

Comment la **bio-cristallographie** permet de proposer un **mécanisme d'action des gaz anesthésiques**

Nathalie Colloc'h⁽¹⁾ (colloch@cyceron.fr), Jacques H. Abraini⁽¹⁾ et Thierry Prangé⁽²⁾

(1) CI-NAPS, UMR 6232 – Université de Caen – CNRS, Centre Cyceron, 14074 Caen Cedex 5

(2) LCRB, UMR 8015 – Université Paris Descartes – CNRS, Faculté de Pharmacie, 75270 Paris Cedex 06

Les gaz inertes sont utilisés pour leurs propriétés anesthésiques. Récemment, la découverte de leurs propriétés neuroprotectrices a relancé les recherches sur les mécanismes moléculaires mis en jeu, encore mal connus.

Nous avons déterminé, sous pression de xénon ou de protoxyde d'azote, la structure de l'urate oxydase et de l'annexine V, deux protéines modèles de celles impliquées dans l'anesthésie.

Cette étude a montré que ces deux gaz occupaient le même site de liaison principal.

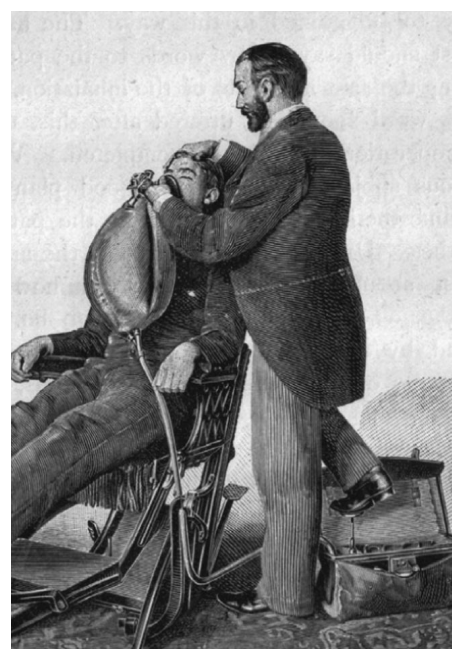
Les relations observées entre l'expansion du volume des cavités de liaison des gaz et leurs pouvoirs anesthésiants ont permis de proposer un mécanisme d'action en deux étapes.

Les termes suivis d'un astérisque (*) sont définis dans le glossaire, p. 13.

Mécanismes d'action des gaz anesthésiques

Les gaz inertes ou, plus exactement, métaboliquement inertes que sont le protoxyde d'azote (N_2O) et le xénon, sont utilisés depuis plusieurs années dans la pratique médicale pour leurs propriétés narcotiques, anesthésiques et analgésiques. Les propriétés analgésiques et sédatives du protoxyde d'azote sont connues depuis le début du XIX^e siècle [1]. Le xénon a commencé à être employé comme anesthésique en 1951 ; actuellement, son utilisation se développe (voir encadré, p.11). En plus de leur pouvoir anesthésiant similaire, le xénon et le protoxyde d'azote ont une action protectrice analogue sur la mort neuronale ischémique : ils limitent les effets délétères dus à un accident vasculaire cérébral [2].

Ce n'est que très récemment que les mécanismes à l'origine des effets sédatifs de ces deux gaz ont été partiellement identifiés. Après avoir longtemps pensé qu'ils produisaient leurs effets en dénaturant les lipides des membranes cellulaires, on sait maintenant qu'ils peuvent perturber *directement* les fonctions protéiques des récepteurs à canal neuronal* inclus dans ces lipides [3]. Mais, au contraire de la plupart des anesthésiques volatils tel que le fluothane (halothane), qui agissent en augmentant l'activité du principal récepteur de la neurotransmission *inhibitrice* du système nerveux central, le GABA_A*, le protoxyde d'azote et le xénon produisent surtout leurs effets en réduisant l'activité du principal récepteur de la neurotransmission *excitatrice*, le NMDA*, une protéine membranaire (voir la figure, p. 13) [4,5].



Anesthésiste administrant le mélange de protoxyde d'azote-oxygène. On remarquera que l'opérateur actionne la sortie des gaz avec son pied. (D'après F.W. Hewitt, *The administration of nitrous oxide and oxygen for dental operations*, C. Ash & sons, Londres, 1897, p. 44).

