



Effets de biomolécules sur la diffusion de sondes fluorescentes dans des milieux organisés

Abderrahim Naoumi

► To cite this version:

Abderrahim Naoumi. Effets de biomolécules sur la diffusion de sondes fluorescentes dans des milieux organisés. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1990. Français. NNT : 1990INPL102N . tel-01776159

HAL Id: tel-01776159

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776159>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

1360370042

[M] 1990 NAOUMI R.

THESE

Présentée à

L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Pour obtenir le titre de

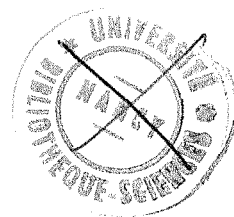
DOCTEUR DE L'INPL

Formation doctorale : Génie des Procédés

par

Abderrahim NAOUMI

Maître es Sciences



**EFFETS DE BIOMOLECULES SUR LA DIFFUSION DE
SONDES FLUORESCENTES DANS DES MILIEUX ORGANISES**

Soutenue le 7 décembre 1990, devant la Commission d'Examen

Alain MARSURA, Nancy
Guy DUPORTAIL, Strasbourg
Jacques MAGDALOU, Nancy
Francis BAROS, Nancy
Marie-Laure VIRIOT, Nancy
Jean-Claude ANDRE, Nancy

Président
Rapporteur
Rapporteur

*à mon père
à ma mère*

à toute ma famille

à mes amis

à Fatiha

Ce travail a été réalisé dans le Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie (DCPR-URA 328 du CNRS-ENSIC-INPL), sous la direction de Jean-Claude ANDRE, DR CNRS, Vice-Président du Conseil Scientifique de l'INPL et sous la bienveillance de Marie-Laure VIRIOT, DR CNRS.

Je tiens d'abord à remercier Monsieur le Professeur A. MARSURA qui a accepté de présider mon jury d'examen et qui a montré un vif intérêt à nos méthodes photophysiques permettant l'étude de l'interaction des protéines avec les liposomes.

J'adresse mes remerciements à Monsieur G. DUPORTAIL qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier vivement Monsieur J. MAGDALOU d'avoir accepté de juger cette étude et de m'avoir particulièrement aidé pour les études biochimiques de ce travail.

Je voudrais aussi, exprimer mon amitié à F. BAROS qui s'est toujours efforcé de me fournir des explications claires et précises sur des sujets difficilement compréhensibles par un biochimiste.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude à Marie-Laure VIRIOT qui n'a pas ménagé ses efforts et ses explications lors de mes recherches et qui m'a également apporté son soutien pour la rédaction de cette thèse. Son expérience et sa compétence m'ont beaucoup aidé.

Je voudrais encore transmettre mes vives remerciements à Jean-Claude ANDRE qui n'a pas hésité à accueillir au GRAPP un biochimiste parmi les chimistes, les physiciens et autres théoriciens émérites et qui m'a ainsi, permis de découvrir l'univers de la lumière et de la photophysique et d'élargir l'éventail de mes connaissances scientifiques. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma sympathie.

Enfin, il m'est agréable d'adresser de sincères remerciements à l'ensemble des membres du DCPR et particulièrement à ceux du GRAPP pour leur sympathie et leur chaleureux accueil.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION	3
1. ETAT DES CONNAISSANCES	8
LA MEMBRANE BIOLOGIQUE :	
PROPRIETES STRUCTURELLES ET DYNAMIQUES.	
LA FLUORESCENCE COMME METHODE	
D'INVESTIGATION	
1.1. LA MEMBRANE BIOLOGIQUE :	10
PROPRIETES STRUCTURELLES ET	
DYNAMIQUES	
1.1.1. STRUCTURE ET ORGANISATION	12
1.1.1.1. LA MEMBRANE BIOLOGIQUE	12
1.1.1.1.1. Composition chimique de la membrane biologique	12
1.1.1.1.2. Structure de la membrane biologique	13
1.1.1.1.3. Fonction de la membrane biologique	17
1.1.1.2. LES PHOSPHOLIPIDES COMME MODELE DE	17
LA MEMBRANE BIOLOGIQUE	
1.1.1.2.1. Auto-assemblage des phospholipides	18
1.1.1.2.2. Description des liposomes	18
1.1.1.2.3. Polymorphisme thermotropique des lipides	20
1.1.2. DYNAMIQUE DES CONSTITUANTS	20
MEMBRANAIRES	
1.1.2.1. LES TECHNIQUES PHYSIQUES D'INVESTIGATION	20
1.1.2.1.1. Les méthodes spectroscopiques	20
1.1.2.1.2. Les méthodes autres que spectroscopiques	22
1.1.2.2. LES MOUVEMENTS DES LIPIDES ET DES PROTEINES	22
1.1.2.2.1. Les mouvements moléculaires des lipides	23
1.1.2.2.2. Les mouvements moléculaires des protéines	24
1.1.3. NOTION D'ORDRE MOLECULAIRE, DE	27
FLUIDITE ET DE MICROVISCOSITE MEMBRANAIRES	
1.1.3.1. NOTION GENERALE DE FLUIDITE ET DE VISCOSITE	27
1.1.3.2. DEFINITION MACROSCOPIQUE DE LA VISCOSITE	28

1.1.3.3. DEFINITION THERMODYNAMIQUE DE LA VISCOSITE	29
1.1.3.4. NOTION DE PARAMETRE D'ORDRE	31
1.1.3.5. RELATIONS ENTRE LA FLUIDITE ET LA COMPOSITION DE LA MEMBRANE	32
1.1.3.5.1. Le cholestérol	32
1.1.3.5.2. Le degré d'insaturation	33
1.1.3.5.3. Les sphingomyélines	33
1.1.3.5.4. Les phosphatidyléthanolamines	33
1.1.3.5.5. Les protéines	33
1.1.4. INTERACTIONS AVEC LES PHOSPHOLIPIDES	33
1.1.4.1. INTERACTIONS AVEC D'AUTRES LIPIDES	33
1.1.4.1.1. Description des déplacements	34
1.1.4.1.2. Types d'interactions	36
1.1.4.2. INTERACTIONS AVEC DES PROTEINES	38
1.1.4.2.1. Classification des protéines membranaires	39
1.1.4.2.2. Interaction protéines-lipides : principaux résultats	40
1.1.4.3. INTERACTIONS AVEC DES DROGUES	48
 1.2. LA FLUORESCENCE COMME METHODE D'INVESTIGATION	 53
 1.2.1. POLARISATION DE FLUORESCENCE	 55
1.2.1.1. PRINCIPE	55
1.2.1.2. APPLICATIONS A LA MESURE DE LA FLUIDITE	57
1.2.1.2.1. Anisotropie moyenne	57
1.2.1.2.2. Formule de PERRIN	57
1.2.1.3. MARQUEURS FLUORESCENTS UTILISES	58
1.2.1.3.1. DPH : 1,6-Diphényl-1,3,5-hexatriène, "all-trans"	58
1.2.1.3.2. TMA-DPH : 1[4-(Triméthylammonium)phényl]-6-phényl- 1,3,5-hexatriène	59
1.2.2. REACTIONS D'INHIBITION DE FLUORESCENCE PAR FORMATION D'EXCIMERES INTERMOLECULAIRES DU PYRENE	66
1.2.2.1. MECANISME	66
1.2.2.2. COEFFICIENT DE DIFFUSION DU PYRENE DANS LES BICOUCHES LIPIDIQUES	67
1.2.3. REACTIONS D'INHIBITION DE FLUORESCENCE PAR FORMATION D'EXCIMERES INTRAMOLECULAIRES DU DIPYRENYLPROPANE	70

2. MATERIELS ET METHODES	75
2.1. MATERIELS	77
2.1.1. PRODUITS	79
2.1.1.1. TRACEURS FLUORESCENTS	79
2.1.1.2. AUTRES PRODUITS	79
2.1.2. SOLVANTS	79
2.2. METHODES	81
2.2.1. PREPARATION DES MILIEUX D'ETUDES :	83
microsomes, liposomes et micelles	
2.2.2. MESURE DE L'ABSORBANCE	83
2.2.3. FLUORESCENCE EN EXCITATION CONTINUE	83
2.2.3.1. MESURES DES INTENSITES DE FLUORESCENCE	83
2.2.3.2. MESURES DE L'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE	84
2.2.4. FLUORESCENCE EN EXCITATION PULSEE	85
3. RESULTATS ET DISCUSSION	87
3.1. INTERACTIONS (<i>IN VIVO</i>) HORMONES	89
THYROIDIENNES ET COMPOSES	
THYROMIMETIQUES APPARENTES -	
MEMBRANES MICROSOMALES	
3.1.1. OBJECTIF DE L'ETUDE	91
3.1.2. ETAT DES CONNAISSANCES	91
3.1.3. MATERIELS ET METHODES	93
3.1.4. RESULTATS ET DISCUSSION	93
3.1.5. CONCLUSION	94
3.6.4. PUBLICATION	95
3.2. INTERACTIONS PROTEINES - LIPIDES	104
3.2.1. OBJECTIF DE L'ETUDE	106
3.2.2. ETAT DES CONNAISSANCES	106
3.2.2.1. FONCTION ET STRUCTURE DE LA	106
(Na ⁺ ,K ⁺)-ADENOSINE-TRIPHOSPHATASE	

3.2.2.2. STRUCTURE ET FONCTION DE LA GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE	107
3.2.2.3. CHOIX DES PROTEINES	109
3.2.3. MATERIELS ET METHODES	109
3.2.3.1. PRODUITS	109
3.2.3.2. PREPARATION DES LIPOSOMES	109
3.2.3.3. INCORPORATION DES PROTEINES DANS LES LIPOSOMES DE DPPC	110
3.2.3.4. MESURE DE L'ACTIVITE DE L'ATPase INCORPOREE	110
3.2.3.5. DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES DANS LA PREPARATION D'ATPase	111
3.2.4. RESULTATS ET DISCUSSION :	111
PROBLEMES POSES DANS LA DETERMINATION DU COEFFICIENT D'AUTODIFFUSION DE PHOSPHOLIPIDES DANS DES VESICULES	
3.2.4.1. MODELES	112
3.2.4.1.1. Modèle cinétique de réaction strictement contrôlée par la diffusion dans des membranes	112
3.2.4.1.2. Etude de réactions partiellement limitées par la diffusion : 115 cas d'une répartition initiale uniforme des réactifs	
3.2.4.1.3. Influence de l'espace accessible à la réaction et de la répartition des réactifs	120
3.2.4.1.4. Répartition poissonnienne des réactifs	123
3.2.4.1.5. Influence des protéines sur la constante de vitesse	124
3.2.4.1.6. Conclusions	128
3.2.4.2. RESULTATS ET DISCUSSION DES EXPERIENCES EN EXCITATION PULSEE (FLUORESCENCE DU PYRENE)	129
3.2.4.2.1. Réactions dont la cinétique est pratiquement limitée par la diffusion	129
3.2.4.2.2. Diffusion dans des phospholipides purs	131
3.2.4.2.3. Influence des protéines sur la diffusion	137
3.2.4.3. RESULTATS ET DISCUSSION DES EXPERIENCES EN EXCITATION CONTINUE (FLUORESCENCE DU PYRENE ET DU DPH)	141
3.2.4.3.1. Influence des protéines sur la fluorescence du pyrène dans les milieux organisés et homogènes	141
3.2.4.3.2. Influence des protéines sur la polarité locale	146
3.2.4.3.3. Influence des protéines sur l'anisotropie du DPH dans des vésicules de DPPC	150
3.2.4.3.4. Influence du saccharose sur la fluidité membranaire des vésicules de DPPC	151
3.2.5. CONCLUSION	154

3.3. INTERACTIONS CYCLOSPORINE A - DPPC	155
3.3.1. OBJECTIF DE L'ETUDE	157
3.3.2. ETAT DES CONNAISSANCES	157
3.3.3. MATERIELS ET METHODES	158
3.3.3.1. MATERIELS	158
3.3.3.2. METHODES	158
3.3.4. RESULTATS ET DISCUSSION	158
3.3.4.1. LA POLARISATION DE FLUORESCENCE (DPH et TMA-DPH)	158
3.3.4.1.1. Utilisation du DPH	159
3.3.4.1.2. Utilisation du TMA-DPH	161
3.3.4.2. INHIBITION DE FLUORESCENCE PAR FORMATION D'EXCIMERES INTRAMOLECULAIRES DU P ₃ P EN EXCITATION CONTINUE	161
3.3.5. CONCLUSION	162
3.4. ETUDE DE SOLUTIONS AQUEUSES DE MICELLES NON IONIQUES (C₁₂(EO)₆ ET C₁₂(EO)₈)	165
3.4.1. OBJECTIF DE L'ETUDE	167
3.4.2. ETAT DES CONNAISSANCES	167
3.4.2.1. DESCRIPTION DES MICELLES AQUEUSES NON IONIQUES	167
3.4.2.2. LA FLUORESCENCE COMME METHODE D'INVESTIGATION DE TENSIO-ACTIF	169
3.4.3. MATERIELS ET METHODES	172
3.4.3.1. MATERIELS	172
3.4.3.2. METHODES	172
3.4.3.2.1. Méthodes spectroscopiques d'analyse	172
3.4.3.2.2. Préparation des micelles et conditions de travail	172
3.4.4. RESULTATS ET DISCUSSION	173
3.4.4.1. FORMATION D'EXCIMERES INTRAMOLECULAIRES DU P ₃ P	173
3.4.4.1.1. Déterminations des valeurs du rapport IE/IM en fonction des variations de température, pour les tensio-actifs C ₁₂ (EO) ₆ et C ₁₂ (EO) ₈	173
3.4.4.1.2. Evaluation de la microviscosité des micelles de C ₁₂ (EO) ₆ et C ₁₂ (EO) ₈	176
3.4.4.1.3. Comparaison de l'effet de la température sur la formation d'excimères intramoléculaires du P ₃ P dans des micelles de tensio-actifs et dans des solvants organiques. Courbes d'énergie d'activation	179
3.4.4.1.4. Conclusion	183

3.4.4.2. POLARISATION DE FLUORESCENCE	184
3.4.4.2.1. Polarisation de fluorescence du DPH et du TMA-DPH en excitation continue	184
3.4.4.2.2. Polarisation de fluorescence du DPH en excitation pulsée	189
3.4.4.2.3. Conclusion	191
3.4.4.3. FORMATION D'EXCIMERES INTERMOLECULAIRES DU PYRENE	194
3.4.4.3.1. Principe de la détermination du nombre d'agrégation de micelles	194
3.4.4.3.2. Résultats et discussion	196
3.4.4.3.3. Conclusion	201
3.4.5. CONCLUSION	201
 CONCLUSION	 203
 BIBLIOGRAPHIE	 209

ABREVIATIONS

Hormones thyroïdiennes et analogues

AT₃ : acide 3,3',5-triiodothyroacétique

DT₄ : D-thyroxine

DIT : 3,5-diiodo-L-thyrosine

IPT₂ : isopropyl-diiodothyronine

LT₃ : 3,3',5-triiodo-L-thyronine

LT₄ : L-thyroxine

TO : L-thyronine

TP₃ : acide 3,3',5-triiodothyropropionique

Méthodes physiques d'analyses

DC : dichroïsme circulaire

DSC : "differential scanning calorimetry"

FEP : fluorimétrie en excitation pulsée

RMN : résonance magnétique nucléaire

RPE (ou ESR) : résonance paramagnétique électronique

Phospholipides

APLP : acide palmitoylphosphatidique

DLPC : dilauroylphosphatidylcholine

DMPA : acide dimirystoylphosphatidique

DMPC : dimirystoylphosphatidylcholine

DMPG : dimirystoylphosphatidylglycérol

DMPS : dimirystoylphosphatidylsérine

DOPC : dioléoylphosphatidylcholine

DOPE : dioléoylphosphatidyléthanolamine

DPC : dodécylphosphocholine

DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

DSPC : distéaroylphosphatidylcholine

LPPC : dilpalmitoylphosphatidylcholine

Lyso LPC : lysolauroylphosphatidylcholine

Lyso LPE : lysopalmitoylphosphatidyléthanolamine

PC : phosphatidylcholine

POPC : 1-palmitoyl-2-oleylglycérophosphatidylcholine

POPG : 1-palmitoyl-2-oleylglycérophosphatidylglycérol

Produits chimiques divers

ADP : adénosine diphosphate

ATP : adénosine triphosphate

Cyclosp. : cyclosporine

DDT : bis (*p*-chlorophényl)trichloroéthane

HCl : acide chlorhydrique

P_i : phosphate inorganique

PM : poids moléculaire

Tampon Tris : (tris-[hydroxyméthyl]-aminométhane)

Protéines

GGT ou γ -GT : Gamma-glutamyltransférase ou γ -glutamyltransférase

(Na⁺,K⁺)-ATPase : Sodium, potassium-adénosinetriphosphatase

UDPGT : Uridine diphosphate glucuronosyltransférase

Solvants

THF : tétrahydrofuranne

DMSO : diméthylsulfoxyde

Sondes fluorescentes

DPH : 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène

PA-DPH : acide 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène propionique

P₃P, P₆P, P₉P, P₁₀P : dipyrénylpropane, dipyrénylhexane, dipyrénylnonane, dipyrényldécane (pyrène substitué en position 1)

(2,P)₃(2,P) : dipyrénylpropane (pyrène substitué en position 2)

Py, Py*, (Py ... Py*) : pyrène, pyrène excité monomère, pyrène excimère

TMA-DPH : 1[4-(triméthylammonium)phényl]-6-phényl-1,3,5-hexatriène

Symboles

ARN : acides ribonucléiques

BHL : balance hydrophile-lipophile

CMC : concentration critique micellaire

D : coefficient de diffusion

D_L : coefficient de diffusion latérale
EC : "enzyme classification"
 I_E : intensité de fluorescence d'un excimère
 I_E/I_M : rapport des intensités de fluorescence de l'excimère à celle du monomère
 I_F : intensité de fluorescence
 I_M : intensité de fluorescence d'un monomère
LUV : "large unilamellar vesicles" (vésicules unilamellaires de grande taille)
MLV : "multilamellar vesicles" (vésicules multilamellaires)
 η : viscosité (ou microviscosité)
 N_A : nombre d'agrégation
PIT : température d'inversion de phase
 P_T : point de trouble
 $r, < r >, r_0$: anisotropie, anisotropie moyenne, anisotropie limite
SUV : "small unilamellar vesicles" (vésicules unilamellaires de petite taille)
 τ : durée de vie d'une espèce excitée
("X") : concentration en "X"

Tensio-actifs

$C_m(EO)_n$: monoalkyléther de polyoxyéthylène
 $C_{12}(EO)_6, C_{12}(EO)_8$: monododécyléther de polyoxyéthylène
HTAC : chlorure d'hexadécyltriméthylammonium
SDS : "sodium dodecyl sulfate", dodécyle sulfate de sodium
Triton X-100 : tert-octylphényléther de polyoxyéthylène
DAC : chlorure de dodécyle ammonium

AVANT-PROPOS

L'activité de recherche a été effectuée dans deux laboratoires nancéens, qui sont :

- le **Centre du Médicament** (CNRS, Faculté de Pharmacie de Nancy, Université de Nancy I) dirigé par le Professeur Gérard SIEST, et,

- le **Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie** (GRAPP-DCPR-CNRS, à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, INPL), dirigé par Jean-Claude ANDRE, DR CNRS.

Au Centre du Médicament, de 1985 à 1986, j'ai étudié sous la direction de Jacques MAGDALOU et en collaboration avec le Professeur TRUCHOT, à Dijon, les interactions des hormones thyroïdiennes et analogues avec les membranes microsomales de rat. Pour cette étude, nous avons mis à profit, via la collaboration déjà très efficace entre le centre du médicament et le GRAPP, la potentialité des méthodologies photophysiques pour appréhender la fluidité membranaire dans des systèmes biologiques.

Ensuite, au GRAPP, de 1986 à 1990, avec Marie-Laure VIRIOT et Francis BAROS, en utilisant les méthodes photophysiques et des systèmes modèles (liposomes, micelles) j'ai développé des études qui peuvent avoir de l'intérêt pour les biochimistes. Ces travaux concernent essentiellement les interactions entre diverses substances (protéines, drogues, ...) et les lipides qui constituent pour une part importante les membranes biologiques.

INTRODUCTION

C'est maintenant un lieu commun de signaler l'intérêt d'une connaissance fine du quatrième état de la matière, celui correspondant aux systèmes organisés. En effet, ces organisations supramoléculaires jouent un rôle essentiel dans les cellules vivantes (membranes biologiques), dans des systèmes modèles (vésicules, micelles), etc..., utilisés soit pour la recherche fondamentale, soit pour des applications (peintures, cosmétiques, médicaments, ...).

C'est un domaine scientifique et applicatif très vaste qui implique une approche méthodologique à l'échelle moléculaire ou supramoléculaire. C'est ainsi, qu'existent différentes méthodes de mesure comme la RMN, la RPE, les spectroscopies d'émission moléculaire, etc... .

A Nancy, j'ai par ma formation de biochimiste, pu démarrer un travail au Centre du Médicament en biologie. Profitant d'une nécessité de mesure photophysique, j'ai développé des activités interdisciplinaires au GRAPP en utilisant mon savoir faire initial pour développer des applications des spectroscopies de fluorescence à l'étude de systèmes organisés.

En fait, à l'échelle moléculaire, les techniques photophysiques utilisables sont les suivantes :

- * réactions intermoléculaires d'inhibition de fluorescence,
- * réactions intramoléculaires de formation d'excimères,
- * polarisation de fluorescence.

De même, les systèmes organisés sur lesquels on peut travailler peuvent avoir des organisations diverses :

- * les liquides, systèmes pratiquement homogènes,
- * les micelles, de faible organisation,
- * les vésicules ou liposomes, systèmes à bicouches,
- * les microsomes, membranes naturelles complexes.

Comme le montre le tableau I., j'ai été, durant ce travail, amené à consacrer une partie de mon temps à des études spectroscopiques sur différentes cibles organisées. Le but essentiel de mon étude ne doit toutefois pas être considéré comme un ensemble d'études réalisées au hasard (choix de la technique et du support), mais au contraire comme un faisceau d'actions permettant de montrer en partant du simple pour expliquer le plus compliqué, comment, par exemple, les protéines peuvent jouer un rôle sur le transport ou l'organisation lipidique. Dans cet esprit, j'ai plus précisément étudié l'influence de deux protéines, la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ et la γ -glutamyltransférase, sur le coefficient de diffusion du pyrène, sonde moléculaire émissive, dans des liposomes de dipalmitoylphosphatidylcholine.

Pour présenter l'ensemble de mes études, et pour respecter leur évolution temporelle, j'ai choisi de décrire mes travaux en considérant la rédaction (Partie 3. Résultats et Discussion) selon l'ordre décroissant de la complexité des systèmes utilisés (avec ou sans additif) et en développant pour chacun le (ou les types) de méthode(s) photophysique(s) utilisée(s).

Cette présentation est faite selon l'ordre suivant :

- * interactions (in vivo) hormones thyroïdiennes et composés thyromimétiques apparentés/membranes microsomales de foie de rat,
- * interactions protéines/liposomes,
- * interactions cyclosporine A/liposomes,
- * étude de solutions aqueuses de tensio-actifs non ioniques.

Relativement aux additifs considérés, il est aussi possible de souligner un ordre croissant de leur complexité moléculaire :

- * les hormones thyroïdiennes, qui sont des analogues d'acides aminés,
- * la cyclosporine A, qui consiste en l'enchaînement cyclique de onze acides aminés,
- * les protéines qui sont constituées d'un nombre élevé d'acides aminés.

Il est certain, que cette thèse, qui repose sur une action interdisciplinaire, ne peut être présentée qu'après avoir rappelé quelques notions sur la membrane biologique, en considérant aussi bien ses propriétés structurales que dynamiques (Partie 1.1.), et sur les spectroscopies d'émission moléculaires (Partie 1.2.).

De plus, afin de pouvoir établir des comparaisons entre mes résultats et les observations précédemment décrites, j'ai fait, pour plusieurs domaines d'intérêt, l'analyse des données de la littérature en les regroupant sous forme synthétique dans des tableaux.

Enfin, les matériels et méthodes utilisés durant ce travail sont décrits d'une part, dans la partie 2. et d'autre part, spécifiquement pour chaque type d'étude dans le paragraphe correspondant de la partie 3..

Tableau I.
Les systèmes étudiés avec ou sans additif
et les méthodes photophysiques utilisées*.

Additifs	Microsomes	Liposomes	Micelles (non ioniques)	solvants
-	Pol. fluo. : DPH (c+p)	- Pol. fluo. : DPH, TMA-DPH (c+p) - Pyrène (c +p) - P ₃ P (c)	- Pol. fluo. : DPH, TMA-DPH (c+p) - Pyrène (p) - P ₃ P (c)	P ₃ P (c)
Hormones thyroïdiennes	Pol. fluo. : DPH (c+p)			
Cyclosporine A		- Pol. fluo. : DPH, TMA-DPH (c+p) - P ₃ P (c)		
Protéines		- Pyrène (c+p) - Pol. fluo. : DPH (c)		Pyrène (c)

<-----

ordre de complexité des systèmes étudiés

* Pol. fluo., polarisation de fluorescence; P₃P, dipyrénylpropane;
(c), excitation continue; (p), excitation pulsée.

1. ETAT DES CONNAISSANCES

**LA MEMBRANE BIOLOGIQUE :
PROPRIETES STRUCTURELLES ET DYNAMIQUES**

**LA FLUORESCENCE
COMME METHODE D'INVESTIGATION**

1.1. LA MEMBRANE BIOLOGIQUE :

PROPRIETES STRUCTURELLES ET DYNAMIQUES

1.1.1. STRUCTURE ET ORGANISATION

Notre but n'est pas de faire une description détaillée des propriétés structurelles et dynamiques de la membrane biologique. En effet, en raison de la collaboration existant entre le Centre du Médicament et le GRAPP portant sur des études par des méthodes photophysiques du transport moléculaire dans des milieux organisés, les propriétés de la membrane biologique ont déjà été décrites [GARCIN, 1989; KAUFFMANN, 1985].

Nous n'en rappellerons que l'essentiel, en adoptant le plan suivant :

- structure et organisation de la membrane biologique,
- dynamique des constituants membranaires,
- notion d'ordre moléculaire, de fluidité et de microviscosité membranaires,
- interactions avec les phospholipides (autres lipides, protéines, drogues).

1.1.1.1. LA MEMBRANE BIOLOGIQUE

Les cellules, comme les organites qu'elles contiennent, sont limitées par une couche extrêmement mince, mais très stable, constituée de lipides, de protéines et de polysaccharides constituant la membrane biologique. Cette membrane fonctionne essentiellement comme une barrière sélectivement perméable délimitant des compartiments distincts dont elle empêche les contenus de se mélanger [FINEAN, 1981; SHECHTER, 1984 et références citées].

Les diverses fonctions des cellules sont en relation avec la structure et la composition de leur membrane.

1.1.1.1.1. Composition chimique de la membrane biologique

Les membranes biologiques sont des édifices composites, comprenant des lipides, qui forment la structure de base, des protéines et des glucides.

a) Les lipides

Les membranes contiennent principalement deux sortes de lipides : le cholestérol et des phospholipides. Nous décrirons plus en détail dans le § 1.1.1.2. le mode d'auto-assemblage des lipides et leur organisation en liposomes et dans le § 1.1.3.5.1. le rôle spécifique du cholestérol sur les propriétés de la membrane.

Les phospholipides sont présents dans toutes les membranes. Ce sont des molécules amphiphiles, constituées d'un pôle hydrophobe comprenant deux chaînes d'acides gras, lié à un pôle hydrophile comprenant un groupement phosphate souvent chargé négativement (PO_4^-). Cependant, les principaux phospholipides, la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, possèdent une charge positive compensatrice apportée par un

autre groupement chimique tel que, le groupement aminé ($-\text{NH}_3^+$). L'ensemble de ces substances, ainsi que le cholestérol n'ont pas de charges nettes au pH physiologique.

Par contre, 5 à 20 % des phospholipides, tels que le phosphatidylinositol, la phosphatidylsérine et le phosphatidylglycérol, portent une charge globale négative. Ces lipides sont principalement responsables d'interactions avec les protéines (cf. § 1.1.4.2. et § 3.1.2.).

Ainsi, la composition lipidique conditionne un certain nombre de paramètres physiques de la membrane : fluidité ou rigidité, charge électrique, potentiel membranaire, etc... et surtout l'interaction appropriée avec les protéines.

b) Les protéines

Une protéine est un enchaînement d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques.

Les chaînes ainsi formées se replient sur elles-mêmes de façon spécifique, déterminée par la séquence d'acides-amino, lesquels imposent aux protéines leurs structures tridimensionnelles.

Ainsi, 40 à 60 % des protéines sont sous forme d'hélice α , alors que la structure β (chaînes parallèles) est plus rarement trouvée. Dans les deux cas, les structures sont stabilisées par des liaisons hydrogène entre les groupements ($-\text{NH}-$) et ($-\text{CO}-$).

A côté du rôle important que jouent les protéines dans la structure des membranes, elles assurent des fonctions vitales très variées : perméabilité sélective, récepteurs moléculaires, catalyseurs enzymatiques, etc... .

c) Les glucides

Des sucres simples tels que le D-galactose, le D-mannose, le D-glucose, ou la N-acétylglucosamine s'enchaînent en une structure linéaire ou ramifiée que l'on appelle oligosaccharide. Cette structure peut être liée aux lipides ou aux protéines membranaires pour former des glycolipides ou des glycoprotéines, lesquels ne sont présents que sur la face externe des membranes.

Ces complexes glycolipidiques et glycoprotéiques sont impliqués dans de nombreuses fonctions de reconnaissance, telles que la spécificité des groupes sanguins.

1.1.1.1.2. Structure de la membrane biologique

a) Historique

La figure 1.1.1. montre l'évolution des modèles structuraux de la membrane proposés depuis le début du siècle [BROWN, 1968].

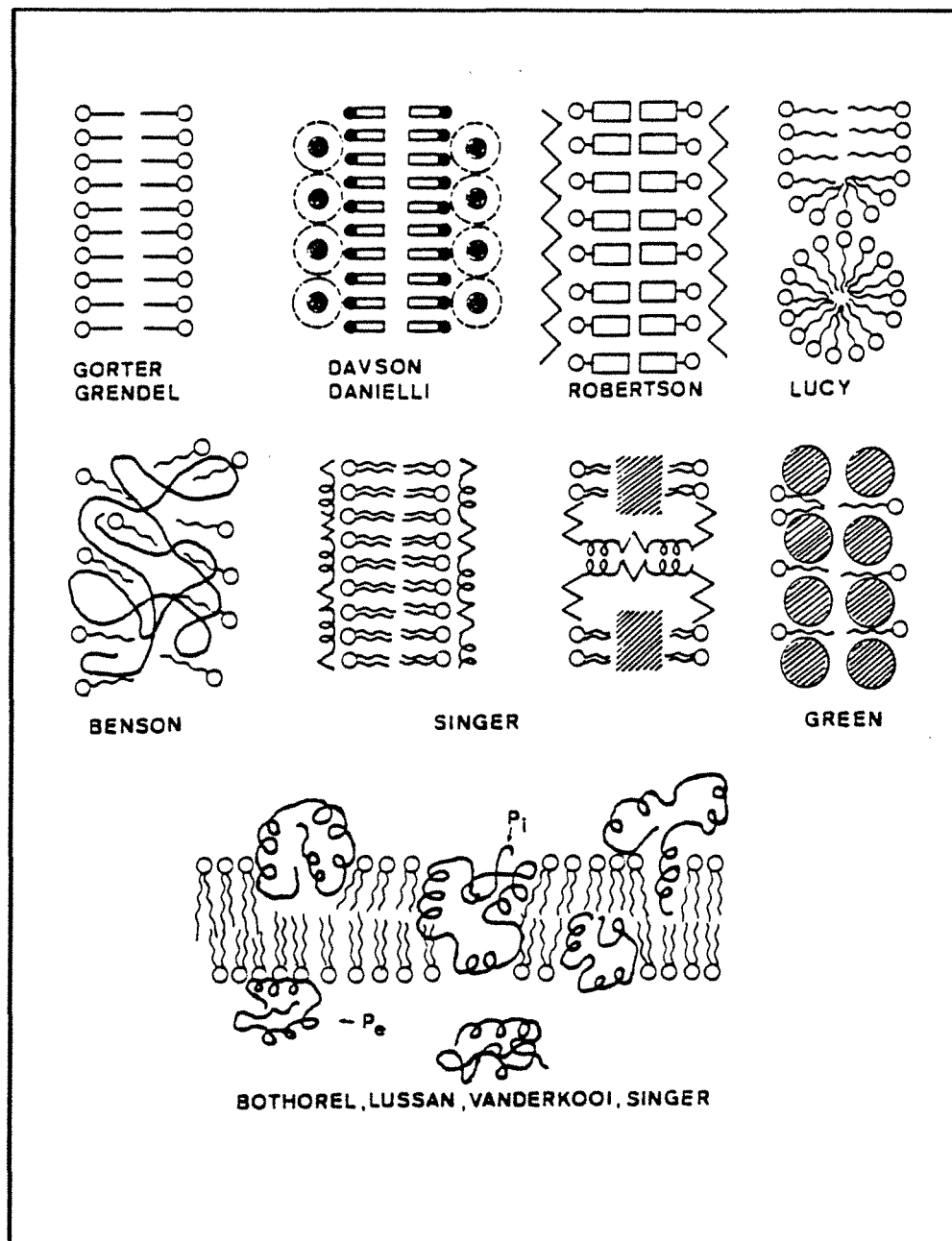


Figure 1.1.1.

Evolution des modèles structuraux de la membrane biologique.

Le caractère lipophile de la membrane a été indiqué dès 1899 par OVERTON.

En 1925, GORTER et GRENDEL furent les premiers à décrire la structure fondamentale de toutes les membranes, c'est-à-dire une double couche de molécules lipidiques, avant que DANIELLI et DAVSON aient proposé en 1935 l'existence d'une monocouche de protéines globulaires hydratées surmontant chaque monocouche lipidique. Ce modèle a été confirmé par les travaux de FERNANDEZ-MORAN et FENEAN, grâce à l'application de la microscopie électronique à l'étude des membranes, vers les années 1950.

En 1955, ROBERTSON a postulé l'hypothèse de "la membrane unitaire". Pour tenir compte de la perméabilité élevée de la membrane à l'eau et à certaines molécules hydrophiles de petite taille, il a suggéré que la couche protéique s'invagine et traverse la membrane, formant ainsi des pores hydrophiles. Le problème de la structure de la membrane biologique semblait alors comme définitivement résolu.

Cependant, le développement des techniques biochimiques a montré que cette structure ne répondait plus aux données nouvelles, et c'est en 1972 que SINGER et NICHOLSON ont proposé "le modèle de membrane en mosaïque fluide".

b) Structure en "mosaïque fluide"

A présent, il est admis que la membrane cellulaire est une structure bidimensionnelle fermée, d'une épaisseur de 60 à 150 Å, constituée d'une matrice de phospholipides organisés en bicouche, perturbée par des protéines qui s'y enfoncent plus ou moins (cf. figure 1.1.2.).

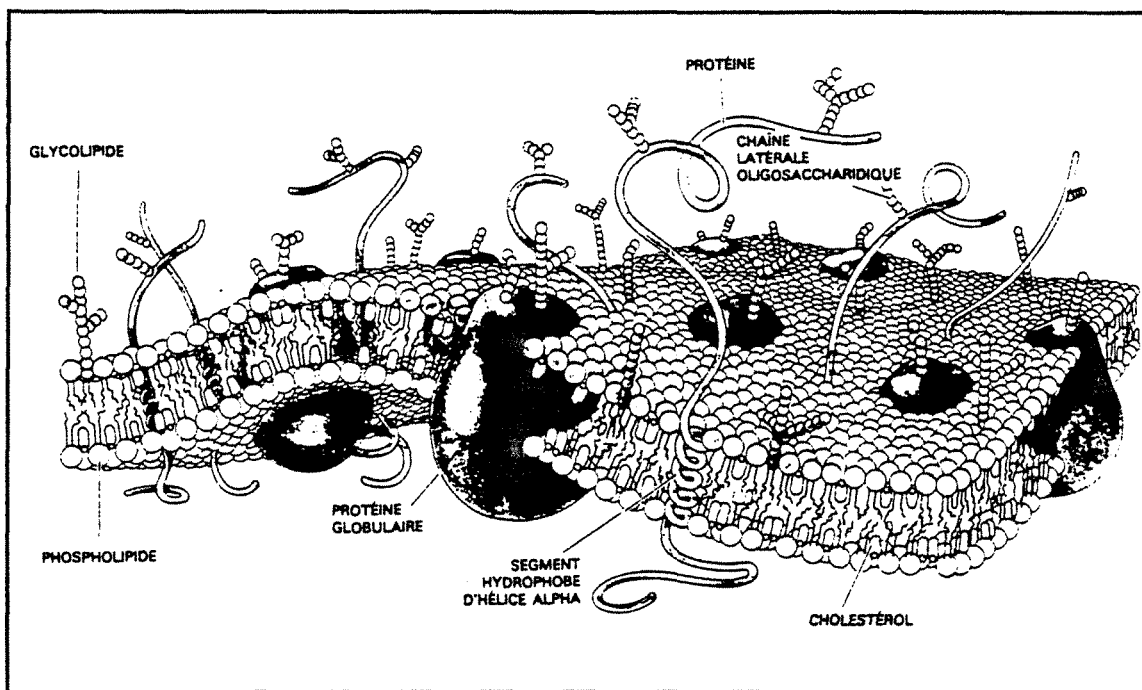


Figure 1.1.2.

Structure en "mosaïque fluide" de la membrane biologique.

Les protéines traversant la membrane de part et d'autre, appelées protéines intégrales ou intrinsèques établissent des interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Alors que les protéines périphériques ou extrinsèques disposées de part et d'autre de la membrane établissent des interactions électrostatiques, soit avec les parties polaires des lipides, soit avec les parties polaires exposées des protéines intrinsèques.

A ce modèle membranaire est lié un concept important, celui de la **fluidité** (les notions de fluidité membranaire, de viscosité, de microviscosité, d'ordre moléculaire seront définies dans le § 1.1.3.). En effet, les différents constituants lipidiques et protéiques ne sont pas figés et les différentes interactions, lipide-lipide, lipide-protéine ou protéine-protéine ne correspondent pas à des liaisons covalentes. Il en résulte ainsi un mouvement continu et une diffusion des constituants membranaires dans le plan et à travers la membrane.

c) *Asymétrie membranaire*

L'une des caractéristiques essentielles de l'organisation moléculaire de la membrane biologique est son asymétrie. Ainsi, les faces interne et externe de la membrane ont des activités fonctionnelles différentes, cette asymétrie fonctionnelle reflète, en effet une asymétrie structurale [KREBS, 1982].

Les protéines membranaires possèdent une orientation déterminée, certaines n'apparaissent qu'à la surface interne, d'autres seulement sur la surface externe, d'autres encore traversent l'épaisseur de la membrane. Alors que l'asymétrie lipidique est plus partielle que totale (cf. figure 1.1.3.).

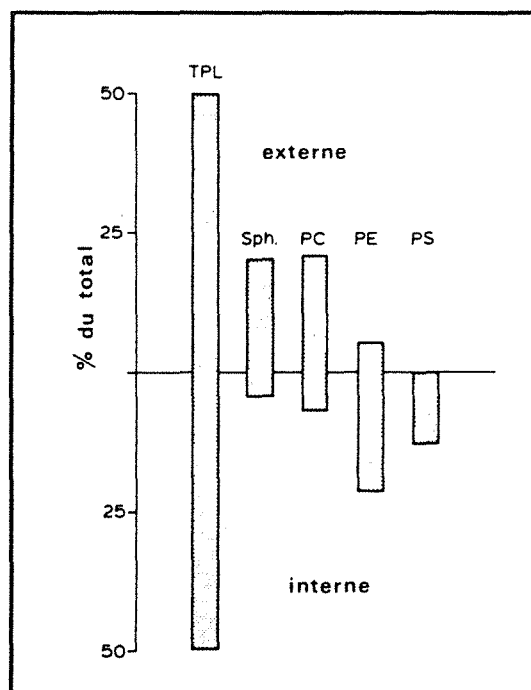


Figure 1.1.3.

Représentation schématique de la distribution des phospholipides dans la membrane d'érythrocyte humain [VERKLEIJ et al., 1973].

TPL : phospholipides totaux; Sph : sphingomyéline; PC : phosphatidylcholine;
PE : phosphatidyléthanolamine; PS : phosphatidylsérine.

Le rôle fonctionnel de l'asymétrie lipidique n'est pas clairement établi. Cette dernière conduit à une asymétrie de charges des deux faces de la membrane :

- * elle pourrait servir de support à des activités protéiques, elles-mêmes distribuées de manière asymétrique dans la membrane ou,

- * elle pourrait conférer une fluidité différente aux deux monocouches de la membrane, et par là-même, contrôler différemment les activités enzymatiques localisées dans chacune des monocouches.

Les glucides membranaires possèdent eux aussi une distribution asymétrique, puisqu'ils n'apparaissent que sur la face externe de la membrane.

1.1.1.1.3. Fonction de la membrane biologique

La fonction de barrière est dévolue aux lipides. En effet, la membrane fonctionne essentiellement comme une barrière sélectivement perméable. Elle compartimente d'une part, les organites cellulaires et isole le contenu cellulaire du milieu environnant d'autre part.

La fonction d'échange est, quant à elle, assurée par les protéines membranaires. Les fonctions remplies par ces protéines sont en effet extrêmement variées :

- * la perméabilité des membranes est très sélective, en raison des protéines particulières qui forment des canaux ou des pompes qui font traverser la membrane à certains ions ou certaines molécules, même quand des gradients de concentrations tendraient à des échanges en sens contraire,

- * les réponses des cellules cibles à l'action des neurotransmetteurs, des hormones ou des antigènes étrangers dépendent des protéines membranaires qui agissent comme des récepteurs,

- * des protéines enzymatiques ou des antigènes sont ancrés dans la membrane pour y localiser certaines réactions.

1.1.1.2. LES PHOSPHOLIPIDES COMME MODELE DE LA MEMBRANE BIOLOGIQUE

L'étude des membranes biologiques par les techniques d'analyse physicochimique, telles que les méthodes spectroscopiques, s'avère difficile, sinon impossible car le nombre de variables à maîtriser est considérable. Ce qui compromet l'interprétation des résultats.

Pour cette raison, des assemblages simples ont été réalisés pour aborder l'étude physicochimique des membranes dans leur diversité.

Nous traitons dans ce chapitre, essentiellement les liposomes. Par ailleurs, notons que nous avons utilisé des liposomes unilamellaires au cours de notre étude.

1.1.1.2.1. Auto-assemblage des phospholipides

En suspension dans l'eau, les phospholipides s'organisent spontanément, de façon à minimiser le contact entre les parties apolaires et le milieu aqueux. En effet, les chaînes aliphatiques peu polaires s'excluent de la phase aqueuse et s'auto-associent pour former un réseau de chaînes; à l'opposé les groupes polaires s'hydratent et restent en interaction favorable avec l'eau. L'auto-assemblage ne peut être produit que si la concentration en phospholipides est supérieure à une concentration de l'ordre de 10^{-10} M, appelée concentration micellaire critique (CMC). Le type d'aggrégation résultant ne dépend pas uniquement de la structure chimique du lipide, mais aussi de paramètres physiques, tels que la charge de surface, la température, la pression et l'environnement ionique. Cependant, le rapport des surfaces des parties apolaires et polaires (a/p) des molécules considérées permet de faire des prédictions sur le type d'aggrégation [EIBL, 1984] (cf. figure 1.1.4.).

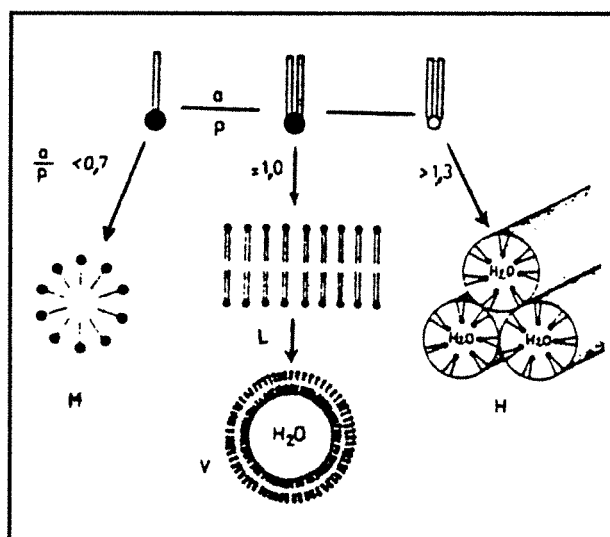


Figure 1.1.4.

