>
1. Introduction .....	21
2. Protocoles expérimentaux .....	22
3. Résultats .....	23
3.1. <i>Viscosité et densité d'un mélange de glycérol-éthanol</i> .....	23
3.2. <i>Courbes étalons de microviscosité</i> .....	24
3.3. <i>Temps de corrélation, Paramètre d'ordre et leurs domaines d'application</i> .....	25
4. Discussion .....	29
<b>Chapitre 3 : Étude de la microviscosité dans les micelles de SDS, DTAB et CTAB .....</b>	<b>31</b>
1. Introduction .....	31
2. Protocoles expérimentaux .....	33
3. Résultats .....	34
3.1. <i>Tension de surface et CMC</i> .....	34
3.2. <i>Etude par RPE</i> .....	35
3.2.1. <i>Le SDS en solution aqueuse</i> .....	35
3.2.2. <i>Le DTAB et le CTAB en solution aqueuse</i> .....	39
3.2.3. <i>Déformation des spectres RPE dans les solutions aqueuses de détergent</i> .....	40
3.3. <i>Nombre de marqueurs de spin dans une micelle</i> .....	42
3.4. <i>Viscosité des micelles</i> .....	44
4. Discussion .....	45
4.1. <i>Tension de surface</i> .....	45
4.2. <i>Etude par RPE des solutions aqueuses de SDS</i> .....	45
4.3. <i>Etude par RPE des solutions aqueuses de DTAB et CTAB</i> .....	47
4.4. <i>Déformation du spectre RPE dans la région de transition (II)</i> .....	49
4.5. <i>Viscosité des micelles</i> .....	50
5. Conclusion .....	51

<b>Chapitre 4 : Les sels biliaires</b> .....	52
1. Introduction .....	52
2. Protocoles expérimentaux .....	56
3. Résultats .....	57
3.1. <i>Le taurocholate de sodium (NaTC)</i> .....	57
3.2. <i>Le taurodeoxycholate de sodium (NaTDC)</i> .....	59
4. Discussion .....	61
5. Conclusion .....	64
<b>Chapitre 5 : La membrane lipidique : effet du cholestérol et du propofol</b> .....	65
1. Introduction .....	65
2. Protocoles expérimentaux .....	68
3. Résultats .....	69
3.1. <i>Effet du cholestérol</i> .....	70
3.2. <i>Effet du propofol (PPF)</i> .....	72
3.3. <i>Expérience complémentaire de spectroscopie d'absorption</i> .....	74
3.4. <i>Distribution des marqueurs de spin dans les liposomes</i> .....	77
3.5. <i>Effet du Diprivan®</i> .....	77
4. Discussion .....	80
4.1. <i>Effet de la température</i> .....	81
4.2. <i>Effet du cholestérol</i> .....	82
4.3. <i>Effet du PPF</i> .....	83
4.4. <i>Effet du Diprivan®</i> .....	85
5. Conclusion .....	86
<b>Chapitre 6 : Les membranes plasmiques et l'effet du propofol</b> .....	87
1. Introduction .....	87
2. Protocoles expérimentaux .....	91
2.1. <i>Érythrocytes</i> .....	91
2.2. <i>Neuro-2a</i> .....	91
3. Résultats .....	93
3.1. <i>Effet du PPF sur la fluidité membranaire des érythrocytes</i> .....	93
3.2. <i>Effet du PPF sur la fluidité membranaire des cellules neuronales (Neuro-2a)</i> .....	94
4. Discussion .....	97
4.1. <i>Les érythrocytes</i> .....	97
4.2. <i>Les Neuro-2a</i> .....	98
4.3. <i>Les faibles concentrations en PPF</i> .....	99
5. Conclusion .....	100
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</b> .....	101
<b>Annexe A : Appareillages, produits chimiques et conditions expérimentales</b> ..	105
A.1 Appareillages .....	105
A.1.1. <i>Viscosité de mélanges glycérol-éthanol</i> .....	105
A.1.2. <i>La résonance paramagnétique électronique (RPE)</i> .....	106
A.1.3. <i>Mesure de la tension superficielle</i> .....	110

A.1.4. Spectrophotométrie d'absorption .....	111
A.2 Produits chimiques .....	113
A.3 Conditions expérimentales .....	114
A.3.1. Les solutions utilisées .....	114
A.3.2. La méthode de fabrication des liposomes.....	114
A.3.2.1. Préparation des vésicules multilamellaires (MLV) .....	114
A.3.2.2. Préparation des vésicules unilamellaires de grande taille (LUV) .....	115
A.3.2.3. Incorporation de substances chimiques dans la bicouche lipidique.....	115
A.3.3. Culture cellulaire (neuro-2a).....	115
A.3.3.1. Détermination de la toxicité des propofol et/ou des marqueurs (n-DSA) de spin au niveau des cellules .....	116
A.3.4. Préparation des érythrocytes .....	116
<b>Annexe B : Les lipides et les modèles de membrane .....</b>	<b>117</b>
B.1. Introduction .....	117
B.2. Les lipides .....	117
B.2.1. Le cholestérol.....	118
B.2.2. Les phospholipides.....	119
B.2.2.1. Les diacylphosphoglycérides .....	119
B.2.2.2. Les sphingolipides.....	120
B.3. Organisation et propriétés des lipides en phase aqueuse .....	120
B.3.1. Organisation .....	120
B.3.2. Propriétés .....	122
B.3.2.1. La transition de phase.....	122
B.3.2.2. Les mouvements des phospholipides .....	123
<b>Annexe C : Le propofol .....</b>	<b>125</b>
C.1. Introduction .....	125
C.2. Le propofol .....	125
C.2.1. Propriétés physico-chimiques .....	126
C.2.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	127
C.2.3. Propriétés pharmacodynamiques .....	127
<b>Liste des références .....</b>	<b>129</b>