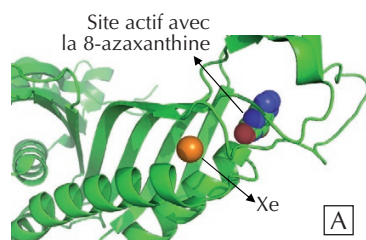
Courtoisie : Marguerite Zimmer

Les gaz inertes se fixent également sur un grand nombre de protéines globulaires, principalement dans des cavités internes hydrophobes [6].

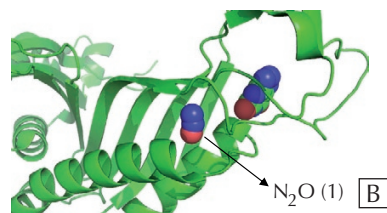
Dans cette étude, nous avons cherché à préciser les sites et les mécanismes de liaison du protoxyde d'azote et du xénon sur leurs cibles biologiques.

Le xénon et le protoxyde d'azote ont-ils les mêmes sites de liaison ?

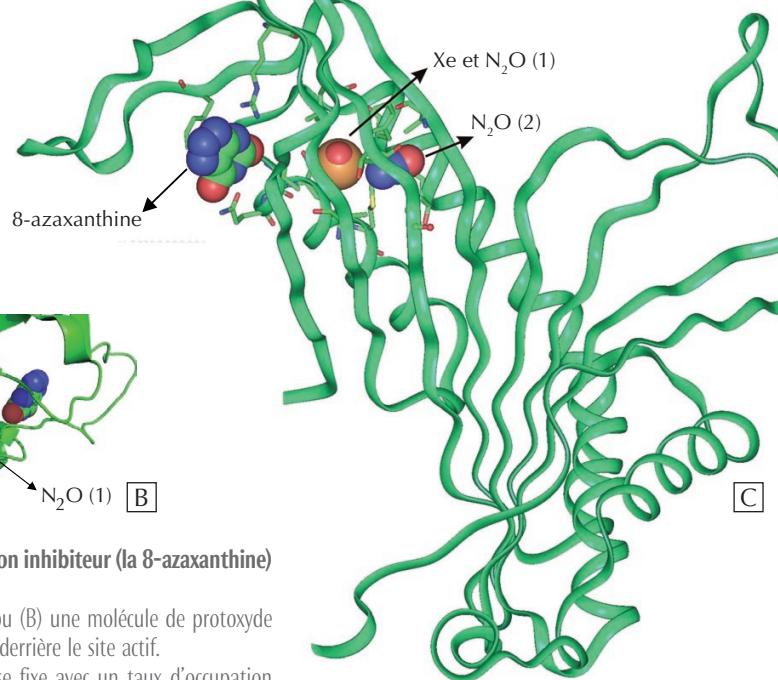
Le xénon (Xe) est un gaz noble qui possède 54 électrons, et dont la masse molaire est de 131 g/mol ; son rayon de van der Waals est de 2,24 Å. Le protoxyde



A



B



C

Vue de la chaîne protéique de l'urate oxydase, représentée en ruban, avec son inhibiteur (la 8-azaxanthine) dans le site actif de l'enzyme, et les atomes de gaz insérés.

A, B : gros plan sur la région de liaison des gaz ; (A) un atome de xénon Xe ou (B) une molécule de protoxyde d'azote N_2O (1) se fixe au même endroit dans la cavité hydrophobe située juste derrière le site actif.

C : vue d'ensemble de la chaîne protéique ; une deuxième molécule N_2O (2) se fixe avec un taux d'occupation partiel dans la même cavité. La 8-azaxanthine, le xénon et les protoxydes d'azote sont représentés en modèle atomique, avec les carbones en vert, les azotes en bleu, les oxygènes en rouge et le xénon en orange.

d'azote (ou gaz hilarant) est un gaz de formule $N \equiv N^+ = O$, synthétisé par Priestley en 1772, dont la masse molaire est de 44 g/mol ; les dimensions approximatives de la molécule N_2O sont de 7 Å de long sur 4 Å de diamètre.