Organisation des phospholipides dans l'eau [EIBL, 1984].

L, bicouche lamellaire; V, vésicule; H, structure hexagonale; M, micelle;

a, apolaire; p, polaire; a/p, rapport des surfaces des régions apolaires et polaires de la molécule.

1.1.1.2.2. Description des liposomes

On définit les liposomes comme des structures en bicouches lipidiques closes, sphériques dans lesquelles l'eau est intégrée [MACHY et LESERMAN, 1987] (cf. figure 1.1.5.). L'organisation en liposomes est favorisée quand le rapport a/p est voisin de 1 (cas des phosphatidylcholines ou lécithines).

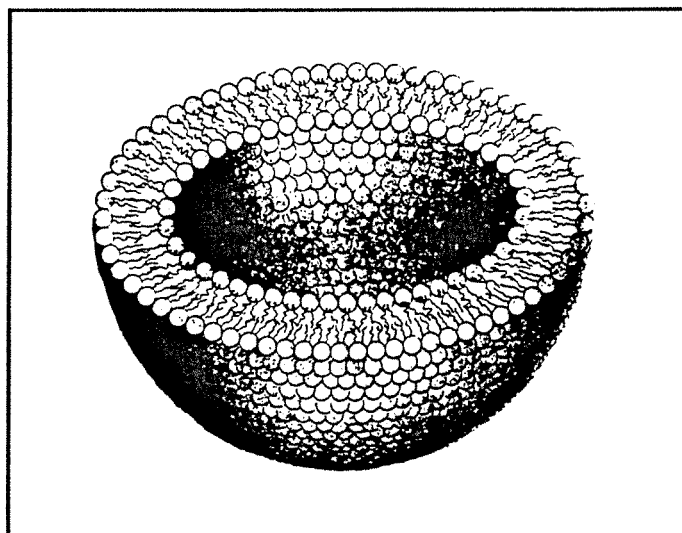


Figure 1.1.5.

Architecture moléculaire d'un liposome [BRETSCHER, 1985].

Les liposomes peuvent être de nature :

- * multilamellaire (MLV pour "multilamellar vesicles"). Ils sont caractérisés par la présence de plusieurs bicouches lipidiques concentriques, séparées les unes des autres par des couches aqueuses. Ils sont obtenus simplement par l'addition des phospholipides à l'eau. Leur diamètre varie de 400 à 3 500 nm suivant le nombre de lamelles.

- * unilamellaire de petite taille (SUV pour "small unilamellar vesicles"), contenant une seule bicouche lipidique dont le diamètre varie de 25 à 50 nm. Ils sont obtenus à partir des liposomes multilamellaires par divers traitements (ultra-sons, cholate, ...).

- * unilamellaire de grande taille (LUV pour "large unilamellar vesicles"), contenant un seul compartiment aqueux de grande taille et de diamètre variant de 200 à 1 000 nm. Ils sont obtenus par diverses méthodes (méthodes à l'éther, à l'alcool, fusion, ...).

Pour l'obtention de chacun des types de liposomes, la température doit être supérieure à la température de transition des phospholipides.

Les liposomes ont fait l'objet d'un très grand nombre d'études, car ils ont servi de modèle pour l'étude de la structure membranaire, de sa perméabilité, des interactions lipides-drogues (cf. § 1.1.4.3., § 3.1.1. et § 3.1.3.) et surtout des interactions lipides-protéines, puisqu'actuellement, on arrive à insérer des protéines dans la bicouche lipidique d'une façon contrôlée (cf. § 1.1.4.2. et § 3.1.2.). Enfin, les liposomes trouvent actuellement de nombreuses applications en servant de systèmes vecteurs de substances variées (médicaments, acides nucléiques, substances cosmétiques, ...) vers les tissus [GABRIELCIC et al., 1990; PUISIEUX, 1985; SHEW et DEAMER, 1985].

1.1.1.2.3. Polymorphisme thermotropique des lipides

D'une manière générale, les lipides subissent un changement d'état pour une température particulière, appelée température de transition (T_M , pour "main transition"). Une phase "gel" se transforme à la température de transition en une nouvelle phase de type "cristal-liquide", cette transition correspond essentiellement à la fusion des chaînes aliphatiques des acides gras qui sont ordonnées en configuration totalement trans dans la phase gel ($T < T_M$), et qui deviennent désordonnées, avec des conformations gauches dans la phase cristal-liquide ($T > T_M$).

La température de transition, T_M , est caractéristique d'un phospholipide donné (cf. § 3.2.4.2.2.), elle varie avec la longueur et le taux d'insaturation des chaînes (cf. § 1.1.3.5.2.), la nature et la charge des groupes polaires à l'interface, les conditions d'environnement : pH, force ionique, pression et interaction avec d'autres molécules (autres phospholipides, cholestérol, protéines, médicaments, anesthésiques, ...).

Il faut ajouter que certains lipides purs, organisés en liposomes multilamellaires, présentent une phase de prétransition (à une température $T_p < T_M$) qui précède la transition principale, résultant de la fusion des seules chaînes hydrocarbonées, les groupements polaires restant rigidelement organisés [DUFOUR et al., 1981; HUANG et al., 1982].

1.1.2. DYNAMIQUE DES CONSTITUANTS MEMBRANAIRES

Pour connaître les propriétés physiques de la membrane et en particulier ses propriétés dynamiques, des techniques physiques sont nécessaires, et particulièrement des méthodes spectroscopiques; nous en rappellerons l'essentiel dans le § 1.1.2.1..

1.1.2.1. LES TECHNIQUES PHYSIQUES D'INVESTIGATION

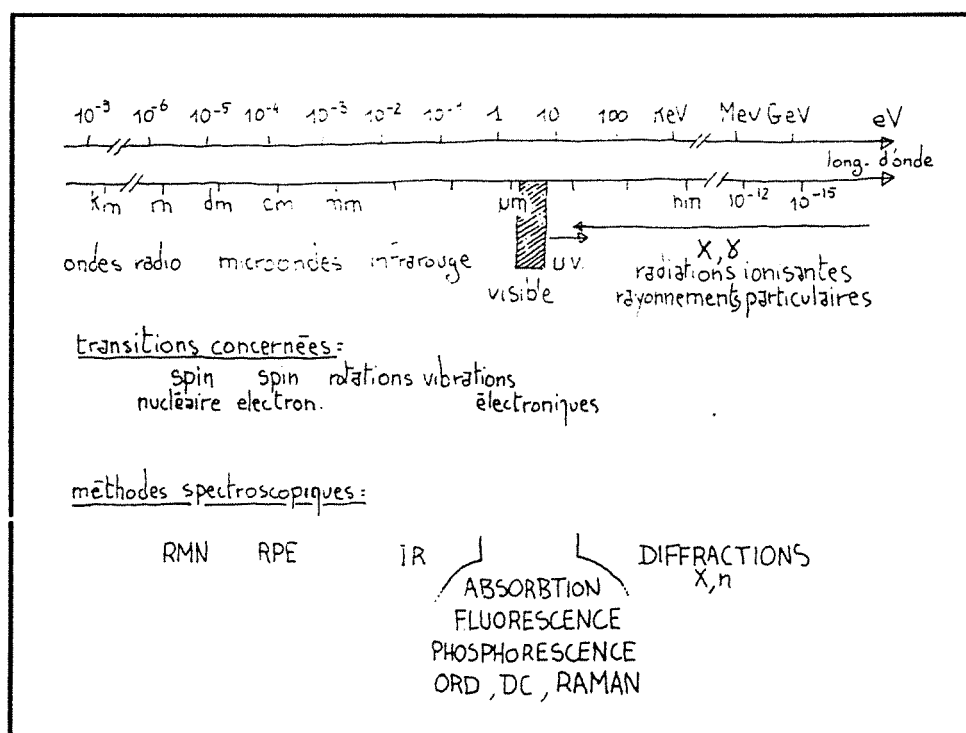
1.1.2.1.1. Les méthodes spectroscopiques

Les méthodes spectroscopiques mettent en jeu les phénomènes d'interactions des rayonnements électromagnétiques avec la matière (cf. tableau 1.1.1.) [LETERRIER et GARY-BOBO, 1989]. Les plus utilisées en biologie font intervenir :

- * soit les rayonnements ultraviolets et visibles : absorption, fluorescence et phosphorescence, diffusion Raman, dispersion optique rotatoire et dichroïsme circulaire,
- * soit les ondes hertziennes : résonance paramagnétique électronique (RPE) et résonance magnétique nucléaire (RMN).

Tableau 1.1.1.

Les ondes électromagnétiques et les différentes méthodes spectroscopiques correspondantes [LETERRIER et GARY-BOBO, 1989].

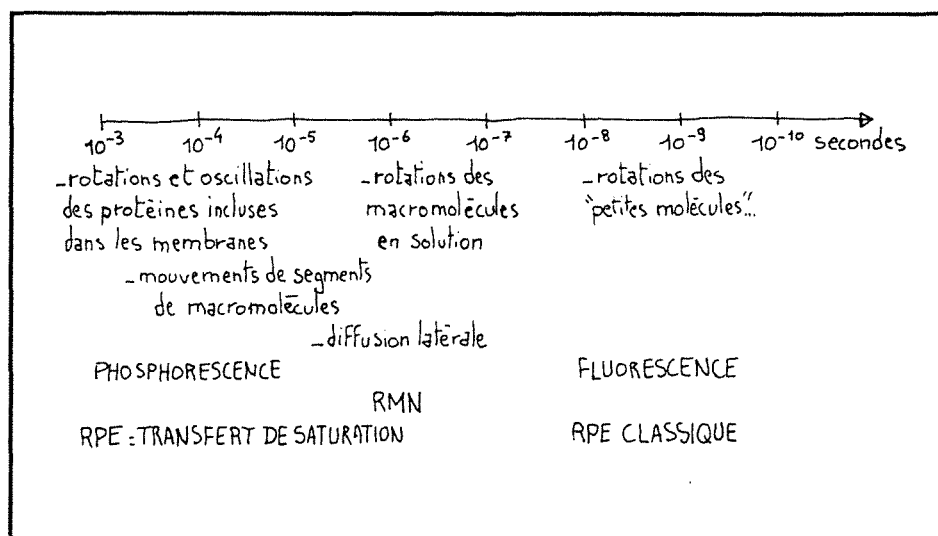


Les méthodes précédemment citées n'apportent pas toutes les informations souhaitées sur l'organisation spatio-temporelle d'un ensemble moléculaire. En effet, pour l'étude des membranes, il est particulièrement important de déterminer l'emplacement et les mouvements de ses constituants. En pratique, seules les spectroscopies de fluorescence (dans certains cas de phosphorescence) en lumière polarisée, et les résonances magnétiques (et principalement la RPE) sont utilisées dans ce but. En effet, les distances qu'elles sont capables d'explorer sont de l'ordre de 0,5 à 1 nm en RPE et en RMN, et atteignent 5 à 10 nm en fluorescence. De plus, le repérage des molécules dans l'espace s'effectue avec une grande précision par référence au plan de polarisation de la lumière en fluorescence et à la direction du champ magnétique statique indispensable pour observer les phénomènes de résonance.

L'ordre de grandeur de la discrimination temporelle est le même que celui qui caractérise les transitions spectroscopiques : durée de vie des états électroniques excités en fluorescence ou phosphorescence, fréquence de LARMOR et temps de relaxation en RMN et RPE. Ces temps caractéristiques sont indiqués dans le tableau 1.1.2. qui montre la très large gamme couverte en associant les différentes méthodes. La dynamique moléculaire est en effet décrite par des temps caractéristiques appelés temps de corrélation, eux-mêmes liés aux phénomènes de diffusion. On distingue en particulier le temps de corrélation de rotation et ceux liés à la diffusion latérale, lesquels sont en relation avec la fluidité membranaire.

Tableau 1.1.2.

Temps caractéristiques et types de mouvements évalués par les principales méthodes spectroscopiques appliquées à l'étude des membranes.



Nous définirons plus en détail dans le chapitre 1.2. les méthodes spectroscopiques d'émission moléculaire que nous avons utilisées au cours de ce travail.

1.1.2.1.2. Les méthodes autres que spectroscopiques

A côté des techniques spectroscopiques, d'autres méthodes sont souvent utilisées pour l'étude des membranes, telles que :

- * la calorimétrie différentielle en balayage de température (DSC, pour "differential scanning calorimetry") [PEHOWICH et al., 1988; MCELHANEY, 1986; MARBREY et STURTEVANT, 1976; JANIAC, 1976],
- * la diffraction des rayons X [CAMPBELL et DWEK, 1984; LAZATTI, 1968],
- * la microscopie électronique [SEVERS et ROBENEK, 1983] et enfin,
- * les techniques biochimiques [CHRISTON et al., 1989; VANCE et VANCE, 1984; VERKLEIJ et al., 1973].

1.1.2.2. LES MOUVEMENTS DES LIPIDES ET DES PROTEINES

Les mouvements des constituants membranaires doivent être envisagés selon deux aspects qui se commandent l'un l'autre. En premier lieu, ils doivent être considérés comme des phénomènes aléatoires régis par les lois de la diffusion. En second lieu, on considère qu'il existe des phénomènes de régulation de ces mouvements (ancrage, métabolisme, ...).

1.1.2.2.1. Les mouvements moléculaires des lipides

Les mouvements des phospholipides peuvent être classés en deux types, schématisés sur la figure 1.1.6. :

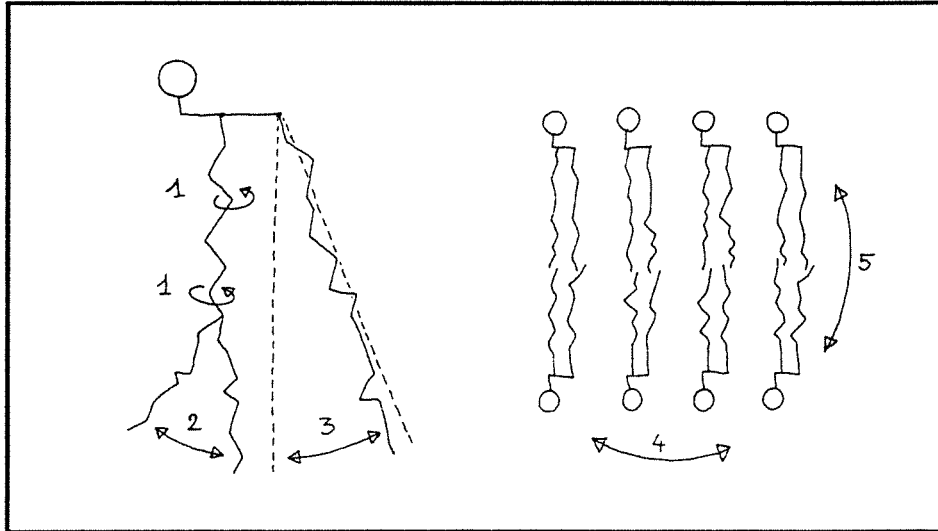


Figure 1.1.6.

Représentation des différents mouvements des lipides

[LETERRIER et GARY-BOBO, 1989].

1, rotation; 2, mouvement d'oscillation; 3, mouvement de balancier;
4, diffusion latérale; 5, diffusion transverse.

a) Les mouvements "locaux"

Ces mouvements regroupent :

- * ceux de rotations locales effectués par les différents atomes de carbone autour d'un axe moyen de chaque chaîne d'acide gras; mouvements très rapides (fréquence $\approx 10^{11} \text{ s}^{-1}$) et localisés,

- * ceux d'oscillation ou de rotation de l'ensemble des chaînes d'acides gras. Ce sont principalement ces mouvements qui déterminent l'ordre de la bicouche lipidique. Leurs amplitudes sont fonction de la nature chimique des lipides (charges, longueur des chaînes aliphatiques, insaturation) et des critères d'environnement (température, pH, pression, ...).

Ces mouvements locaux sont à l'origine de la notion de microviscosité et de celle d'ordre moléculaire (cf. § 1.1.3.5.). Ils sont facilement détectables et mesurables par des techniques spectroscopiques.

b) Les mouvements de déplacement

Ces mouvements concernent chaque molécule lipidique prise dans son ensemble. On distingue :

- * *les mouvements de diffusion latérale (D_L)*, les plus importants sont relatifs au déplacement dans le plan de la bicouche de l'ensemble des phospholipides. C'est un phénomène de diffusion parfaitement aléatoire, pouvant être responsable de la formation de lacunes dans la bicouche ou d'échanges directs entre molécules identiques.

- * *les mouvements de diffusion transverse ("flip-flop")*, concernent le passage de lipides d'une couche à l'autre de la bicouche. Il s'agit de mouvements lents, dont la période varie de 20 min à 40 heures [NICOLSON et al., 1977] et qui ne contribuent en rien au phénomène de la microviscosité membranaire.

La détermination des valeurs des mouvements de déplacement est difficile, en particulier pour la diffusion latérale, car elle nécessite un équipement sophistiqué et coûteux.

1.1.2.2. Les mouvements moléculaires des protéines

Il est possible de définir trois types de mouvements des protéines et de les schématiser selon la figure 1.1.7. :

a) Les mouvements de diffusion latérale

Ceux-ci sont exprimés en terme de mobilité lipidique [SACKMANN et al., 1973]. La rapidité de la diffusion latérale de la protéine dépend du taux de déplacement des lipides et de l'apparition de volumes libres dans le périmètre de la protéine. Par conséquent, elle est fonction de la fluidité de la bicouche lipidique et, à un moindre degré, de la taille de la protéine ou de l'agrégation.

En fait, l'examen des résultats sur la diffusion des protéines révèle une large étendue des valeurs de D_L , allant de la diffusion rapide à une immobilité apparente. Ceci n'est pas surprenant en raison de la diversité des fonctions associées aux protéines membranaires et il est certain que la diffusion protéique est contrôlée non seulement par la fluidité lipidique mais par des interactions entre composants membranaires (cf. § 1.1.4.).

Des contraintes peuvent être imposées aux molécules exposées à la surface, soit par interaction avec d'autres molécules présentes sur la même face de la membrane ("cis-membrane interaction"), soit par des interactions survenant à travers la bicouche avec les molécules présentes sur la face interne de la membrane ou avec des structures cytoplasmiques ("trans-membrane interaction").

Ces contraintes peuvent être transitoires ou permanentes. Celles qui sont permanentes sont probablement impliquées dans la formation de structures de surfaces spécialisées dans

la fonction cellulaire, tandis que celles qui sont temporaires peuvent être imposées aux molécules normalement mobiles dans la membrane ($D_L = 6 \cdot 10^{-8}$ à $3 \cdot 10^{-8}$ cm²/s pour la gramicidine A dans du DMPC entre 25 et 40 °C, $D_L = 1$ à $2 \cdot 10^{-8}$ cm²/s pour la glycophorine dans du DMPC au-dessus de 15 °C [VAZ et al., 1982]).

b) Les phénomènes de "patching" et "capping"

L'interaction des macromolécules de surface avec d'autres structures peut restreindre le mouvement des molécules. Mais avec beaucoup de systèmes, elle peut avoir l'effet opposé en augmentant leur déplacement par des mécanismes non diffusionnels ("patching" ou "capping"). Ces mouvements des protéines de membrane sont observés lorsque des macromolécules de surface sont l'objet d'une "cross"-liaison par l'intermédiaire d'autres molécules situées dans l'espace extra-cellulaire. Deux types différents de redistribution peuvent être observés : les molécules forment des "patches" (qui correspondent à des microprécipités dans le plan de la membrane). Ces "patches" peuvent migrer rapidement pour former un "cap" à un pôle de la cellule. Le phénomène de "capping" survient probablement par l'intermédiaire d'un système contractile qui nécessite de l'énergie. Il dépend de la fluidité du milieu lipides-protéines, des caractéristiques physiques (forme, taille) des macromolécules mobiles et de l'existence de contraintes imposées aux molécules diffusantes par d'autres protéines.

c) Les mouvements de diffusion de rotation

Certaines protéines membranaires peuvent tourner rapidement autour d'un axe normal au plan de la membrane. Dans le cas des protéines intrinsèques, cette diffusion de rotation peut être liée à la fréquence de "hopping" n_L des molécules lipidiques, toujours selon le modèle de SACKMANN. Dans ce modèle, une protéine tourne autour d'un axe perpendiculaire à la membrane. Le périmètre de la protéine n'est pas parfaitement cylindrique et porte au moins une excroissance de quelques Å (due à des chaînes latérales d'acides aminés, par exemple). La protéine peut tourner seulement lorsqu'un volume libre lipidique se produit au voisinage de l'excroissance. En ce qui concerne la rotation des protéines autour d'un plan parallèle au plan de la membrane, cette possibilité de rotation pose un certain nombre de problèmes. Il est clair que les protéines qui contiennent une partie carbohydre située à l'extérieur de la surface devraient avoir un taux de rotation particulièrement faible. Néanmoins, il est concevable que les protéines de membranes puissent adopter une structure dans laquelle la surface est largement hydrophobique. Quoiqu'il en soit, le transport au travers des membranes est un processus dans lequel la diffusion de rotation des protéines pourrait avoir un rôle fonctionnel important.

Les mouvements des constituants membranaires, ainsi présentés nous permettent de remarquer que la notion de microviscosité membranaire est ambiguë. En effet, comme nous

le soulignons dans le chapitre suivant, la viscosité est une propriété caractéristique des fluides en écoulement, la diffusion caractérise aussi le déplacement des molécules, mais n'implique pas la notion d'écoulement. Néanmoins, il est important de rappeler que la diffusion est d'autant plus facile que la microviscosité est plus faible.

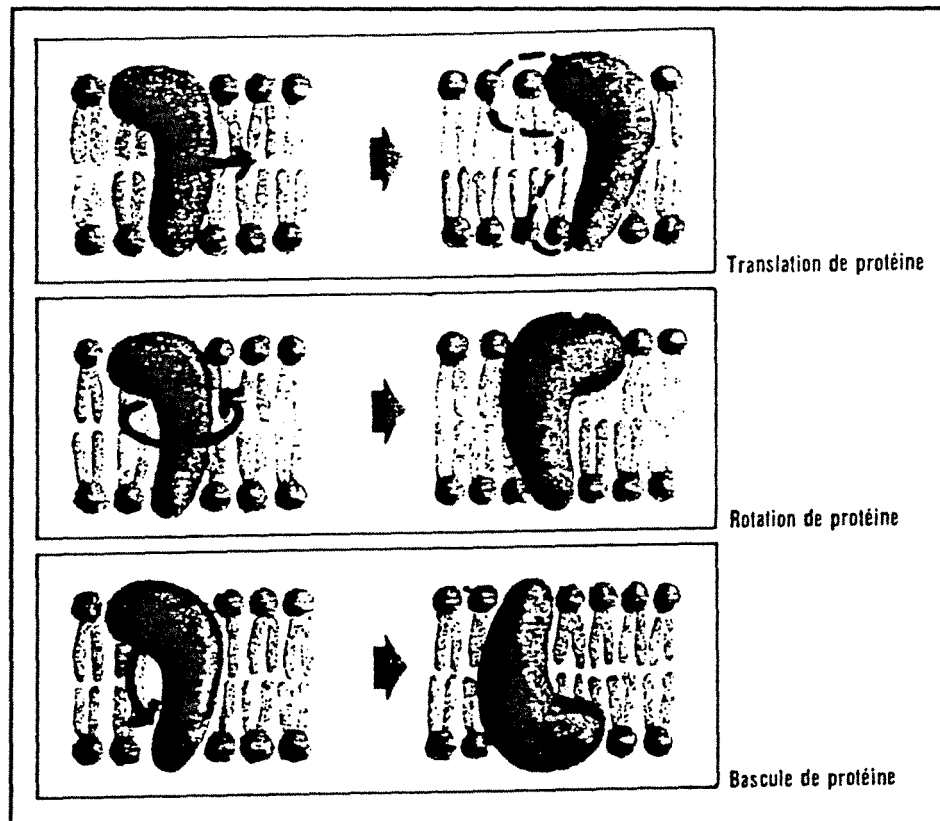


Figure 1.1.7.
Représentation des mouvements des protéines.

1.1.3. NOTION D'ORDRE MOLECULAIRE, DE FLUIDITE ET DE MICROVISCOSITE MEMBRANAIRES

Pour se rendre compte des propriétés physiques des systèmes organisés, des paramètres physiques accessibles par l'expérience peuvent être déterminés :

- * la microviscosité membranaire,
- * le paramètre d'ordre,
- * les coefficients de diffusion moyens.

Depuis l'introduction du modèle en "mosaïque fluide", les spécialistes de la membrane essaient de quantifier la fluidité membranaire dans le but d'une meilleure compréhension de sa signification biologique. Cependant, cette tâche apparaît très difficile car la bicouche lipidique est un type de fluide spécial pour lequel la fluidité est difficile à définir.

1.1.3.1. NOTION GENERALE DE FLUIDITE ET DE VISCOSITE

Sont dits "fluides" les corps, gaz et liquides qui, n'ayant pas de forme propre, sont déformables sans effort. Ainsi, pour un liquide ordinaire, tel que l'eau, la fluidité est définie comme étant l'inverse de la viscosité. Cependant, la bicouche lipidique diffère du fluide macroscopique par les aspects suivants :

- * c'est un fluide microscopique strictement limité,
- * il est essentiellement de nature bidimensionnelle,
- * il est anisotrope; ainsi, ses propriétés physiques, telles que la conductivité ou la microviscosité ont des valeurs différentes suivant la direction parallèle ou perpendiculaire à la membrane,
- * la variation de la température du système lipide-eau montre l'existence de plusieurs phases (cf. § 1.1.1.2.3.).

Cependant à l'intérieur des limites qui lui sont imposées par les forces de cohésion intermoléculaires, les constituants de la membrane sont mobiles. Ainsi, le déplacement des constituants implique un écoulement, donc des frottements caractérisés par un coefficient de friction. Par conséquent, il est indispensable de toujours considérer simultanément les mouvements moléculaires (fluidité, microviscosité) et l'ordre moléculaire (disposition spatiale des constituants et de leurs éléments). Pour tenir compte du fait que l'on considère des phénomènes qui ont lieu à l'échelle moléculaire, on parle de microviscosité.

Par ailleurs, ANDRE et al., 1983, ont montré que ni la définition macroscopique de la viscosité (expérience de COUETTE) ni une approche thermodynamique (théorie de EYRING) ne permettent de définir sagement la microviscosité, et en particulier celle des milieux complexes constitués de phospholipides différents, de protéines, de cholestérol, etc... .

1.1.3.2. DEFINITION MACROSCOPIQUE DE LA VISCOSITE

Si l'on considère le montage pseudo-expérimental représenté sur la figure 1.1.8., il est possible, par la pensée, de remplir l'espace annulaire à l'aide de phospholipides placés parallèlement à l'axe de rotation du cylindre extérieur (montage de COUETTE) ou au contraire perpendiculairement à cet axe.

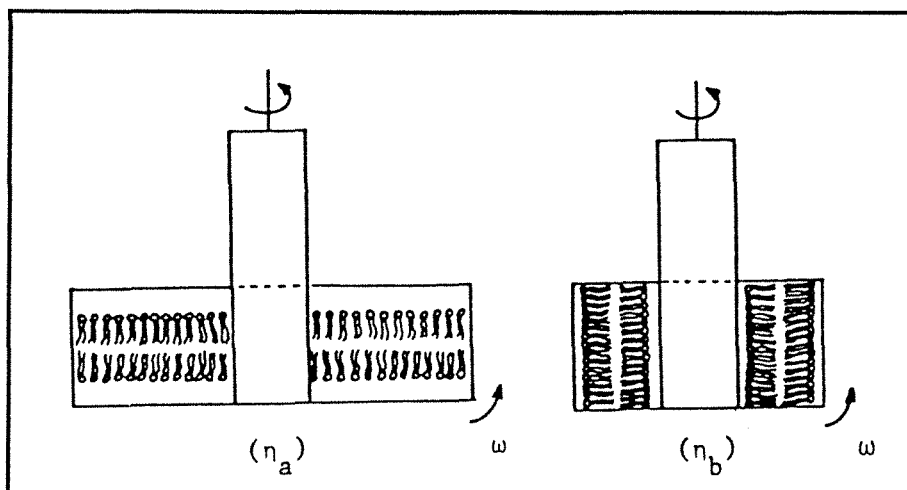


Figure 1.1.8.

Montage théorique autorisant la mesure de η_a et η_b .

En faisant tourner le cylindre extérieur, comme on le ferait pour un fluide newtonien, on devrait observer une rotation partielle d'un angle α_a (ou α_b) du cylindre intérieur, correspondant à l'équilibre du couple et des forces tangentielles impliquées, et dépendant d'un coefficient de viscosité η_a (ou η_b).

Dans le cas a, pour une membrane artificielle constituée des mêmes phospholipides, on obtiendrait une mesure des forces moyennes de friction qui existent entre ces molécules. Dans le cas b, il s'agirait des forces de friction qui agissent sur les extrémités des chaînes phospholipidiques.

En tenant compte, d'une part, de la nature viscoélastique des membranes et de leur dimension, d'autre part, de l'existence de forces de friction dépendant de la zone d'observation considérée (têtes polaires, régions hydrophobes) ce type d'expérience, même s'il était possible, ne pourrait conduire à une mesure satisfaisante. En effet, la question qui se pose est la suivante : la cohésion du système provient-elle des têtes polaires, des queues hydrophobes ou des deux parties de ces molécules ? Pour essayer de comprendre le problème ainsi posé, nous avons tenté de prendre en considération les potentiels d'interaction locaux qui peuvent intervenir dans des membranes constituées de phospholipides identiques (ce qui représente déjà une hypothèse simplificatrice, par rapport à une membrane réelle).

1.1.3.3. DEFINITION THERMODYNAMIQUE DE LA VISCOSITE

Pour décrire les modes de transport visqueux, on peut considérer le modèle liquide décrit par la figure 1.1.9..

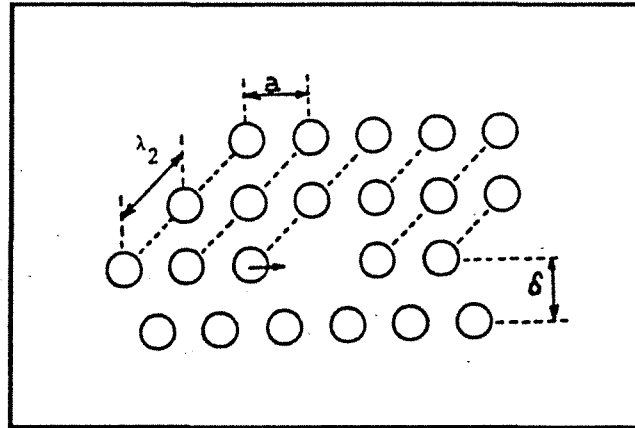


Figure 1.1.9.

Représentation schématique du processus diffusionnel dans un liquide servant à illustrer la théorie de EYRING.

Si l'on admet par souci de simplicité que la distance entre la position d'une molécule et celle d'un site à occuper est a , que la distance entre deux plans contenant les phospholipides est δ et que n est le nombre de molécules par unité de volume, on peut essayer de décrire le mouvement d'une molécule, qui doit passer schématiquement par un étranglement pour atteindre son site d'accueil. Dans de telles conditions, le transfert s'effectue quand la molécule peut surmonter un potentiel de répulsion lié à la grande proximité entre les molécules.

La théorie de EYRING qui repose sur ces concepts conduit à l'expression suivante de la microviscosité η définie par :

$$\eta = (\delta/a)^2 n h \exp \Delta E/RT \exp \Delta S_e/R$$

où ΔE correspond à la variation d'énergie potentielle et ΔS_e à la variation d'entropie, h étant la constante de PLANCK.

Cette expression définit la viscosité en terme d'énergie d'activation : or, les liaisons entre molécules voisines qui doivent être rompues pour former un trou sont les mêmes que celles que l'on doit rompre dans le procédé de vaporisation. S'il en est ainsi, on devrait avoir :

$$\Delta E \approx \Delta V_{\text{vaporisation}}$$

Expérimentalement EYRING a trouvé pour un grand nombre de molécules que :

$$\Delta V \approx V_{\text{vap.}} / 2,45$$

ce qui conduit à modifier les hypothèses concernant les déplacements d'une molécule dans une lacune qui ne devrait plus posséder un volume identique à celui occupé par l'espèce diffusante mais un volume plus restreint. Ceci est possible s'il existe une certaine coopérativité entre l'espèce qui migre et le milieu dans lequel elle se déplace.

Si l'on admet, en accord avec d'autres auteurs, cette équation qui définit en terme d'énergie d'activation la microviscosité, la question qui se pose à ce niveau est la suivante : y a-t-il modification du paramètre d'ordre (cf. § 1.1.3.4.) lors du déplacement moléculaire ? Si la réponse à cette question est non, ΔS_e est défini par la relation suivante :

$$T \Delta S_e = n S^2 \Delta E$$

de même :

$$\Delta E \approx [u (a^2 + \delta^2)^{1/2} - u(\delta)] S$$

Ainsi, la microviscosité doit-elle être une fonction complexe des potentiels d'interaction mis en jeu et du paramètre d'ordre S (cf. § 1.1.3.4.) qui joue un rôle important puisqu'intervenant aux puissances 2 et 3 dans un terme exponentiel :

$$\eta = (\delta/a)^2 n h \exp [(n S^2 \Delta E/RT) (1 + S)]$$

Si la réponse est oui, il doit y avoir une certaine modification du milieu pour que l'énergie d'activation soit inférieure à celle que l'on calcule ici.

On conçoit donc la difficulté que l'on a pour définir la viscosité moyenne. Il apparaît donc, que le concept de microviscosité membranaire n'a pas de signification précise. Il recouvre en effet un ensemble de faits étroitement liés les uns aux autres, ayant pour dénominateur commun de concerner les phénomènes dynamiques, à l'échelle moléculaire, dont les constituants moléculaires sont le siège.

Malgré leurs caractères flous, les concepts de fluidité et de microviscosité membranaires sont d'une grande utilité, à condition que les conditions expérimentales de la détermination des paramètres qui les caractérisent soient clairement précisées.

1.1.3.4. NOTION DE PARAMETRE D'ORDRE

La bicouche lipidique est un fluide ordonné, où l'orientation perpendiculaire des lipides au plan de la membrane est la plus probable. Ainsi, le paramètre d'ordre est un paramètre statistique à but descriptif exprimant sous la forme d'un coefficient le rapport entre une organisation théorique maximale (chaînes acyles perpendiculaires au plan de la membrane) et l'organisation réelle de la membrane.

Comme nous le verrons dans le § 1.1.2.2.1., la description des mouvements moléculaires dans une membrane constituée de phospholipides purs et identiques ne peut être obtenue qu'à la suite d'approches semi-quantitatives à cause de la complexité du problème.

Pour essayer toutefois d'atteindre des renseignements qui rendent compte à la fois des forces de liaison interphospholipidiques et des effets de leurs orientations relatives, on peut définir le potentiel intermoléculaire comme le produit d'une fonction de la distance entre les centres de gravité des molécules supposées proches de la forme d'un bâtonnet, à partir de la relation de MAIER et de SAUPE, 1958 :

$$y_{12} = u(r) \cdot (3 \cos^2 q_{12} - 1) / 2$$

où $u(r)$ est liée aux forces de dispersion de LONDON et q_{12} étant l'angle que font deux molécules entre elles.

En faisant la moyenne sur les différentes orientations possibles, on définit le paramètre d'ordre ou paramètre de ZWETKOFF par l'expression :

$$S = \langle 3 \cos^2 q_{12} - 1 \rangle / 2$$

avec les deux cas limites suivants :

$S = 1$, pour des orientations parfaitement parallèles,

$S = 0$, pour des orientations aléatoires (isotropie).

De plus, il est possible d'affiner cette notion et de déterminer le paramètre d'ordre en fonction de la distance par rapport à l'interface. En effet, en raison des fortes contraintes imposées par le squelette carboné du glycérol et la cohésion des têtes polaires, les mouvements des atomes proches de la périphérie de la bicouche sont très limités, alors que ceux-ci sont moins limités quand on se rapproche de la région hydrophobe centrale.

Lorsqu'on arrive dans la région centrale hydrophobe de la bicouche, il devient très difficile d'en déterminer l'ordre [VIRET et LETERRIER, 1986]. Seule reste accessible la mesure de fréquences moyennes des mouvements moléculaires (fréquences de corrélation de rotation : $n = KT/\eta V$), par la polarisation de fluorescence ou le marquage de spin. Ces méthodes font appel à des sondes extrinsèques (supposées sphériques), dont la mobilité rotationnelle est supposée rendre compte des mouvements au sein de la bicouche.

Le paramètre d'ordre n'est donc qu'une évaluation statistique de la position relative moyenne des éléments moléculaires constitutifs des systèmes organisés. En pratique, cependant, la diminution du paramètre d'ordre correspond à une augmentation de la mobilité moléculaire.

Ces résultats, (tout comme ceux qui impliquent d'autres méthodes physiques), ne sont valables que si la bicouche est assimilée à une surface plane infinie. Cette propriété a été mise en doute; en effet, des ruptures dans la bicouche pourraient intervenir en introduisant des coupures, en particulier dans les zones proches des phases de transition [CHARVOLIN, 1985].

1.1.3.5. RELATIONS ENTRE LA FLUIDITE ET LA COMPOSITION DE LA MEMBRANE

La fluidité membranaire est une propriété associée aux lipides. Elle est souvent utilisée pour décrire le degré de désordre des chaînes hydrocarbonées (informations structurales) et/ou le degré de facilité de leurs mouvements (informations dynamiques). Un seul paramètre physique n'est pas suffisant pour caractériser à la fois la structure et la dynamique des lipides. La fluidité membranaire représente ainsi, une série de paramètres : le "packing", la diffusion de rotation et de translation, la perméabilité et l'ordre. Les relations entre ces paramètres et les différents mouvements des constituants membranaires ne sont pas encore clairement définies et leur signification biologique n'est pas toujours bien comprise.

Dans ce paragraphe, nous rappellerons des études concernant des modulateurs naturels et essentiels de la fluidité membranaire, dans l'ordre croissant d'importance.

1.1.3.5.1. Le cholestérol

Le cholestérol est le facteur essentiel de diminution de la fluidité membranaire [KAUFFMANN, 1985; SHINITZKY, 1984; VIRIOT et al., 1983; VAN BLITTERSWIJK et al., 1981; CHAPMAN, 1973]. Dans les membranes artificielles, où la température de transition peut être mesurée et la microviscosité estimée, par une variété de techniques, le cholestérol a un effet faiblement fluidisant en dessous de la température de transition et un effet largement rigidifiant au dessus de cette température [ANTUNES-MADEIRA et MADEIRA, 1990; NEEDHAM et al., 1988; BACH et CHAPMAN, 1980; KAWATO et al., 1978; CHAPMAN, 1973]. Dans les membranes biologiques et dans les conditions physiologiques, le cholestérol impose aux phospholipides hétérogènes une "fluidité intermédiaire" [OLDFIELD et CHAPMAN, 1972] et entraîne le lissage ou la disparition des transitions de phase [MARBREY et STURTEVANT, 1976; PAPAHAADJOPOULOS et al., 1973]. En général, l'effet du cholestérol se manifeste par la rigidification de ces membranes, c'est-à-dire la diminution de la fluidité et l'augmentation de l'ordre moléculaire [MACDONALD et al., 1988; FIORINI et al., 1988; CASTUMA et BRENNER, 1986].

1.1.3.5.2. Le degré d'insaturation

L'introduction des doubles liaisons dans les chaînes acyles des phospholipides entraîne une configuration *cis* de ces chaînes, qui s'écartent ainsi les unes des autres. Ceci se traduit par une augmentation de la fluidité membranaire et une diminution de la température de transition [POPP-SNIJDERS et al., 1986; SHINITZKY, 1984; ROOZEMOND et URLI, 1981]. Cependant, aux degrés élevés d'insaturation, le changement de la fluidité est de moins en moins prononcé [STUBBS et al., 1981].

1.1.3.5.3. Les sphingomyélines

La quantité de sphingomyélines est l'un des paramètres les plus importants déterminant l'ordre structural des biomembranes, ceci est dû à leurs conformations rigides à la température physiologique [SHINITZKY, 1984; BARENHOLZ et THOMPSON, 1980].

1.1.3.5.4. Les phosphatidyléthanamines

Ces phospholipides sont connus pour leur effet rigidifiant, dû principalement, à deux propriétés structurales des phosphatidyléthanamines : le groupement amine primaire peut former des liaisons hydrogènes avec le groupement phosphate adjacent et l'éthanolamine présente un encombrement stérique faible [HIRATA et AXELROD, 1980].

1.1.3.5.5. Les protéines

Les protéines membranaires peuvent être présentées comme des structures rigides dans une matrice fluide; ainsi, le mouvement des lipides à proximité des protéines peut être nettement affaibli par l'augmentation de la microviscosité locale. En effet, l'effet des protéines sur la dynamique des lipides est tout à fait similaire à celui du cholestérol, elles rigidifient et augmentent l'ordre des bicouches lipidiques à l'état fluide et agissent inversement quand les lipides sont à l'état de gel. Dans le chapitre 1.1.4.2., nous développerons les interactions des protéines avec les lipides et dans la partie 3.2. nous décrirons plus en détail les interactions des deux protéines membranaires retenues pour nos études (GGT et $[Na^+,K^+]$ -ATPase).

1.1.4. INTERACTIONS AVEC LES PHOSPHOLIPIDES

1.1.4.1. INTERACTIONS AVEC D'AUTRES LIPIDES

Comme nous l'avons déjà fait remarquer, pour éviter la complexité de la structure membranaire, on peut choisir des membranes artificielles constituées de phospholipides

purs, comme modèle de la matrice lipidique des membranes biologiques. Et tout d'abord, on les assimilera à des liquides bidimensionnels, par conséquent, on ne tiendra compte ni des interactions locales des chaînes hydrocarbonées, ni de leur flexibilité relative, ni enfin des interactions entre couches.

1.1.4.1.1. Description des déplacements

Un tel système a été étudié par EIMEIS et FEHDER, 1970, dans le cadre d'une étude plus générale des réactions dont la cinétique est limitée par la diffusion. On suppose que la diffusion relative de deux molécules peut être représentée par un coefficient qui est juste la somme des coefficients de diffusion entre deux espèces d'intérêt. Cette approximation correspond à l'absence de corrélation entre les déplacements (fonction du temps) des deux molécules et entre leur position et vitesses relatives [ANDRE et al., 1979, 1978].

Cette hypothèse qui est bien vérifiée pour des distances intermoléculaires élevées (plusieurs dizaines d'Å) ne l'est plus aux courtes distances (quelques Å). Il doit exister en effet un aspect coopératif à l'échelle moléculaire entre les déplacements des molécules.

A partir de potentiels d'interaction simples du type LENNARD-JONES, il a été possible à ces auteurs de décrire les déplacements dans un liquide bidimensionnel (cf. figures 1.1.10. et 1.1.11.). La figure 1.1.10. en particulier, met en évidence l'existence de trous irréguliers dont la durée d'existence peut être très supérieure au temps de relaxation caractéristique du fluide.

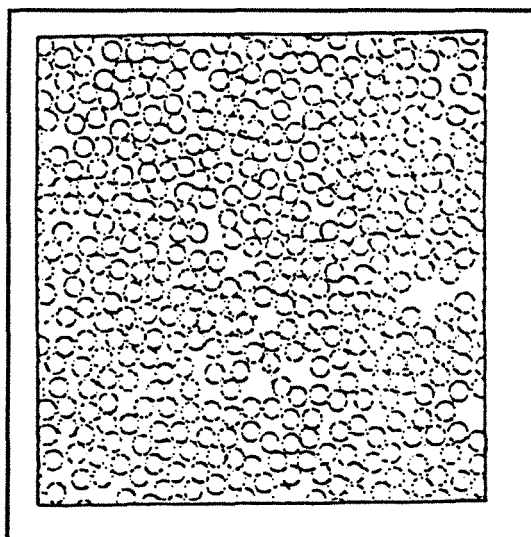


Figure 1.1.10.

Exemple de configuration instantanée d'un fluide bidimensionnel.

Les particules sont tracées avec un diamètre σ correspondant à celui utilisé dans l'expression de LENNARD-JONES.