Nous nous sommes posés la question de savoir si, malgré leurs caractéristiques physico-chimiques différentes, ces deux gaz avaient les mêmes sites de liaison dans leurs protéines cibles. Ces sites ont été très étudiés dans le cas du xénon⁽¹⁾ [6], car cet élément a été utilisé comme atome lourd pour la détermination des structures de protéines par diffraction de rayons X ; il se fixe généralement dans une cavité hydrophobe enfouie dans la structure native (celle sans gaz). Par contre, aucune structure de complexe entre une protéine et le protoxyde d'azote n'avait été résolue avant notre étude.

La structure du canal du récepteur NMDA, où le xénon et le protoxyde d'azote pourraient se lier, n'est pas connue, et il est très difficile techniquement d'envisager la détermination de la structure cristallographique d'une protéine membranaire* sous pression de gaz inerte.

Nous avons donc choisi de déterminer les sites de liaison des gaz dans deux protéines modèles de celles impliquées dans l'anesthésie. Le premier modèle utilisé est l'urate oxydase, une protéine globulaire* intracellulaire qui possède une grande cavité hydrophobe dans laquelle le xénon peut se lier. Le deuxième modèle est l'annexine V, une protéine qui peut être considérée comme un prototype du récepteur NMDA, avec lequel elle partage de nombreuses propriétés : sa liaison aux membranes lipidiques dépend du taux de calcium, et elle possède un pore hydrophile par lequel le calcium pourrait passer.

Déterminations structurales

Enregistrement de données de diffraction des rayons X sous pression de gaz

Pour déterminer, par diffraction des rayons X, la structure d'une protéine sous pression d'un gaz, nous utilisons une cellule de pressurisation spécialement conçue pour le xénon [7]. Le cristal de protéine est inséré dans un capillaire en quartz, qui est scellé sur la cellule de pressurisation. Celle-ci est reliée à la bouteille de gaz par l'intermédiaire d'un manomètre et d'un système de purge, et est montée sur une tête goniométrique standard. On utilise une pression de gaz de 20 bars pour saturer les sites de liaison potentiels des gaz. Cette pression est maintenue constante tout au long de l'enregistrement des données cristallographiques, qui a été effectué à température ambiante à l'ESRF de Grenoble.

Détermination de la structure de l'urate oxydase en complexe avec le xénon ou le protoxyde d'azote

Le site de liaison du xénon dans l'urate oxydase était déjà connu comme une grande cavité hydrophobe vide, située juste derrière le site actif occupé par un inhibiteur, la 8-azaxanthine (fig. 1A). L'étude structurale de l'urate oxydase sous pression de protoxyde d'azote (N_2O) a montré qu'une molécule de N_2O se fixe dans cette cavité hydrophobe, au même endroit que l'atome de xénon (fig. 1B).

»»»

(1) Les interactions entre le xénon, gaz inerte, et son environnement dans la protéine mettent en jeu la polarisabilité électronique et les forces de répulsion ; le xénon présente en effet une polarisabilité électronique particulièrement élevée.

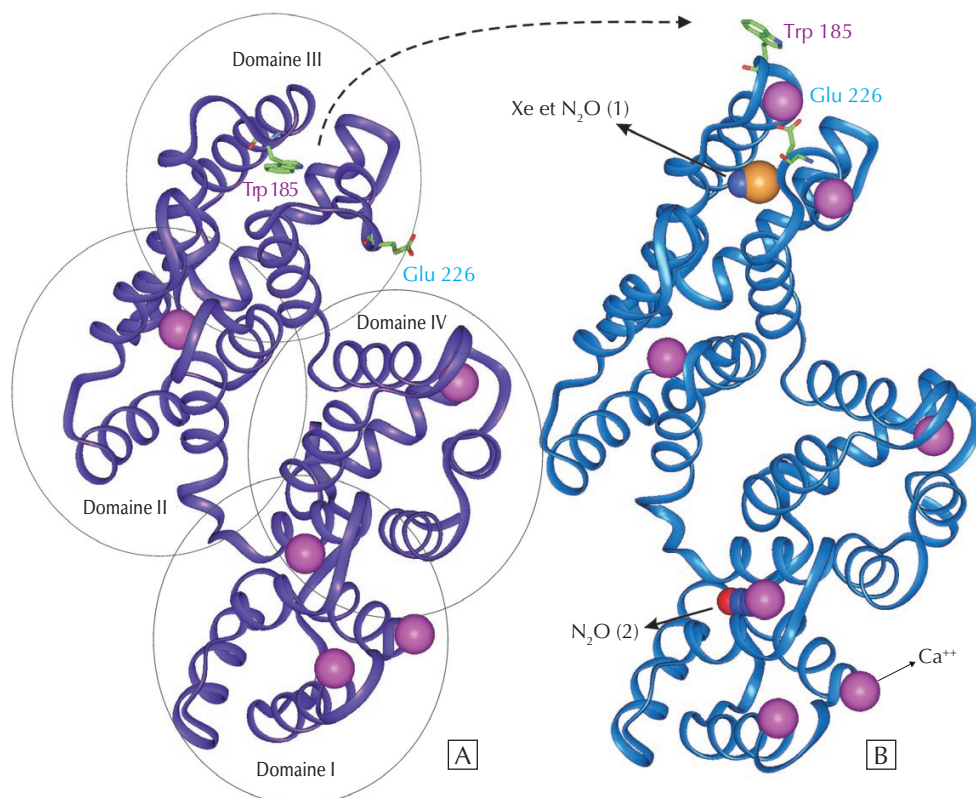
L'anesthésie au xénon

Les propriétés anesthésiques du xénon ont été décrites pour la première fois en 1938, à la suite de plongées en eau profonde.

Le xénon est un gaz rare qui, contrairement aux autres anesthésiants, n'est pas métabolisé par l'organisme et est rapidement éliminé par voie pulmonaire. Il permet, quelle que soit la durée d'administration, un endormissement et un réveil beaucoup plus rapides qu'avec les agents d'anesthésie classiques. Il n'est pas utilisé pour induire une anesthésie mais, administré avec de l'oxygène, pour l'entretenir (l'induction étant réalisée avec un anesthésique intraveineux). Il est particulièrement intéressant pour les interventions longues et pour les patients présentant une fragilité cardiovasculaire. Par contre, son coût élevé empêche son utilisation en routine, qui nécessite le développement de systèmes en circuit fermé.

Depuis le 1^{er} octobre 2007, le xénon a obtenu une autorisation de mise sur le marché français pour les anesthésies. Il est commercialisé par Air Liquide. À l'heure actuelle, en France, quatre centres disposent de la méthodologie permettant de l'utiliser : à Nîmes, Bordeaux, Lille et Clermont-Ferrand.

2. Vue en ruban de la chaîne protéique de l'annexine V, avec ses quatre domaines de structures similaires. À gauche (A), l'annexine V est dans sa conformation à basse concentration de calcium. À droite (B), elle est dans sa conformation à haute concentration de calcium : le glutamate 226 a basculé pour former le site de liaison du calcium, et le tryptophane 185 est accessible au solvant ; l'atome de xénon ou une molécule de protoxyde d'azote se fixe au même endroit dans la cavité hydrophobe au centre du domaine III, laissée vacante par le mouvement du tryptophane 185. Une deuxième molécule de protoxyde d'azote se fixe au centre du domaine I. Le xénon, les protoxydes d'azote et les ions calcium sont représentés en modèle atomique, avec les azotes en bleu, les oxygènes en rouge, le xénon en orange, et les ions calcium en rose.



>>>

Détermination de la structure de l'annexine V en complexe avec le xénon ou le protoxyde d'azote

Aucune structure de complexe entre l'annexine V et un gaz n'avait été résolue auparavant : on ne savait donc pas si cette protéine possédait un site capable de lier un gaz. L'annexine V est composée de quatre domaines* structuralement similaires, chaque domaine possédant un site de liaison principal du calcium (fig. 2A). Son étude cristallographique sous pression de xénon ou de protoxyde d'azote a montré que ces gaz se fixent au même endroit, dans une cavité hydrophobe enfouie au sein du domaine III (fig. 2B). De plus, une seconde molécule de N_2O , moins présente que la première, se loge dans une cavité hydrophobe plus petite, localisée au sein du domaine I.

Conclusion des études structurales

Ces études par bio-cristallographie sous pression de gaz montrent que le site principal de liaison du xénon et du protoxyde d'azote est identique dans chacune des deux protéines modèles, suggérant que ces deux gaz ont des propriétés d'hydrophobie similaires.