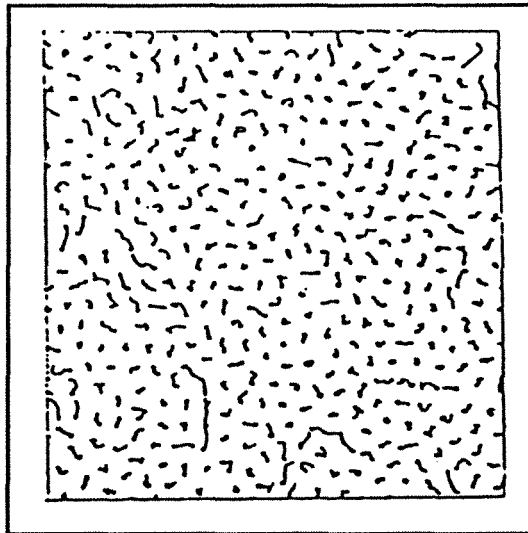


Figure 1.1.11.

Exemple de trajectoire des particules dans un fluide bidimensionnel.

Des trajectoires présentées sur la figure 1.1.11., on peut tirer les conclusions suivantes :

- * les déplacements sont plus importants, en général, au voisinage d'un trou,
- * des déplacements concertés existent conduisant également à des transferts de matière élevés.

Ce type de résultat conforte d'un point de vue quantitatif les modèles diffusionnels déjà proposés, en particulier pour des solides (cf. figure 1.1.12.).

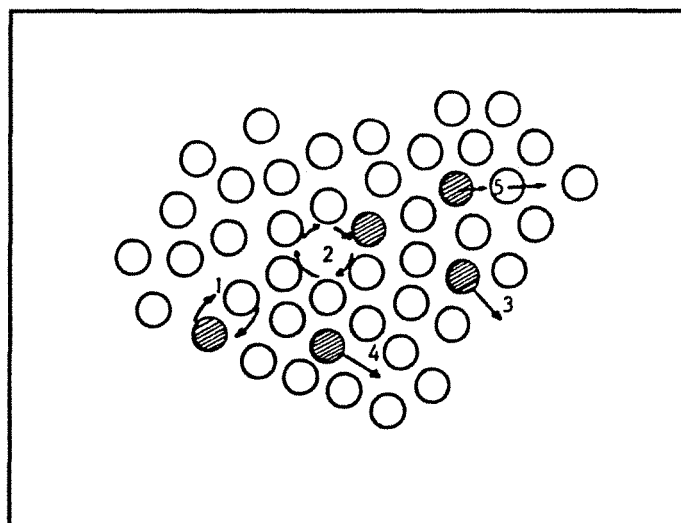


Figure 1.1.12.

Représentation schématique des principaux mécanismes de diffusion.

- 1) échange simple; 2) échange cyclique; 3) diffusion par lacune (totale ou partielle);
- 4) diffusion directe dans un interstice; 5) diffusion indirecte dans un interstice.

Pour des températures inférieures à la température de transition T_M d'une bicouche lipidique contenant des phospholipides identiques, avec des queues hydrophobes saturées, la taille moyenne des molécules est de l'ordre de 4,2 Å (cf. figure 1.1.13.) [NAGLE, 1980].

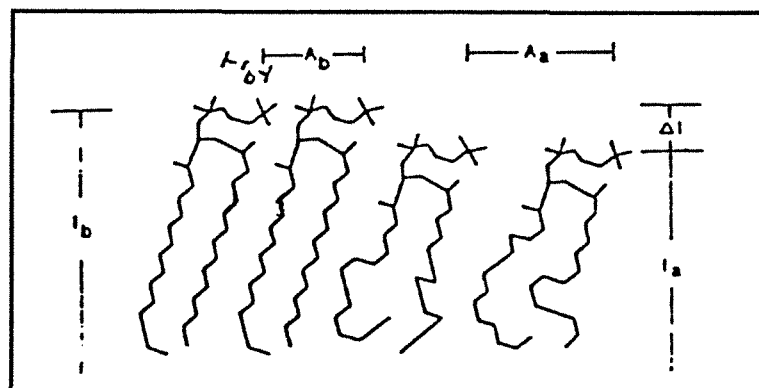


Figure 1.1.13.

Représentation schématique d'une demi-bicouche lipidique de DMPC
(avec 14 carbones par chaîne) mettant en évidence
l'influence du désordre local sur l'espace occupé par les phospholipides.

A des températures supérieures à la température de transition, les chaînes lipidiques se déplacent dans un volume plus important, ce qui correspond schématiquement à une sorte de fusion de la chaîne hydrocarbonée.

Ainsi, pour des températures basses, inférieures à T_M , ces chaînes sont essentiellement en conformation "all-trans", même pour des molécules isolées. S'il n'existait pas d'interactions intermoléculaires, quand la température augmente, on devrait observer graduellement une augmentation du désordre moyen des chaînes (transitions trans-gauche). En particulier, si une chaîne lipidique doit tourner autour d'une liaison carbone-carbone, alors le groupe méthyle terminal va entrer en collision, lors de la rotation, avec les chaînes voisines qui sont en général très proches (4,8 Å). Ainsi, les rotations des chaînes correspondent nécessairement à des actions coopératives, qui impliquent un grand nombre de molécules. Comme on peut le constater, il s'agit ici d'un problème de mécanique statistique particulièrement ardu.

1.1.4.1.2. Types d'interactions

Néanmoins, il faut considérer les interactions qui existent entre les phospholipides et qui proviennent de divers facteurs :

a) *Des chaînes carbonées* [NAGLE, 1980] : les interactions hydrophobes entre les hydrocarbures et l'eau sont responsables des structures des bicouches membranaires. En général, quand la température est différente de 0 °C, l'agitation thermique tend à augmenter

le volume occupé par les phospholipides. Cette expansion est limitée en partie par cet aspect hydrophobe, mais surtout par des liaisons de type VAN DER WAALS qui sont responsables de la cohésion des chaînes lipidiques.

Pour connaître ce potentiel d'interaction, on détermine le volume moyen occupé par un groupe "CH₂" et à partir de cette valeur on calcule la distance interchaînes r_b ou r_a . Ces valeurs sont utilisées ultérieurement pour définir les énergies d'interaction de VAN DER WAALS, qui sont de la forme :

$$U = A/4 \left[(r_0/r)^{25} - (r_0/r)^5 \right] \quad \text{avec } A \approx 1,84 \text{ Kcal/mole pour un groupe CH}_2$$

Il découle de ce calcul simplifié que cette énergie est fonction du domaine spatial concerné : près des têtes polaires ou des extrémités des chaînes lipidiques. D'après ce résultat, la cohésion de la membrane doit se traduire en un terme fonction de la zone spatiale considérée comme l'ont vérifié des expériences de résonance paramagnétique électronique qui illustrent ces considérations.

b) De la flexibilité des chaînes [ANDRE et al., 1983] : si l'on cherche à représenter un phospholipide autrement que par un cylindre rigide à base circulaire, on peut montrer que la flexion des chaînes phospholipidiques peut participer aux déplacements d'une sonde même au-dessous de la température de transition (cf. figure 1.1.14.).

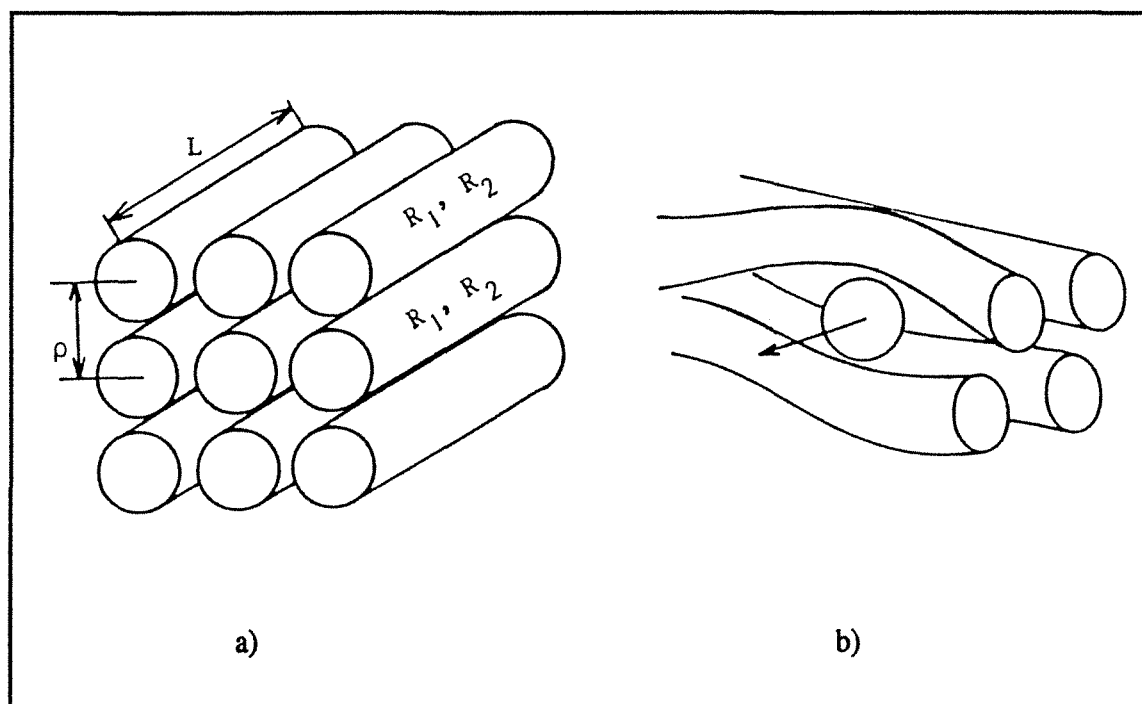


Figure 1.1.14.

Représentation schématique de phospholipides. a) arrangement "idéal"
b) déplacement dépendant de la flexibilité des chaînes lipidiques R_1 et R_2 .

c) Des interactions entre les têtes polaires [NAGLE, 1980] : à part les interactions que nous avons mentionnées ci-dessus, il en existe un grand nombre d'autres entre les groupes carbonyles, les liaisons du glycérol et dans les lécithines, les groupements des têtes phosphatidylcholines. Ces interactions concernent :

- * des interactions dipolaires, et pour le cas de lipides chargés, monopolaires,
- * des interactions de volume exclu,
- * des liaisons hydrogène entre les groupes phosphate, éthanolamine, etc...,
- * des forces de VAN DER WAALS non spécifiques.

Ce type d'interactions ne peut en général être négligé de celles concernant les chaînes polyméthyléniques car lorsqu'on change les groupes des têtes polaires, on peut observer des changements dans les températures de transition qui peuvent atteindre 20 °C, ce qui est très important, surtout en biologie. Toutefois, le phénomène essentiel concerne les chaînes hydrophobes (un décalage de 20 °C pour la température de transition correspond approximativement à remplacer la chaîne hydrocarbonée à n carbones par une chaîne à n+2 carbones).

d) Des interactions entre les deux monocouches de la membrane [NAGLE, 1980] : le fait que des monocouches et des bicouches ont des températures de transition très proches fait qu'en général on néglige pratiquement les interactions entre couches. Toutefois, il ne doit pas toujours en être de même pour les lipides à chaînes hydrocarbonées à nombre de carbones variable.

1.1.4.2. INTERACTIONS AVEC DES PROTEINES

La plupart des membranes biologiques sont composées approximativement, de 50 % de lipides et de 50 % de protéines et ce sont les interactions protéines-lipides qui sont responsables de nombreuses fonctions physiologiques. Ceci est dû, d'une part à l'influence des protéines sur les propriétés structurales et dynamiques de la membrane et, d'autre part, à la nécessité des lipides pour le fonctionnement de la majorité des systèmes enzymatiques membranaires.

Ainsi, une meilleure connaissance de ces interactions est la clef de la compréhension de nombreux processus biologiques.

A présent, il est très important de s'intéresser, non seulement, aux changements fonctionnels et conformationnels des protéines quand elles sont associées à la membrane, mais aussi à l'effet que ces protéines peuvent avoir sur la structure et l'organisation membranaires, les deux aspects ont un grand intérêt pour comprendre les implications des interactions lipides-protéines.

Nous rappellerons que dans notre travail, nous nous sommes intéressés particulièrement à ce dernier aspect en étudiant l'influence de deux protéines : la GGT et la (Na⁺,K⁺)-ATPase, sur la cohésion membranaire.

D'un point de vue plus général, nous citerons quelques exemples d'étude en rappelant la classification des protéines membranaires et en regroupant sous forme de tableau (cf. tableau 1.1.3.) les résultats les plus marquants.

1.1.4.2.1. Classification des protéines membranaires

Les protéines membranaires sont classées en protéines intrinsèques, appelées aussi intégrales et protéines extrinsèques ou périphériques. Cependant, bien que cette classification soit habituellement utilisée, elle ne reflète pas le fait que les protéines extrinsèques sont associées à la membrane de deux manières. Elles sont, soit adsorbées à la membrane soit ancrées dans celle-ci. Ainsi, nous considérons trois classes de protéines membranaires : intrinsèques, ancrées et adsorbées.

a) Les protéines intrinsèques

Les protéines de ce groupe, hydrophobes, se situent à l'intérieur de la membrane ou sont trans-membranaires. Leur extraction nécessite des concentrations élevées de détergents.

L'insertion de ces protéines dans des liposomes peut se réaliser de différentes façons. En effet, des protéines telles que le cytochrome b_5 , peuvent s'insérer spontanément en absence de détergents [HOKIN et DIXON, 1979; STRITTMATTER et al., 1978]. D'autres nécessitent la présence de composés inducteurs de l'incorporation. Ainsi, les insertions de la bactériorhodopsine, de la cytochrome oxydase et de l'UDP-glucuronosyltransférase dans des liposomes de DMPC sont facilitées par l'addition de myristate ou de cholestérol [JAIN et ZAKIM, 1987; SCOTTO et ZAKIM, 1986, 1985; LETO et al., 1980; DOWNER et al., 1976].

Cependant, les techniques usuelles pour la reconstitution des protéines dans des liposomes sont la dialyse et la filtration sur gel du cholate [HERMONI-LEVINE et RAHAMIMOFF, 1990; SUNAMOTO et al., 1990; MOSSA et al., 1989; AMLER et al., 1987; INGELMAN-UNBERG et GLAUMANN, 1980].

Enfin, il semble qu'aucune propriété intrinsèque de la bicouche lipidique ne soit considérée comme importante pour l'incorporation des protéines intrinsèques dans les bicouches phospholipidiques [RAPOPORT et WIEDMANN, 1985; VON HEIJNE, 1985; WICKNER, 1979].

Bien que l'incorporation des protéines intrinsèques dans des membranes lipidiques modifie la fluidité membranaire, la température de transition de phase n'est pas significativement affectée. En outre, ces protéines provoquent, généralement, une augmentation de l'enthalpie de transition [PAPAHADJOPOULOS et al., 1977, 1975].

b) Protéines ancrées

Ces protéines, telles que la GGT [MATSUDA et al., 1983], sont généralement attachées à la face interne ou externe de la membrane par une queue hydrophobe qui permet leur ancrage dans la membrane. Cependant, la phospholipase A₂, protéine soluble dans l'eau est ancrée à la membrane, essentiellement par des interactions ioniques, bien que le système protéines-bicouche lipidique montre plusieurs caractéristiques d'interactions hydrophobes [JAIN et ZAKIM, 1987].

Cette classe de protéines induit une diminution, aussi bien, de la température que de l'enthalpie de transition des bicouches lipidiques [PAPAHADJOPOULOS et al., 1977, 1975].

c) Protéines adsorbées

Les protéines de ce groupe, telles que la spectrine érythrocytaire, sont hydrophiles et ont la propriété d'être faiblement liées à la membrane, essentiellement par des interactions ioniques. Elles sont solubilisées facilement par variation de la force ionique. Ces protéines associées aux bicouches lipidiques, augmentent leur enthalpie de transition [PAPAHADJOPOULOS et al., 1977, 1975]. Cependant, leur effet sur la température de transition est généralement modeste [BOGGS, 1983].

1.1.4.2.2. Interaction protéines-lipides : principaux résultats

L'interaction des protéines avec les lipides membranaires est un aspect de la recherche sur les biomembranes qui présente actuellement un intérêt grandissant car elle permet une meilleure compréhension de la membrane biologique et de ses propriétés dynamiques.

Nous avons analysé et regroupé les principaux résultats (tableau 1.1.3.) des plus récentes publications concernant les études des interactions protéines-lipides.

Plusieurs observations peuvent être dégagées de cette analyse :

- * aussi bien des peptides de petites tailles obtenus par synthèse chimique, que de grosses protéines purifiées ont fait l'objet de différents travaux,
- * de nombreux auteurs se sont intéressés à tester des peptides utilisés comme médicaments tels que la cyclosporine A, l'insuline et la gramicidine,
- * la diversité des techniques et des systèmes membranaires utilisés,
- * enfin, des résultats contradictoires sont parfois rencontrés. Ainsi, au contraire de divers travaux [DUTTA-ROY et al., 1985; BRYSEWSKA et al., 1983; LULY et al., 1981] ceux de LULY et al., 1979, montrent un effet rigidifiant de l'insuline. L'utilisation de la mélittine conduit à des résultats différents; LAVIALLE et al., 1980, ont mis en évidence l'existence de deux transitions de phase pour le complexe mélittine-DMPC, alors que PRENDERGAST et al., 1982, ne mentionnent qu'une seule transition de phase à 31 °C.

Tableau 1.1.3.
Interactions protéines-lipides.

Protéine ou polypeptide	Système lipidique	Rôle sur la microviscosité	Techniques et observations	Références
Ca ²⁺ -ATPase	Réticulum endoplasmique		Polarisation de fluorescence L'ATPase est entourée d'une couche lipidique hautement ordonnée (lipides liés) et d'une couche secondaire, moins ordonnée.	LENTZ et al., 1982
	Réticulum sarcoplasmique		RPE La mobilité des protéines dépend directement de la fluidité lipidique.	SQUIER et al., 1988
(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺)-ATPase	DMPC	/	DSC, Polarisation de fluorescence La protéine provoque un élargissement de la transition de phase du DMPC et une augmentation de l'anisotropie de fluorescence du DPH.	CHAPMAN et al., 1979; GOMEZ-FERNANDEZ et al., 1979
(Na ⁺ , K ⁺)-ATPase	Membranes naturelles enrichies en ATPase		RPE La mobilité des chaînes lipidiques est gênée de manière significative par l'interaction avec la protéine.	ESMANN et al., 1988

	PC		Activité enzymatique Baisse de l'activité enzymatique quand la longueur des chaînes acylées augmente.	MARCUS et al., 1986; CHARNOCK et al., 1983
(Na ⁺ , Mg ²⁺)-ATPase	DMPC PC		DSC, Activité enzymatique La reconstitution de l'enzyme dans les vésicules entraîne une augmentation de l'activité enzymatique et un élargissement de la transition de phase des phospholipides.	GEORGE et al., 1990, 1985
Bactériorhodopsine	DMPC	↗	Polarisation de fluorescence Augmentation linéaire du paramètre d'ordre avec la concentration en protéine. L'ordre augmente pour une distance supérieure à 40 Å.	REHOREK et al., 1985
	DMPC POPC	↗	Polarisation de fluorescence La protéine entraîne un environnement hétérogène du DPH. L'anisotropie du DPH augmente avec la présence de la protéine.	WILLIAMS et al., 1990
Cyclosporine A	DPPC	↗	RMN, DSC La cyclosporine A provoque une augmentation du paramètre d'ordre. La cyclosporine A serait localisée le long des chaînes acylées des phospholipides.	WIEDMANN et al., 1990
Cytochrome b ₅	DMPC POPC	↗	Polarisation de fluorescence La protéine entraîne une augmentation de l'anisotropie de fluorescence du DPH.	WILLIAMS et al., 1990

	DPPC	↗	Polarisation de fluorescence La T_M n'est pas affectée par de fortes concentrations en protéine.	DUFOURCQ et al., 1984
Cytochrome oxydase	Cardiolipines		RMN, RPE La présence de la protéine stabilise la phase lamellaire des cardiolipines, en empêchant les transitions en phase hexagonale inversée, induites par les sels.	POWELL et al., 1990
	DMPC POPC	↗	Polarisation de fluorescence L'anisotropie du DPH augmente avec la concentration en protéine.	WILLIAMS et al., 1990
	DMPC		Calorimétrie Le système DMPC/protéine subit des changements conformationnels : le premier est propre à l'enzyme et le second est attribué à la transition de phase des lipides.	KAWATO et al., 1980
Facteur α (phéromone tridécapeptide)	DPPC DOPC DSPC DOPE		RMN Présence d'interactions entre le peptide et les têtes polaires des phospholipides.	JELICKS et al., 1989
Ferricytochrome C	DPPC		Raman Perturbation de la structure de la bicouche lipidique à faible concentration en protéine ($< 10^{-4}$ M). A des concentrations supérieures à 10^{-4} M, la T_M est significativement altérée.	VINCENT et al., 1988

Gramicidine A	DMPC		RMN Effet ordonnant à faible concentration et désordonnant à forte concentration en protéine.	RICE et al., 1979
	DMPC LPPC		RMN Dans les vésicules de DMPC à l'état fluide la diffusion de rotation de la protéine est importante (2.10^{-7} s), alors qu'à l'état de gel, la protéine est immobilisée. La mobilité de la protéine dépend de la nature chimique et physique des lipides utilisés.	Mc DONALD et SEELIG, 1988
	DPPC DMPC	↑	Fluorescence, IR La gramicidine A entraîne une baisse de l'ordre en-dessous de T_M et une augmentation de l'ordre au-dessus de T_M .	CORTIJO et al., 1982
	PC		Rayons X, RMN La gramicidine A induit une organisation hexagonale des phospholipides dans lesquels elle est incorporée.	VAN ETCHELD et al., 1982
Gramicidine D	DMPC POPC	↑	Polarisation de fluorescence L'anisotropie de fluorescence du DPH augmente avec la concentration en protéine.	WILLIAMS et al., 1990
Glycophorine	DMPC	↑	RPE, Polarisation de fluorescence Le paramètre d'ordre commence par diminuer à faible concentration en protéine puis augmente linéairement avec la concentration en protéine.	PINK et Mac DONALD, 1986

3 β -Hydroxystéroïde deshydrogénase	Membrane mitochondriale	/	Polarisation de fluorescence La protéine a un effet rigidifiant s'ajoutant à celui du cholestérol.	DEPAILLERETS et al., 1984
Insuline	Membrane plasmique de foie de rat	/	Fluorescence du pyrène L'insuline entraîne une diminution du coefficient de diffusion latérale du pyrène dans la membrane.	LULY et al., 1979
	Membranes d'érythrocytes	↘	Polarisation de fluorescence Réduction significative de la microviscosité membranaire par l'addition de l'insuline.	DUTTA-ROY et al., 1985
		↘	Fluorescence du pyrène L'insuline entraîne une augmentation de la fluidité membranaire.	LULY et al., 1981
		↘	Fluorescence du pyrène L'insuline entraîne une augmentation significative de la mobilité latérale du pyrène, mais ne produit pas de changement de conformation des protéines membranaires.	BRYSEWSKA et LEYKO, 1983
α -Lactalbumine	DMPC	/	Polarisation de fluorescence, DC A pH 8, l'interaction entre les vésicules et la protéine est restreinte. A pH 6 et 4, une forte interaction est observée.	HANSSENS et al., 1985

Mélittine	DMPC		Raman Mise en évidence de deux transitions de phase à 17 °C (des lipides purs) et à 29 °C (du complexe mélittine-lipides).	LAVIALLE et al., 1980
	DMPC	/	Rayons X, Raman, Polarisation de fluorescence T_M n'est pas fonction de la quantité en protéine ajoutée. En phase rigide la mélittine n'a pas d'effet sur l'anisotropie de fluorescence du DPH, alors qu'en phase fluide cette anisotropie est augmentée par la mélittine.	VOGEL, 1981
	DMPC		Polarisation de fluorescence Mise en évidence d'une seule transition de phase à 31 °C. A concentration élevée en protéine, la transition s'élargit puis disparaît.	PRENDERGAST et al., 1982
	DMPC DMPS POPG		RMN du ^{31}P et du ^2H La protéine entraîne un changement de la conformation des têtes polaires des phospholipides, dû à la charge électrique de la protéine.	DEMPSEY et al., 1989; KUCHINKA et SEELIG, 1989
	DPPC	/	Fluorescence L'addition de la mélittine à des bicouches de DPPC provoque une augmentation de T_M . Mise en évidence de zones rigides à concentration faible en mélittine.	GALLA et al., 1978

Mélittine (suite)	PC		RPE La mélittine entraîne l'élargissement de la transition de phase des PC, lorsque des acides gras marqués par le groupement doxyle (localisé près de la surface des bicouches) est utilisé. L'ordre dans le feuillet intérieur reste inchangé.	SCHULZE et al., 1987
	POPG POPC		RMN, DC Aucun complexe mélittine - POPG n'est détecté. Les têtes "phosphoglycérol" sont moins affectées par la mélittine que celles des cholines.	BESCHIASCHVILI et SEELIG, 1990
Poly(L-lysine)	DMPC DMPA		Raman Augmentation de la stabilité de la matrice des chaînes acylées par le polypeptide.	LAROCHE et al., 1988
Protéine basique de Myéline	DPC/APLP		RMN, DC Mise en évidence de sites différents d'interaction de la protéine avec le détergent anionique et avec le détergent neutre. Ces interactions limitent la formation d'hélices.	MENDZ et al., 1990
	Lyso LPC Lyso LPE		DC, Dialyse à l'équilibre L'association du lysolipide avec la protéine commence en-dessous de la CMC et continue au-delà de cette concentration.	GOW et al., 1990

1.1.4.3. INTERACTIONS AVEC DES DROGUES

De nombreuses drogues et particulièrement des substances médicamenteuses affectent l'organisation structurale des membranes. La compréhension des interactions des drogues, hormones, peptides et vitamines avec la membrane est nécessaire, pour pouvoir expliquer en partie leurs mécanismes d'action.

L'interaction de nombreuses drogues avec les biomembranes joue un rôle vital dans leurs actions biologiques. Ainsi, la capacité de certaines molécules à atteindre leurs récepteurs est fonction de leur transport à travers la membrane ou le long de la membrane [BONTING, 1981]. En outre, la conformation acquise par certaines drogues dans la phase lipidique peut être la clef de leurs activités biologiques.

Il a été observé que le mode d'interaction des drogues avec la membrane dépend en grande partie de leur localisation dans les bicouches lipidiques [SRIVASTAVA et al., 1990].

De nombreux travaux ont été effectués pour comprendre les interactions drogues-lipides, nous présentons quelques exemples dans le tableau 1.1.4. où nous désignons par drogue toute substance chimique dotée ou non d'une action pharmacologique.

Pour notre travail, nous avons testé l'effet d'un médicament : la cyclosporine A (*in vitro*) (cf. § 3.3.) et d'une classe d'hormone : la thyronine et composés thyromimétiques apparentés (*in vivo*) (cf. § 3.1.), sur les propriétés physiques et thermiques de la membrane.

Tableau 1.1.4.
Interactions drogues-lipides.

Drogues		Système lipidique	Techniques et observations	Références
Fonction	Substance			
Anesthésiques	Ethanol	Membranes plasmiques de levure DMPC	Perméabilité passive à l'acide acétique, Polarisation de fluorescence : DPH et TMA-DPH Cet alcool augmente la fluidité membranaire et diminue la température de transition de phase (T_M). Son effet est plus important dans le centre hydrophobe qu'à la surface de la membrane. Il agit sur les bicouches lipidiques à une concentration inférieure aux doses pharmacologiques.	HITZEMANN, 1989; RODNEY et GREENFIELD, 1987; VEIRO et al., 1987; HARRIS et SCHOEDER, 1982
	Butanol	Dispersions lipidiques de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	RPE, Polarisation de fluorescence : DPH et TMA-DPH Le butanol entraîne une augmentation de 20 à 30 % de la fluidité des membranes de <i>Clostridium acetobutylicum</i> .	HITZEMANN, 1989; BAUT et al., 1988; VOLLHERBST-SCHNECK et al., 1984;
	Alcool benzylique	Erythrocytes intacts et membranes d'érythrocytes Membranes plasmiques de cortex de bovins	RPE, Polarisation de fluorescence : DPH et TMA-DPH L'alcool benzylique provoque un changement progressif de la forme des érythrocytes, alors que la viscoélasticité membranaire est inchangée. De même, il entraîne une augmentation de la fluidité membranaire.	KITAGAWA et al., 1990; DEFORESTA et al., 1987; CHABANEL et al., 1985

Anesthésiques (suite)	cis et trans Tétradécanol	Lécithines/cholestérol	RPE, Polarisation de fluorescence : DPH L'isomère cis diminue T_M , alors que l'isomère trans l'augmente. Cependant, les deux isomères ont un effet fluidifiant.	MILLER, 1978
	Etomidate	DPPC	RMN, RPE L'étomidate provoque une diminution de T_M (d'environ 10 °C) quand il est présent en faibles quantités.	SRIVASTAVA et al., 1989
	Chlorpromazine	Membrane d'érythrocytes Erythrocytes intacts	RPE, Polarisation de fluorescence : DPH A faible concentration (10^{-6} M), la chlorpromazine est localisée dans la région hydrophile de la membrane, à concentration moyennement élevée (10^{-3} M), la drogue atteint la région hydrophobe et à concentration élevée la membrane est détruite.	LETERRIER et al., 1977; SALESSE et al., 1982(a), 1982(b)
Agents anticancéreux	Doxorubicine (adriamycine)	Cellules cancéreuses de rat en culture	Polarisation de fluorescence : DPH et TMA-DPH L'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH dans les membranes plasmiques des cellules cancéreuses sensibles à la doxorubicine est inférieure à celle trouvée dans les membranes de cellules résistantes. Cependant, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence une corrélation positive entre la fluidité membranaire et la résistance aux agents antimétaboliques.	CARBONNEAU et al., 1987

Agents anticancéreux (suite)	Mitomycine et adriamycine	Cellules lymphoma RDM4 en culture	Polarisation de fluorescence : TMA-DPH Le traitement des cellules par les deux drogues entraîne des changements dans la composition lipidique, la fluidité membranaire et la taille des cellules. La polarisation de fluorescence du TMA-DPH diminue avec l'augmentation de la concentration des deux drogues. Cependant, pour des concentrations élevées, une rigidification apparente des membranes cellulaires est observée.	OTH et al., 1987
	Daunomycine	Membranes naturelles de <i>T. marmorata</i>	Polarisation de fluorescence : DPH et TMA-DPH A concentration faible, la daunomycine est localisée préférentiellement à la surface de la membrane. Par contre, à concentration élevée, elle est localisée à l'intérieur de la membrane.	FERRER-MONTIEL et al., 1988
Neurotransmetteurs	Norépinéphrine et épinéphrine	DPPC	RPE, RMN Les deux drogues entraînent une diminution de T_M d'environ 3,5 et 6,5 °C, respectivement. De même, elles provoquent une fluidification des bicouches lipidiques.	SRIVASTAVA et al., 1989
Anti-dépresseurs	Nitroxazépine et imipramine	DPPC	RPE, RMN La conformation des deux drogues est altérée quand elles sont introduites dans les bicouches lipidiques.	SRIVASTAVA et al., 1989

Immunosup- resseur	Cyclosporine A	DPPC	Polarisation de fluorescence : DPH et TMA-DPH, Fluorescence du P₃P La cyclosporine A n'entraîne pas de modification de la polarisation de fluorescence du DPH et du TMA-DPH, alors que le rapport I_E/I_M du P ₃ P est diminué par cette drogue	Présent travail
			RMN, DSC La cyclosporine A provoque une augmentation du paramètre d'ordre et serait localisée le long des chaînes acylées des phospholipides.	VEREB et al., 1990; WIEDMANN et al., 1990
Hypo- glycémiant	Insuline	Membranes d'érythrocytes	Polarisation de fluorescence du DPH Les concentrations physiologiques en insuline entraînent une réduction significative de la microviscosité membranaire.	DUTTA-ROY et al., 1985
Anticoagulant	Ticlopidine	Erythrocytes intacts Membranes d'érythrocytes	RPE Pour des concentrations pharmacologiques, les effets essentiels de la ticlopidine sont la protection des érythrocytes contre l'hémolyse hypotonique et l'augmentation de la fluidité membranaire. A concentration élevée ($> 5 \cdot 10^{-4}$ M), elle dénature les protéines membranaires.	DAVELOOSE et al., 1982

1.2. LA FLUORESCENCE

COMME METHODE D'INVESTIGATION

Parmi les techniques physiques d'investigation des propriétés des membranes, le GRAPP s'intéresse à des méthodes de spectroscopie d'émission moléculaire (qui font appel à des sondes fluorescentes généralement extrinsèques) et particulièrement à celles décrites ci-dessous, et utilisées pour nos études :

- * **la polarisation de fluorescence**, fondée sur la rotation de la sonde (diffusion rotationnelle),

- * **les réactions d'inhibition de fluorescence par formation de complexes intermoléculaires**, dont la cinétique est limitée par la diffusion de translation des espèces réagissantes (excimères intermoléculaires du pyrène),

- * **les réactions d'inhibition de fluorescence par formation de complexes intramoléculaires** de systèmes bichromophoriques, sensibles à la cohésion du milieu (excimères intramoléculaires du dipyrénylpropane).

Ces techniques tirent leur existence d'interactions à l'échelle moléculaire et conduisent parfois à des résultats d'interprétation délicate, cependant elles possèdent des avantages évidents de **sensibilité** et de **résolution** (spectrale, spatiale, temporelle et orientationnelle).

1.2.1. POLARISATION DE FLUORESCENCE

1.2.1.1. PRINCIPE

Outre son caractère corpusculaire, une radiation lumineuse peut être caractérisée par son champ électrique $\vec{E}$. Cette grandeur de nature vectorielle, possède une amplitude qui varie sinusoïdalement à la fréquence de l'onde lumineuse. Sa direction, dans le plan perpendiculaire à la direction de propagation, est soit fixe, l'onde est dite "polarisée rectilignement", soit distribuée au hasard, la lumière est alors dite "naturelle".

Lors du phénomène d'absorption, ce champ électrique interagit avec l'oscillateur dipolaire du moment d'absorption du chromophore $\vec{M}$. Ainsi, la probabilité d'absorption est proportionnelle à $\cos^2\theta$, où θ désigne l'angle entre $\vec{E}$ et $\vec{M}$ et la probabilité d'émission est proportionnelle à $\cos^2\theta'$, où θ' représente l'angle que font le champ électrique de l'onde lumineuse de fluorescence $\vec{E}'$ et le moment d'émission $\vec{M}'$ (cf. figure 1.2.1.).

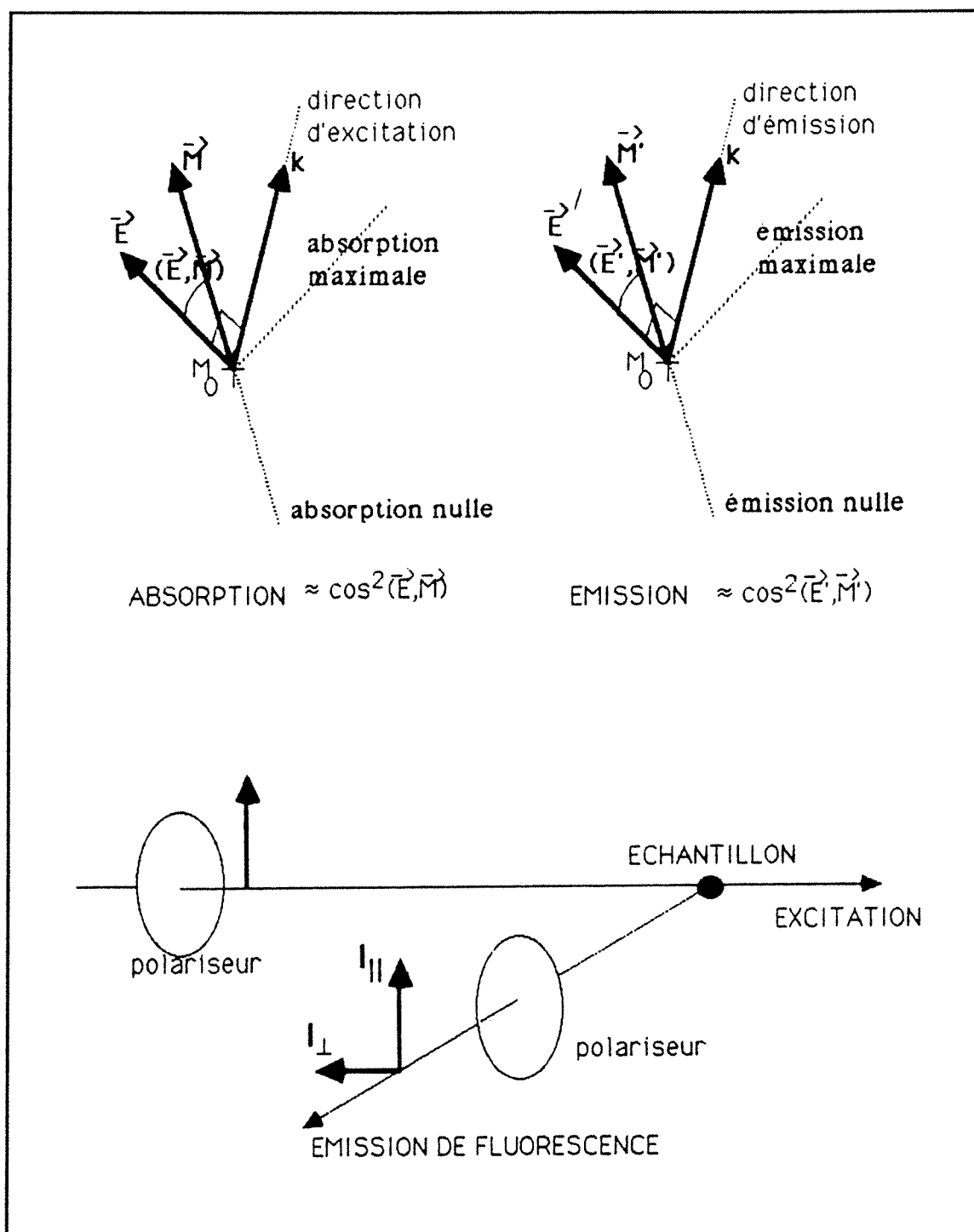


Figure 1.2.1.
Principe de la polarisation de fluorescence.

La probabilité de l'orientation de $\vec{E}'$ est alors déterminée pour une molécule excitée donnée par l'angle entre son moment d'émission $\vec{M}'$ et le champ électrique de la radiation émise $\vec{E}'$. L'orientation de $\vec{E}'$ est donc caractéristique de la position du chromophore au moment de l'émission.

1.2.1.2. APPLICATIONS A LA MESURE DE LA FLUIDITE

Les orientations relatives des moments d'absorption et d'émission sont fixes dans la molécule. La détermination de la distribution des orientations des champs électriques des ondes émises, c'est-à-dire de l'état de polarisation de la lumière de fluorescence, va alors, permettre la détermination de la mobilité de la sonde.

Ainsi, une excitation polarisée de molécules sondes n'est possible que pour des molécules ayant des positions spatiales données par rapport à l'excitation. Si la molécule est dans un milieu rigide, l'émission sera anisotrope; au contraire, dans un milieu infiniment fluide, la molécule pourra prendre une orientation quelconque et l'émission de fluorescence se fera avec la même probabilité dans toutes les directions de l'espace. Entre les deux, une dépolarisation intermédiaire sensible à la fluidité du milieu pourra être obtenue et corrélée à celle-ci.

1.2.1.2.1. Anisotropie moyenne

Le degré de polarisation est donné par l'équation suivante :

$$p = (I_{VV} - G I_{VH}) / (I_{VV} + G I_{VH})$$

où G représente un facteur de correction, lié à l'appareil, égal au rapport I_{HV}/I_{HH} lorsque l'excitation est polarisée horizontalement.

I_{VV} représente l'intensité de fluorescence relative lorsque l'excitation et l'émission sont polarisées verticalement.

I_{VH} représente, dans les mêmes conditions d'excitation, l'intensité de fluorescence relative lorsque l'émission est polarisée horizontalement.

On peut définir également l'anisotropie du milieu par :

$$r = (I_{VV} - G I_{VH}) / (I_{VV} + 2 G I_{VH})$$

$$\text{avec } I_{F_{\text{totale}}} = I_{VV} + 2 I_{VH}$$

Ainsi pour une dépolarisation totale où $I_{VV} = I_{VH}$, $p = 0$, $r = 0$; le milieu est alors très fluide.

1.2.1.2.2. Formule de PERRIN

En première approximation, c'est la formule de PERRIN, 1926, qui nous permet d'estimer la microviscosité des bicouches lipidiques.

En effet, d'après cette relation l'anisotropie de fluorescence est liée à la microviscosité de l'environnement lipidique par la relation :

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} = 1 + \frac{RT\tau}{V\eta}$$

où

r_0 est l'anisotropie initiale dans un état où la molécule émettrice est supposée être en équilibre,

$\langle r \rangle$ est l'anisotropie statique moyenne,

τ est la durée de vie de fluorescence du marqueur,

T est la température absolue,

V est le volume molaire de la sonde,

η est la microviscosité.

Ainsi, il faut remarquer que $1/\langle r \rangle$ varie linéairement avec $1/\eta$ pour une sonde donnée, lorsque la viscosité, η , du milieu varie. Cette relation est généralement vérifiée et permet, par extrapolation, d'atteindre la valeur de r_0 . Inversement, la mesure de $\langle r \rangle$ permet, connaissant τ , d'atteindre la valeur de η .

Cependant pour que l'anisotropie de fluorescence $\langle r \rangle$ varie proportionnellement à la microviscosité η , il est nécessaire que la durée de vie τ de la sonde soit constante.

1.2.1.3. MARQUEURS FLUORESCENTS UTILISES

1.2.1.3.1. DPH : 1,6-Diphényl-1,3,5-hexatriène, "all-trans"

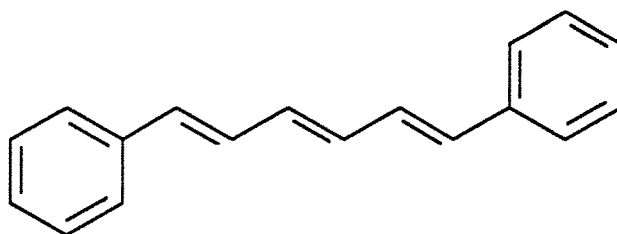


Figure 1.2.2.
Molécule de DPH.

La popularité du DPH (représenté dans la figure 1.2.2.), qui est la sonde la plus utilisée en polarisation de fluorescence pour l'étude de la structure, de l'organisation et de la dynamique des bicouches lipidiques, provient largement de ses propriétés photophysiques favorables à ce genre d'études [DALE et al., 1977; LAKOWICZ et al., 1976]. En effet, les

moments d'absorption et d'émission du DPH sont pratiquement colinéaires l'un par rapport à l'autre, d'une part et par rapport à l'axe de symétrie du marqueur d'autre part. Ceci fait du DPH un excellent marqueur pour l'étude de l'ordre dans les membranes puisqu'un petit déplacement de son axe de symétrie entraîne une dépolarisation de l'émission de fluorescence. En plus, peu fluorescent en milieu aqueux, le DPH s'incorpore assez facilement dans les membranes (cf. tableau 1.2.1. pour les applications principales).

Des avantages supplémentaires de son utilisation viennent de sa durée de vie de fluorescence (8 à 10 ns, selon l'environnement) qui permet l'utilisation de la spectroscopie résolue dans le temps et du rendement quantique de son émission de fluorescence élevé en milieu hydrophobe.

Cependant, en dépit de ces avantages, plusieurs difficultés sont liées à l'utilisation du DPH en polarisation de fluorescence :

- * sa localisation exacte dans les bicouches lipidiques n'est pas bien définie, on peut uniquement avancer l'hypothèse qu'il est localisé dans la région hydrocarbonée,
- * l'existence de zones de cohésion différentes dans la bicouche lipidique,
- * les modèles cinétiques de relaxation de transition utilisés ont parfois un aspect peu précis,
- * les potentiels chimiques locaux peuvent être variables selon l'environnement de la sonde,
- * sa possible photodégradabilité.