Par analogie, nous faisons l'hypothèse qu'il en est de même dans les protéines qui sont physiologiquement impliquées dans l'anes-

thésie. Ceci explique vraisemblablement la similitude des propriétés neuroprotectrices et anesthésiques de ces deux gaz.

Implication de la liaison des gaz sur la fonction des protéines

Urate oxydase

Nous avons utilisé l'urate oxydase comme prototype de protéine globulaire pouvant fixer un atome de gaz inerte dans une cavité, et dont le fonctionnement enzymatique pourrait être inhibé par cette présence. Cette inhibition a depuis été vérifiée expérimentalement. L'urate oxydase, elle-même, est absente chez l'homme. Mais d'autres protéines globulaires intracellulaires possédant des cavités internes analogues, pourraient être impliquées dans les mécanismes de la neuroprotection et de l'anesthésie.

Annexine V

L'élévation de la concentration de calcium induit un important changement de conformation de l'annexine V (fig. 2). À basse concentration de calcium, le centre du domaine III est occupé par un résidu tryptophane* (Trp 185). À concentration de calcium plus élevée, un résidu glutamate* (Glu 226) bascule pour former le site de

liaison du calcium, ce basculement entraînant un mouvement de la boucle portant le résidu tryptophane ; celui-ci se retrouve complètement accessible au solvant et prêt à se lier à la membrane lipidique. Au centre du domaine III, à la place du résidu tryptophane, se trouve maintenant une cavité hydrophobe. C'est dans cette cavité que le xénon ou le protoxyde d'azote se fixe (fig. 2B). Nous suggérons donc que la présence d'un gaz dans la cavité empêcherait, ou du moins perturberait, cet important changement de conformation indispensable au processus d'attachement et détachement de l'annexine V aux membranes, entraînant des modifications du fonctionnement cellulaire. Cette hypothèse peut être étendue aux récepteurs neuronaux NMDA : la présence d'un gaz dans une cavité proche du canal neuronal* par lequel passe l'ion calcium pourrait entraîner des perturbations importantes de ces récepteurs.

Implication pour les mécanismes de l'anesthésie

Les deux étapes de l'anesthésie

Suivant la concentration de gaz anesthésique employée, les effets obtenus ne sont pas les mêmes. Ainsi, une faible concentration

de gaz entraîne des phénomènes d'hypnose et des troubles psychiques correspondant aux premières étapes de l'anesthésie. L'anesthésie dite chirurgicale, à savoir l'endormissement et l'absence de réponse à des stimuli de douleur, requiert des concentrations de gaz plus importantes. Pour comparer les gaz anesthésiques entre eux, leur pouvoir anesthésiant est évalué par leur *mac* : "minimum alveolar anesthetic concentration", la concentration minimale de gaz nécessaire pour atteindre un état donné. La *mac-awake* correspond à la concentration entraînant des phénomènes d'hypnose ou des troubles psychiques ; la *mac-immobility* correspond à celle nécessaire pour atteindre l'anesthésie chirurgicale.

Le rapport entre les *mac-awake* du protoxyde d'azote et du xénon est de 1,3 : ce dernier est donc 1,3 fois plus puissant que le N_2O pour induire une hypnose et des troubles psychiques. Par contre, le rapport entre les *mac-immobility* des deux gaz est de l'ordre de 1 : ils sont donc équivalents pour induire une anesthésie chirurgicale.

Relation entre l'expansion de volume induite par les gaz et leur pouvoir anesthésiant

Une théorie ancienne prédisait que le pouvoir anesthésiant des gaz était lié à l'expansion générée par leur présence. Nous avons donc calculé l'expansion du

volume de la cavité de liaison des gaz dans les deux protéines modèles utilisées.

Dans l'urate oxydase, le volume de la cavité hydrophobe augmente en présence de gaz, et s'accroît 1,3 fois plus en présence de xénon qu'en présence de N_2O . Ce rapport d'expansion est similaire au rapport des pouvoirs anesthésiants des gaz évalués par leur *mac-awake* (les premières étapes de l'anesthésie).