1.2.1.3.2. TMA-DPH : 1[4-(Triméthylammonium)phényl]-6-phényl-1,3,5-hexatriène

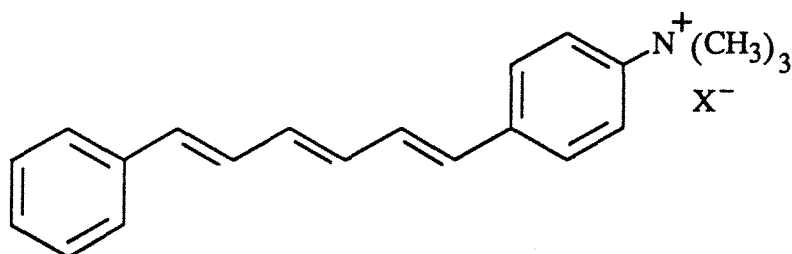


Figure 1.2.3.
Molécule de TMA-DPH.

Le TMA-DPH est un dérivé du DPH, qui grâce à sa structure (cf. figure 1.2.3.) peut

être à la fois hydrophile par son extrémité chargée positivement et hydrophobe par son extrémité hydrocarbonée aromatique. Son utilisation a été envisagée [KUHR Y et al., 1985; 1983; PRENDERGAST et al., 1981] puisque sa localisation dans la membrane semble être plus définie que celle du DPH. En effet, le TMA-DPH intercale sa partie apolaire entre les chaînes apolaires des lipides et sa tête polaire cationique au niveau des têtes polaires des phospholipides.

Cette sonde de part sa nature bipolaire diffuse beaucoup moins vite à travers toute la cellule que ne le fait le DPH et serait un marqueur membranaire plus sélectif que ne l'est le DPH [KUHR Y et al., 1983], dont une importante partie se localise dans les compartiments intracellulaires [BOUCHY et al., 1983].

Ces propriétés particulièrement importantes du TMA-DPH ont poussé ces dernières années, beaucoup d'auteurs à l'utiliser pour l'étude de la membrane plasmique des cellules intactes.

Nous présentons dans le tableau 1.2.1. les principaux travaux récents utilisant la polarisation de fluorescence du TMA-DPH, pour l'étude aussi bien, des membranes naturelles que des liposomes. En fait ce tableau 1.2.1. regroupe l'ensemble des résultats d'utilisation du DPH et du TMA-DPH. Ils sont classés par ordre chronologique de publication, commençant par les plus récents. Les articles moins récents sont décrits dans BEDDARD et WEST, 1981.

Tableau 1.2.1.
Utilisation du DPH et TMA-DPH, en excitations continue (c) et pulsée (p), pour l'étude de milieux organisés.

Références	Sonde fluorescente (c), (p)	Système lipidique	Observations
ANTUNES-MADEIRA et al., 1990	DPH (c)	DMPC	Etude comparative de l'effet du lindane sur les bicouches lipidiques par l'utilisation du DPH et du rapport I_E/I_M du pyrène.
ANTUNES-MADEIRA et MADEIRA, 1990	DPH (c)	DMPC DPPC DSPC	Suivi de l'altération de la fluidité membranaire par le DDT.
BEYERS et al., 1990	TMA-DPH (c) + (p)	Membranes plasmiques de plaquettes humaines	Le marquage des plaquettes par le TMA-DPH entraîne une augmentation rapide de l'intensité de fluorescence. Le TMA-DPH est localisé uniquement dans le feuillet extérieur de la membrane.

FEIJGE et al., 1990	DPH, TMA-DPH (c)	Plaquettes sanguines humaines	L'activation des plaquettes avec la thrombine augmente les valeurs d'anisotropie de fluorescence des deux sondes, alors que l'activation avec l'ionomycine entraîne une diminution de celles-ci. Les changements d'anisotropie dans les plaquettes intactes ne sont pas dus à une modification de la composition lipidique, mais à un changement des propriétés optiques des suspensions cellulaires, au moins en partie.
SCHULER et al., 1990	DPH (c)	PC de soja	Comparaison de l'effet de stérols de plantes (sitostérol, stigmastérol et campestérol) et du cholestérol sur la modulation de la fluidité des vésicules de phosphatidylcholine de soja.
TOPLAK et al., 1990	TMA-DPH (c)	Cellules en culture (fibroblastes, astrocytoma de cerveau de rat)	Etude des effets des conditions de culture et d'incubation sur la fluidité membranaire des cellules en cultures.
WILLIAMS et al., 1990	DPH (c) + (p)	DMPC POPC	L'effet de trois protéines membranaires différentes sur l'hétérogénéité de la durée de vie de fluorescence du DPH dans des vésicules de phospholipides est étudié.
HITZEMANN, 1989	DPH, TMA-DPH (c)	DMPC	Etude comparative de l'effet de molécules non électrolytes sur les propriétés physiques des liposomes de DMPC.

TROTTER et STORCH, 1989	PA-DPH (Acide DPH- propionique) (c) + (p)	DMPC DMPG	La charge négative du PA-DPH est caractérisée par comparaison avec le DPH et le TMA-DPH. Comme le TMA-DPH, le PA-DPH est localisé à la surface de la membrane par sa charge, mais il caractérise des régions plus profondes de la bicouche que le TMA-DPH.
DICKENS et al., 1988	DPH (c)	Erythrocytes intacts et membranes d'érythrocytes isolées	L'anisotropie de fluorescence apparente du DPH est plus faible dans les érythrocytes intacts que dans les membranes d'érythrocytes isolées. Ceci serait dû à la diffusion intense de la lumière par les cellules intacts.
FERRER -MONTIEL et al., 1988	DPH, TMA-DPH (c)	Membranes naturelles de <i>T-marmorata</i>	L'association de la daunomycine à la membrane et sa localisation dans la bicouche lipidique sont étudiées. A faibles concentrations, la drogue est localisée à la surface de la membrane, alors qu'à fortes concentrations, elle atteint l'intérieur de la membrane.
FIORINI et al., 1988	DPH (c)	Membranes d'érythrocytes	Utilisation du déclin de fluorescence du DPH pour l'étude de l'effet du cholestérol sur la microhétérogénéité de la membrane érythrocytaire.
Mc DONALD et al., 1988	DPH (c)	DLPC Microsomes de foie de rat	L'altération de la fluidité membranaire par la température, la pression et le cholestérol est étudiée par comparaison entre l'utilisation du rapport I_E/I_M du pyrène et la polarisation de fluorescence du DPH.
PLASEK et al., 1988	DPH (c)	Membranes intacts d'érythrocytes	Etude de la fluidité de membranes d'érythrocytes intacts en tenant compte du transfert d'énergie de fluorescence du DPH à l'hémoglobine.

SHERIDAN et BLOCK, 1988	DPH, TMA-DPH (c)	Vésicules de membranes plasmiques de cellules endothéliales	Etude de la relation entre le transport de la sérotonine à travers la membrane et la fluidité membranaire.
SHERIDAN et BLOCK, 1988	TMA-DPH (c)	Cellules endothéliales intactes	La pression d'oxygène diminue la fluidité membranaire.
WILLIAMS et STUBBS, 1988	DPH (p)	POPC phospholipides microsomaux Membranes de microsomes intacts	Etude des propriétés influençant les distributions des durées de vie du DPH dans les bicouches lipidiques.
AMIER et al., 1987	TMA-DPH (c)	Liposomes contenant la (Na ⁺ ,K ⁺)-ATPase	Etude de l'effet du magnésium sur le paramètre d'ordre des phospholipides et sur la conformation de la (Na ⁺ ,K ⁺)- ATPase.
BEST et al., 1987	DPH, TMA-DPH (c) + (p)	DPPC DMPC	Détermination de l'ordre et de la fluidité membranaire par le déclin de l'anisotropie de fluorescence.
CARBONEAU et al., 1987	DPH, TMA-DPH (c)	Cellules cancéreuses de rat en culture	Pas de corrélation positive entre la fluidité et la résistance membranaire aux radiations ionisantes et aux agents antimitotiques.
DE FORESTA et al., 1987	DPH, TMA-DPH (c)	Membranes plasmiques de cortex surrénal de bovins	Etude de l'effet de la température et de l'alcool benzylique sur la fluidité membranaire et sur la structure et l'activité de l'adénylate cyclase des membranes plasmiques.

FIORINI et al., 1987	DPH (p)	DPPC DMPC	Etude des distributions de la durée de vie du DPH dans les vésicules de phospholipides.
KUBINA et al., 1987	TMA-DPH (c) + (p)	Plaquettes humaines	Investigation parallèle de la cinétique de l'exocytose et des changements de la fluidité membranaire.
MULLER et al., 1987	DPH, TMA-DPH (c)	Lymphocytes Granulocytes Monocytes	Les populations cellulaires dont les propriétés fonctionnelles sont différentes présentent une fluidité différente.
OTH et al., 1987	TMA-DPH (c)	Cellules lymphoma RDM4 en culture	Etude de l'effet de l'adriamycine et la mitomycine C sur la composition lipidique, la taille, la fluidité membranaire et la perméabilité des cellules lymphoma RDM4 en culture.
BRONNER et al., 1986	DPH, TMA-DPH (c)	Cellules mastoïdiennes de rat	Suivi de la cinétique de l'exocytose.
CASTUMA et BRENNER, 1986	DPH (c)	Microsomes de foie de rat	Etude de l'influence du cholestérol dans l'apport nutritionnel sur la dynamique membranaire, en relation avec l'effet sur la composition membranaire et sur les propriétés cinétiques de l'UDP-glucuronosyltransférase.

1.2.2. REACTIONS D'INHIBITION DE FLUORESCENCE PAR FORMATION D'EXCIMERES INTERMOLECULAIRES DU PYRENE

1.2.2.1. MECANISME

La fluorescence du pyrène (cf. figure 1.2.4.) a une large application dans l'étude des modèles membranaires, des membranes biologiques et des membranes de cellules entières, en particulier l'étude de la microviscosité membranaire et des transitions des bicouches lipidiques.

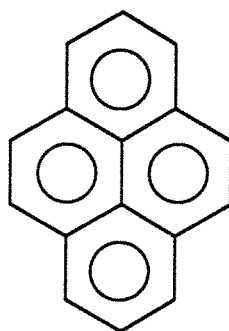


Figure 1.2.4.
Molécule de pyrène.

Les mesures sont basées sur la propriété du pyrène de former des excimères intermoléculaires [PARKER, 1968]. En effet, si un monomère excité entre en collision avec un monomère stable, un dimère ou un excimère est formé.

La désactivation de l'excimère par émission de fluorescence donne une bande large avec un maximum à 480 nm, laquelle peut être facilement distinguée de l'émission du monomère qui émet entre 370 et 420 nm, avec une structure fine caractéristique.

La formation d'excimères intermoléculaires du pyrène est une réaction bimoléculaire dont le mécanisme est schématisé dans la figure 1.2.5..

La formation d'excimères du pyrène dans les membranes biologiques et dans les vésicules phospholipidiques est caractérisée, dans l'observation des spectres de fluorescence, par :

- * une émission hautement résolue du monomère dont le rendement quantique est une fonction décroissante de la concentration du pyrène,
- * une large bande d'émission de l'excimère, observable à des concentrations élevées en pyrène,
- * enfin des spectres d'excitation identiques pour les deux espèces.

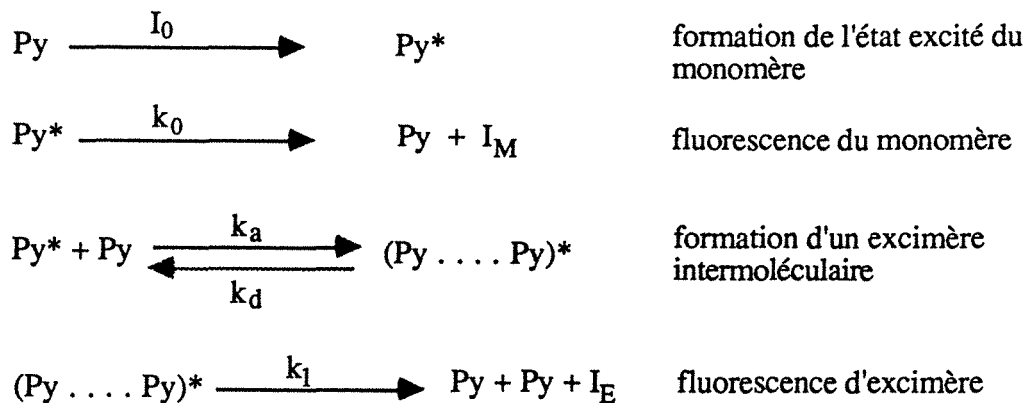


Figure 1.2.5.

Mécanisme de la formation d'excimères intermoléculaires du pyrène.

Py, pyrène; Py^* ; pyrène excité (monomère); $(\text{Py} \dots \text{Py})^*$, excimère; I_0 , lumière absorbée; I_M et I_E , intensités de fluorescence du monomère et de l'excimère; k_0 et k_1 , constantes de réaction liées au déclin radiatif du monomère et de l'excimère excités; k_a et k_d , constantes d'association et de dissociation de l'excimère.

Les états excités Py^* et $(\text{Py} \dots \text{Py})^*$ peuvent être désactivés par des processus non radiatifs.

L'excimère $(\text{Py} \dots \text{Py})^*$ représente un complexe qui n'a d'existence qu'à l'état excité, sa vitesse de formation est influencée par la diffusion latérale (translationnelle) d'une molécule de pyrène à l'état excité qui peut approcher suffisamment une molécule de pyrène à l'état fondamental. Sa formation dépend particulièrement de la viscosité du milieu [PARKER, 1968].

1.2.2.2. COEFFICIENT DE DIFFUSION DU PYRENE DANS LES BICOUCHES LIPIDIQUES

La mesure des intensités de fluorescence provenant de Py^* et de $(\text{Py} \dots \text{Py})^*$ peut renseigner sur un coefficient de diffusion moyen puisque la réaction de Py^* avec Py dépend de la fluidité du milieu. En effet, plus le milieu est fluide plus la vitesse de transport relatif de Py vers Py^* est élevée, donc plus la désactivation de Py^* par Py est importante.

Le pyrène apparaît comme l'une des molécules les mieux adaptées à cette méthode, puisque sa durée de vie de fluorescence est suffisamment longue pour que la formation d'excimères puisse se produire à des concentrations assez faibles. Toutefois, la durée de vie de l'état excité dépend du rapport des concentrations lipides membranaires/pyrène et il est

souvent très difficile d'avoir accès à ce paramètre, surtout dans le cas de cellules entières.

Ainsi, les coefficients de diffusion latérale dans les bicouches lipidiques peuvent être déterminés grâce au pyrène suivant des techniques de fluorescence qui regroupent le déclin de fluorescence [DEMBO et al., 1979; VANDERKOOI et al., 1975], les rapports d'intensité I_E/I_M [GALLA et al., 1979] ou l'inhibition de fluorescence (cf. § 3.2.) [ANDRE et al., 1985; KANO et al., 1981] (cf. tableau 1.2.2.).

Cependant, l'émission d'excimères du pyrène est peu utilisée pour l'étude des membranes cellulaires et a été appliquée essentiellement à des membranes érythrocytaires [SCHACHTER et al., 1982; DONNER et al., 1980; DEMBO et al., 1979] ou à d'autres systèmes tels que les suspensions mitochondriales [VEKSHIN, 1987], les lymphocytes [KIDO et al., 1980] ou la membrane plasmique du foie de rat [LULY et al., 1979].

Enfin, la fluorescence du pyrène n'est pas utilisée uniquement pour des études en rapport avec la fluidité des systèmes organisés mais également pour d'autres études telles que les interactions entre le virus de stomatite vésiculaire et des membranes synthétiques [PAL et al., 1988] ou les transferts spontanés des phospholipides entre les deux bicouches de la membrane [ROSEMAN et THOMPSON, 1980].

Tableau 1.2.2.

Tableau regroupant les déterminations des coefficients de diffusion latérale du pyrène
et de ses dérivés dans des systèmes organisés.

Références	Système lipidique	Sonde	T °C	Coefficient de diffusion 10 ⁻⁸ cm ² /s
GALLA et SACKMANN, 1974	DPPC (MLV)	Pyrène	50	14
	DPPC-cholestérol		50	6,4
VANDERKOOI et CALLIS, 1974	DMPC	Pyrène	30	3
	DMPC-cholestérol			1,3
	Erythrocytes			2,8
LULY et al., 1979	Membranes plasmiques	Pyrène	-	2,8
	Membranes plasmiques + insuline			1,4
DEMBO et al., 1979	Erythrocytes	Pyrène	25	10
			40	25
DONNER et al., 1980	Erythrocytes	Pyrène	25	10 ± 5
KANO et al., 1981	DPPC	Pyrène-diméthylaniline	25	1,6
			50	47
		Acide pyrène décanoïque-diméthylaniline	25	1,3
			50	31
VAN DEN ZEGEL et al., 1984	DMPC	1-méthyl-pyrène	25	0,4
			70	2

1.2.3. REACTIONS D'INHIBITION DE FLUORESCENCE PAR FORMATION D'EXCIMERES INTRAMOLECULAIRES DU DIPYRENYLPROPANE

La formation de complexes intramoléculaires peut être produite dans le cas de systèmes bichromophoriques du type $A-(CH_2)_n-B$.

Pour de tels systèmes en solution, des rotations internes dépendant des potentiels de torsion des liaisons, de l'agitation moléculaire, de la viscosité du milieu, des interactions avec le solvant conduisent à une répartition stable des distances entre les deux chromophores A et B.

Un excimère ($A = B$) ou un exciplexe ($A \neq B$) peut être formé quand, par exemple A est excité électroniquement (A^*) et quand une distance minimale entre A^* et B existe.

Dans les études que nous avons entreprises, nous avons utilisé le dipyrénylpropane ($Py-(CH_2)_3-Py$ ou P_3P), schématisé sur la figure 1.2.6. :

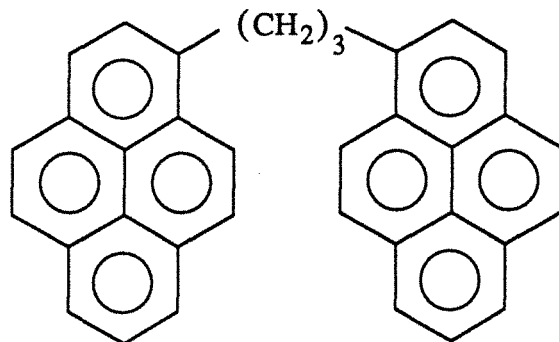


Figure 1.2.6.
Molécule de dipyrénylpropane.

Le principe de formation de l'excimère est rappelé dans la figure 1.2.7..

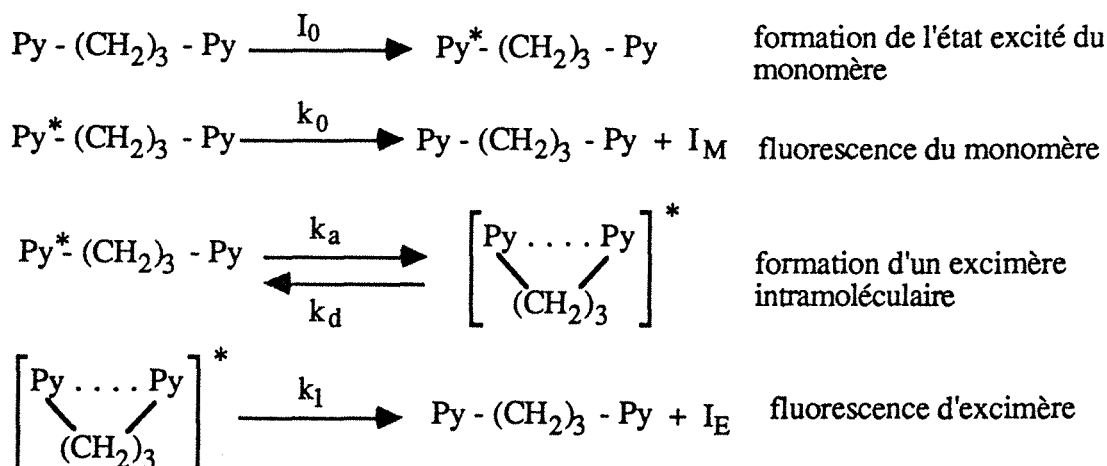
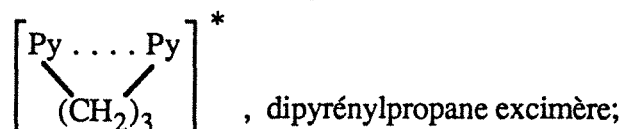


Figure 1.2.7.

Mécanisme de la formation d'excimères intramoléculaires du dipyrénylpropane.

Py-(CH₂)₃-Py, dipyrénylpropane; Py^{*}-(CH₂)₃-Py, dipyrénylpropane monomère;



I₀, lumière d'excitation; I_M et I_E, intensités de fluorescence du monomère et de l'excimère;
k₀ et k₁, constantes de réaction liées au déclin radiatif du monomère et de l'excimère excités;
k_a et k_d, constantes d'association et de dissociation de l'excimère.

Pendant la durée de vie de Py^{*}-(CH₂)₃-Py, des rotations internes autour des liaisons carbone-carbone interviennent, fonctions de la répartition initiale, de la viscosité, de l'agitation moléculaire, de la coopérativité du milieu, etc Quand la distance entre les chromophores réactifs est inférieure à une certaine valeur, le potentiel attractif qui existe généralement devient suffisant pour que le complexe soit formé. On dispose alors en solution d'un système dont la cinétique va dépendre également de la viscosité mais va être indépendante de la concentration de la sonde.

Des études théoriques ont été entreprises [COLLIN, 1987; ANDRE et al., 1983] où l'on a cherché à établir une relation entre la flexibilité des groupes méthyléniques, le milieu et la cinétique de réaction entre un pyrényle excité électroniquement et un pyrényle à l'état fondamental.

Cependant, il est difficile de réaliser un modèle cinétique diffusionnel (même en milieu homogène) qui prendrait en compte les différentes contributions et il n'est pas possible pour l'instant de relier de façon théorique les intensités de fluorescence en excitation continue I_E et I_M à la viscosité d'un milieu homogène.

Toutefois, il est possible de définir un critère objectif expérimental représenté par la valeur du rapport I_E/I_M, qui caractérise l'effet que peut avoir la viscosité macroscopique d'un milieu sur la cinétique de formation d'un complexe intramoléculaire émissif (cf. figure 1.2.8.) et en principe d'utiliser cette relation pour calculer la viscosité équivalente d'un milieu organisé (micelles, liposomes) (cf. § 3.4.4.1.2.).

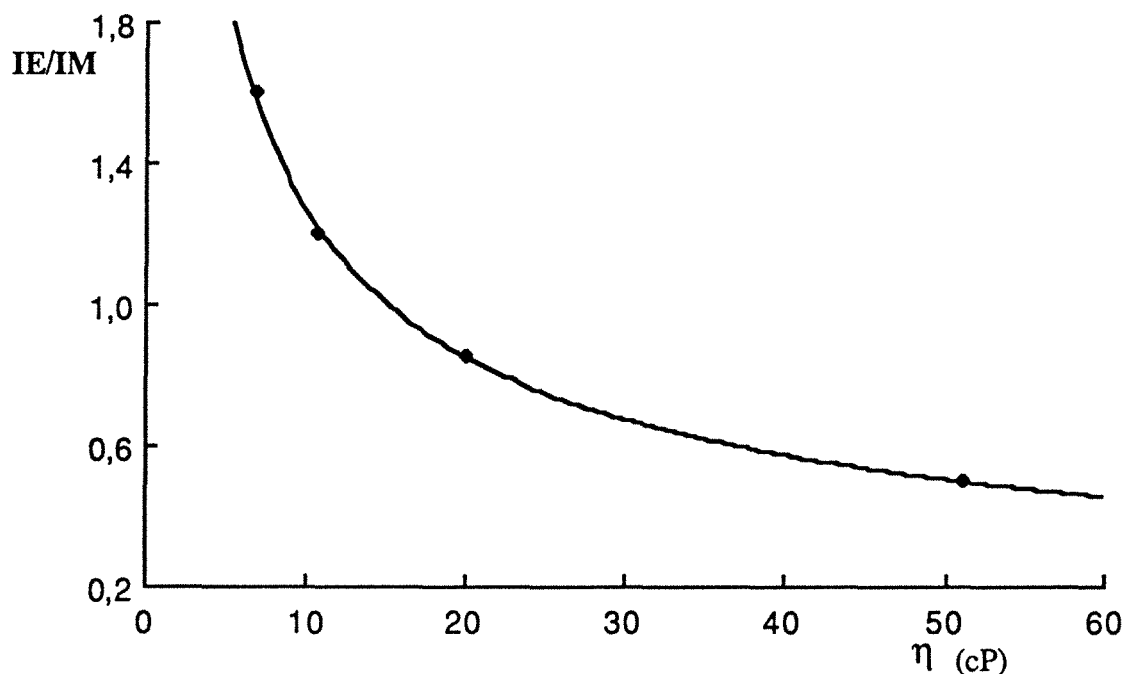


Figure 1.2.8.

Variations de I_E/I_M du P₃P en fonction de la viscosité dans des mélanges cyclohexanol/cyclohexane à 25 °C.

La détermination de la viscosité de ces milieux organisés peut être effectuée par la mesure d'une microviscosité équivalente (viscosité d'un solvant pris comme référence) mais n'a qu'une signification restreinte car elle nécessite de nombreuses approximations dans les modèles physiques.

La formation d'excimères intramoléculaires devrait présenter un avantage certain sur la technique d'excimères intermoléculaires décrite précédemment puisque les résultats sont théoriquement indépendants de la concentration de marqueur dissous dans les membranes. Toutefois, des problèmes pratiques liés à l'utilisation de ce type de sonde existent et limitent pour l'instant l'emploi de ces substances. Un des problèmes lié à l'utilisation des dipyrénylalcane tient au fait que ces molécules fluorescent en milieu aqueux (fluorescence d'excimères de contact par suite de formation de cristallites [VIRIOT et al., 1982; ZACHARIASSE et al., 1982]).

Par ailleurs, il est nécessaire de travailler à des concentrations suffisamment faibles pour éviter la formation d'excimères intermoléculaires qui introduisent des artefacts dans les résultats.

Le tableau 1.2.3. présente les quelques travaux effectués sur des milieux organisés (micelles, lipides, membranes), à l'aide de sondes fluorescentes formant des excimères intramoléculaires. C'est essentiellement P₃P qui a été utilisé pour l'étude des membranes naturelles, reconstituées ou des cellules entières.

Tableau 1.2.3.
Récapitulatif des utilisations du P₃P et de ses dérivés
pour l'étude de milieux organisés.

Références	Système lipidique	Sonde	Additif
ZACHARIASSE, 1978	Micelles de SDS	P ₃ P	-
HENDERSON et al., 1981	Micelles	P ₃ P, P ₁₀ P	-
MELNICK et al., 1981	DMPC Mitochondrie PC d'œuf	P ₃ P bis (4-biphényl- méthyl) éther	Cholestérol
DANGREAU et al., 1982	DMPC	P ₃ P	α- Lactalbumine
ZACHARIASSE et al., 1982	DMPC Ghosts d'érythrocyte PC d'œuf	P ₃ P di (pyrénylméthyl) éther	-
ALMEIDA et al., 1982	Membranes de réticulum sarcoplasmique	P ₃ P	ATPase
VIRIOT et al., 1983	Sewa, lymphocytes de sang humain DPPC SDS	P ₃ P, P ₆ P, P ₉ P	-
MILLNER et BARBER, 1985	Thylakoïdes de membranes de pois	P ₃ P	-
TURLEY et OFFEN, 1985	Micelles de SDS et C ₁₂ (EO) ₆	P ₃ P	-
KANO et al., 1985	Micelles de SDS, HTAC et Triton X-100	P ₃ P	-

ALMEIDA et al., 1986	DMPC Réticulum sarcoplasmique	P ₃ P	Ethanol, butanol et hexanol
ANTUNES- MADEIRA et al., 1990	DMPC	(2,P) ₃ (2,P)	Lindane (hexachloro- cyclohexane)
HARA et SUZUKI, 1990	SDS C ₁₂ (EO) ₅ C ₁₂ (EO) ₆ DAC (C ₁₂ H ₂₅ NH ₃ Cl)	P ₃ P	-

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. MATERIELS

2.1.1. PRODUITS

2.1.1.1. TRACEURS FLUORESCENTS

Le DPH et le TMA-DPH sont des échantillons Molecular Probes (USA), le TMA-DPH est un dérivé tosylate. Le DPH est utilisé en solution dans le tétrahydrofuranne (THF) et le TMA-DPH dans le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Le P₃P est synthétisé selon la méthode décrite par ZACHARIASSE et KUHNLE, 1976, et est parfaitement purifié [VIRIOT et al., 1983_b].

Le pyrène est un échantillon (n° 177) Community Bureau of Reference-BCR (Europe).

Le P₃P et le pyrène sont mis en solution dans le chloroforme.

Ces sondes fluorescentes sont introduites différemment dans les systèmes organisés selon le système utilisé :

- * dans les liposomes, elles sont généralement introduites au cours de leur préparation (cf. § 3.2.3.2.),

- * dans les microsomes, la solution de DPH est ajoutée à la suspension microsomiale (cf. § 3.1.3.),

- * dans les solutions aqueuses de tensio-actifs, elles sont introduites sous forme de microquantités de solution concentrée, ajoutées aux micelles préformées (cf. § 3.4.3.2.2.).

2.1.1.2. AUTRES PRODUITS

Les produits (phospholipides, tensio-actifs) et les additifs (hormones thyroïdiennes et analogues, protéines, cyclosporine A) seront décrits dans les § correspondants à leurs études.

2.1.2. SOLVANTS

Le chloroforme (2427 E) et le THF (2027) sont des produits SDS (spectrosol grade).

Le DMSO (n° 23 486.29) est un produit Prolabo.

Le Tampon Tris (tris-[hydroxyméthyl]-aminométhane) est un échantillon Fluka (puriss, 93350).

HCl est un produit Prolabo (R-normapur, 20252290).

L'eau utilisée est bidistillée.

2.2. METHODES

2.2.1. PREPARATION DES MILIEUX D'ETUDE : microsomes, liposomes et micelles

Ces différents systèmes seront décrits ultérieurement dans les paragraphes 3.1.3., 3.2.3.2. et 3.4.3.2.1., pour respectivement les microsomes, les liposomes et les micelles.

2.2.2. MESURE DE L'ABSORBANCE

Les mesures d'absorption ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre VARIAN, DMS 70 UV/Visible.

Pour toutes nos mesures de fluorescence (intensités et anisotropies), nous avons travaillé avec des solutions ayant une absorbance comprise entre 0,10 et 0,25 afin d'éviter l'effet de peau.

2.2.3. FLUORESCENCE EN EXCITATION CONTINUE

2.2.3.1. MESURES DES INTENSITES DE FLUORESCENCE

Les mesures des intensités de fluorescence ont été réalisées avec un spectrofluorimètre Jobin Yvon, JY3 (cf. figure 2.2.1.). C'est un appareil qui possède un monochromateur à l'excitation et un à l'analyse.

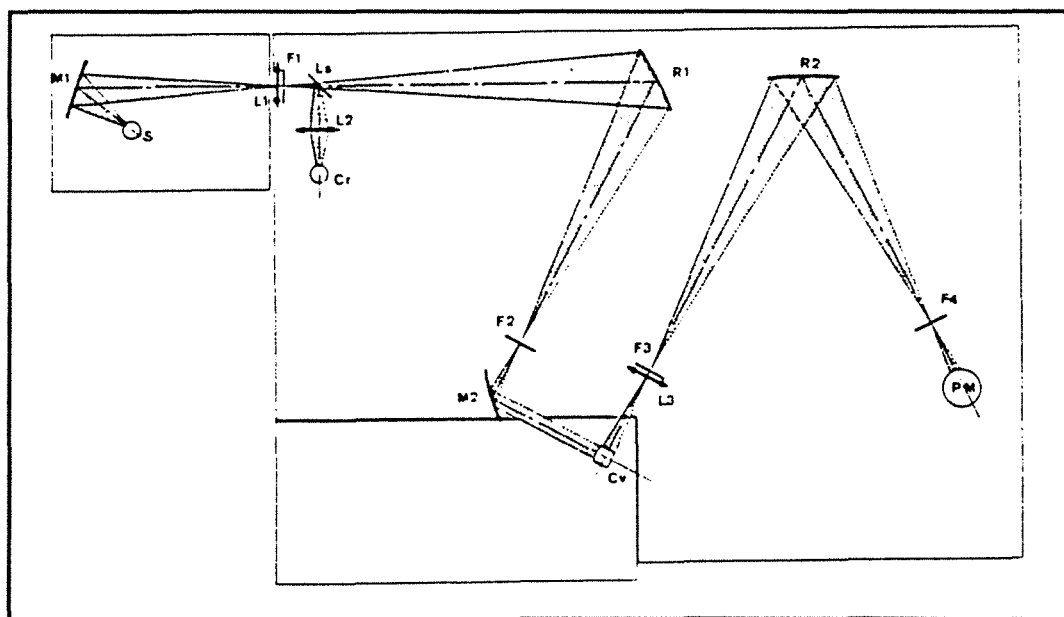


Figure 2.2.1.

Schéma optique du spectrofluorimètre, Jobin Yvon, JY3.

2.2.3.2. MESURES DE L'ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE

L'anisotropie de fluorescence du DPH et du TMA-DPH a été mesurée sur un spectrofluorimètre Jobin Yvon, JY3 doté d'accessoires de polarisation (cf. figure 2.2.2.). C'est un appareil fabriqué au laboratoire, conçu à l'origine pour la mesure de l'anisotropie dans les cellules malignes.

Il est équipé :

- * à l'excitation : soit d'un filtre, soit d'un monochromateur, d'un polarisateur (position verticale ou horizontale, successivement) et d'une cellule photoélectrique qui permet de tenir compte des fluctuations de la lampe,

- * à l'émission : d'un double système d'analyse, avec pour chacun, un polariseur (soit horizontal, soit vertical), un filtre interférentiel et un photomultiplicateur.

Les valeurs de l'anisotropie de fluorescence sont directement données par un micro-ordinateur relié au montage.

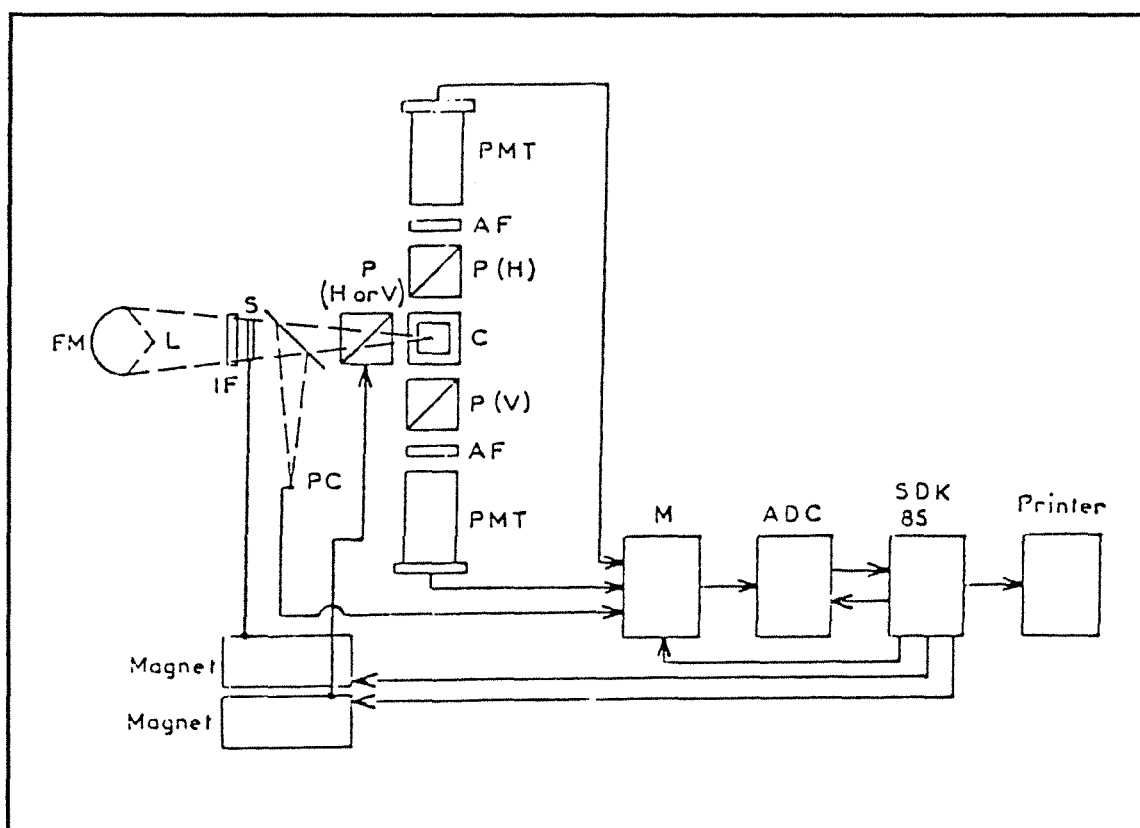


Figure 2.2.2.

Montage expérimental d'un spectrofluorimètre Jobin Yvon, JY3, équipé d'accessoires de polarisation . FM, miroir de focalisation; L, lampe; EF, filtre à l'excitation (365 nm); PC, cellule photoélectrique; P, polariseur; C, cellule; AF, filtre à l'analyse (420 nm); PM, photomultiplicateur; M, multiplexeur; ADC, convertisseur analogique-numérique; S, obturateur (VINCENT et al., 1981).

2.2.4. FLUORESCENCE EN EXCITATION PULSEE

Les déclins de fluorescence du pyrène sont obtenus par excitation pulsée laser et comptage monophotonique. Le montage utilisé est présenté schématiquement sur la figure 2.2.3.. Le laser à argon ionisé (modèle 164, Spectra Physics) pompe le laser à colorant. La fréquence de la lumière du faisceau en sortie du "cavity dumper" est doublée pour obtenir une excitation en ultraviolet. A chaque impulsion sélectionnée par le "cavity dumper", un signal "START" est envoyé au convertisseur temps-amplitude (TAC), qui déclenche une rampe de tension. Le premier photon émis par l'échantillon, reçu par le photomultiplicateur (PM), arrête la rampe de tension et l'événement est mémorisé dans l'analyseur multicanaux. L'opération est répétée un grand nombre de fois.

Les déclins de fluorescence ainsi obtenus sont déconvolués suivant une technique de déconvolution numérique par transformée de FOURIER rapide (FFT) [ANDRE et al., 1979).

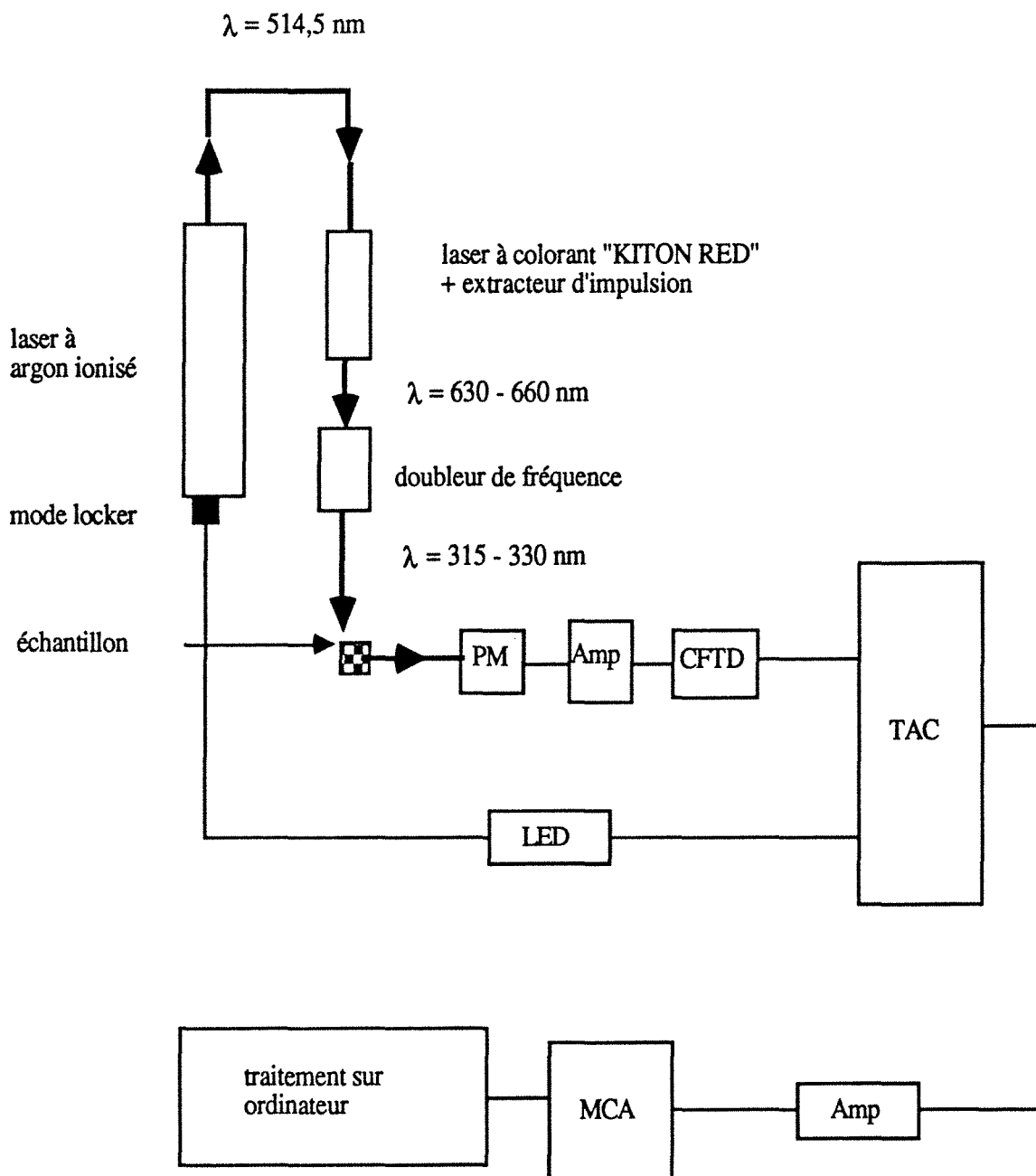


Figure 2.2.3.

Montage de comptage monophotonique avec excitation par source laser.

PM : photomultiplicateur; Amp : amplificateur; CFTD : discriminateur;

TAC : convertisseur temps-amplitude; LED : discriminateur différentiel;

MCA : analyseur multicanaux.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. INTERACTIONS (*IN VIVO*)

HORMONES THYROIDIENNES ET COMPOSES THYROMIMETIQUES APPARENTES - MEMBRANES MICROSOMALES

3.1.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

Cette étude fait partie d'un travail plus vaste, détaillé dans la publication présentée à la fin de ce chapitre (cf. § 3.1.6.) [GOUDONNET et al., 1990]. Dans ce mémoire, nous présentons uniquement la partie relative à l'étude de l'influence des **hormones thyroïdiennes et analogues structuraux (acides arylcarboxyliques)** sur les **activités des enzymes du métabolisme des médicaments** (UDP-glucuronosyl-transférases et cytochromes P-450), sachant que notre objectif est de relier leur mode d'action à une éventuelle modification de la **fluidité membranaire**.

3.1.2. ETAT DES CONNAISSANCES

Les hormones thyroïdiennes exercent un effet inhibiteur *in vitro* sur un grand nombre d'enzymes purifiées et affectent *in vivo* l'activité de nombreuses enzymes en augmentant ou en diminuant leurs activités [CHOWDHURY et al., 1983; GOUDONNET et al., 1980].

Cependant, l'influence de ces hormones sur les activités des enzymes microsomales impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques n'est pas complètement élucidée, qu'il s'agisse d'une inhibition ou d'une stimulation. L'effet des hormones thyroïdiennes est relativement faible si on le compare à celui des inhibiteurs ou des inducteurs classiques [ANDERS, 1973].

En revanche, les hormones thyroïdiennes exercent une influence très nette sur l'induction d'enzymes développée par certaines substances telles que le phénobarbital, le DDT ou le naphtacène [GOUDONNET et al., 1980; TRUCHOT et al., 1979].

Le clofibrate est un inducteur qui a particulièrement attiré notre attention, car comme les hormones thyroïdiennes, sa structure est apparentée aux acides arylcarboxyliques d'une part, et possède des propriétés hypolipémiantes d'autre part. En plus, ces composés présentent d'autres aspects communs telle que l'induction de la prolifération des peroxysomes [GIBSON et al., 1982].

Par ailleurs, rappelons que les activités des enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont fortement liées à la nature de l'environnement lipidique et à la cohésion membranaire [CUMMINGS et al., 1984; MAGDALOU et al., 1982]. Ceci nous a conduit à penser que d'éventuels changements de ces activités dus aux acides arylcarboxyliques, pourraient être liés, entre autre, à un éventuel effet sur l'organisation membranaire et par conséquent sur la fluidité de la membrane.

Cependant, comparé au clofibrate, inducteur spécifique de la glucuronoconjugaison de la bilirubine [FOURNEL et al., 1985], la 3,3',5-triiodo-L-thyronine (LT₃) présente un effet opposé sur l'UDP-glucuronosyltransférase (UDPGT). En effet, la glucuronoconjugaison de la bilirubine est diminuée par la LT₃, alors que celle du 4-nitrophénol est augmentée par la même LT₃ [CHOWDHURY et al., 1983; GOUDONNET et al., 1980].

Pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire responsable de ce double effet, nous avons entrepris au Centre du Médicament et en collaboration avec les équipes du Professeur TRUCHOT, à Dijon et du GRAPP, à Nancy, une étude qui permet de comparer l'effet de la LT_3 , prise comme modèle, avec ceux de six acides arylcarboxyliques possédant (AT_3 , TP_3 , LT_4 , DT_4 , IPT_2) ou non (TO , DIT) une activité thyromimétique (cf. figure 3.1.1. et la figure 1 de la publication du § 3.1.6.) sur :

- * les activités enzymatiques de l'UDPGT et des monooxygénases,
- * les lipides sériques et,
- * sur la fluidité membranaire.

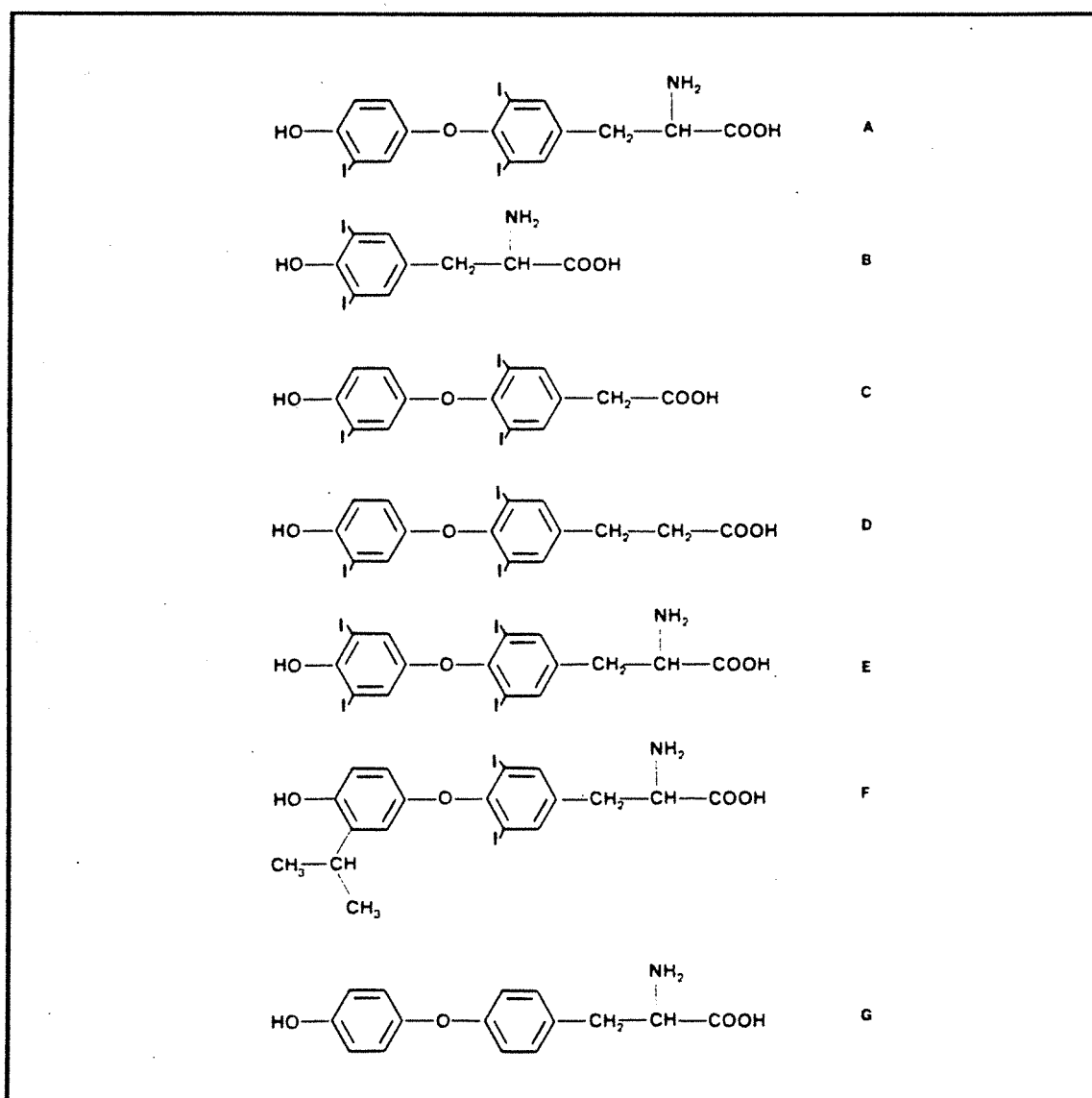


Figure 3.1.1.

Structure chimique des composés utilisés. A : LT_3 (3,3',5-triiodo-L-thyronine);

B : DIT (3,5-diiodo-L-tyrosine); C : AT_3 (acide 3,3',5-triiodothyroacétique);

D : TP_3 (acide 3,3',5-triiodothyropropionique); E : LT_4 , DT_4 (L et D-thyroxine);

F : IPT_2 (isopropyl-diiodothyronine); G : TO (L-thyronine).

3.1.3. MATERIELS ET METHODES

Les matériels et les méthodes (traitement des rats, préparation des microsomes, dosage des activités enzymatiques) sont décrits dans la publication du § 3.1.6..

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé uniquement la polarisation de fluorescence du DPH (cf. § 1.2.1.).

Avant toutes les mesures, les suspensions microsomiales sont ramenées à une absorbance comprise entre 0,20 et 0,25 à 360 nm, par dilution dans le Tampon 1 mM Tris-HCl (pH 7,4) utilisé pour la préparation des microsomes. Le DPH est ajouté aux microsomes (concentration de l'ordre du μM) pour que l'intensité de fluorescence donne un signal facilement détectable.

L'incorporation de la sonde dans la membrane est suivie par la mesure de l'intensité de fluorescence, qui augmente au cours du temps, jusqu'à l'obtention d'un palier. Le temps relatif à cette stabilisation (30 minutes) est considéré comme le temps nécessaire à l'incorporation du DPH dans les membranes des microsomes.

3.1.4. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats montrent que la glucuronoconjugaison des terpènes (induite par le phénobarbital) est insensible aux traitements par les différents acides arylcarboxyliques, en revanche on observe un effet opposé, dose-dépendant, sur la glucuronoconjugaison du 4-nitrophénol (induite par le 3-méthylcholanthrène) et de la bilirubine (induite par le clofibrate). Ainsi, la glucuronoconjugaison du 4-nitrophénol est augmentée, alors que celle de la bilirubine est diminuée. De même, les activités monooxygénasiques ont baissé.

Or, comme nous l'avons signalé ci-dessus, les variations des activités enzymatiques observées peuvent être dues à une éventuelle modification de la fluidité membranaire.

Ainsi, pour se rendre compte de l'action de ces acides arylcarboxyliques sur la cohésion membranaire, nous avons mesuré l'anisotropie de fluorescence du DPH dans les microsomes issus de rats traités par différents analogues.

Les valeurs trouvées (moyenne de dix mesures) dans les microsomes de rats thyroïdectomisés et de ceux traités par la LT_3 , l' AT_3 et l' IPT_2 ne varient pas d'une manière significative par rapport à celles mesurées dans les microsomes issus de rats témoins (cf. tableau 3.1.1.).

Tableau 3.1.1.

Valeurs des anisotropies de fluorescence du DPH mesurées dans des microsomes hépatiques de rats normothyroïdiens (N), thyroïdectomisés (THX) et traités par la LT₃, l'AT₃ et l'IPT₂.

Traitement	Dose µg/kg/jour	Anisotropie de fluorescence
rats normaux	– (N)	0,119 ± 0,009
rats thyroïdectomisés	– (THX)	0,125 ± 0,005
LT ₃	3 ^a	0,122 ± 0,009
	10 ^b	0,129 ± 0,010
	50 ^c	0,120 ± 0,007
AT ₃	10 ^d	0,130 ± 0,004
	50 ^e	0,129 ± 0,008
	100 ^f	0,126 ± 0,010
IPT ₂	500 ^g	0,135 ± 0,009

Test de Student, valeurs de p :

N vs THX : p < 0,8 (N.S.); N vs a : p < 0,6 (N.S.); N vs b : p < 0,9 (N.S.);
 N vs c : p < 0,5 (N.S.); N vs d : (N.S.); N vs e : p < 1 (N.S.);
 N vs f : p < 0,8 (N.S.); N vs g : (N.S.) (N.S., non significatif).

3.1.5. CONCLUSION

Ces résultats montrent que la LT₃ et ses analogues l'AT₃ et l'IPT₂ n'entraînent pas de changement de la cohésion membranaire, telle qu'elle est estimée par la mesure de l'anisotropie de fluorescence du DPH, dans les conditions expérimentales décrites dans les chapitres précédents. Ceci suggère que les variations de la glucuroconjugaison du 4-nitrophénol et de la bilirubine, ne semblent pas associées à des modifications de l'organisation lipidique des membranes microsomales. Probablement, elles seraient liées à une stimulation ou à une diminution de la biosynthèse protéique de l'isoenzyme correspondante [CHOWDHURY et al., 1983], ou à une différence de stabilité des ARN messagers codant pour ces deux isoformes.

BBAGEN 23329

Differential action of thyroid hormones and chemically related compounds on the activity of UDP-glucuronosyltransferases and cytochrome *P*-450 isozymes in rat liver

Herve Goudonnet ¹, Jacques Magdalou ², Jacques Mounie ¹, Abderrahim Naoumi ³,
Marie-Laure Viriot ³, Andre Escousse ¹, Gerard Siest ² and Roger Truchot ¹

¹ Formation de Biochimie Pharmacologique, Faculté de Médecine et Pharmacie, Dijon. ² Centre du Médicament, U.R.A. CNRS No. 597, Nancy, and ³ Département de Chimie Physique des Réactions, U.A. CNRS No. 328, Nancy (France)

(Received 31 October 1989)

Key words: UDP-glucuronosyltransferase; Cytochrome *P*-450 isozyme; Thyroid hormone; Carboxylic acid; Peroxisome marker; (Rat liver)

The effect of thyroid hormones and chemically related compounds, on the activity of UDP-glucuronosyltransferases (EC 2.4.1.17) and cytochrome *P*-450-dependent monooxygenases in rat liver microsomes was investigated. The animals were thyroidectomized and treated with different doses of the drugs for 3 weeks. Opposite effects were observed depending on the isoenzyme of UDP-glucuronosyltransferase considered. While 3,3',5-triiodo-L-thyronine, 3,3',5-triiodothyroacetic acid, 3,3',5-triiodothyropropionic acid, isopropylidiodothyronine and L- and D-thyroxine strongly increased 4-nitrophenol glucuronidation in a dose-dependent fashion, they decreased markedly bilirubin glucuronidation. However, the activity toward nopol, a monoterpenoid alcohol, was not significantly changed regardless of which compound or dose was used. Variation of UDP-glucuronosyltransferase observed with 4-nitrophenol and bilirubin was related to the thyromimetic effect of the drugs estimated from the increase in α -glycerophosphate dehydrogenase. Thyronine and 3,5-diiodo-L-tyrosine, which did not enhance this activity, also failed to affect glucuronidation. Variations in UDP-glucuronosyltransferase activity were more likely due to changes in protein expression rather than changes in enzyme latency, since lipid organization of the microsomal membrane, as estimated from the mean anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene by fluorescence polarization was not significantly modified by the drug administration. Although some of the drugs could significantly decrease the triacylglycerol and cholesterol contents in plasma, all failed to affect lauric acid hydroxylation. The activities of catalase, palmitoyl-CoA dehydrogenase (CN⁻ insensitive) and carnitine acetyltransferase in the fraction enriched in peroxisomes were also not significantly affected by treatment with the thyroid hormone LT₃. In contrast, the activity of 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase was increased by large doses of thyronine and by 3,3',5-triiodothyropropionic acid. The concentration of total cytochrome *P*-450 was decreased in a dose-dependent fashion by all the compounds used, except thyronine. Finally, significant correlations were observed between glucuronidation of bilirubin and 4-nitrophenol and the content in cytochrome *P*-450. This suggests a possible coordinate regulation of the two processes, which depends on the physicochemical characteristics of the thyroid hormones and related compounds.

Introduction

UDP-glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17) belongs to a family of enzymes involved in the conjugation of

UDP-glucuronic acid to a variety of chemicals, drugs or endogenous compounds, some of them potentially toxic, like bilirubin [1]. The enzymes are exclusively associated with the membranes of the cell, mainly those of the endoplasmic reticulum [2]. This situation confers to the protein a strong phospholipid dependence, since any perturbation of the lipid bilayer or change in the membrane lipid composition can simultaneously affect its activity [3–5].

Each isoenzyme has been characterized by its selective induction by drugs (phenobarbital, 3-methylcholanthrene and clofibrate), or by its substrate specificity

Abbreviations: LT₃, 3,3',5-triiodo-L-thyronine; TA₃, 3,3',5-triiodothyroacetic acid; TP₃, 3,3',5-triiodothyropropionic acid; LT₄, L-thyroxine; DT₄, D-thyroxine; IPT₃, 3,5-diiodo-3'-isopropyl-L-thyronine; TO, thyronine; DIT, 3,5-diiodo-L-tyrosine; DPH, 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene.

Correspondence: J. Magdalou, Centre du Médicament, U.R.A. CNRS No. 597, 30 Rue Lionnois, 54000 Nancy, France.

[6–8]. Glucuronidation of planar mono-hydroxylated substrates (4-nitrophenol, 1-naphthol) is preferentially enhanced after treatment of rats with 3-methylcholanthrene, whereas the protein which catalyzes glucuronidation of bulkier molecules (monoterpenoid alcohols, morphine) is induced by phenobarbital. Finally, we recently reported that the hypolipidemic drug, clofibrate, and other structurally related arylcarboxylic acids, selectively enhanced bilirubin glucuronidation catalyzed by another distinct form of enzyme [9]. These types of drug, especially the peroxisome proliferators, concomitantly induce a cytochrome *P*-450 (cytochrome *P*-450 IVA1) involved in the ω -hydroxylation of lauric and arachidonic acids [10].

Like clofibrate, thyroid hormones belong to the class of arylcarboxylic acids. They are substrates of UDP-glucuronosyltransferase [11] and are known to present hypolipidemic properties upon administration [12]. Thyroxine can also induce proliferation of microperoxisomes [13]. Compared to clofibrate, 3,3',5-triiodo-L-thyronine (LT₃) was found to present opposite effects

on the activity of UDP-glucuronosyltransferases after administration to rats. The drug was responsible for decreasing bilirubin glucuronidation, whereas that of 4-nitrophenol was increased [14–16].

In order to understand better the molecular mechanism responsible for this dual effect, we compared the action of the thyroid hormone LT₃, used as a model compound, with that of six other chemically related carboxylic acids, whose structures are indicated in Fig. 1. Their effect on the activity of UDP-glucuronosyltransferases monitored with 4-nitrophenol, nopol (a monoterpenoid alcohol) and bilirubin as substrates, were tested using rat liver microsomes. This series of compounds corresponds to iodine-containing molecules which possess thyromimetic properties, 3,3',5-triiodothyroacetic acid (TA₃), 3,3',5-triiodothyropropionic acid (TP₃), L- and D-thyroxine (LT₄, DT₄), 3,5-diiodo-3'-isopropyl-L-thyronine (IPT₂) and two other with no thyromimetic effect, thyronine (TO) and 3,5-diiodo-L-tyrosine (DIT). These molecules were tested for their effects on plasma lipids and their different actions on the activity of UDP-glucuronosyltransferases and cytochrome *P*-450 isozymes. The existence of a possible relation between the content of cytochrome *P*-450 and the activity of UDP-glucuronosyltransferase toward bilirubin was also investigated.

Materials and Methods

Chemicals

LT₃, LT₄, DT₄, DIT and TO were purchased from Sigma (St Louis, MO). IPT₂ and TA₃ were kindly provided by Smith-Kline and French Research Institute (The Frythe, Welwyn, U.K.). Nopol, substrate of UDP-glucuronosyltransferase, was provided by Fluka (Buchs, Switzerland). The other substrates 4-nitrophenol, bilirubin and the detergents for enzyme activation Triton X-100 and digitonin were from Merck (Darmstadt, F.R.G.). Lauric acid and 12-hydroxydodecanoic acid were purchased from Aldrich-Chimie (Strasbourg, France). 1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) was obtained from Koch-Light (Colnbrook, U.K.). All reagents were of the best quality commercially available.

Treatments of animals and preparation of subcellular fractions

Male Wistar rats (Domaine des Oncins, St Germain l'Abresle, France) were used throughout this study. Except for a control group of animals, the thyroid gland was surgically removed when they weighed 80 g. The success of the ablation was monitored by measurement of free LT₄ in plasma by radioimmunoassay; the animals, whose LT₄ level was less than 1 pM, were used for subsequent treatments. Injection of the compounds to rats started 3 weeks after surgery. Each group of rats was composed of eight animals. A control group and a

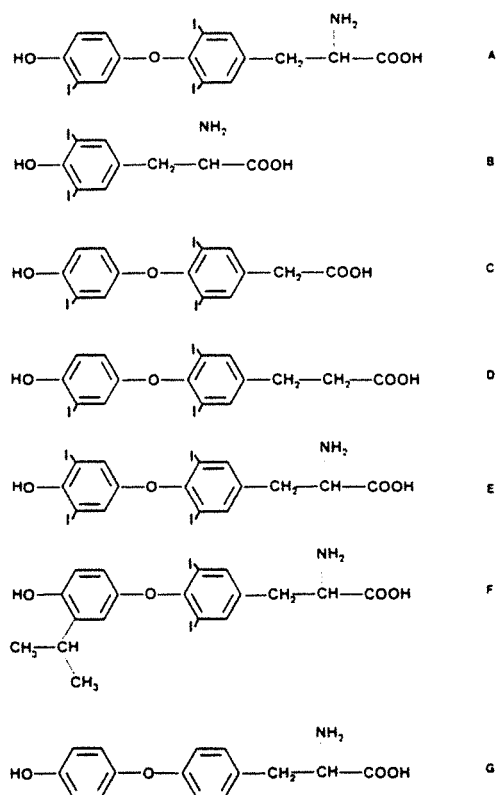


Fig. 1. Chemical structure of the compounds used. A, LT₃ (3,3',5-triiodo-L-thyronine); B, DIT (3,5-diiodo-L-tyrosine); C, TA₃ (3,3',5-triiodothyroacetic acid); D, TP₃ (3,3',5-triiodothyropropionic acid); E, LT₄, DT₄ (L- and D-thyroxine); F, IPT₂ (isopropyl diiodothyronine); G, TO (L-thyronine).

group of thyroidectomized rats did not receive any compound. Three groups of rats were treated intraperitoneally with LT_3 dissolved in 0.9% NaCl, at the doses 3, 10, 30 and 50 $\mu\text{g/kg}$ body weight per day for 10 days. The smallest quantity of the hormone injected corresponded to a substitutive hormonal dose, whereas the highest amounts were considered as pharmacological doses. The other compounds were tested under the same conditions, except for the doses: 5, 20 and 100 $\mu\text{g/kg}$ per day for IPT_2 ; 10, 50 and 500 $\mu\text{g/kg}$ per day for TA_3 ; 500 $\mu\text{g/kg}$ per day for TP_3 ; 1 mg/kg per day for LT_4 and 2.5 mg/kg per day for DT_4 . The doses were chosen for their thyromimetic effects, as judged from the increases in the mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase [17]. Finally, compounds which did not exhibit a thyromimetic activity were administered at the doses 2.5 mg/kg per day for DIT and 20, 200 and 1000 $\mu\text{g/kg}$ per day for TO. Rats were killed by decapitation 16 h after the last injection; their blood was collected in tubes containing heparin and the plasma was separated by centrifugation at $3000 \times g$. The livers were homogenized individually in 1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 0.1 mM EDTA and 154 mM KCl. The homogenate was spun for 10 min at $750 \times g$ and the pellet was discarded. The supernatant was centrifuged at $8700 \times g$ for 10 min; the pellet, which constituted the

mitochondrial fraction was homogenized in the buffer and collected again at the same speed. Subsequently, the post-mitochondrial supernatant was centrifuged at $25000 \times g$ for 10 min, and the pellet constituted the fraction enriched in peroxisomes. Finally, the supernatant was spun at $100000 \times g$ for 60 min. The pellet was homogenized in the buffer and centrifuged again under the same conditions. The microsomal pellet was homogenized and all the subcellular fractions were stored at -80°C . Their protein content was estimated by the method of Lowry et al. [18].

Biochemical assays

In plasma, the concentration of free LT_4 was measured using the radioimmuno assay of Amersham (Les Ulis, France); levels in triacylglycerols and cholesterol were determined with a reagent kit provided by Boehringer (Mannheim, F.R.G.) on a Cobas fast-analyzer centrifuge (Roche Bioelectronique, Basel, Switzerland). The activity of mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase was measured according to the method of Gardner [19]. In the fraction enriched in peroxisomes, the activity of catalase, palmitoyl-CoA dehydrogenase (CN^- insensitive) and carnitine acetyltransferase was followed according to the method of Baudhuin et al. [20], Lazarow and De Duve [21] and Gray et al. [22],

TABLE I

Effect of treatments on morphological parameters, plasma lipids and α -glycerophosphate dehydrogenase activity

Treatments and doses (μg)	Body weight (g)	Liver/body weight ratio	Plasma lipids (mM)		α -Glycerophosphate dehydrogenase (nmol/min per mg protein)
			cholesterol	triacylglycerols	
Control	258 $\pm$ 18	3.8 $\pm$ 0.2	1.95 $\pm$ 0.23	0.92 $\pm$ 0.24	0.95 $\pm$ 0.14
Thyroidectomized	217 $\pm$ 18 ^a	3.5 $\pm$ 0.3	2.41 $\pm$ 0.35 ^a	0.84 $\pm$ 0.09 ^a	0.46 $\pm$ 0.15 ^a
LT_3 -3 10 50	240 $\pm$ 32	3.5 $\pm$ 0.1	2.22 $\pm$ 0.22	0.95 $\pm$ 0.24	0.70 $\pm$ 0.18 ^b
	229 $\pm$ 29	3.6 $\pm$ 0.2	1.84 $\pm$ 0.38 ^b	0.70 $\pm$ 0.19	2.00 $\pm$ 0.20 ^b
	203 $\pm$ 19	3.1 $\pm$ 0.1	1.53 $\pm$ 0.21 ^b	0.58 $\pm$ 0.15 ^b	3.90 $\pm$ 0.22 ^b
TA_3 -10 50 500	214 $\pm$ 35	2.8 $\pm$ 0.2	2.21 $\pm$ 0.32	1.15 $\pm$ 0.34 ^b	2.30 $\pm$ 0.19 ^b
	236 $\pm$ 24	3.6 $\pm$ 0.2	2.23 $\pm$ 0.30	0.77 $\pm$ 0.27	2.80 $\pm$ 0.23 ^b
	230 $\pm$ 33	3.6 $\pm$ 0.2	2.28 $\pm$ 0.28	0.63 $\pm$ 0.15 ^b	3.70 $\pm$ 0.25 ^b
IPT_2 -5 20 100	212 $\pm$ 25	3.4 $\pm$ 0.2	2.35 $\pm$ 0.21	1.05 $\pm$ 0.15 ^b	0.97 $\pm$ 0.16 ^b
	215 $\pm$ 31	3.1 $\pm$ 0.2	2.05 $\pm$ 0.32 ^b	0.88 $\pm$ 0.18	1.10 $\pm$ 0.17 ^b
	212 $\pm$ 27	2.2 $\pm$ 0.3	1.90 $\pm$ 0.28 ^b	0.80 $\pm$ 0.21	1.70 $\pm$ 0.17 ^b
LT_4 -1000	167 $\pm$ 23 ^b	3.8 $\pm$ 0.2	1.81 $\pm$ 0.28 ^b	0.69 $\pm$ 0.18	4.00 $\pm$ 0.25 ^b
DT_4 -2500	215 $\pm$ 44	3.7 $\pm$ 0.2	1.98 $\pm$ 0.33 ^b	0.76 $\pm$ 0.21	2.60 $\pm$ 0.20 ^b
DIT-2500	185 $\pm$ 18 ^b	3.9 $\pm$ 0.2	2.35 $\pm$ 0.19	0.95 $\pm$ 0.20	0.67 $\pm$ 0.11
TP_3 -500	229 $\pm$ 23	4.1 $\pm$ 0.2	2.15 $\pm$ 0.25	0.77 $\pm$ 0.17	2.00 $\pm$ 0.18 ^b
TO-20 200 1000	200 $\pm$ 18	3.5 $\pm$ 0.2	2.45 $\pm$ 0.35	1.12 $\pm$ 0.15 ^b	0.30 $\pm$ 0.14
	185 $\pm$ 21	3.2 $\pm$ 0.2	2.27 $\pm$ 0.19	0.95 $\pm$ 0.09 ^b	0.40 $\pm$ 0.11
	229 $\pm$ 22	3.2 $\pm$ 0.2	2.35 $\pm$ 0.28	1.08 $\pm$ 0.21 ^b	0.45 $\pm$ 0.08

^a Significantly different from control normal rats.

^b Significantly different from thyroidectomized rats.

P < 0.05, eight animals.

respectively. Cytochrome *P*-450 content was determined from the reduced carbon monoxide difference spectrum [23] on a Cary 15 spectrophotometer (model 219, Varian, Palo-Alto, CA). The monooxygenase 7-ethoxycoumarine *O*-deethylase activity was measured by the technique of Grenlee and Poland [24] on a Jobin-Yvon JY3D spectrofluorometer (Longjumeau, France). Hydroxylation of lauric acid was monitored as described in Ref. 25.

Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity was evaluated according to Heirwegh et al. [26], using digitonin at a detergent/protein weight ratio of 1:4 to obtain maximal activation. Glucuronidation reactions with 4-nitrophenol and nopol as substrates was followed by the method of Mulder and Van Doorn [27], as previously described [28], in Triton X-100-treated microsomes.

Fluorescence polarization

Changes in the organization of the lipid phase of the microsomal membranes upon treatment with the compounds were estimated from the anisotropy of the steady-state fluorescence emission of DPH. The signals were recorded at 25°C on a Jobin-Yvon spectrofluorometer equipped with a polarization accessory and coupled to an Apple II computer for the data processing.

The incubation conditions were essentially the same as those described in Ref. 9.

Results

Morphometric parameters and hypolipidemic effects

Thyroid ablation in rats significantly decreased total body weight by 16% (Table I). Administration of the compounds did not affect body weight, except LT₄ and DIT, which decreased the weight by 20%. However, whatever the compound and the dose used, the ratio of liver/body weight was not significantly changed upon treatment (Table I).

Table I also presents plasma levels of cholesterol and triacylglycerols in rats treated with the different carboxylic acids. Compared to control animals, thyroidectomy increased the plasma cholesterol content by 24%. From all the chemical structures considered, treatments with LT₃, IPT₂, LT₄ and DT₄, significantly decreased the cholesterol level. LT₃ and TA₃, at the highest doses used, lowered the triacylglycerol content by 37 and 31%, respectively (Table I). In contrast, the lowest doses in TA₃ and IPT₂ as well as TO increased this parameter. DIT and TP₃ did not cause significant changes of lipid concentration in plasma.

TABLE II

Effects of treatments on cytochromes *P*-450 dependent monooxygenase activities

Treatments and doses (μg)	Cytochrome <i>P</i> -450 (nmol/mg protein)	7-Ethoxycoumarine <i>O</i> -deethylase (nmol/min per mg protein)	Hydroxylation of lauric acid (nmol/min per mg protein)
Control	0.84 ± 0.12	0.58 ± 0.17	0.148 ± 0.023
Thyroidectomized	0.94 ± 0.09 ^a	0.53 ± 0.13	0.138 ± 0.029
LT ₃ -3 10 50	0.69 ± 0.05 ^b 0.59 ± 0.07 ^b 0.42 ± 0.12 ^b	0.50 ± 0.11 0.50 ± 0.13 0.51 ± 0.15	0.135 ± 0.031 0.166 ± 0.062 0.166 ± 0.031
TA ₃ -10, 50, 500	0.63 ± 0.06 ^b 0.67 ± 0.09 ^b 0.37 ± 0.05 ^b	0.46 ± 0.10 0.46 ± 0.12 0.46 ± 0.12	0.177 ± 0.050 0.105 ± 0.017 0.163 ± 0.037
IPT ₂ -5 20 100	0.69 ± 0.06 ^b 0.49 ± 0.07 ^b 0.38 ± 0.10 ^b	0.67 ± 0.13 0.56 ± 0.08 0.59 ± 0.16	0.148 ± 0.031 0.151 ± 0.027 0.165 ± 0.035
LT ₄ -1000	0.45 ± 0.12 ^b	0.62 ± 0.13	— ^c
DT ₄ -2500	0.53 ± 0.14 ^b	0.56 ± 0.14	— ^c
DIT-2500	0.84 ± 0.20	0.54 ± 0.19	— ^c
TP ₃ -500	0.62 ± 0.10 ^b	0.72 ± 0.17 ^b	— ^c
TO-20 200 1000	0.91 ± 0.11 0.88 ± 0.10 0.96 ± 0.12	0.61 ± 0.15 0.72 ± 0.15 ^b 0.85 ± 0.16 ^b	0.130 ± 0.028 0.142 ± 0.033 0.145 ± 0.041

^a Significantly different from control normal rats.

^b Significantly different from thyroidectomized rat.

^c not determined.

P < 0.05, eight animals.

The different treatments failed to alter the physico-chemical properties of the microsomal membrane lipids as revealed by the fluorescence polarization experiments. Whatever the treatment, the mean anisotropy (r) of the fluorescent probe 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, was not significantly changed and ranged from 0.119 ± 0.009 for normal rats to 0.125 ± 0.005 for thyroidectomized rats and 0.135 ± 0.009 for IPT₂-treated animals.

Mitochondrial α -glycerophosphate dehydrogenase

The enzyme activity, considered as an index of the thyromimetic effects [17], was strongly enhanced in a dose-dependent fashion by LT₃, TA₃ and IPT₂ (Table I). LT₄ and TP₃ also promoted an increase in enzyme activity, whereas TO and DIT were ineffective, as expected.

Monoxygenase activities

The amount of total cytochrome *P*-450 was slightly but significantly increased by 14% in thyroidectomized rats (Table II). LT₃ administration caused a dose-dependent decrease in this protein, which reached 50% with the highest dose. The chemically related structures TA₃ and IPT₂ led to the same results. TP₃, LT₄ and DT₄ also decreased the amount of cytochrome *P*-450. DIT and TO did not affect its concentration at any dose.

The activity of 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase (cytochromes *P*-450 IIB1 and IA1 dependent) did not significantly change upon administration of the compounds (Table II). The hydroxylation of lauric acid was not significantly affected regardless of which compound was administered.

UDP-glucuronosyltransferase activities

Glucuronidation of 4-nitrophenol was enhanced by LT₃, TA₃ and IPT₂ in a dose-dependent fashion (Fig. 2). LT₄, DT₄ and TP₃ also strongly increased (200%) this activity. On the other hand, TO or DIT did not produce any effect. Interestingly, the opposite situation was found when bilirubin glucuronidation was examined. Except for TO and DIT, which did not change the activity, the other chemicals markedly decreased bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity. The maximal decrease reached 80% with TA₃ and IPT₂. Finally, glucuronidation of nopol, catalyzed by another form of enzyme, was not significantly changed, regardless of which treatment was used (Fig. 2).

Variation in bilirubin glucuronidation upon treatment with the compounds was correlated ($r = 0.91$) with the amount of cytochrome *P*-450 (Fig. 3). A similar correlation ($r = 0.86$) could also be established between 4-nitrophenol glucuronidation and cytochrome *P*-450 content (results not shown).

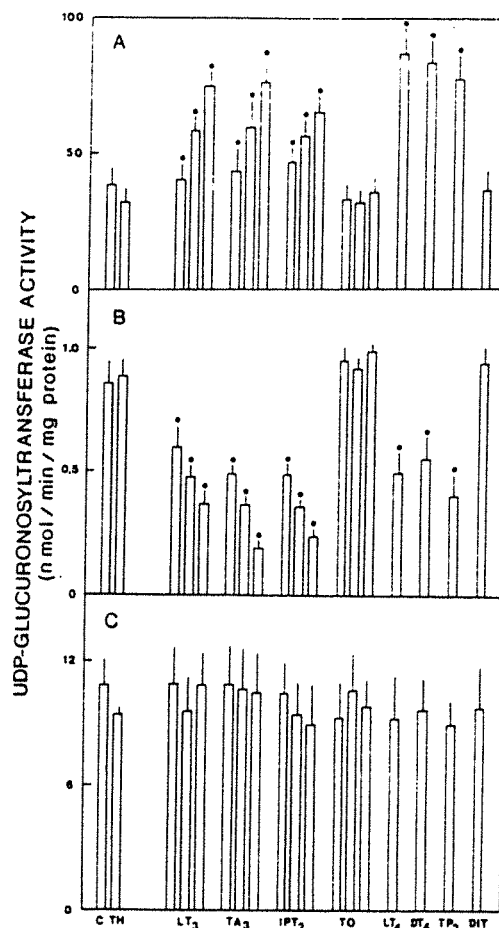


Fig. 2. Effect of treatment by thyroid hormones and chemically related structures on three forms of UDP-glucuronosyltransferases investigated with A, 4-nitrophenol; B, bilirubin; C, nopol as substrates. Enzyme specific activities are the means $\pm$ S.D., for eight rats. ●, represents results significantly different ($P < 0.05$) from thyroidectomized animals (TH); c, controls.

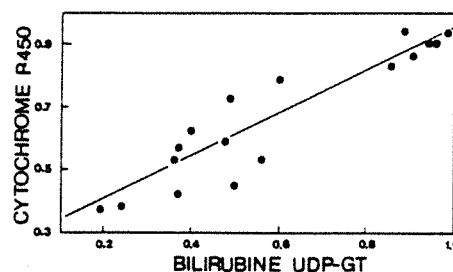


Fig. 3. Correlation between cytochrome *P*-450 content and bilirubin UDP-glucuronosyltransferase activity. The concentration on cytochrome *P*-450 was expressed in nmol/mg protein; bilirubin glucuronidation was expressed in nmol/min per mg protein; ($r = 0.91$).

TABLE III

Activities of peroxisomal marker enzymes after treatment with 3,3',5-tri-iodo-L-thyronine

The enzyme activities were expressed in munit per mg protein for catalase (1 unit corresponds to the amount of enzyme that degrades 90% of substrate per min, under the experimental conditions), and in nmol/min per mg protein for palmitoyl-CoA dehydrogenase and carnitine acetyltransferase. LT₃ was administered at the dose of 30 µg/kg body weight for 10 days. Values are the means ± S.D. (eight animals).

Treatment	Enzymes		
	catalase	palmitoyl-CoA dehydrogenase	Carnitine acetyltransferase
Control	32 ± 6	2.38 ± 1.00	6.64 ± 1.45
Control + LT ₃	39 ± 5	2.70 ± 0.36	7.39 ± 0.92
Thyroidectomized	35 ± 7	2.41 ± 0.42	7.50 ± 2.10
Thyroidectomized + LT ₃	32 ± 9	1.43 ± 0.84	6.75 ± 1.70

Peroxisomal marker enzymes

The activity of catalase, palmitoyl-CoA dehydrogenase and carnitine acetyltransferase, in the fraction enriched in peroxisomes was determined in rats treated with LT₃ (30 µg/kg per day), which was the most powerful compound used in this study. Regardless of which enzyme was used, we did not find any significant modification of the specific activities after administration of LT₃ (Table III).

Discussion

Among the iodine-containing carboxylic acids tested, TA₃, IPT₂, LT₄ and TP₃ presented biological effect is similar to those found with LT₃, when the activity of α-glycerophosphate dehydrogenase and that of drug-metabolizing enzymes was considered. These results indicated that structural modifications of the lateral chain of alanine leading to the acetic and propionic derivatives TA₃ and TP₃, and substitution of an iodine atom by an isopropyl moiety did not strongly change the effect of the iodinated hormones regardless of which enzyme activity was considered. By contrast, the absence of iodine or modifications on the diphenyl ether residue resulted in a complete loss of activity.

Examination of the administered dose/observed effect ratio showed large differences from one compound to another. To obtain a quantitative increase of α-glycerophosphate dehydrogenase activity similar to that observed with LT₃, doses 3- to 5-fold higher of IPT₂ and TA₃, 20-fold higher of TP₃ and LT₄, and more than 100-fold higher of DT₄ had to be administered. This may be related to different affinity of thyromimetic compounds for the thyroid hormone receptors within the cell [29,30]. Interestingly, the decrease in total cytochrome P-450 was closely associated with the thyromimetic effect. This result could be partially re-

lated to the increase in the activity of haem oxygenase reported by Leakey et al. [31]. Despite the decrease in total cytochrome P-450, the thyroid hormones did not affect the O-deethylation of 7-ethoxycoumarin and hydroxylation of lauric acid supported by different isoenzymes [32]. On the other hand, administration of DIT and TO, which did not change the α-glycerophosphate dehydrogenase activity, led to a different enzyme profile with no decrease in cytochrome P-450 and an increase of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity. A differential effect of these substances on the various monooxygenases cannot be ruled out.

Since some of the carboxylic compounds used in this work lowered the plasma lipid concentration, it was interesting to determine whether they could also induce ω-hydroxylation supported by cytochrome P-450 IVA1 and stimulate enzyme markers of peroxisomes. In recent work using several structurally unrelated hypolipidemic compounds, we observed a strong correlation between peroxisomal β-oxidation and lauric acid hydroxylation [33]. Indeed, hypolipidemic drugs such as clofibrate [34] or other classes of pharmacologically active structures such as phthalates [35] and the herbicide tridiphen [36], have been found to induce both cytochrome P-450 IVA1 and peroxisomal proliferation. These two events may be linked. Sharma et al. [37] reported that induction of this type of cytochrome probably resulted first in ω-hydroxylation of fatty acids, which, after further oxidation into dicarboxylic acids could initiate peroxisomal proliferation. On the other hand, some authors proclaimed a complete dissociation between the hypolipidemic effect and the peroxisomal proliferation, suggesting that the two processes were mechanistically unrelated [38]. In our study, the activity of enzymes considered as markers of peroxisomes (catalase, palmitoyl-CoA dehydrogenase, carnitine acetyltransferase) was not significantly affected by LT₃, and none of the compounds enhanced the hydroxylation of lauric acid, thus suggesting that peroxisome proliferation was unlikely to occur under our experimental conditions.

The activity of UDP-glucuronosyltransferase was affected differently upon administration of the compounds tested, according to the substrate used. The glucuronidation of terpene was not changed. On the other hand, the conjugation of 4-nitrophenol and bilirubin was affected but in opposite ways. This result emphasizes the existence of at least three independently regulated isoenzymes. 4-Nitrophenol glucuronidation is known to be supported by different isozymes [6,7,39], namely those induced by 3-methylcholanthrene. The stimulation of this pathway may be due to induction of proteins other than those involved in glucuronidation of monohydroxylated planar substrates, since thyroid hormones and related compounds did not concomitantly enhance, like 3-methylcholanthrene and related substances, cytochrome P-450 IA1, which supports 7-

ethoxycoumarine *O*-deethylase activity. Moreover, they did not present the classical structural requirements for 3-methylcholanthrene-type inducers [40]. Finally, the induction level observed upon administration of this class of compounds is generally higher (4-fold) [6,7], than that observed (2-fold) in this study. We found that an *in vitro* addition of the compounds in the micromolar range to microsomes did not inhibit nor activate UDP-glucuronosyltransferase. Since the changes in glucuronidation of bilirubin and 4-nitrophenol were not associated with modifications in lipid organization of the microsomal membranes, as suggested by fluorescence polarization experiments, variations in enzyme latency were not involved in the process. More likely, a decrease or increase in the biosynthesis of corresponding isoenzyme proteins could be postulated. Indeed, by radioimmunoassay, Chowdhury et al. [15] reported similar results concerning the effects of LT₃ on the content of different UDP-glucuronosyltransferase proteins, although a higher dose was used.

Analysis of the data revealed a good correlation between cytochrome *P*-450 concentration and activity of UDP-glucuronosyltransferase towards bilirubin or 4-nitrophenol. Such correlation has been previously observed after treatment of rats by carboxylic acids structurally related to clofibrate [9]. Malik and Owens [41] also reported a strong correlation between bilirubin glucuronidation and aryl hydrocarbon hydroxylase activity supported by cytochrome *P*-450 IA1. A coregulation via the fixation of benzo[*a*]pyrene to the Ah locus has been clearly established for the expression of this type of cytochrome and that of the isozyme catalyzing the glucuronidation of 1-naphthol [42]. The coordinate variation found in this study between bilirubin UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome *P*-450 could involve interactions of the substances with a cellular structure, which depend on their physicochemical properties. Indeed a thyroid receptor which corresponds to a family of eight identified proteins has been characterized [43]. The study of the regulation of the enzyme expression at the gene level should now be undertaken.

Acknowledgments

The help of T. Munsch with the radioimmuno assay of LT₄ is appreciated. Professor E. Boerwinkle (University of Texas Health Science Center, Houston, TX) is acknowledged for his critical reading of the manuscript.

References

- Dutton, G.J. (1980) in *Glucuronidation of Drugs and Other Compounds* (Dutton, G.J., ed.), pp. 3-16, CRC Press, Boca Raton.
- Antoine, B., Magdalou, J. and Siest, G. (1983) *Biochem. Pharmacol.* 32, 2629-2632.
- Magdalou, J., Hochman, Y. and Zakim, D. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 13624-13629.
- Castuma, C.E. and Brenner, R.R. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 729, 9-16.
- Cummings, J., Graham, A.B. and Wood, G.C. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 771, 127-141.
- Bock, K.W., Josting, D., Lilienblum, W. and Pfeil, H. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98, 19-26.
- Okulicz-Kozaryn, I., Schaefer, M., Batt, A.M., Siest, G. and Lopinet, V. (1981) *Biochem. Pharmacol.* 30, 1457-1461.
- Fournel, S., Magdalou, J., Pinon, P. and Siest, G. (1987) *Xenobiotica* 17, 445-457.
- Fournel, S., Magdalou, J., Thomassin, J., Villoutreix, J., Siest, G., Caldwell, J. and André, J.C. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 842, 202-213.
- Gibson, E.E., Orton, T.C. and Tamburini, P.P. (1982) *Biochem. J.* 203, 161-168.
- Goldstein, J.A. and Taurog, A. (1968) *Biochem. Pharmacol.* 17, 1049-1065.
- Rumbaugh, R.C., Krammer, R.E. and Colby, H.D. (1978) *Biochem. Pharmacol.* 27, 2027-2031.
- Just, W.W., Hartl, F.U. and Schimassek, H. (1982) *Eur. J. Cell Biol.* 26, 249-254.
- Goudonnet, H., Mounié, J. and Truchot, R.C. (1980) *J. Pharmacol.* 11, 245-256.
- Chowdhury, R.J., Chowdhury, N.R., Moscioni, A.D., Tukey, R., Tephly, T. and Arias, I.M. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 761, 58-65.
- Van Steenberg, W., Fevery, J., De Vos, R., Leyten, R., Heirwegh, K.P.M. and De Groote, J. (1989) *Hepatology* 9, 314-321.
- Lee, Y.P. and Lardy, H.A. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 1427-1436.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Gardner, R.S. (1974) *Anal. Biochem.* 59, 272-276.
- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Watiaux, R., Jacques, P. and De Duve, C. (1964) *Biochem. J.* 92, 179-205.
- Lazarow, P.B. and De Duve, C. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2043-2046.
- Gray, T.J.R., Beamand, J.A., Lake, B., Foster, J.R. and Gangolli, S.D. (1982) *Toxicol. Lett.* 10, 273-279.
- Omura, T. and Sato, R. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378.
- Grenlee, W.S. and Poland, A. (1978) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205, 593-605.
- Salaiün, J.P., Benveniste, I., Reichhart, D. and Durst, F. (1981) *Eur. J. Biochem.* 119, 651-655.
- Heirwegh, K.P.M., Van der Vijver, M. and Fevery, J. (1972) *Biochem. J.* 129, 605-611.
- Mulder, G.J. and Van Doorn, A.B.D. (1975) *Biochem. J.* 151, 131-140.
- Colin-Neiger, A., Kauffmann, I., Boutin, J.A., Fournel, S., Siest, G., Batt, A.M. and Magdalou, J. (1984) *J. Biochem. Biophys. Methods* 9, 69-79.
- Oppenheimer, J.M., Koerner, D., Schwartz, H.L. and Surks, M.J. (1972) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35, 330-333.
- Torresani, J. and De Groot, L.J. (1975) *Endocrinology* 90, 1201-1209.
- Leakey, J.E.A., Muktar, H., Fouts, J.R. and Bend, J.R. (1982) *Chem. Biol. Interactions* 40, 257-264.
- Nebert, D.W. and Gonzalez, F.J. (1987) *Annu. Rev. Biochem.* 56, 945-993.
- Thomas, H.T., Schladt, L., Knehr, M., Post, K., Oesch, F., Boiteux-Antoine, A.F., Fournel-Gigleux, S., Magdalou, J. and Siest, G. (1989) *Biochem. Pharmacol.* 38, 1963-1969.
- Markwell, M.A., Bieber, L.L. and Tolbert, N.E. (1977) *Biochem. Pharmacol.* 26, 1697-1702.
- Mitchell, A.M., Lhugenot, J.C., Bridges, J.W. and Elcombe, C.R. (1985) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80, 23-32.