Dans l'annexine V, le volume des cavités hydrophobes augmente en présence de Xe ou de N_2O , mais nous n'avons trouvé aucune relation entre le rapport des expansions et celui des pouvoirs anesthésiants. Par contre, si l'on additionne les volumes des cavités accessibles au xénon ou au protoxyde d'azote dans l'urate oxydase et dans l'annexine V, comme un modèle d'occupation simultanée par les gaz de protéines globulaires et de récepteurs neuronaux, l'expansion globale des cavités est similaire en présence des deux gaz. Le rapport des expansions globales induites par Xe et N_2O est donc de l'ordre de 1, voisin du rapport de leurs pouvoirs anesthésiants évalués par leur *mac-immobility* (anesthésie chirurgicale).

Le modèle proposé

Ces deux relations observées entre l'expansion de volume induite par les gaz et leur pouvoir anesthésiant nous ont permis de proposer un modèle d'action des gaz

anesthésiques en deux étapes :

- à faible concentration, ils se lieraient aux protéines globulaires possédant de larges cavités hydrophobes, cibles d'accès facile. La liaison des gaz modifierait la fonction de leurs protéines cibles, entraînant des perturbations cellulaires conduisant aux premières étapes de l'anesthésie, comme l'amnésie ou les troubles psychiques ;
- à plus haute concentration, quand tous les sites dans les protéines globulaires sont saturés, le gaz se lierait dans les cavités plus proches des canaux neuronaux, perturbant leur fonctionnement, ce qui conduirait à l'anesthésie chirurgicale (endormissement, absence de réponse à la douleur) [8]. ■

Références

- 1 • M. Zimmer, *Histoire de l'anesthésie – Méthodes et techniques au XIX^e siècle*, EDP Sciences, Les Ulis (2008)
- 2 • H.N. David et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23** (2003) 1168-1173.
- 3 • N.P. Franks et W.R. Lieb, *Nature* **310** (1984) 559-601.
- 4 • N.P. Franks et al., *Nature* **396** (1998) 324.
- 5 • V. Jevtovic-Todorovic et al., *Nat. Med.* **4** (1998) 460-463.
- 6 • T. Prangé et al., *Proteins* **30** (1998) 61-73.
- 7 • M. Schiltz, T. Prangé, et R. Fourme, *J. Appl. Cryst.* **27** (1994) 950-960.
- 8 • N. Colloc'h et al., *Biophys J.* **92** (2007) 217-224.

Glossaire

Canal neuronal : lorsque le neurotransmetteur, comme par exemple le glutamate ou le GABA (acide gamma-aminobutyrique), se fixe sur son récepteur, ce dernier change de forme et permet ainsi à des ions de traverser son canal central.

Domaine structural : partie d'une protéine qui a une conformation indépendante du reste de la chaîne.

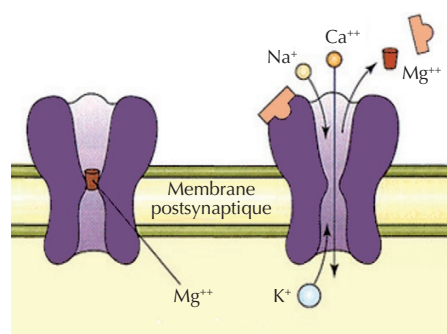
Glutamate, tryptophane : acides aminés naturels, composants des chaînes de protéines.

Protéine globulaire : protéine sans attache à la membrane, elle peut être extracellulaire ou intracellulaire. Les enzymes appartiennent majoritairement à cette catégorie de protéine.

Protéine membranaire : protéine se liant à la membrane, avec un ou plusieurs domaines transmembranaires, ou intégralement membranaire. Les récepteurs canaux sont des protéines membranaires.

Récepteur GABA_A : récepteur canal neuronal de type A du GABA. Le GABA est le principal neurotransmetteur dans le cerveau des vertébrés.

Récepteur NMDA : récepteur canal neuronal du N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA), très présent dans les neurones, et impliqué dans la neurotransmission par le glutamate (voir figure ci-contre).



Fonctionnement du récepteur NMDA.

À gauche : le récepteur NMDA est bloqué par un ion Mg^{++} qui occupe le canal central ; le Ca^{++} ne peut pas entrer. À droite : lorsque des molécules de glutamate (accompagnées d'une dépolarisation électrique) se fixent sur le récepteur, ce dernier se déforme, l'ion Mg^{++} est libéré, ce qui permet aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{++} de traverser le canal. L'entrée de calcium dans le neurone modifie l'intensité de la force de transmission synaptique.