- 36 Moody, D.E. and Hammock, B.D. (1987) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 89, 37-48.
- 37 Sharma, R., Lake, B.G., Foster, J. and Gibson, G.G. (1988) *Biochem. Pharmacol.* 37, 1193-1201.
- 38 Harrison, E.H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 796, 163-168.
- 39 Thomassin, J., Dragacci, S., Faye, B., Magdalou, J. and Siest, G. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* 83, 127-131.
- 40 Lilienblum, W., Platt, K.L., Schirmer, G., Oesch, F. and Bock, K.W. (1987) *Mol. Pharmacol.* 32, 173-177.
- 41 Malik and Owens, I.S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 9599-9604.
- 42 Robertson, J.A., Nebert, D.W. and Hankinson, O. (1987) *Chemica Scripta* 27, 83-87.
- 43 Roberson, M. (1987) *Nature* 330, 420-421.

3.2. INTERACTIONS PROTEINES - LIPIDES

3.2.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

Notre équipe de recherche a commencé d'abord par étudier la diffusion latérale du pyrène dans des vésicules constituées uniquement de phospholipides. Le bon accord entre le modèle et les expériences menées en excitation pulsée nous a encouragés à poursuivre dans cette voie pour étudier l'influence des protéines incluses dans la membrane sur le coefficient de diffusion de cette sonde, laquelle peut nous renseigner sur l'effet que peuvent avoir les protéines sur la fluidité membranaire. Ainsi, deux protéines ont été utilisées pour réaliser cette étude : la (Na⁺,K⁺)-adénosinetriphosphatase et la gamma-glutamyltransférase. Nous décrirons dans le paragraphe suivant ces deux protéines.

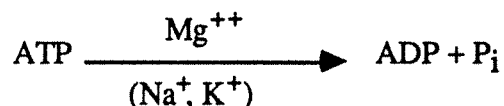
3.2.2. ETAT DES CONNAISSANCES

3.2.2.1. FONCTION ET STRUCTURE DE LA (Na⁺,K⁺)-ADENOSINE-TRIPHOSPHATASE

La (Na⁺,K⁺)-ATPase (EC 3.6.1.3) est une enzyme associée à la membrane, son activité apparaît maximale dans la membrane des dendrites et des axones neuronaux.

La (Na⁺,K⁺)-ATPase est le support enzymatique de la pompe à sodium, elle joue un rôle important dans le transport actif des ions Na⁺ et K⁺ à travers la membrane biologique.

La (Na⁺,K⁺)-ATPase a pour propriété de scinder la molécule d'adénosine triphosphate (ATP) et de libérer une molécule de phosphate inorganique (P_i) et une molécule d'adénosine diphosphate (ADP) dans le milieu intracellulaire :



Le substrat reconnu par l'enzyme est le Mg.ATP. *In vitro*, l'intensité de l'hydrolyse de l'ATP est affectée par la composition ionique du milieu réactionnel.

On admet actuellement que la (Na⁺,K⁺)-ATPase est formée de deux sous-unités principales et d'une troisième d'existence encore fort controversée [JORGENSEN, 1982] :

- un gros polypeptide, appelé α, de poids moléculaire (PM) variant entre 90 000 et 120 000, responsable de la catalyse,
- une glycoprotéine, appelée β, de PM variant entre 40 000 et 57 000, apparaît sans rôle catalytique,
- un protéolipide, appelé γ, de PM variant entre 10 000 et 12 000, dont l'existence est liée aux méthodes de purification.

Le dimère $\alpha\beta$ est suffisant pour posséder une activité catalytique [HAYASHI et al., 1989], mais on ne sait pas s'il est capable d'organiser seul, le transport des ions (qui nécessite le tétramère $\alpha_2\beta_2$).

L'activité enzymatique de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ nécessite la présence des phospholipides. De plus, elle dépend de la nature des lipides environnants [MARCUS et al., 1986]. Ainsi, la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol sont nécessaires à l'activité $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ optimale [KIMELBERG et al., 1974]. Il semble que les phospholipides interviennent dans le maintien d'un microenvironnement membranaire hydrophobe nécessaire à la fonction catalytique. En plus, l'activité ATPasique nécessite une certaine fluidité membranaire permettant des changements conformationnels de l'enzyme indispensables au fonctionnement de la pompe à sodium [BOELSTERLI et al., 1983; KEEFE et al., 1979; KIMELBERG, 1975]. Cette fluidité membranaire est elle-même sous la dépendance de la longueur et du degré de saturation des chaînes carbonées des acides gras et du taux de cholestérol.

3.2.2.2. STRUCTURE ET FONCTION DE LA GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE

La gamma-glutamyltransférase (EC 2.3.2.2) [TATE et MEISTER, 1981; GOLDBERG, 1980; CURTHOYS et HUGHEY, 1979; MEISTER et TATE, 1976], appelée encore gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), est une enzyme localisée à la face externe de la membrane plasmique. C'est la seule enzyme capable de catalyser la coupure de molécules qui renferment un groupement γ -glutamyl, tels que le glutathion et ses conjugués. Ainsi, elle joue un rôle important dans l'approvisionnement des cellules en glutathion.

En effet, la réaction de dégradation du glutathion, localisée principalement dans le rein, est une étape indispensable à la réabsorption et la redistribution de la cystéine nécessaire à la synthèse protéique et à la resynthèse intracellulaire du glutathion.

La GGT intervient aussi dans la détoxification de nombreux xénobiotiques et dans le métabolisme des leucotriènes.

La GGT est composée de deux sous-unités localisées à la face externe de la membrane plasmique, l'ancrage à la membrane se fait par l'extrémité NH_2 terminale de la grosse sous-unité [MATSUDA et al., 1983] (cf. figure 3.2.1.). La petite sous-unité qui porte le site catalytique est associée à la grosse sous-unité par des liaisons électrostatiques.

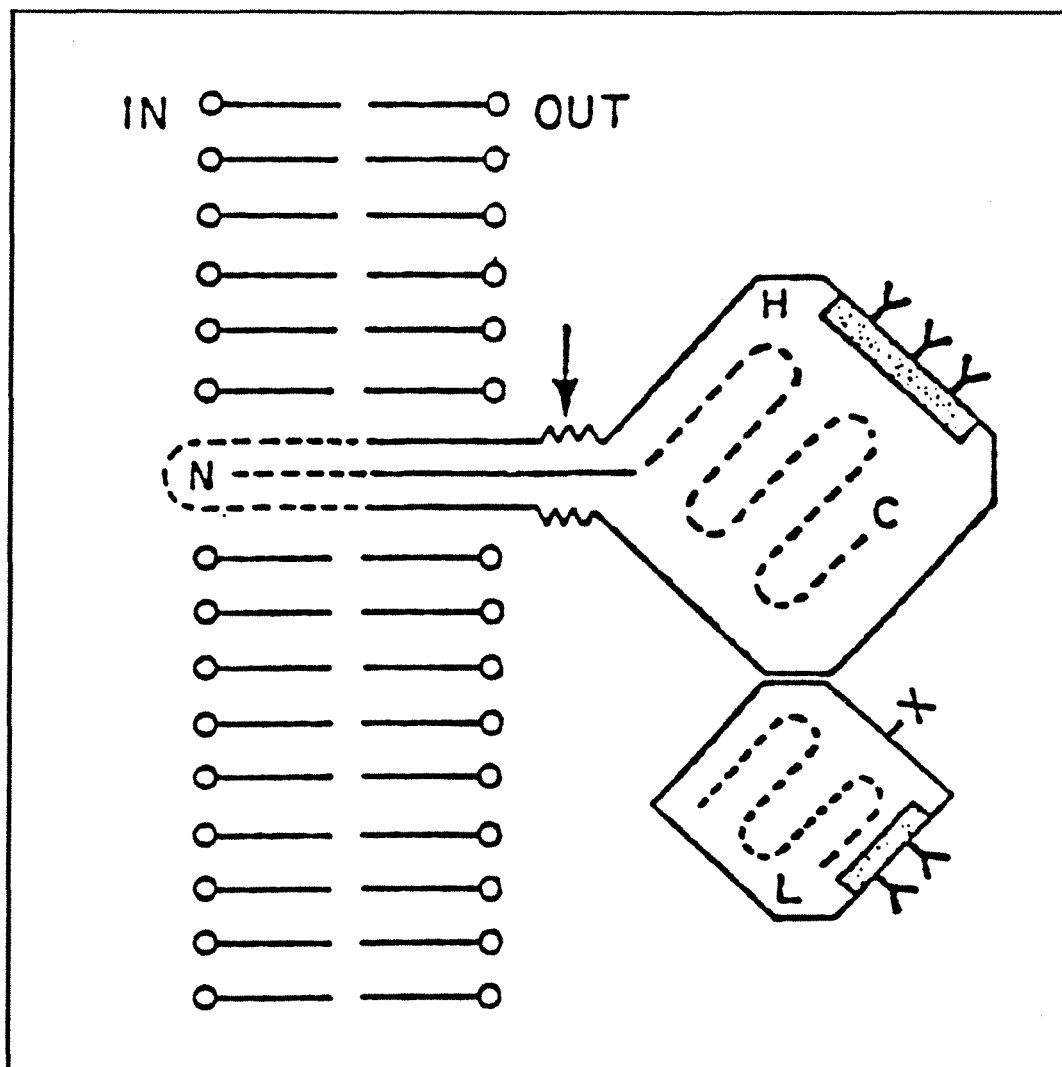


Figure 3.2.1.

Représentation schématique de la GGT [TATE et MEISTER, 1981].

X : site actif; H : grosse sous-unité; L : petite sous-unité; Y Y Y : régions glycosylées;

C et N : extrémités carboxy- et amino-terminales.

La flèche indique le site de coupure à la papaïne.

Le poids moléculaire des deux sous-unités varie selon les espèces et dans une même espèce, selon les organes [BAKOURI et al., 1984]. Il varie de 46 000 à 65 000 pour la grosse sous-unité et de 20 000 à 29 000 pour la petite sous-unité.

La GGT utilisée dans notre travail a été traitée par la papaïne. Cependant, le traitement de la GGT solubilisée dans le Triton X-100 par la papaïne libère la région amino-terminale de la grosse sous-unité [MATSUDA et al., 1983]. Il semble que cette portion soit composée d'une partie hydrophobe et d'une partie hydrophile. La partie hydrophobe, constituée d'environ 20 amino-acides hydrophobes et de poids moléculaire moyen de 2 700, permet la fixation de l'enzyme dans la membrane.

3.2.2.3. CHOIX DES PROTEINES

La (Na⁺,K⁺)-ATPase et la GGT ont été retenues pour réaliser cette étude pour les raisons suivantes :

- * elles sont membranaires, donc en principe facilement incorporables dans les liposomes. En plus, l'activité ATPasique dépend de la présence de phospholipides, ce qui nous permet de vérifier l'incorporation de cette enzyme dans les bicouches lipidiques,

- * nous avons choisi deux protéines de tailles différentes : le fragment de la GGT susceptible de s'incorporer dans les liposomes est de petite taille (PM = 2 700), alors que l'ATPase est une grosse molécule (le dimère $\alpha\beta$ est de PM 153 000) [JORGENSEN, 1974],

- * enfin, les deux protéines ne présentent ni absorption, ni fluorescence aux longueurs d'ondes où nous effectuons les mesures.

3.2.3. MATERIELS ET METHODES

3.2.3.1. PRODUITS

Les phospholipides (L- α -DLPC, P-1263; L- α -DMPC, P-0888; DL- α -DPPC, P-5911 et L- α -DSPC, P-6517) sont des produits Sigma Chemical Company.

La (Na⁺,K⁺)-ATPase de rein de chien (Grade IV : sensible à l'ouabaïne, lyophilisée, A 0142) provient de Sigma. Sachant que la protéine n'est pas complètement purifiée, nous avons corrigé les valeurs des coefficients de diffusion du pyrène trouvées en présence de cette enzyme, par le dosage des phospholipides contenus dans l'ATPase.

La GGT de rein de bœuf est un échantillon Biozyme (GGTB-2).

Le saccharose (Grade I, S 9378) provient de Sigma.

3.2.3.2. PREPARATION DES LIPOSOMES

Nous avons utilisé des liposomes unilamellaires (SUV) préparés par sonication [PAPAHADJOPOULOUS et MILLER, 1967].

Cette méthode consiste à solubiliser les phospholipides dans le chloroforme et à évaporer le solvant sous vide (rotavapor Buchi pendant 45 minutes). On obtient ainsi, un film opaque et uniforme sur les parois de verre, lequel est ensuite solubilisé dans un Tampon Tris HCl (0,1 M, pH 7,4) par chauffage au bain-marie à une température supérieure à la température de transition du phospholipide considéré (cf. § 3.2.4.2.2.). Une suspension trouble composée de vésicules multilamellaires (MLV) est obtenue.

La sonication de cette suspension, effectuée à 27 KHz, pendant 30 minutes, à l'aide d'un appareil construit au laboratoire permet d'obtenir des liposomes unilamellaires, de

diamètre compris entre 250 et 500 Å [TENCHOV et al., 1985; VAN DEN ZEGEL et al., 1984].

La solution, ainsi obtenue, est limpide et a une absorbance comprise entre 0,1 et 0,2. En effet, il est important que le milieu soit peu diffusant pour que les mesures de fluorescence soient correctes (la diffusion provoque une diminution de l'anisotropie de fluorescence (cf. § 3.4.4.2.1.)).

La concentration finale en phospholipides utilisée est de $5 \cdot 10^{-4}$ M.

Durant toutes nos expériences utilisant des liposomes, les sondes fluorescentes en solution (pyrène, P₃P, DPH et TMA-DPH) sont introduites dans la solution chloroformique des phospholipides avant la formation du film lipidique par évaporation.

3.2.3.3. INCORPORATION DES PROTEINES DANS LES LIPOSOMES DE DPPC

Les protéines (en poudre) sont ajoutées aux liposomes préformés. La suspension est agitée à l'aide d'un vortex pendant 10 s, maintenue à température ambiante au moins pendant 2 heures et finalement, sonicatée pendant 30 s.

Cette méthode [HOKIN et DIXON, 1979] d'incorporation de protéines dans les bicouches lipidiques permet d'éviter deux inconvénients :

- * la dénaturation des enzymes,
- * l'utilisation de détergents, lesquels ont généralement un effet fluidifiant sur les bicouches lipidiques.

On élimine l'oxygène des suspensions liposomiales par barbotage à l'argon pur avant toute mesure de fluorescence.

3.2.3.4. MESURE DE L'ACTIVITE DE L'ATPase INCORPOREE

Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, la mesure de l'activité ATPasique permet de vérifier l'incorporation de cette enzyme dans les liposomes. Ainsi, nous avons mesuré cette activité par la méthode de BAGINSKY et al., 1967, dans trois milieux réactionnels :

- * solution constituée uniquement du Tampon Tris HCl, utilisé pour la préparation des liposomes,
- * solution du Tampon Tris HCl contenant l'ATPase,
- * suspension des liposomes dans laquelle nous avons incorporé la même quantité d'ATPase contenue dans la deuxième solution.

L'activité enzymatique mesurée dans la première solution est nulle, alors que celle trouvée dans le troisième échantillon a augmenté de 80% par rapport à celle mesurée dans le deuxième.

On peut penser que l'augmentation de l'activité ATPasique témoigne de l'incorporation de l'enzyme dans les liposomes.

3.2.3.5. DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES DANS LA PREPARATION D'ATPase

Afin de tenir compte d'une éventuelle présence de phospholipides dans l'échantillon ATPasique utilisé, nous avons pensé à doser ces derniers.

Pour cela, nous avons utilisé la méthode de CHEN et al., 1956, laquelle est fondée sur le dosage du phosphore inorganique libéré après minéralisation des échantillons.

Les résultats montrent l'existence de 6% de phospholipides dans l'ATPase, ce qui nous a permis de corriger les valeurs des rapports (Py)/(phospholipides) et d'aboutir à des coefficients de diffusion " $D_{\text{corr.}}$ " qui tiennent compte des phospholipides ainsi dosés (cf. figure 3.2.13.).

Cependant, il faut remarquer que la quantité de phosphore mesurée peut provenir aussi de l'ATPase qui est une protéine phosphorylée. Dans tous les cas, l'influence de l'ATPase sur la diffusion membranaire a une tendance identique (cf. § 3.2.4.2.3.).

3.2.4. RESULTATS ET DISCUSSION : PROBLEMES POSES DANS LA DETERMINATION DU COEFFICIENT D'AUTODIFFUSION DE PHOSPHOLIPIDES DANS DES VESICULES

La technique d'inhibition de fluorescence utilisant des sondes comme le pyrène dont la durée de vie à l'état excité est élevée (de l'ordre de 400 ns) permet en principe d'étudier des processus de transfert dans un espace, de l'ordre de 50 à 500 Å, pouvant être affectés par la présence de protéines.

Dans cette partie, après avoir rassemblé les concepts classiques utilisés pour déterminer l'évolution temporelle de la constante apparente de vitesse de réaction d'un processus, fonction du transport moléculaire, nous avons tenté de prendre en compte un certain nombre de facteurs macro- et microscopiques qui peuvent jouer un rôle important sur la détermination, via un modèle théorique, des paramètres de réaction qui sont :

- * la distance chimique de réaction,
- * le coefficient de diffusion.

Nous montrons en particulier l'influence de la prise en compte de concepts généraux de physique des liquides pseudo-bidimensionnels, du rayon de courbure de la vésicule et également du couplage transport-réactivité entre distance de collision et distance de réaction. Les résultats des calculs sont utilisés dans la partie expérimentale et permettent d'estimer les différents paramètres d'intérêt.

3.2.4.1. MODELES

3.2.4.1.1. Modèle cinétique de réaction strictement contrôlée par la diffusion dans des membranes

Les théories des réactions dont la cinétique est limitée par la diffusion l'une vers l'autre de deux molécules A et B reposant sur des modèles continus (loi de FICK ou systèmes moléculaires s'en rapprochant) ont fait l'objet d'un grand nombre de travaux [ANDRE et al., 1979; NEMZEK et WARE, 1975; NOYES, 1956; COLLINS et KIMBALL, 1949; SMOLUCHOWSKY, 1917].

Si les aspects expérimentaux sur ce thème sont relativement moins développés, une des méthodes reposant sur une technique d'inhibition de fluorescence conduit en principe à la détermination des deux paramètres essentiels qui sont la distance de collision σ et le coefficient de diffusion mutuelle D. Or l'inhibition de fluorescence de A peut être suivie essentiellement par deux techniques : excitation continue et excitation pulsée. Lorsque ces deux techniques sont utilisées pour le même couple A et B, les valeurs de σ et D que l'on peut calculer à partir des modèles de diffusion où l'on suppose que la constante de vitesse apparente dans un espace à deux dimensions est sensiblement de la forme :

$$k_a(t) = 2\pi ND \left(\frac{1}{2} + \frac{\sigma}{\sqrt{\pi Dt}} \right) \quad (1)$$

où les symboles suivants représentent :

t : le temps

N : le nombre d'AVOGADRO

σ : la distance de collision

D : le coefficient de diffusion mutuelle

peuvent être très différentes entre elles et éloignées de la réalité physique. En effet, il n'est pas rare d'obtenir, à partir de l'hypothèse simple définie ci-dessus sur l'expression de $k_a(t)$, des valeurs de σ qui sont de l'ordre de 10 Å alors que le calcul conduit en général pour la plupart des couples (A, B) utilisés, à des valeurs de l'ordre de 6 à 7 Å.

Pour pallier ces difficultés, un certain nombre de raffinements, dans un espace à trois dimensions, a été proposé :

* introduction d'une distance cinétique $\sigma' > \sigma$ au-delà de laquelle seul intervient le processus de transport moléculaire, permettant, par l'emploi d'un paramètre supplémentaire, la cohérence entre résultats en excitations continue ou pulsée [ANDRE et al., 1979, 1978],

* introduction d'une distance de corrélation R ($\sigma < R < 2\sigma$), telle qu'entre σ et R, il existe un mécanisme de transport corrélé à une probabilité de double rencontre de deux

particules A et B [STEVENS, 1981],

- * hypothèse d'un coefficient de diffusion D fonction de r , distance entre deux espèces réactives A et B, etc... .

Grâce à l'emploi de ces techniques d'ajustement, il est possible d'obtenir des résultats cohérents avec :

- * la réalité physique, $\sigma \sim 6-7 \text{ \AA}$, $D \sim D_{\text{calculé}}$

- * l'expression de $k_a(t)$ de la forme $\alpha_0 + \beta_0/\sqrt{t}$

où α_0 et β_0 sont deux constantes expérimentales.

Toutefois, si l'introduction d'un paramètre supplémentaire dont la signification physique peut être partiellement discutable permet des ajustements, il nous a paru important de revenir à la nature même du milieu dans lequel la réaction se produit. En effet, dans les calculs ayant servi à l'interprétation des expériences d'inhibition de fluorescence, on a toujours supposé la stationnarité de la fonction de distribution radiale $g(r)$.

Sachant que les milieux étudiés sont de nature particulièrement complexe, car faisant intervenir des molécules de dimension et de forme différentes, d'interactions différentes, nous nous sommes proposés dans un premier temps de considérer les molécules A, B et S (S pour le solvant) comme des entités cylindriques dures, sans potentiel entre elles au-delà de σ . Ceci revient à supposer un ordre local S proche de l'unité et à ne pas tenir compte de processus de transport coopératifs. Toutefois, l'approche entreprise en tenant compte de l'influence de la fonction de distribution radiale sur le transport moyen, permet d'affiner les modèles développés. On verra d'ailleurs, par la suite, que les problèmes expérimentaux ont une importance aussi grande que les raffinements théoriques.

On montre toutefois que, quelle que soit la valeur de $\bar{\rho}$, représentative de la densité corpusculaire, l'expression de $k_a(t)$ est pratiquement toujours de la forme : $k_a(t) = \alpha + \beta/\sqrt{t}$.

Les résultats des calculs entrepris permettent d'expliquer une partie des différences entre résultats qui peuvent exister à partir des mesures en excitations continue ou pulsée et conduisent à des valeurs "expérimentales" beaucoup plus proches des distances réelles de collision que celles que l'on peut obtenir à l'aide d'autres modèles à deux paramètres.

La description des modèles présentée ci-après, compte tenu de son apport à la physique du système, doit être affinée dans une étape ultérieure où il sera possible de prendre en compte en particulier :

- * les potentiels locaux,
- * la forme des molécules,
- * les différences de potentiels entre molécules excitées électroniquement ou non,
- * la coopérativité des processus de transport,
- * l'influence du paramètre d'ordre sur D , etc... .

Récemment BAROS et ANDRE, 1988 ont clairement mis en évidence l'influence de $g(r)$ sur la vitesse apparente de réaction (cf. figure 3.2.2).

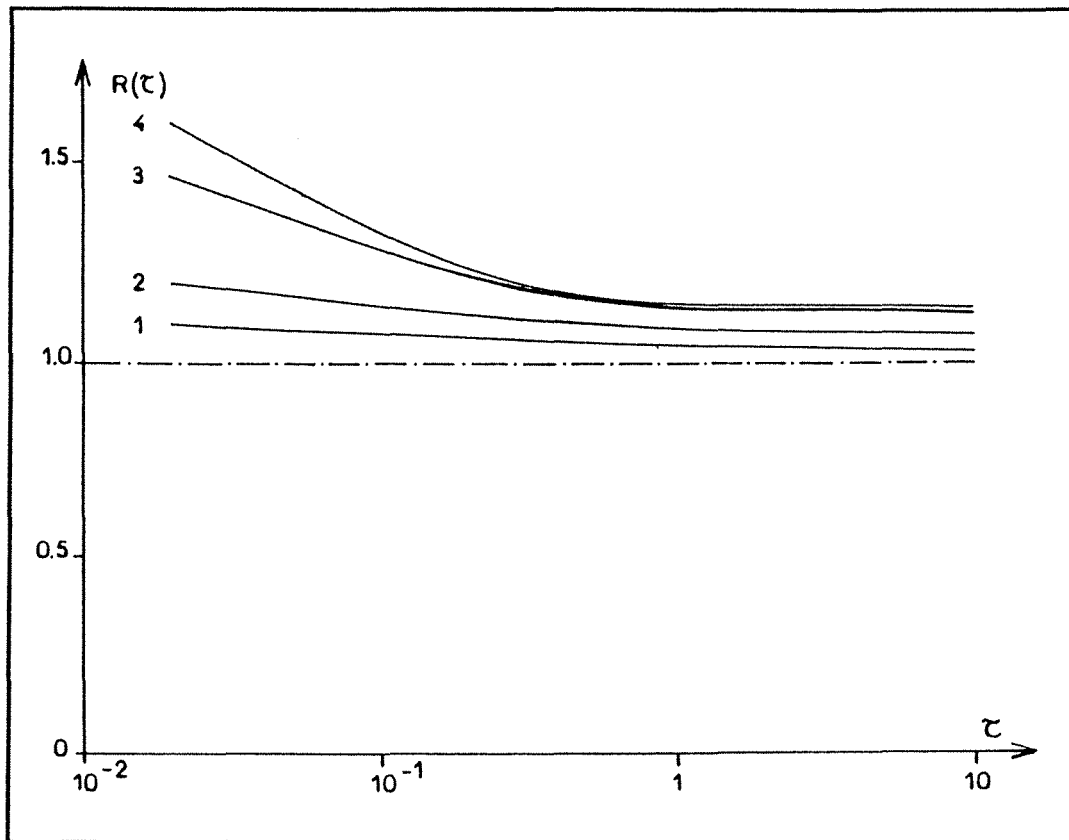


Figure 3.2.2.

Variations de $R(\tau)$ (rapport de la constante de vitesse apparente avec $g(r)$ à la constante de vitesse apparente avec $g(r)$ uniforme) pour différentes valeurs de la densité du milieu :

1) $\bar{\rho} = 0,1$; 2) $\bar{\rho} = 0,2$; 3) $\bar{\rho} = 0,4$; 4) $\bar{\rho} = 0,5$ et $\tau = Dt/\sigma^2$.

Ainsi, une augmentation de $g(r)$ a pour conséquence une diminution significative de la valeur expérimentale de σ qui atteint des valeurs acceptables.

3.2.4.1.2. Etude de réactions partiellement limitées par la diffusion : cas d'une répartition initiale uniforme des réactifs

Pour des raisons de simplicité dans des milieux à trois dimensions, il a été considéré par ANDRE et al., 1978, que l'on pouvait séparer l'espace au voisinage d'une molécule réactive A en deux zones, entre σ , distance de collision et σ' , distance de réaction et au-delà de σ' .

* Entre σ et σ' , on considère que la réaction chimique intervient avec la même probabilité et que la diffusion est pratiquement infinie entre ces deux bornes. Ceci revient à considérer une répartition uniforme de la densité des molécules B entre ces deux valeurs.

* Au-delà de σ' , seule intervient la diffusion.

Partant d'une répartition initiale des réactifs, la figure 3.2.3. illustre schématiquement l'évolution temporelle de $\phi(r,t)$ où ϕ est la fonction de distribution configurationnelle.

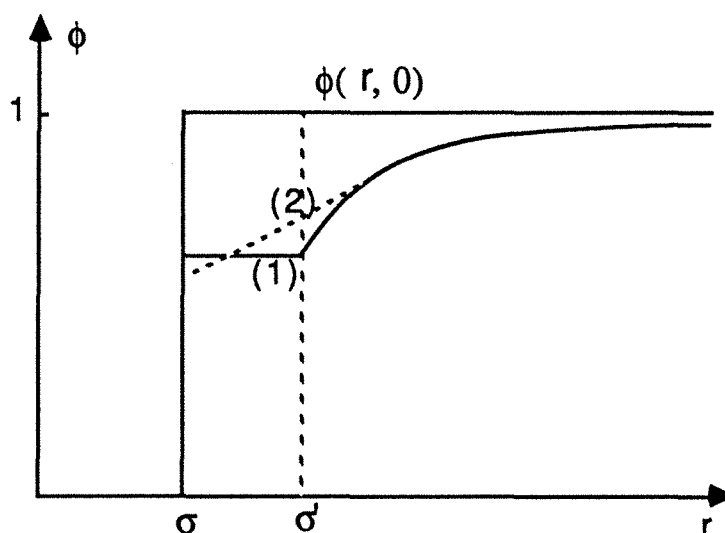


Figure 3.2.3.

Variations approximatifs de $\phi(r,t)$

1) : Modèle simplifié (diffusion infinie entre σ et σ') 2) : Modèle complet.

Partant de cette base développée à trois dimensions, il est possible de la transposer dans un espace à deux dimensions. Nous montrons qu'il est possible également de faire intervenir une diffusion non infinie entre σ et σ' , ce qui ne modifie pas profondément l'expression de la vitesse de réaction mais change en partie les coefficients dans cette expression.

*** Modèle simplifié faisant l'hypothèse d'une diffusion infinie entre σ et σ'**

Comme cela a déjà été précisé ci-dessus, il convient de résoudre le système classique :

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \phi}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial \phi}{\partial r} \right) - k\phi \quad (2)$$

où k est la constante de vitesse de réaction, exprimée en s^{-1} .

A partir des hypothèses présentées sur la figure 3.2.3., on découpe l'espace de symétrie cylindrique en deux domaines distincts, l'un où la réaction intervient, l'autre où seule la diffusion joue un rôle.

Ainsi, pour $r > \sigma'$, on a à résoudre le système simplifié :

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 \phi}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial \phi}{\partial r} \right) \quad (3)$$

avec les conditions limites suivantes : le flux de B à σ' est la somme des molécules B qui apparaissent par accumulation entre σ et σ' et de celles qui disparaissent par réaction chimique [ANDRE et al., 1979], conduisant à :

$$2\pi N\sigma'D \left(\frac{\partial \phi}{\partial r} \right)_{\sigma'} = NS_1 \left(\frac{\partial \phi}{\partial t} \right)_{\sigma'} + K_c \phi(\sigma', t) \quad (4)$$

où $S_1 = \pi (\sigma'^2 - \sigma^2)$ et $K_c = kNS_1$

Ce système a une solution dans l'espace de LAPLACE. En posant :

$$y(r, s) = \int_0^\infty e^{-s\tau} \phi(r, t) d\tau, \quad K = k \frac{\sigma'^2}{D} \quad R = \frac{\sigma'}{\sigma} \quad \text{et} \quad \tau = \frac{Dt}{\sigma'^2}$$

la solution du système conduit à :

$$y(R, s) = \frac{1}{s} \left(1 - \frac{K\alpha}{\alpha(K + s) + \sqrt{s} \frac{K_1(R\sqrt{s})}{K_0(R\sqrt{s})}} \right) \quad (5)$$

où K_0 et K_1 sont des fonctions de BESSEL,

et à l'expression de la vitesse apparente de réaction dans l'espace de LAPLACE :

$$k_a^1(s) = 2\pi N \sigma^2 k \frac{R^2 - 1}{2} y(R, s) \quad (6)$$

provenant de l'expression de la constante de vitesse apparente dans l'espace réel :

$$k_a(t) = NS_1 k \phi(R, t)$$

En particulier, quand K tend vers l'infini, cette expression se simplifie notablement et conduit à une valeur approchée de la constante apparente de réaction qui est :

$$k_a(t) \approx 2\pi ND \left(\frac{1}{2} + \frac{\sigma'}{\sqrt{\pi Dt}} \right)$$

où $k_a(t)$ est ici exprimée en $\text{mole}^{-1} \cdot \text{dm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

En dehors de ces conditions particulières, il est exclu de pouvoir inverser l'expression de $y(R, s)$ et de revenir dans l'espace réel.

* Modèle ne faisant pas l'hypothèse d'une diffusion infinie entre σ et σ'

Dans ces conditions, le modèle se complique mais reste soluble dans l'espace de LAPLACE. Le système suivant doit être résolu en prenant $\rho = r/\sigma$, $R = \sigma'/\sigma$ et $\tau = Dt/\sigma^2$:

$$\text{- pour } 1 < \rho < R : \frac{\partial \phi_1}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 \phi_1}{\partial \rho^2} + \frac{1}{\rho} \frac{\partial \phi_1}{\partial \rho} - K \phi_1 \quad (7)$$

$$\text{- pour } \rho > R : \frac{\partial \phi_2}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 \phi_2}{\partial \rho^2} + \frac{1}{\rho} \frac{\partial \phi_2}{\partial \rho} \quad (8)$$

avec pour conditions aux limites :

$$\left(\frac{d\phi_1}{d\rho} \right)_1 = 0 \quad ; \quad (\phi_1)_R = (\phi_2)_R \quad ; \quad \left(\frac{d\phi_1}{d\rho} \right)_R = \left(\frac{d\phi_2}{d\rho} \right)_R$$

ce qui conduit, dans l'espace de LAPLACE à :

$$- \text{pour } 1 < \rho < R \quad (s + K) y_1 - 1 = y_1'' + \frac{1}{\rho} y_1' \quad (9)$$

$$- \text{pour } \rho > R \quad s y_2 - 1 = y_2'' + \frac{1}{\rho} y_2' \quad (10)$$

et à :

$$y_1(\rho, s) = \frac{1}{s + K} + A_1 K_0(\rho \sqrt{s + K}) + B_1 I_0(\rho \sqrt{s + K})$$

$$y_2(\rho, s) = \frac{1}{s} + A_2 K_0(\rho \sqrt{s + K})$$

avec I_0 , K_0 , I_1 et K_1 : des fonctions de BESSEL modifiées; A_1 , A_2 et B_1 : trois coefficients fonction de s .

$$\text{En posant } v = \frac{I_1(\sqrt{s + K})}{K_1 \sqrt{s + K}} \text{ et } \mu = \frac{v \sqrt{s + K} K_1(R \sqrt{s + K}) - \sqrt{s + K} I_1(R \sqrt{s + K})}{\sqrt{s} K_1(R \sqrt{s})}$$

on obtient :

$$A_1 = v B_1 ; A_2 = \mu B_1 ; B_1 = \frac{K}{s(s + K) [v K_0(R \sqrt{s + K}) + I_0(R \sqrt{s + K}) - \mu K_0(R \sqrt{s})]}$$

La constante apparente de réaction de A avec B s'exprime par la relation :

$$k_a(\tau) = 2\pi N \int_{\sigma}^{\infty} r \cdot k(r) \cdot \phi(r) dr = 2\pi N \sigma^2 k \int_1^R \rho \phi(\rho) d\rho$$

ce qui conduit, dans l'espace de LAPLACE, à la transformée $k_a^2(s)$ de $k_a(t)$ suivante :

$$k_a^2(s) = \frac{2\pi N \sigma^2 k}{s + K} \left(\frac{R^2 - 1}{2} + A_1 \sqrt{s + K} [K_1(\sqrt{s + K}) - R K_1(R \sqrt{s + K})] \right. \\ \left. + B_1 \sqrt{s + K} [R I_1(R \sqrt{s + K}) - I_1(\sqrt{s + K})] \right) \quad (11)$$

Sans chercher à inverser ces expressions algébriques, nous montrons ci-dessous qu'il est possible de les comparer.

* Comparaison entre les deux modèles

Le second modèle qui a été décrit ci-dessus correspond à une représentation plus physique que le premier. Ainsi, nous partons d'un couple de valeurs (R, K), ce qui permet de calculer l'expression de $k_a^2(s)$ mais également, par une méthode d'ajustement numérique, les valeurs de R' et K' dans l'expression de $k_a^1(s)$ conduisant, au sens des moindres carrés, à des expressions de $k_a^1(s)$ et $k_a^2(s)$ aussi proches que possible l'une de l'autre.

Par ces techniques d'ajustement autorisées par le théorème de PARCEVAL, il est possible de montrer que les valeurs de R' et K' sont toujours supérieures à celles de R et K (cf. tableau 3.2.1.).

Tableau 3.2.1.
Valeurs de R, K, R/R' et K/K'.

R	K	R/R'	K/K'
1,5	0,1	0,91	1,47
	1	0,91	1,45
	10	0,92	1,39
	25	0,93	1,32
1,25	0,1	0,94	1,49
	1	0,94	1,48
	10	0,94	1,46
	25	0,95	1,43
1	0,1	1	1
	10	1	1

Ainsi, pour des réactions dont la cinétique est partiellement limitée par la diffusion, on utilise généralement un modèle simplifié (R', K') et les valeurs physiques de R qui lui correspondent sont des valeurs qui sont toujours inférieures. Ce résultat est important car cela conduit à des valeurs de σ réelles qui peuvent être inférieures à celles déterminées à partir de modèles simplifiés.

Or, expérimentalement, il est particulièrement délicat de faire la différence entre une réaction **totale**ment limitée par la diffusion (K infini) et une réaction **partiellement** limitée par la diffusion avec K grand. Dans ces conditions, la valeur de σ trouvée à l'aide d'un modèle simplifié est une valeur mesurée par excès.

3.2.4.1.3. Influence de l'espace accessible à la réaction et de la répartition des réactifs

Dans les modèles développés ci-dessus, nous avons fait l'hypothèse d'un espace à deux dimensions pratiquement infini. Or, l'expérimentation projetée concerne des vésicules de taille restreinte. Dans ces conditions, il apparaît deux limites aux modèles présentés, liées à l'espace accessible à la réaction et à la probabilité de présence des espèces réactives au sein de chaque système organisé.

* Influence de l'espace accessible à la réaction

DE SCHRYVER et VAN DER AUWERAER, 1981, ont montré l'influence du rayon de courbure sur la cinétique de réaction limitée par la diffusion dans des espaces bornés, des micelles en particulier. Dans le cas de vésicules de grande taille, par rapport aux systèmes micellaires ayant fait l'objet d'études, on se trouve dans une situation intermédiaire entre celle de ces systèmes et celle du transport dans un plan.

En reprenant les bases des calculs présentés par VAN DER AUWERAER et en admettant une fonction de distribution radiale uniforme, nous avons cherché à calculer l'évolution temporelle d'une réaction dont la cinétique est limitée strictement par la diffusion l'une vers l'autre des espèces en réaction.

En coordonnées sphériques, il convient de résoudre, si aucun potentiel n'existe entre les molécules réactives, l'équation différentielle :

$$\frac{\partial \phi(\theta, t)}{\partial t} = \frac{D}{R^2 \sigma^2} \frac{1}{\sin(\theta)} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin(\theta) \frac{\partial \phi(\theta, t)}{\partial \theta} \right) \quad (12)$$

où ϕ représente la distribution configurationnelle,

$R \cdot \sigma$ le rayon moyen de la vésicule,

D la somme des coefficients de diffusion, et,

θ l'angle qui existe entre la position des réactifs (cf. figure 3.2.4.), en tenant compte des conditions suivantes :

$$\begin{array}{ll} \phi(\theta_{AB}, t) = 0 & \text{pour } t > 0 \\ & \theta_{AB} \text{ correspondant à l'angle de réaction} \\ \phi(\theta, 0) = 1 & \text{pour } \theta > \theta_{AB} \end{array}$$

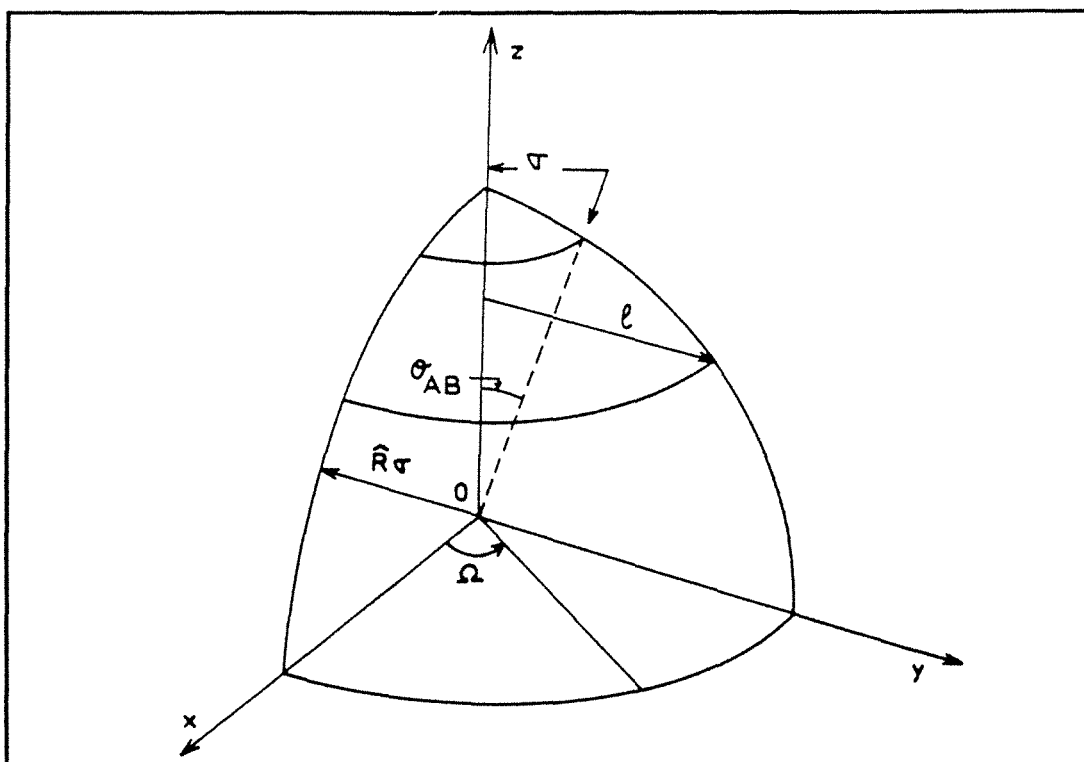


Figure 3.2.4.

Définitions utilisées pour décrire la diffusion sur une sphère.

Cependant, la conservation du nombre de molécules réactives au cours du temps implique que :

$$\int_{\theta_{AB}}^{\pi} \sin(\theta, \tau) d\theta = \text{cste}$$

Pour une valeur de s donnée, il est possible de calculer l'expression de la transformée de LAPLACE du flux définissant la constante apparente de vitesse, f_R , mais ces calculs sont très longs et entachés de suspicion à cause de problèmes d'erreurs de chute.

Solution stationnaire

Quand s tend vers 0, la résolution de l'équation de transport devient pratiquement triviale ; compte tenu des contraintes liées au système en réaction, on obtient :

$$F_{\infty} = 2\pi ND (1 - \cos^2(\theta_{AB})) \left(\frac{\partial \phi}{\partial \cos(\theta)} \right)_{\cos(\theta_{AB})} = 2\pi ND \frac{1 + \cos(\theta_{AB})}{\text{Ln} \left(\frac{1 - \cos(\theta_{AB})}{2} \right)}$$

Cette solution stationnaire peut être atteinte si les molécules qui diffusent ont la possibilité de migrer dans tout l'espace accessible, c'est-à-dire la surface de la sphère.

Or si l'on désigne par τ_0 la durée de vie moyenne des molécules réactives à l'état excité, la distance quadratique moyenne s'exprime sensiblement par : $\langle d \rangle \approx \sqrt{D\tau_0}$.

Dans le cas particulier du pyrène excité électroniquement dans son premier singulet, τ_0 est de l'ordre de 10^{-7} s ; si $D \sim 10^{-7}$ cm²/s, valeur courante trouvée pour l'auto-diffusion de lipides dans des membranes [VAZ et al., 1984; 1982], alors : $\langle d \rangle \approx 10$ Å.

Ainsi, dans des micelles où le coefficient de diffusion est toujours plus élevé, $\langle d \rangle$ est supérieur à $2R^*\sigma$; en revanche, pour les vésicules qui font l'objet de cette étude et dont le diamètre est de l'ordre de 250 Å [VAN DEN ZEGEL et al., 1984] : $\langle d \rangle \ll 2R\sigma$.

Il découle de cette constatation que la solution stationnaire s'applique au cas de milieux bornés de faible dimension comme l'ont montré DE SCHRYVER et al., 1981. En revanche, dans des milieux plus larges (cas des vésicules), cette valeur n'est pratiquement jamais atteinte et en première approximation, tout se passe comme si on avait affaire à un espace infini.

Système simplifié

Si on considère que le diamètre de la molécule est faible par rapport au rayon de la vésicule, alors $\cos(\theta_{AB}) \approx 1$.

Ainsi, il est possible d'exprimer la valeur approximative de la constante de vitesse apparente par la relation :

$$k_{\infty} \approx 2\pi ND \left(\frac{1}{2} + \frac{\sigma}{\sqrt{\pi Dt}} + a \text{Erfc} \left(\frac{bR^*\sigma}{2\sqrt{Dt}} \right) \right) \quad (13)$$

$$\text{Pour les temps courts : } k_{\infty} \approx 2\pi ND \left(\frac{1}{2} + \frac{\sigma}{\sqrt{\pi Dt}} \right)$$

Pour des temps plus longs :

$$k_{\infty} \approx 2\pi ND \left(\frac{1}{2} + \frac{\sigma}{\sqrt{\pi Dt}} + \frac{a \exp \left(-\frac{b^2 R^{*2} \sigma^2}{4Dt} \right)}{\sqrt{\pi} b R^* \sigma} 2\sqrt{Dt} + \dots \right)$$

avec $a = -0,036 \sqrt{R^*}$ et $b = 0,096$ pour $2,5 \leq R^* \leq 20$.

Par exemple pour : $t = 100 \text{ ns}$, $D = 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, $\sigma = 10 \text{ \AA}$ et $R^* = 10$, la contribution du terme complémentaire est inférieure à 10 %. Nous verrons par la suite si l'on peut négliger ce terme.

3.2.4.1.4. Répartition poissonnienne des réactifs

Supposons tout d'abord que toutes les vésicules contiennent le même nombre b_0 de molécules réactives dans l'état fondamental; en admettant par simplicité que la constante de vitesse de réaction est sensiblement constante - soit $\langle k \rangle$ - l'équation définissant l'évolution temporelle du réactif excité est de la forme :

$$\frac{d[A^*]}{dt} = -[A^*] \left(\frac{1}{\tau_0} + \langle k \rangle \frac{b_0}{4\pi N R^{*2} \sigma^3} \right)$$

où τ_0 est la durée de vie naturelle. Ceci conduit, dans le cas du pyrène à :

$$[A^*]_t = b_0 [A_0] \exp \left(- \left[\frac{1}{\tau_0} + \langle k \rangle \frac{b_0}{4\pi N R^{*2} \sigma^3} \right] t \right)$$

Si l'on suppose que le nombre de molécules de pyrène dans une vésicule n'est plus constant mais est distribué suivant une loi de POISSON centrée en b_0 , sachant que la probabilité d'avoir i molécules de B dans une vésicule est exprimée par :

$$p(i) = \frac{b_0^i e^{-b_0}}{i!}$$

le calcul de l'évolution temporelle de $(A)^*$ est défini par :

$$[A^*]_t = \sum_{i=1}^{\infty} i p(i) [A_i] = [A_0] b_0 \exp \left(- \frac{t}{\tau_0} + b_0 \exp \left(- \langle k \rangle \frac{t}{4\pi N R^{*2} \sigma^3} \right) - 1 \right)$$

dans les conditions de nos mesures, en supposant :

$$\langle k \rangle = 2\pi N \sigma D \left(1 + \frac{2\sigma}{\sqrt{D\tau_0}} \right)$$

et avec des valeurs numériques typiques :

$$\sigma = 10 \text{ \AA} ; D = 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s} ; \tau_0 = 2.10^{-7} \text{ s} ; R^* \sigma = 125 \text{ \AA}$$

nous avons représenté dans le tableau 3.2.2. les variations de $[(A^*)_1 - (A^*)_2]/(A^*)_1 = (\Delta A/A)$ en fonction du temps.

Tableau 3.2.2.
Variations de $\Delta A/A$ en fonction du temps.

t (ns)	$\Delta A/A$	
	b = 20	b = 40
2	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$
102	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-2}$
192	$1,9 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$

3.2.4.1.5. Influence des protéines sur la constante de vitesse

Lorsque des protéines sont présentes dans une membrane, il va de soi que les mouvements de "contournement" qui peuvent intervenir contribuent à ralentir la cinétique de réaction entre A^* et B et, par suite, à fournir une valeur de D entachée d'erreur par défaut.

Nous fournissons ci-après une analyse simplifiée des phénomènes mis en cause.

La figure 3.2.5. met en évidence l'influence que peut avoir une protéine sur la cinétique de réaction $A^* + B$. Pour modéliser simplement l'influence d'un tel "obstacle", nous avons utilisé les hypothèses simplificatrices suivantes :

- * l'espace accessible à la diffusion est infini, ou pratiquement infini,
- * la diffusion de la ou des protéines est considérée comme négligeable devant les autres mouvements moléculaires,
- * la forme des protéines, pratiquement identiques, peut être représentée schématiquement par l'aire comprise entre deux cercles concentriques et deux rayons convergents vers le centre de A.

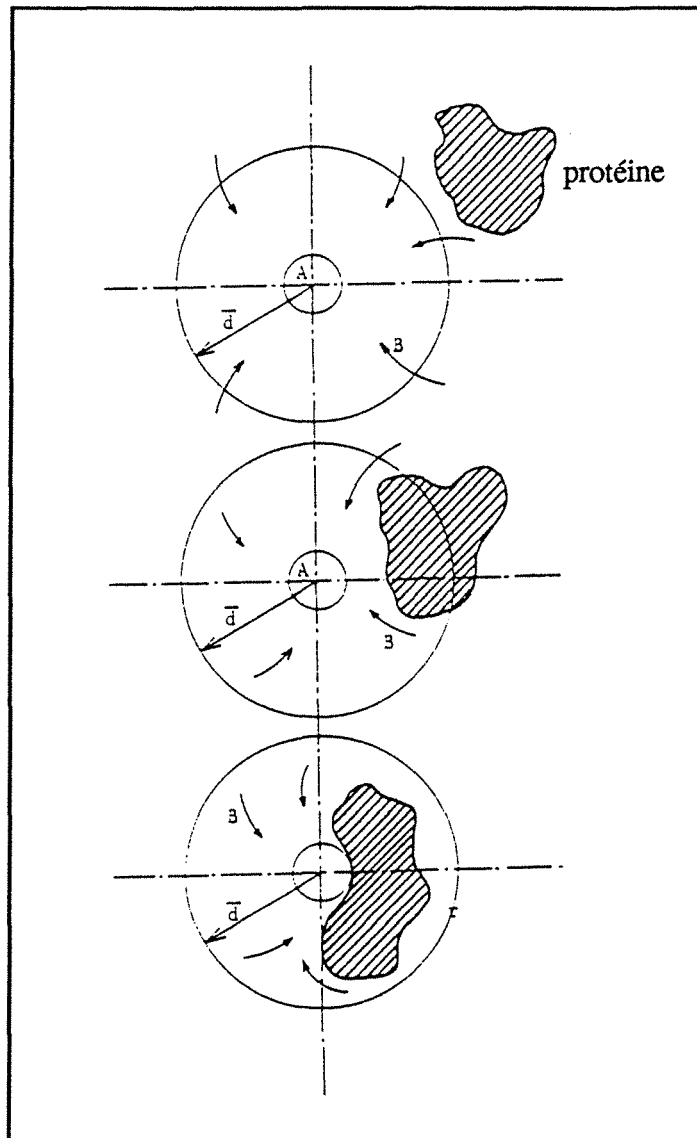


Figure 3.2.5.

Influence des protéines sur la diffusion des autres molécules.

Comme le montre la figure 3.2.6., on peut remplacer le système complexe précédent par plusieurs sous-systèmes :

- * entre σ et σ' , il n'existe pas de protéines (coefficient de diffusion maximum $\langle D_a \rangle$),
- * entre $R\sigma'$ et $2L\sigma'$ (épaisseur de la protéine), on peut trouver une protéine; le coefficient de diffusion apparent et la concentration en B doivent être modifiés pour tenir compte de la présence de la protéine,

* au-delà de la dernière limite, le coefficient de diffusion peut être défini par :

$$\langle D \rangle = (1 - p) D_f + p D_s$$

où D_f et D_s correspondent à la diffusion dans la partie fluide et dans la partie solide du milieu respectivement et p est la probabilité de présence d'une partie solide.

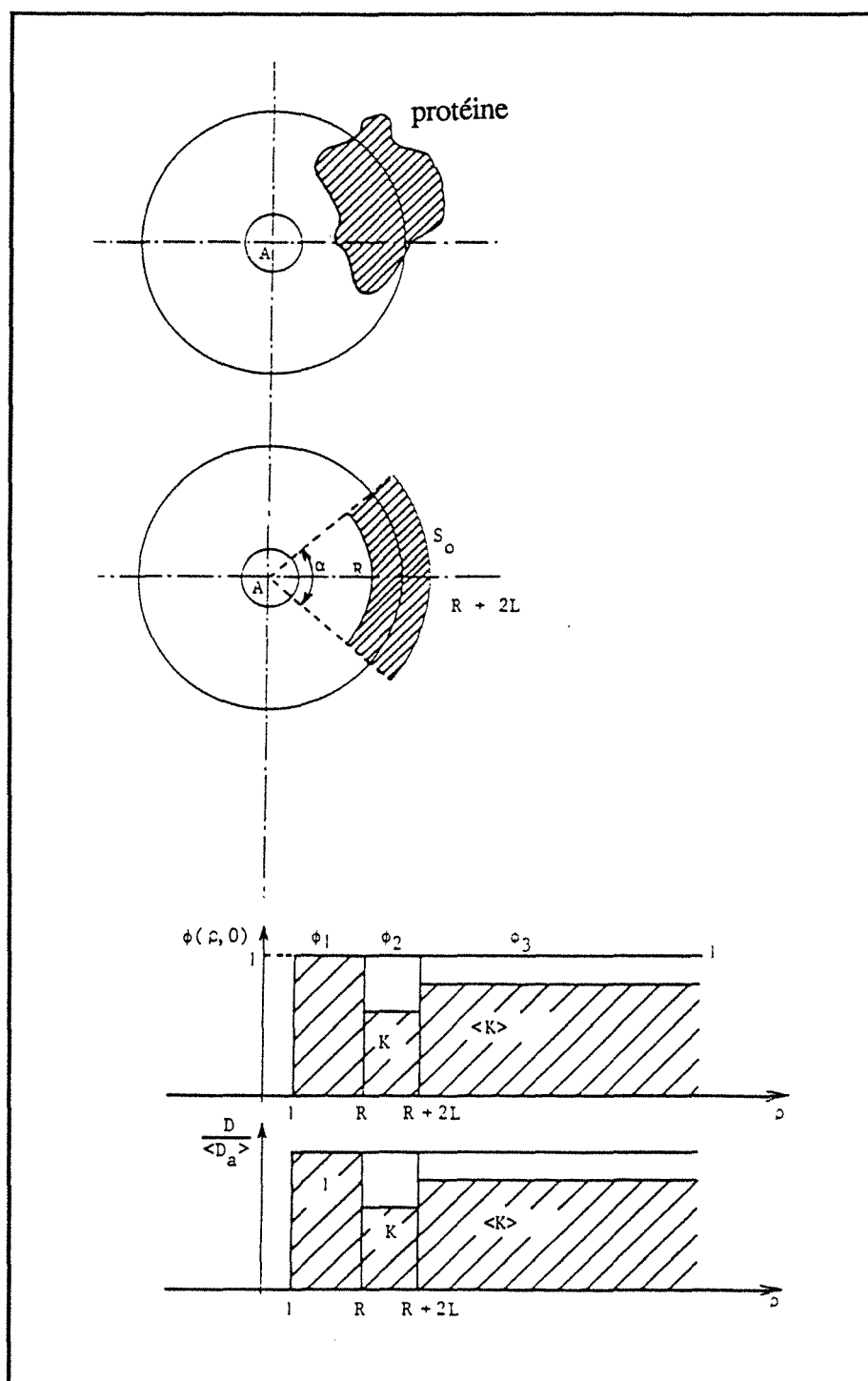


Figure 3.2.6.
Simplification du système diffusionnel en présence de protéines.

A partir de ces hypothèses, on doit résoudre le système d'équations suivant :

$$\text{- pour } 1 < \rho < R \quad \frac{\partial \phi_1}{\partial \tau} = \left(\frac{\partial^2 \phi_1}{\partial \rho^2} + \frac{1}{\rho} \frac{\partial \phi_1}{\partial \rho} \right)$$

$$\text{- pour } R < \rho < R + 2L \quad \frac{\partial \phi_2}{\partial \tau} = K \left(\frac{\partial^2 \phi_2}{\partial \rho^2} + \frac{1}{\rho} \frac{\partial \phi_2}{\partial \rho} \right)$$

$$\text{- pour } R + 2L < \rho < \infty \quad \frac{\partial \phi_3}{\partial \tau} = \langle K \rangle \left(\frac{\partial^2 \phi_3}{\partial \rho^2} + \frac{1}{\rho} \frac{\partial \phi_3}{\partial \rho} \right)$$

$$\text{avec } \tau = \frac{\langle D_a \rangle t}{\sigma'^2} \quad \text{et } \rho = \frac{r}{\sigma'}$$

et les conditions limites suivantes :

$$\phi_1(\rho, 0) = 1 ; \phi_2(\rho, 0) = K ; \phi_3(\rho, 0) = \langle K \rangle$$

$$\left(\frac{\partial \phi_1(\rho, t)}{\partial \rho} \right)_R = \left(\frac{\partial \phi_2(\rho, t)}{\partial \rho} \right)_R \quad \text{et} \quad \left(\frac{\partial \phi_2(\rho, t)}{\partial \rho} \right)_{R+2L} = \left(\frac{\partial \phi_3(\rho, t)}{\partial \rho} \right)_{R+2L}$$

Ce système ne peut pas être résolu dans l'espace réel, par contre il est résolu dans l'espace de LAPLACE. Un développement en série dans cet espace nous permet d'obtenir une estimation de la constante de vitesse apparente de réactions limitées par la diffusion, qui en deux dimensions, est de la forme :

$$k_a(t) \approx 2\pi N \langle D_a \rangle \left(a + \frac{\sigma'}{\sqrt{\pi \langle D_a \rangle t}} \right) \quad (14)$$

où a est un coefficient de calcul compris entre 0 et 0,5 dépendant de la surface globale occupée par les protéines (cf. figure 3.2.7.).

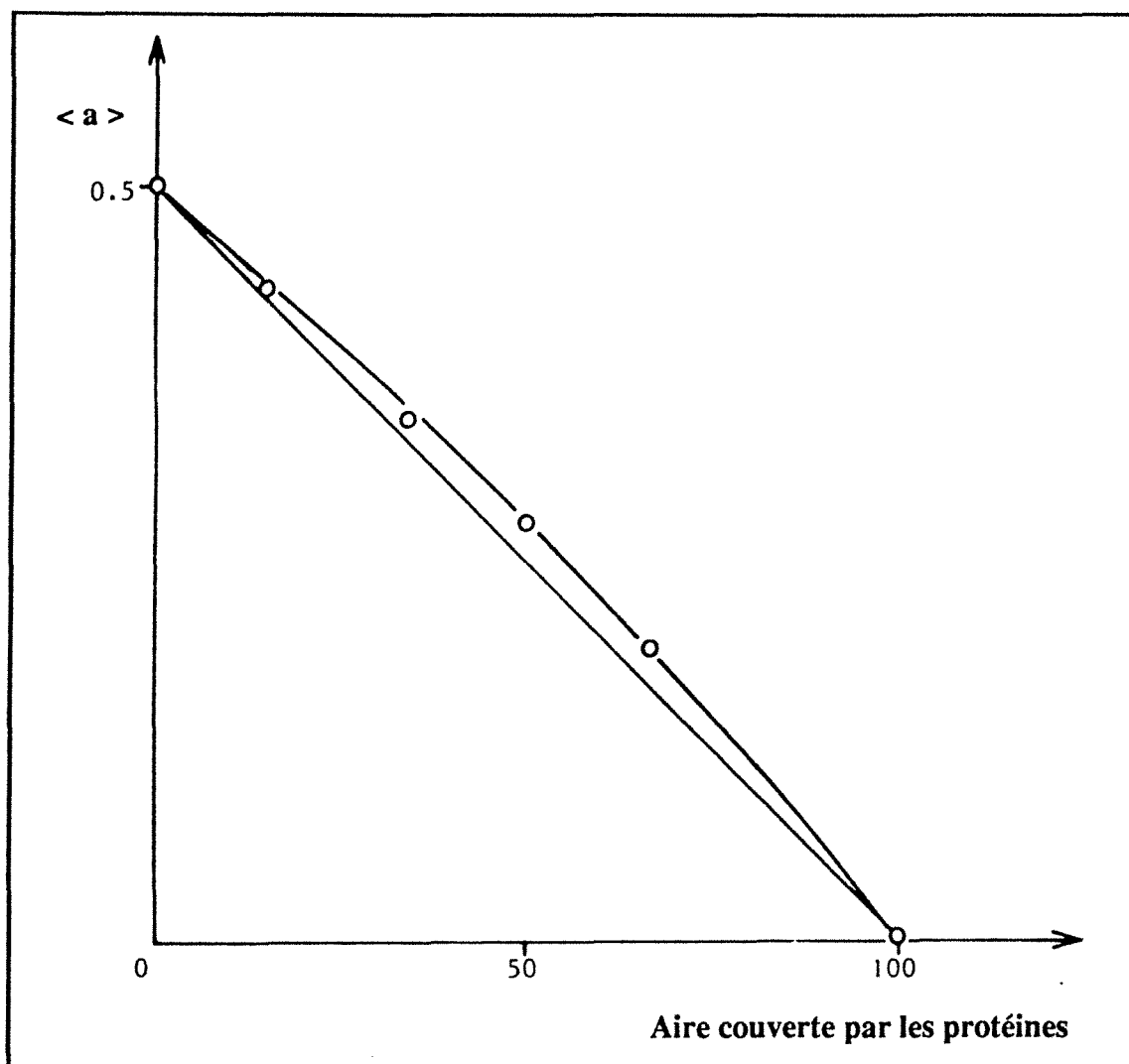


Figure 3.2.7.

Influence de l'aire couverte par les protéines constituant la membrane sur le facteur constant $\langle a \rangle$.

Ainsi, très schématiquement, la présence d'une protéine à une distance R de la sonde est interprétée par le déclin de la composante stationnaire de la constante de vitesse apparente, ce qui se traduit par une diminution apparente du coefficient de diffusion.

3.2.4.1.6. Conclusions

Comme l'a montré l'ensemble des calculs sur des cinétiques de réaction se produisant dans des milieux quasi bidimensionnels, la constante de vitesse d'une réaction dont la cinétique est pratiquement limitée par la diffusion peut toujours être exprimée par une loi de la forme :

$$k_a(t) = \alpha + \beta/\sqrt{t}$$

où α et β sont deux paramètres ajustables.

L'utilisation de concepts de physique des liquides, la prise en compte du transport moléculaire couplé avec la réactivité ainsi que du rayon de courbure du milieu dans lequel la réaction s'effectue conduit à des modifications faibles mais parfois significatives des coefficients définissant le système en réaction, à savoir coefficient de diffusion et distance chimique de réaction.

Cependant, l'incorporation des protéines dans les membranes semble altérer significativement, ces coefficients.

Ces différentes corrections sont apportées à des mesures d'inhibition de fluorescence dans des milieux organisés et permettent, comme le montrent les résultats faisant l'objet de la partie expérimentale, la détermination des paramètres d'intérêt.

3.2.4.2. RESULTATS ET DISCUSSION DES EXPERIENCES EN EXCITATION PULSEE (FLUORESCENCE DU PYRENE)

Après avoir défini les constantes de vitesse de processus dont la cinétique est diffusionnelle, une expérimentation sur la formation d'excimères du pyrène en excitations continue et pulsée a été réalisée. S'il est délicat pour l'instant d'essayer de tirer des conclusions sur la physique du système à partir d'expériences en excitation continue, nous montrons par contre, que moyennant des hypothèses raisonnables, il est possible d'atteindre dans des membranes synthétiques la valeur du coefficient de diffusion et la distance de réaction entre pyrène excité et pyrène dans l'état fondamental.

3.2.4.2.1. Réactions dont la cinétique est pratiquement limitée par la diffusion

Dans le cas particulier du pyrène la réaction de formation d'excimères intermoléculaires (cf. figure 1.2.5.) est une réaction dont la cinétique du processus de retour peut être considérée comme négligeable. De plus, on fait l'hypothèse que la cinétique de formation d'excimère est définie par le transport l'une vers l'autre de ces deux entités. Compte tenu de ces propriétés particulières, la constante de vitesse du processus de réaction correspond sensiblement à celle d'un processus dont la cinétique est limitée par la diffusion et par suite aux systèmes définis au § 3.2.4.1..

On rappelle que pour une réaction se produisant de façon collisionnelle dans un plan, la constante apparente de réaction est sensiblement de la forme :

$$k_a^{(0)}(t) \approx 2\pi ND \left(\frac{1}{2} + \frac{\sigma}{\sqrt{\pi Dt}} \right)$$

L'utilisation de concepts de physique des liquides prenant en compte l'effet des fonctions de distribution radiales $g(r)$ conduit en fait à une expression de forme semblable qui est :

$$k_a^{(1)}(t) \approx 2\pi N f_1 D \left(\frac{1}{2} + \frac{\sigma}{\sqrt{\pi D t}} \right)$$

où f_1 est un facteur d'amplification qui dépend essentiellement de la densité surfacique du milieu dans lequel s'effectue le transport.

Par ailleurs, la réaction, compte tenu d'une attraction élevée entre les deux espèces réactives, peut se produire à des distances supérieures à la distance de collision σ ; on considère alors par simplicité une constante de vitesse indépendante de l'espace entre σ et σ' , la distance chimique de réaction. On montre alors que pour des réactions dont la cinétique est **pratiquement** (mais pas complètement) limitée par la diffusion l'une vers l'autre des espèces en réaction, $k_a(t)$ devient :

$$k_a^{(2)}(t) \approx 2\pi N D \left(\frac{1}{2} + \frac{f_2 \sigma}{\sqrt{\pi D t}} \right)$$

où f_2 est un facteur dépendant de la constante chimique de réaction, de σ'/σ , de D . Ce coefficient tire son origine de la compétition entre réaction et transport entre σ et σ' .

Enfin, quand on change l'espace accessible à la réaction en jouant sur le rayon de courbure de la sphère sur laquelle le transport s'effectue, l'expression de $k_a(t)$ est à nouveau modifiée et devient :

$$k_a^{(3)}(t) \approx 2\pi N D \left(\frac{1}{2} + \frac{\sigma}{\sqrt{\pi D t}} + a \operatorname{Erfc} \left(\frac{b R^* \sigma}{2 \sqrt{D t}} \right) \right)$$

où a et b sont des coefficients et $R^* \sigma$ le rayon de la sphère.

Comme on peut le constater, la prise en compte de l'ensemble de ces considérations est nécessaire pour que simultanément on puisse atteindre les deux paramètres de réaction que sont σ et D .

Il va de soi que cette représentation ne correspond qu'à une vision simplifiée des phénomènes de transport couplés avec la réaction chimique. Toutefois, nous avons surtout recherché des relations utilisables par les expérimentateurs. Ce sont ces relations qui seront utilisées dans la suite de ce travail.

3.2.4.2.2. Diffusion dans des phospholipides purs

Les déclin de fluorescence, obtenus par comptage monophotonique, de la forme $\exp - (\alpha t + \beta \sqrt{t})$, où α et β sont deux constantes ajustées, ont été déterminés à partir d'une technique de déconvolution numérique par transformée de FOURIER rapide (FFT) [ANDRE et al., 1979].

D'une manière générale, quand la concentration en pyrène est suffisante pour que l'excimère soit formé avec un rendement acceptable, le déclin déconvolué du pyrène est compatible avec un déclin où un terme non stationnaire intervient. La figure 3.2.8. illustre ce comportement et met en évidence un déclin de la forme $\exp - (\alpha t + \beta \sqrt{t})$ où α et β sont deux coefficients expérimentaux.

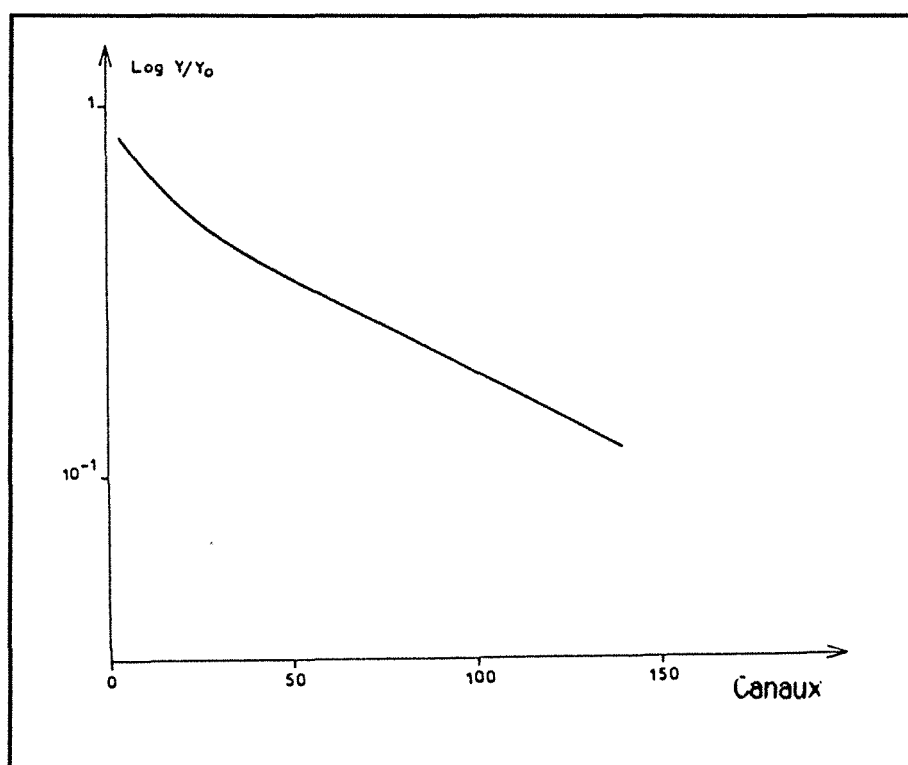


Figure 3.2.8.

Evolution de l'intensité de fluorescence du pyrène (après reconvolution par FFT).

(Py)/(lipides) = 0,01; température = 50 °C.

Les effets décrits plus haut doivent être complétés par l'introduction d'un coefficient amplificateur g , tirant son origine de la diffusion axiale importante (relativement à la diffusion latérale) et qui intervient directement dans les expressions de $k_a(t)$. La difficulté réside alors dans le choix de la valeur $g\sigma$, correspondant en première approximation à la hauteur d'une couche lipidique [ANDRE et al., 1980].

Par ailleurs, la désactivation du pyrène excité P^* peut se traduire par la relation :

$$\frac{d(P^*)}{dt} = - [k_a(t) (P^*) (P) + (P^*) K]$$

où K représente la constante de vitesse des désactivations produites par divers processus, $K = 1/\tau_0$.

On peut arriver alors à la relation :

$$\frac{(P^*)}{(P^*)_0} = \exp - \left(\int_0^t k_a(u) d(u) (P) + K \right) t$$

où $(P^*)_0$ est la concentration initiale en pyrène excité, τ_0 étant la durée de vie naturelle de P^* accessible par l'expérience à faible concentration en pyrène.

En remplaçant $k_a(t)$ par sa valeur, on obtient :

$$\frac{(P^*)}{(P^*)_0} = \exp \left(- \left[\frac{1}{\tau_0} + 2\pi N D f_1 g \sigma \left(1 + \frac{2\sigma}{\sqrt{\pi D t}} \right) (P^*) \right] t \right)$$

Cette relation peut alors s'écrire sous la forme :

$$\frac{(P^*)}{(P^*)_0} = \exp - (\alpha t + \beta \sqrt{t})$$

Ainsi, on obtient les expressions de α et β :

$$\alpha = \frac{1}{\tau_0} + 2\pi N D f_1 g \sigma (P)$$

et

$$\beta = 2\pi N D f_1 g \sigma \left[\frac{4\sigma}{\sqrt{\pi D}} \right] (P)$$

Les expressions de α et β nous permettront alors d'accéder expérimentalement aux valeurs de la distance de réaction σ et du coefficient de diffusion D et cela par la représentation des variations de α et de β en fonction de la concentration en pyrène, représentée par le rapport $(Py)/(lipides)$.

Notons que la concentration en pyrène utilisée dans ces relations est calculée à partir des considérations suivantes :

- * en admettant que les vésicules sont des sphères dont le rayon extérieur est de 125 Å [VAN DEN ZEGEL et al., 1984] et d'épaisseur 40 Å [WU, 1984], on arrive au volume occupé par les phospholipides,

- * et si on considère qu'il y a approximativement 2 800 molécules de lipides par vésicule [BIRKS, 1970], on aboutit à la relation liant (Py) au rapport (Py)/(lipides), soit $(Py) = 0,83 \cdot (Py)/(lipides)$.

* Diffusion dans des vésicules à l'état "liquide", $T > T_M$

Les figures 3.2.9. et 3.2.10. montrent que α et β varient linéairement avec la concentration en pyrène, ce que prévoient nos modèles et conduisent aux valeurs de D et σ présentées dans le tableau 3.2.3..

A titre comparatif, nous présentons sur la figure 3.2.9., la variation de α pour des liposomes de DPPC à 25 °C, température à laquelle les vésicules sont à l'état de "gel" ($T < T_M$). Remarquons que la pente de cette droite est pratiquement nulle.

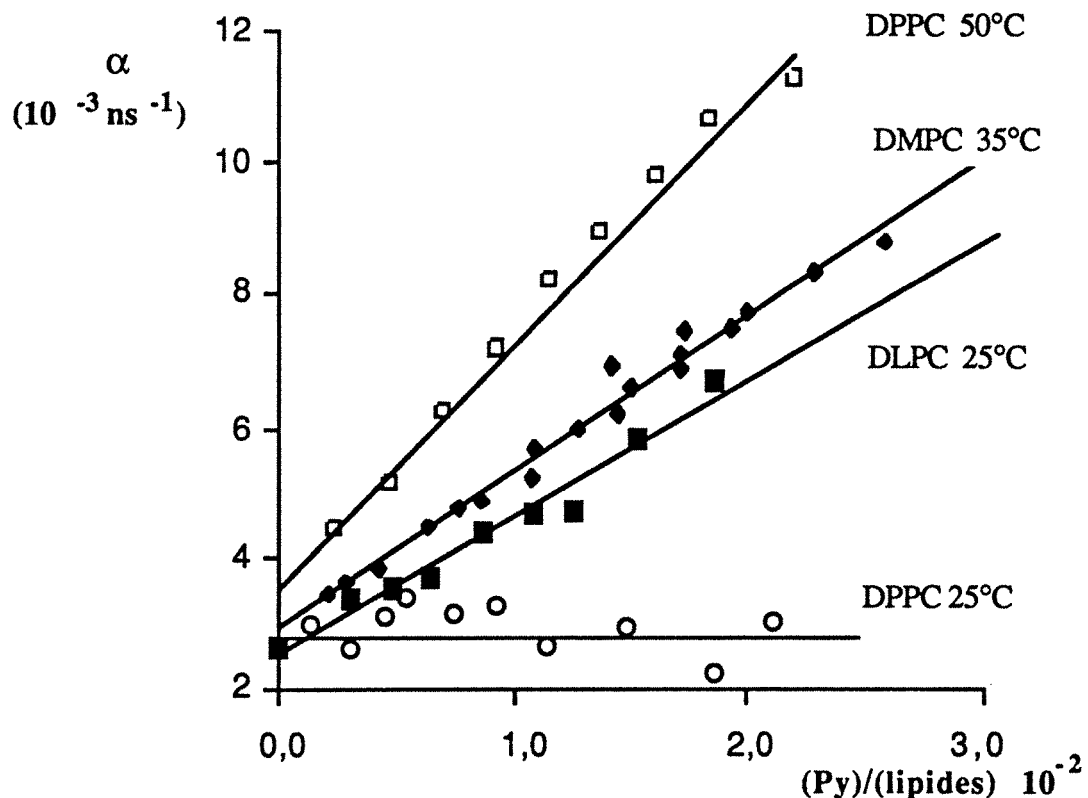


Figure 3.2.9.

Variations du coefficient α en fonction du rapport (pyrène)/(lipide), pour divers types de liposomes, à $T > T_M$ (et à $T < T_M$ pour les liposomes de DPPC).

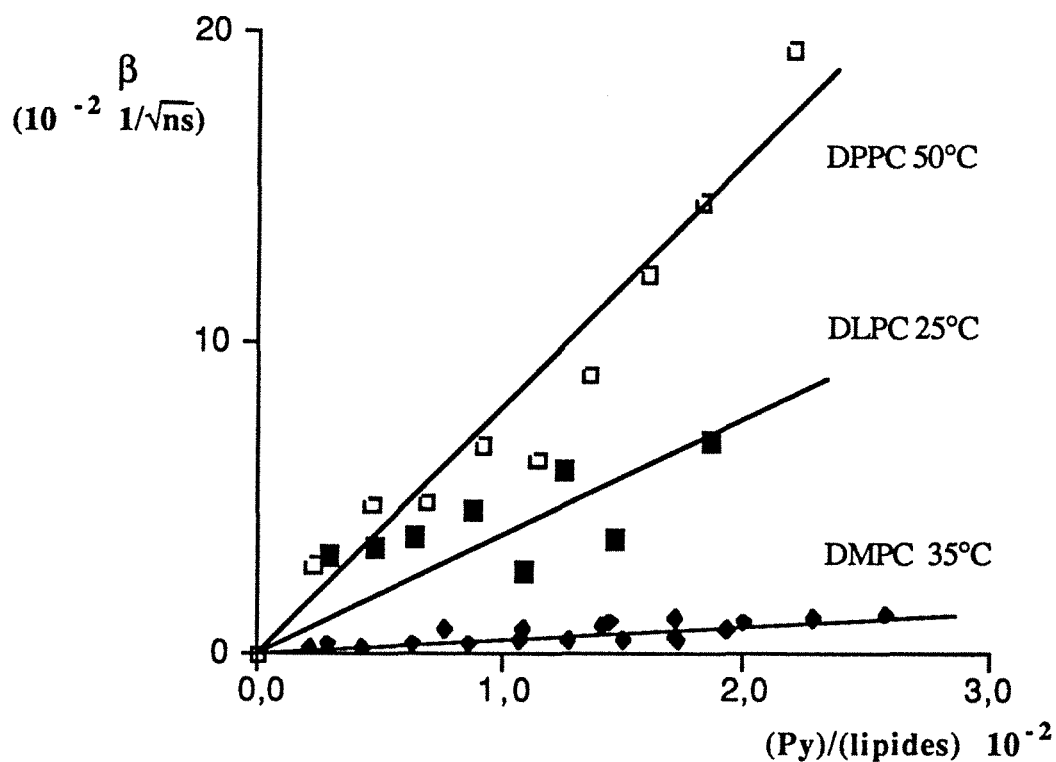


Figure 3.2.10.

Variations du coefficient β en fonction du rapport (pyrène)/(lipide), pour divers types de liposomes, à $T > T_M$.

Tableau 3.2.3.

Valeurs expérimentales du coefficient de diffusion D et de la distance de réaction σ dans divers liposomes (SUV), déterminées à partir du modèle de réactions partiellement limitées par la diffusion (cf. § 3.2.4.1.2.)

lipide (SUV)	T_M (°C)	T (°C)	D ($10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$)	σ (Å)
DPPC	41	50	5,0	6,8
DPPC	41	25	1,5	6,8
DLPC	0	25	5,9	5,9
DMPC	23	35	3,0	5,5

Ainsi, les valeurs de D trouvées concordent d'une manière globale avec celles publiées par ailleurs, en utilisant d'autres techniques, telles que le "photobleaching" [VAZ et al., 1987, 1982] ou l'étude du rapport excimère/monomère pour le pyrène [GALLA et al., 1974]. De même, les travaux utilisant le déclin de fluorescence d'un dérivé du pyrène, le méthyl-1-pyrène, aboutissent à des coefficients du même ordre de grandeur [VAN DEN ZEGEL et al., 1984] (cf. tableau 1.2.2.).

De plus, les valeurs de σ trouvées sont comparables à celles correspondant au cas où la collision entre les deux entités réagissantes est nécessaire pour qu'il y ait réaction.

Par ailleurs, en tenant compte du rayon de courbure des vésicules (ANDRE et BAROS, résultats non publiés), on montre que le terme proportionnel au temps (α) est compris entre :

$$\frac{1}{\tau_0} + 2\pi N D f_1 g \sigma (P) \quad \text{et} \quad \frac{1}{\tau_0} + 2\pi N D f_1 g \sigma (P) [1 + 2a]$$

et le terme non stationnaire (β) est compris entre :

$$2\pi N D f_1 g \sigma (P) \frac{4\sigma}{\sqrt{\pi D}} \quad \text{et} \quad 2\pi N D f_1 g \sigma \left[\frac{4\sigma}{\sqrt{\pi D}} + \frac{b R^* \sigma a}{\sqrt{\pi D}} \right]$$

Ainsi, dans le cas des vésicules de DPPC et pour :

$$R^* = 10$$

$$a = -0,036 \sqrt{R^*}$$

$$b = 0,096$$

on obtient :

$$5,0 \cdot 10^{-7} < D < 6,5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$$

et

$$6,8 < \sigma < 7,0 \text{ \AA}$$

Cependant, à 25 °C, les valeurs de α obtenues pour des vésicules de DPPC ne varient quasiment pas. Ceci peut être expliqué par le fait qu'à l'état de "gel", la diffusion faible du pyrène dans les liposomes conduit à une pente faible de la droite représentant α en fonction du rapport (Py)/(lipides).

On remarque ainsi, que cette méthode présente une limitation; elle ne semble pas permettre d'accéder au coefficient de diffusion D dans des liposomes en-dessous de la température de transition.

* Cas de liposomes à l'état de "gel", $T < T_M$

Dans ces conditions expérimentales, la structure lipidique est une structure "solide", ordonnée et l'on doit s'attendre à un coefficient de diffusion beaucoup plus faible. S'il en est ainsi, le terme correctif lié à la concavité de la zone sur laquelle le transport brownien intervient peut être complètement négligé.

Par ailleurs, comme le montre la figure 3.2.9., il est particulièrement difficile d'exprimer une variation de α avec le rapport $(Py)/(lipides)$, pour des liposomes de DPPC à 25 °C.

Pour contourner cette difficulté, nous avons cherché la variation de la constante de temps $1/\tau$ en fonction de la concentration en pyrène, τ étant la durée de vie de Py^* obtenue en traitant le déclin de fluorescence comme déclin monoexponentiel. Ainsi, expérimentalement, $1/\tau$ varie linéairement avec le rapport $(Py)/(lipides)$ comme le montre la figure 3.2.11..

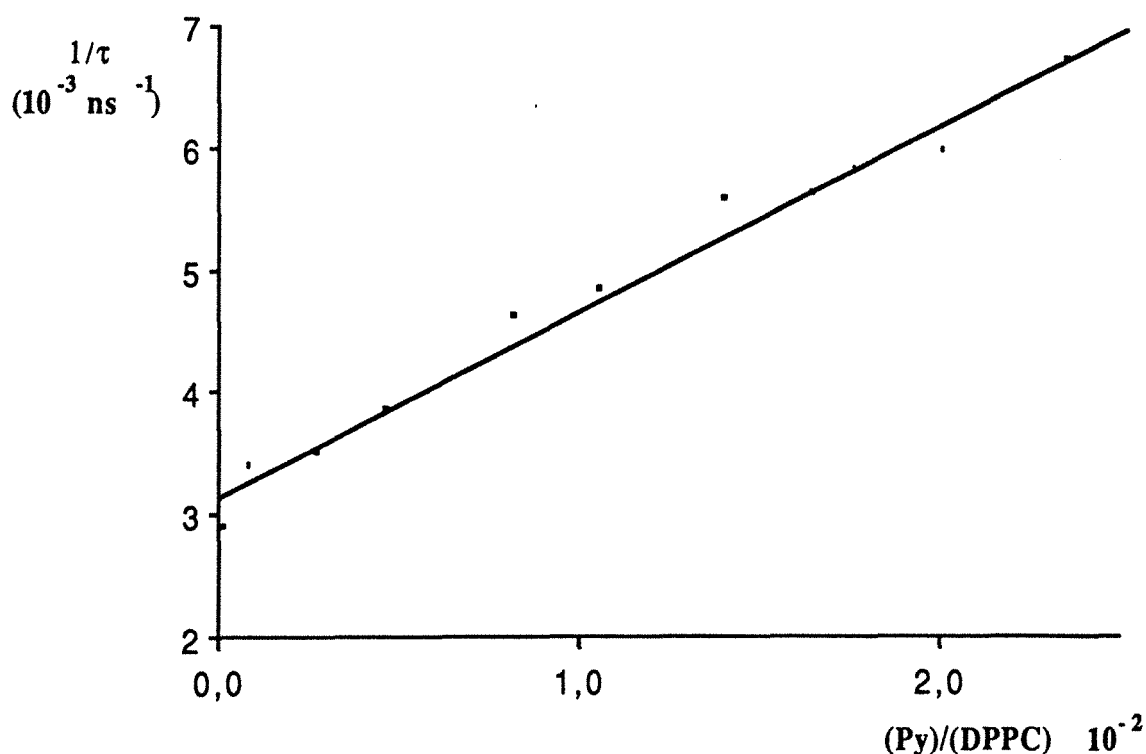


Figure 3.2.11.

Variations de $1/\tau$ en fonction du rapport $(Py)/(DPPC)$,
en dessous de la température de transition (à 25 °C).
 τ est la durée de vie du pyrène en déclin monoexponentiel.

Or, il est facile de montrer que si :

$$k_a(t) \approx \alpha_1 + \frac{\beta_1}{\sqrt{\pi t}} \quad \text{où } \alpha_1 \text{ et } \beta_1 \text{ sont des constantes,}$$

alors :

$$\frac{1}{\tau_1} \approx \frac{1}{\tau_0} + \left[\alpha_1 + \frac{\beta_1}{\sqrt{\tau_0}} \right] (P)$$

Partant de la valeur de σ trouvée précédemment, il est possible de calculer la valeur de D . On trouve alors, dans la phase rigide :

$$D_{25^\circ\text{C}} = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$$

Cependant ce résultat est obtenu en admettant que σ est stable avec la variation de la température, or des travaux récents effectués au GRAPP [GARCIN, 1989] montrent une augmentation de la valeur de σ avec l'augmentation de la température.

Néanmoins, la valeur de D trouvée correspond à une diminution du coefficient de diffusion d'un facteur 3, résultat compatible avec celui trouvé par la technique de "photobleaching" [VAZ et al., 1987, 1982].

3.2.4.2.3. Influence des protéines sur la diffusion

L'influence des protéines sur la diffusion du pyrène dans les bicouches lipidiques est explorée par la mesure des coefficients de diffusion en utilisant la technique de déclin de fluorescence décrite précédemment et en testant deux protéines : l'ATPase et la GGT (cf. § 3.2.2.).

* Cas de l'ATPase

La variation de α en fonction du rapport (Py)/(DPPC), en présence d'ATPase et à 50 °C (cf. figure 3.2.12.) conduit aux valeurs de D présentées sur la figure 3.2.13..

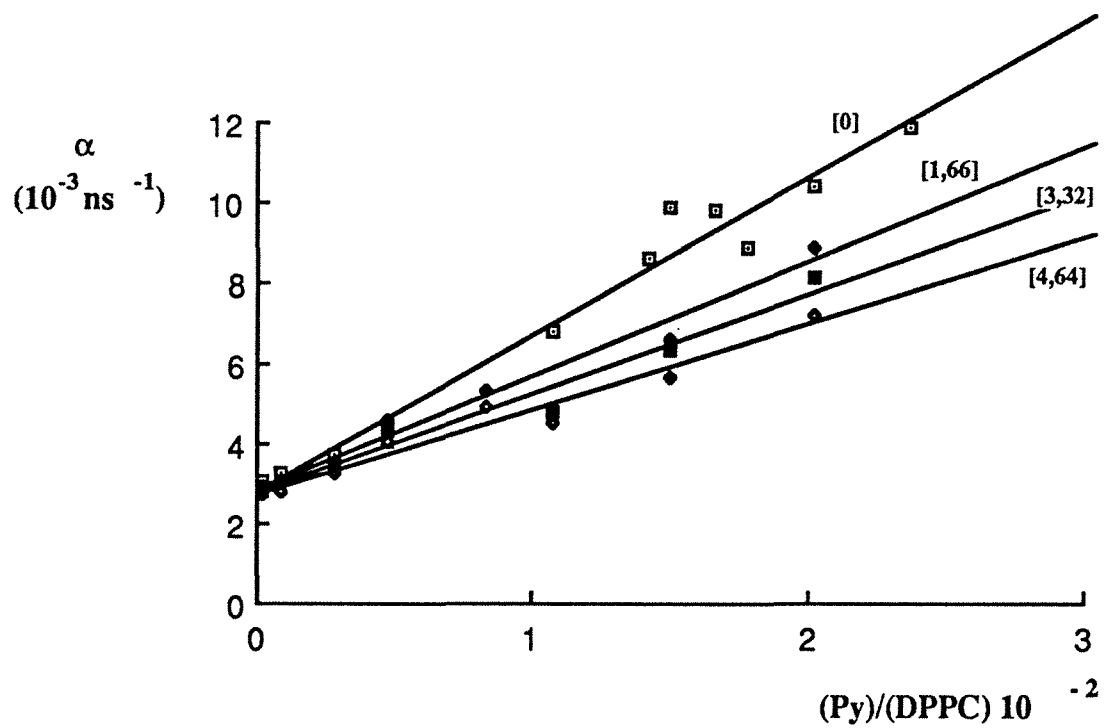


Figure 3.2.12.

Evolution de α en fonction du rapport (Py)/(DPPC), pour différentes concentrations en (Na⁺,K⁺)-ATPase (notées sur chaque courbe), à 50 °C.

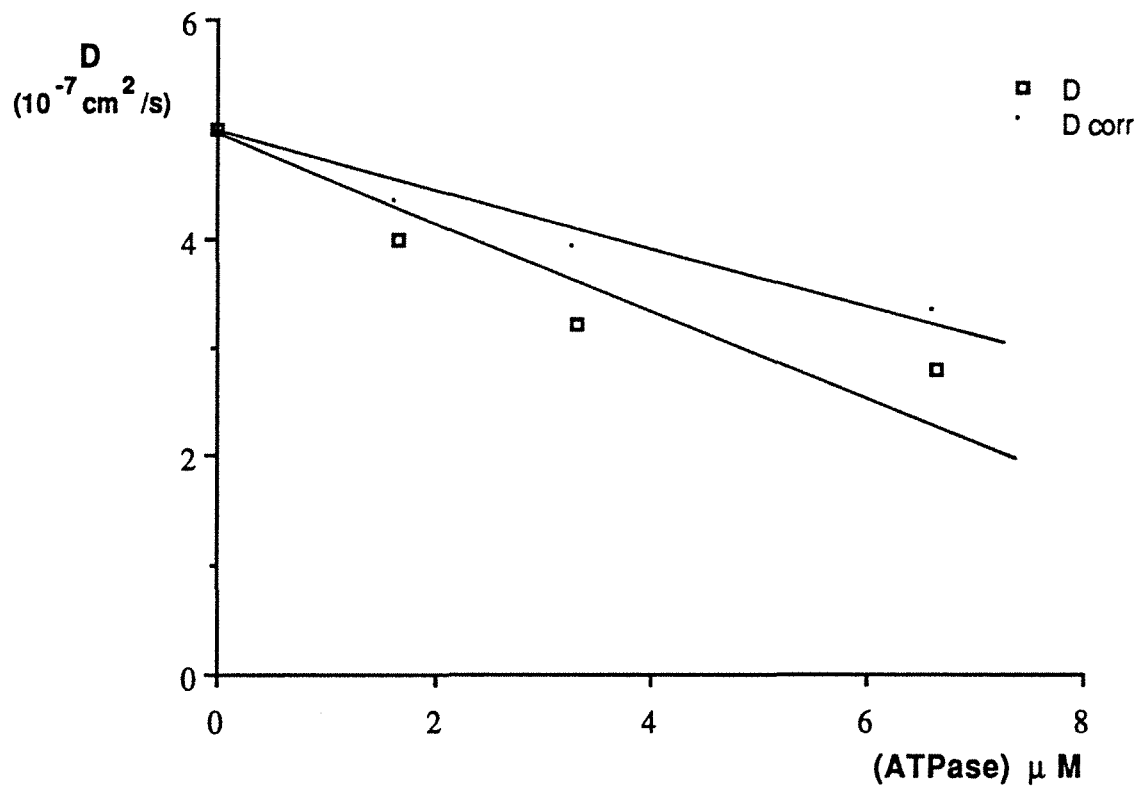


Figure 3.2.13.

Variations des coefficients de diffusion D et "D corr." (voir texte, § 3.2.3.5.) du pyrène avec la concentration en (Na⁺,K⁺)-ATPase.

* Cas de la GGT

Les résultats relatifs à l'étude de la (Na⁺,K⁺)-ATPase sont compatibles avec ceux obtenus au GRAPP en utilisant une autre protéine, la gamma-glutamyltransférase (cf. tableau 3.2.4. et figure 3.2.14.).

Tableau 3.2.4.

Valeurs expérimentales de D et σ du pyrène dans des bicouches de DPPC, en présence de GGT et à 50 °C [GARCIN, 1989].

Rapport molaire (%)	D (10 ⁻⁷ cm ² /s)	σ (Å)
0,00	6,3	6,3
0,25	5,4	3,9
0,30	4,5	5,6
0,75	3,5	5,1
1,00	4,9	5,8
2,00	3,2	7,7
2,70	3,2	7,5

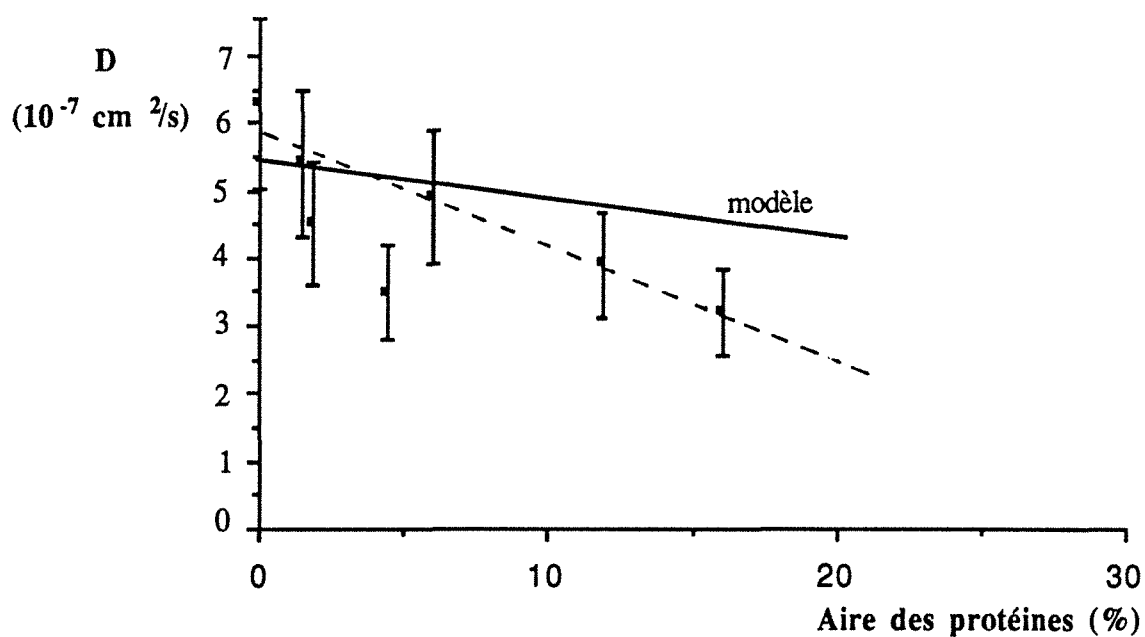


Figure 3.2.14.

Variations du coefficient de diffusion D du pyrène avec la surface occupée par la GGT. Expériences et modèle [GARCIN, 1989].

Ainsi, il apparaît clairement, en se basant sur l'ensemble de ces résultats, que l'incorporation des protéines dans les bicouches lipidiques entraîne une diminution du coefficient de diffusion du pyrène. Celle-ci est d'autant plus importante que la concentration en protéines augmente.

Plusieurs facteurs peuvent être attribués à la variation de D induite par les protéines. A priori, on peut penser qu'elle est due soit à une diminution de la fluidité membranaire, soit au fait que les protéines constituent des obstacles à la libre diffusion du pyrène ou enfin à l'association des deux phénomènes. Notons qu'outre ces phénomènes physiques, elle peut être due à l'adsorption d'une partie du pyrène sur les protéines, diminuant ainsi, la concentration en pyrène diffusant (cf. § 3.2.4.3.).

3.2.4.3. RESULTATS ET DISCUSSION DES EXPERIENCES EN EXCITATION CONTINUE (FLUORESCENCE DU PYRENE ET DU DPH)

3.2.4.3.1. Influence des protéines sur la fluorescence du pyrène dans les milieux organisés et homogènes

Parallèlement aux mesures effectuées en excitation pulsée, nous avons étudié, en excitation continue, l'influence de trois protéines sur la fluorescence du pyrène.

Afin d'aboutir à une idée globale sur la question, nous avons, d'une part, effectué les mesures dans des milieux différents tels que les bicouches lipidiques ou des milieux homogènes, d'autre part trois sortes de protéines ont été testées : 1) la gamma-glutamyltransférase, 2) la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ et 3) l'albumine bovine.

a) Utilisation des bicouches lipidiques de DPPC

Les figures 3.2.15., 3.2.16. et 3.2.17. montrent que l'utilisation des trois protéines conduit à un résultat similaire quant à l'évolution du rapport I_E/I_M (cf. figure 1.2.5. pour les définitions de I_E , I_M et I_E/I_M). En effet, dans les trois cas, l'addition des protéines aux bicouches lipidiques de DPPC contenant du pyrène est accompagnée d'une diminution du rapport I_E/I_M .

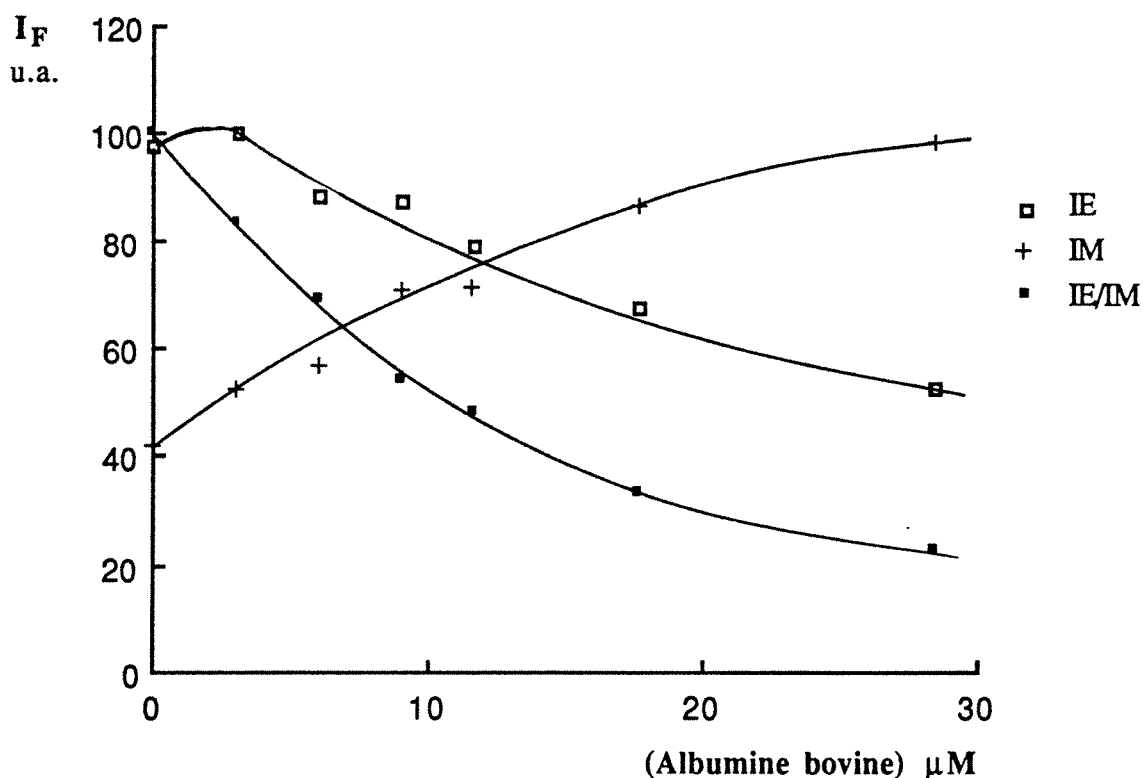


Figure 3.2.15.

Influence de l'albumine bovine délipidée sur la fluorescence du pyrène, dans des liposomes de DPPC, $T = 50^\circ\text{C}$.

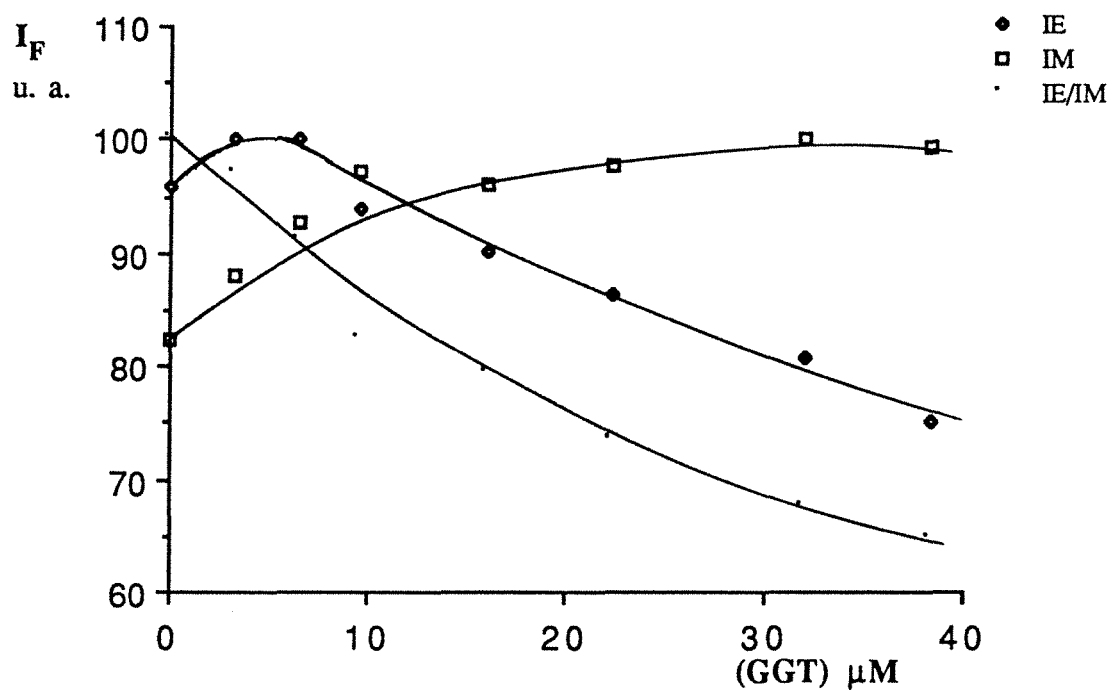


Figure 3.2.16.

Influence de la gamma-glutamyltransférase sur la fluorescence du pyrène, dans des liposomes de DPPC, $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

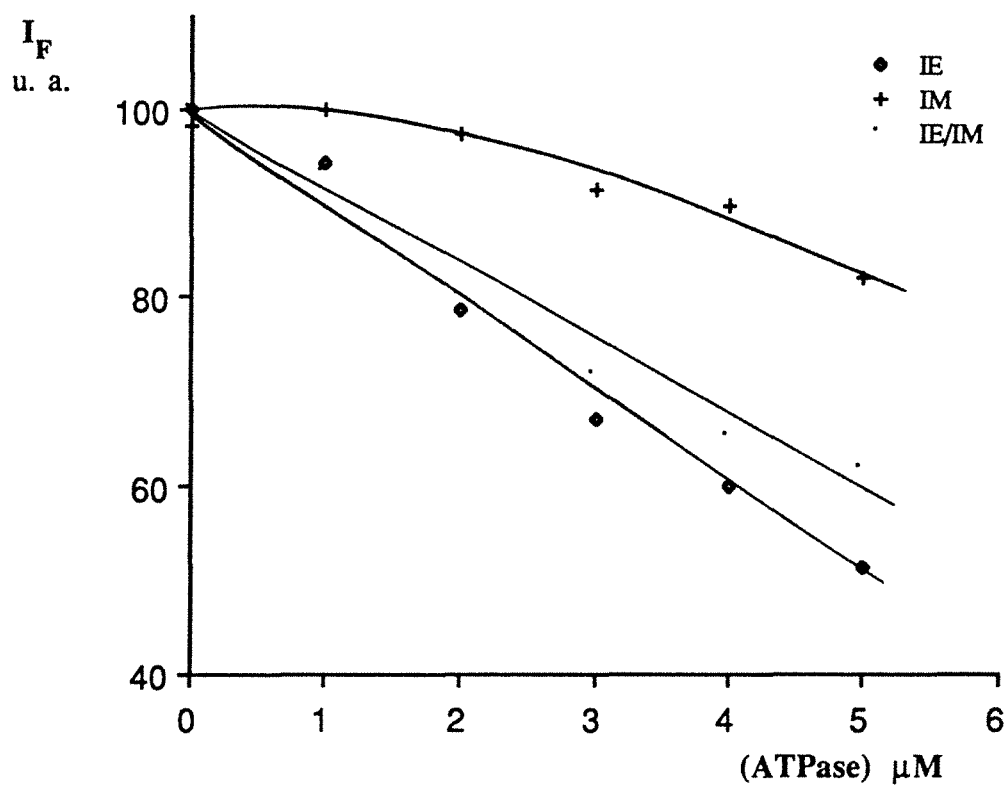


Figure 3.2.17.

Influence de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ sur la fluorescence du pyrène, dans des liposomes de DPPC, $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dans le cas de la GGT et de l'albumine bovine ce résultat se traduit par une augmentation de l'intensité de fluorescence du monomère d'une part et une diminution de l'intensité de fluorescence de l'excimère d'autre part.

L'ATPase entraîne la diminution de l'intensité de fluorescence aussi bien celle de l'excimère que celle du monomère, avec cependant une diminution plus nette dans le cas de l'excimère.

On peut donc, a priori, penser que ce résultat est compatible avec celui obtenu en excitation pulsée, notamment la rigidification des bicouches lipidiques par les protéines. Un tel résultat est traduit par une diminution du rapport I_E/I_M en excitation continue.

Mais avant de tirer des conclusions relatives aux milieux lipidiques, examinons l'effet de ces protéines sur la fluorescence du pyrène dans des milieux homogènes.

b) Utilisation de milieux homogènes

Contrairement aux résultats trouvés dans les bicouches de DPPC, l'addition des trois protéines testées provoque une exaltation de la fluorescence du pyrène dans des milieux isotropes.

Cependant, cette augmentation de l'intensité de fluorescence peut concerner uniquement l'excimère ou le monomère selon la protéine utilisée. En effet, dans le cas de l'addition de la GGT et de l'ATPase à une solution de pyrène dans un mélange eau/glycérol : 70/30 ($\eta \approx 3$ cP à 20 °C), à 25 °C, l'augmentation est plus nette pour l'excimère que pour le monomère (cf. figures 3.2.18. et 3.2.19.).

En revanche, l'addition de l'albumine bovine au pyrène dans l'eau à 25 °C, conduit à une augmentation de l'intensité de fluorescence du monomère, alors que celle de l'excimère reste quasiment nulle (cf. figure 3.2.20.).

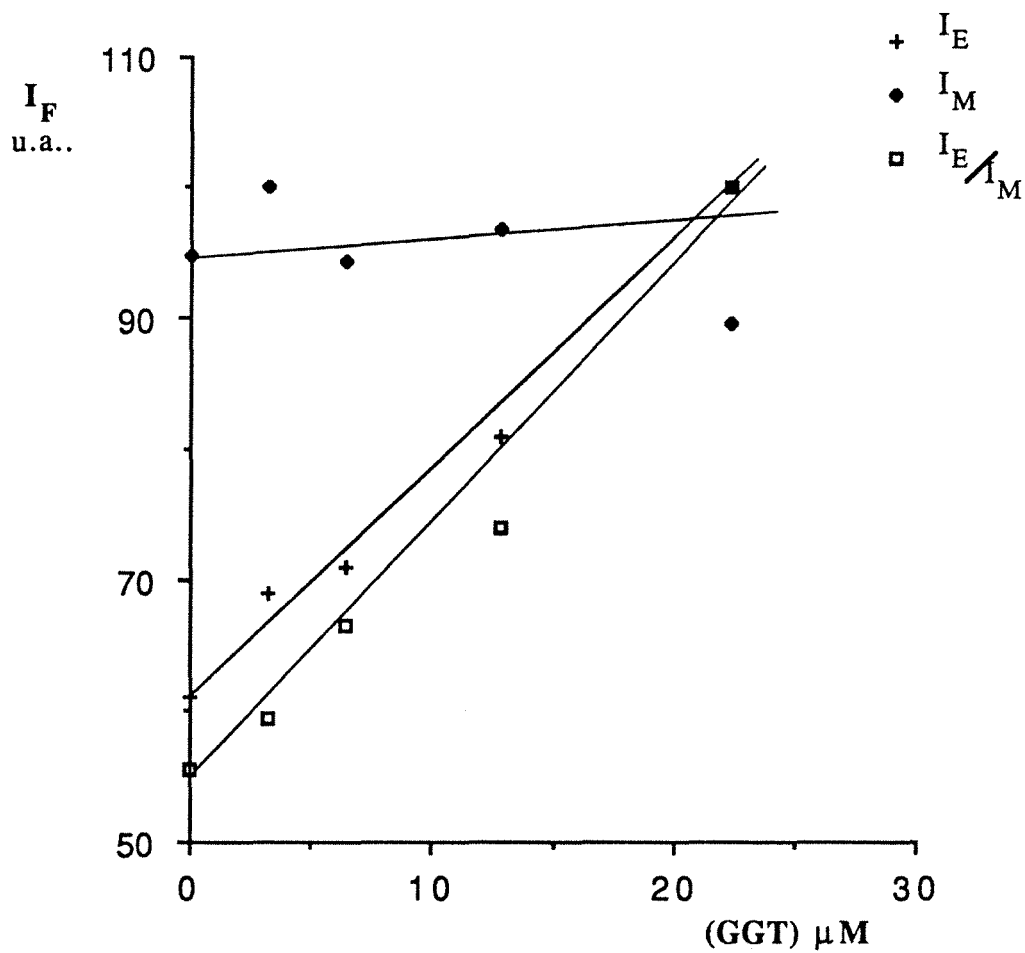


Figure 3.2.18.

Influence de la gamma-glutamyltransférase sur la fluorescence du pyrène, dans un mélange eau/glycérol, $T = 25^\circ\text{C}$.

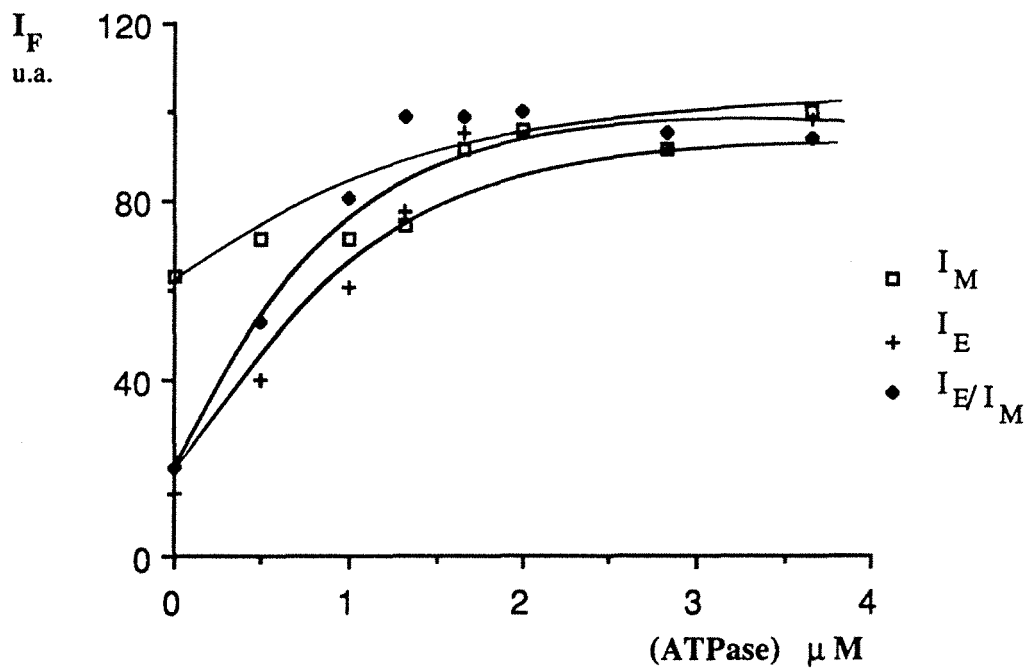


Figure 3.2.19.

Influence de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ sur la fluorescence du pyrène, dans un mélange eau/glycérol, $T = 25^\circ\text{C}$.

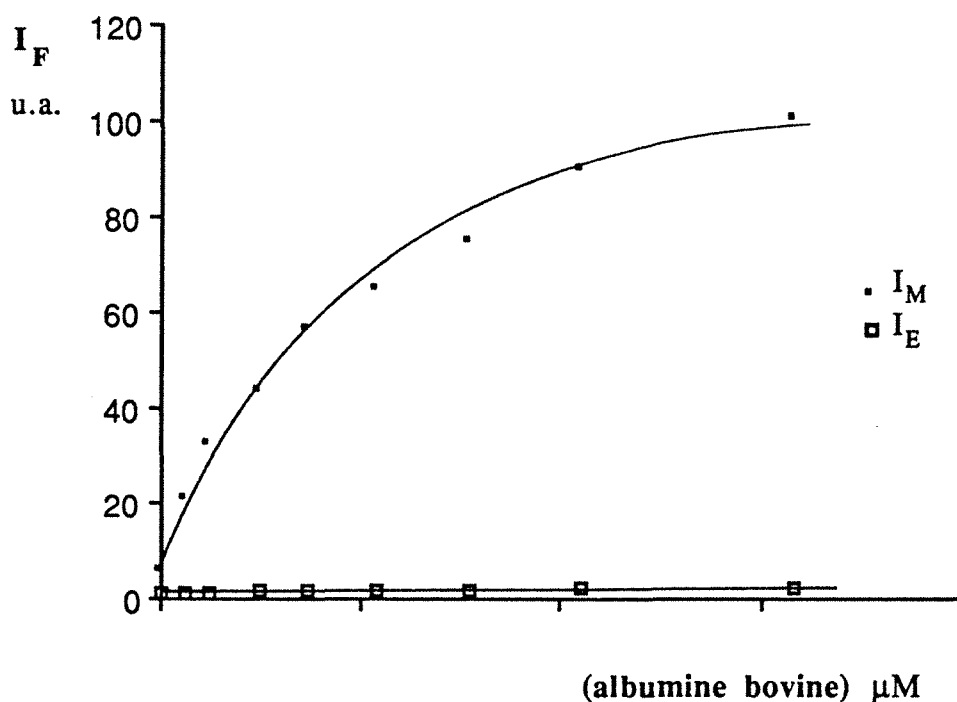


Figure 3.2.20.

Influence de l'albumine bovine délipidée sur les intensités de fluorescence (I_F) du monomère (I_M) et de l'excimère (I_E) du pyrène dans l'eau, $T = 25^\circ\text{C}$.

On peut penser que ces résultats différents sont liés à la nature des protéines utilisées. L'ATPase et la GGT, par leur caractère hydrophobe, favoriseraient la concentration des molécules de pyrène dans des poches hydrophobes où elles forment des excimères, alors que l'albumine bovine par son caractère hydrophile ne permettrait pas une telle concentration.

Par ailleurs, il faut souligner que l'ATPase et la GGT, étant des enzymes membranaires, ne seraient pas totalement délipidées. Ceci permettrait au pyrène de se concentrer éventuellement, dans des fractions lipidiques et de former ainsi des excimères.

Nous avons testé deux échantillons différents d'albumine bovine, une fraction complètement délipidée (0,005% d'acides gras) et une autre moins pure (96 à 99% d'albumine bovine). Dans les deux cas les résultats sont similaires (cf. figure 3.2.21.).

Par ailleurs, on remarque qu'à partir d'une certaine concentration en albumine bovine l'intensité de fluorescence du monomère n'augmente plus de manière linéaire, ceci pourrait être dû au fait qu'à cette concentration en protéines, toutes les molécules de pyrène sont piégées par les protéines.

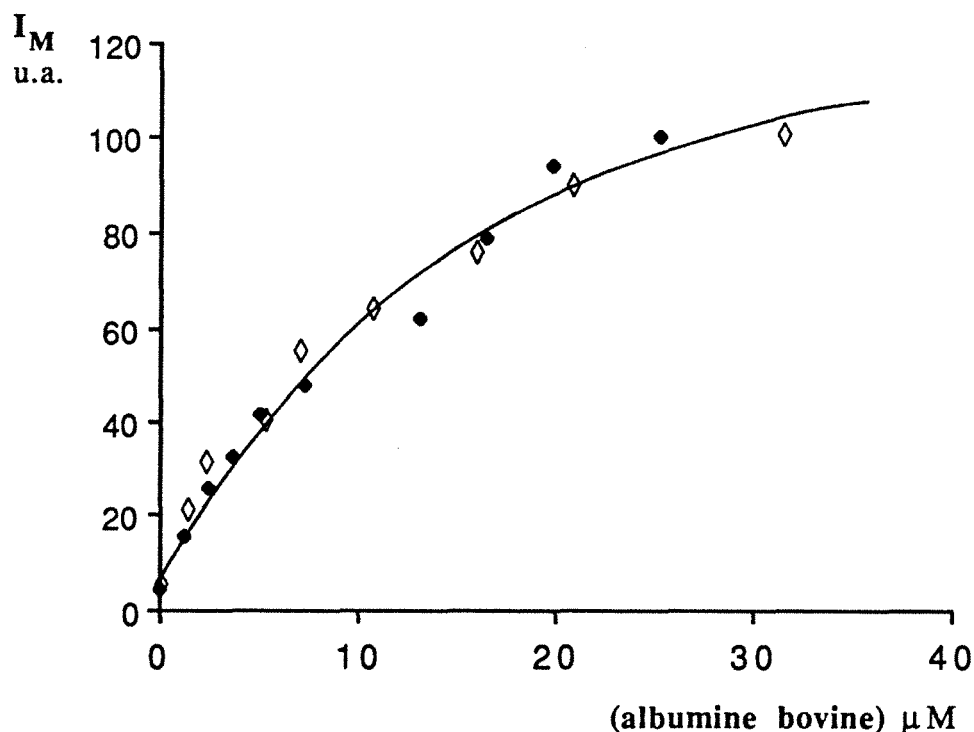


Figure 3.2.21.

Comparaison de l'influence de la nature de deux fractions d'albumine bovine sur l'intensité de fluorescence du monomère du pyrène.

◆ : fraction complètement délipidée; ◇ : fraction contenant 96 à 99 % d'albumine bovine.

3.2.4.3.2. Influence des protéines sur la polarité locale

L'effet des protéines sur la fluorescence du pyrène dans les milieux organisés est lié aux changements des propriétés physico-chimiques de l'environnement de la sonde que peuvent provoquer ces protéines.

Outre les changements de la microviscosité membranaire, cet effet peut être dû en partie à un changement de la polarité de l'environnement de la sonde.

Ainsi, des informations sur la polarité locale peuvent être obtenues à partir de la structure vibrationnelle du spectre de fluorescence de la sonde utilisée [ZACHARIASSE et al., 1982]. En effet, la structure vibrationnelle du spectre de fluorescence du monomère du pyrène dépend de la polarité du solvant. On peut alors suivre la variation de la polarité locale par la mesure du rapport I_{373}/I_{393} , appelé encore B_I/B_{III} . I_{373} est l'intensité de fluorescence à 373 nm ou bande I et I_{393} étant celle à 393 nm ou bande III.

Avant de nous intéresser aux bicouches lipidiques, nous avons réalisé des expériences préliminaires, nous permettant de chiffrer l'effet de la polarité des solvants sur l'évolution du rapport I_{373}/I_{393} , dans nos conditions expérimentales.

a) Variations du rapport I_{373}/I_{393} avec la polarité des solvants

La mesure du rapport I_{373}/I_{393} , dans différents solvants (cf. figure 3.2.22.) et dans nos conditions opératoires, permet de mettre en évidence une augmentation de I_{373}/I_{393} avec l'accroissement de la polarité, cette dernière étant déterminée par le paramètre de polarité $E_T(30)$ [REICHARDT et HARBUSCH-GORNERT, 1983].

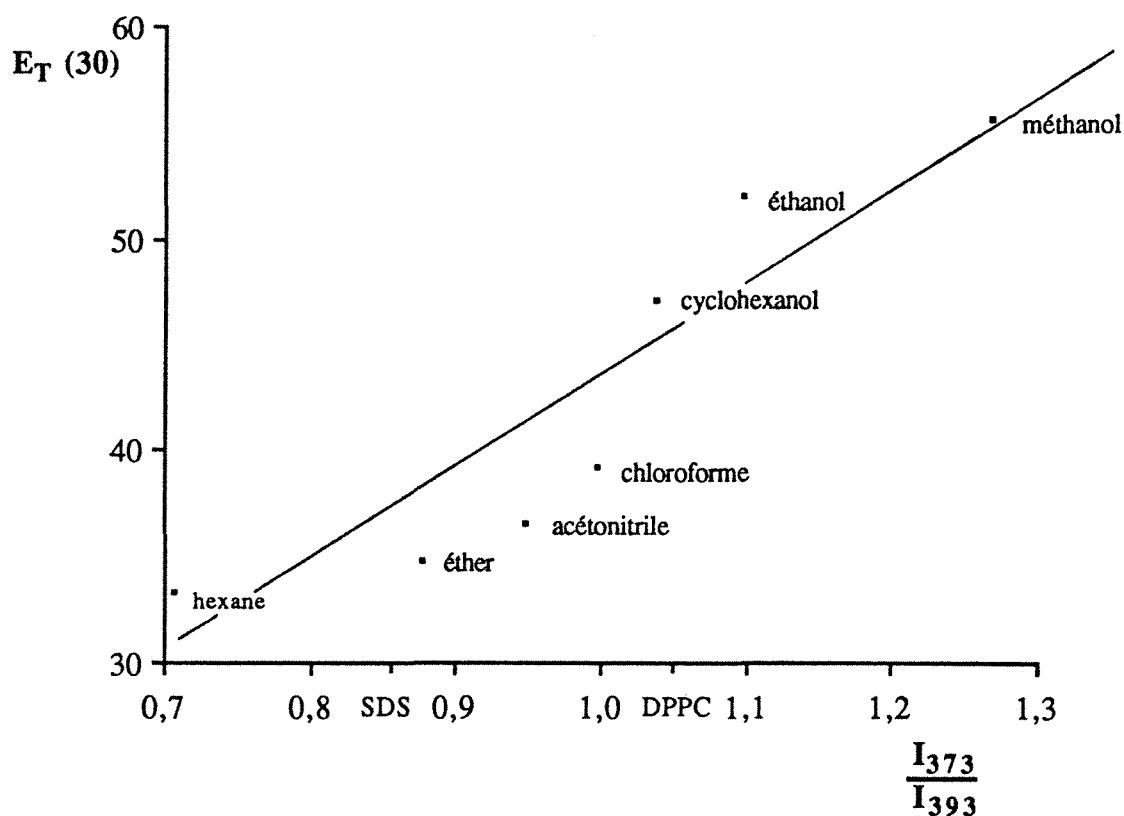


Figure 3.2.22.

Influence de la polarité des solvants représentée par le paramètre de polarité $E_T(30)$, sur la valeur du rapport I_{373}/I_{393} pour le pyrène. Les valeurs de I_{373}/I_{393} dans des liposomes de DPPC et des micelles de SDS sont 0,85 et 1,05 respectivement.

En plus, par l'observation des spectres de fluorescence du monomère du pyrène dans des solvants de différentes polarités, le changement de la structure vibrationnelle de ces spectres apparaît clairement (cf. figure 3.2.23.).

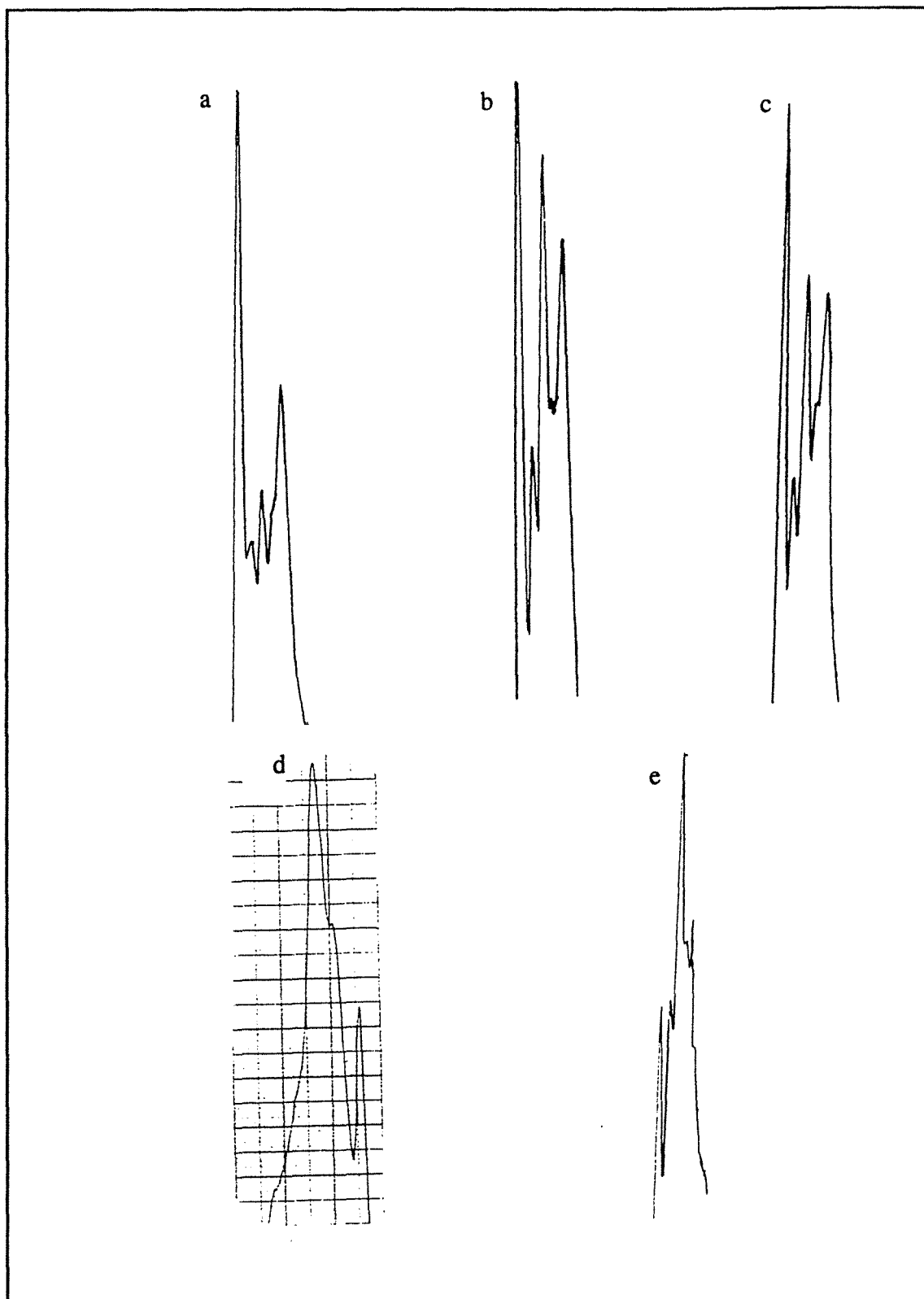


Figure 3.2.23.

Exemples de spectres de fluorescence du monomère du pyrène montrant les variations de la structure vibrationnelle avec la polarité du milieu.

a : méthanol, b : éthanol, c : chloroforme, d : DPPC, e : hexane.

b) Addition de protéines

Nous avons cherché l'influence de l'albumine bovine sur l'évolution du rapport I_{373}/I_{393} dans les bicouches lipidiques de DPPC et dans l'eau (cf. figure 3.2.24.).

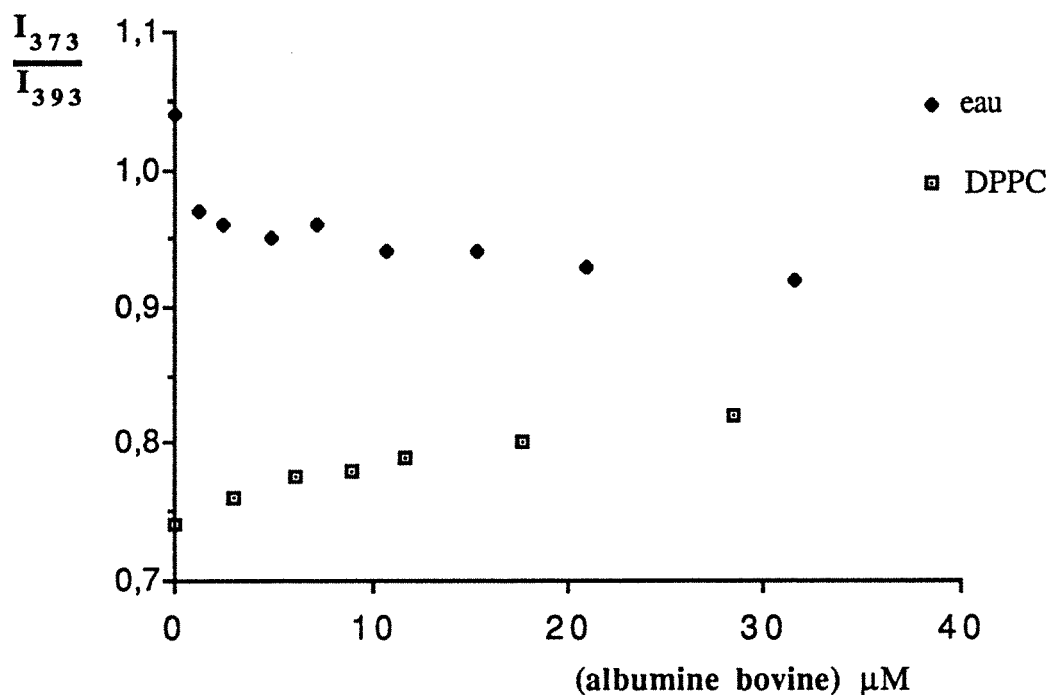


Figure 3.2.24.

Variations du rapport I_{373}/I_{393} du pyrène avec l'addition de l'albumine bovine, dans les bicouches lipidiques de DPPC à $5 \cdot 10^{-4}$ M et dans l'eau.

Les résultats dans l'eau montrent que l'addition de cette protéine entraîne une diminution du rapport I_{373}/I_{393} . L'hypothèse selon laquelle le pyrène est adsorbé par des zones protéiques moins polaires que l'eau permettrait d'expliquer l'exaltation de la fluorescence du monomère (cf. figure 3.2.20.).

En revanche, dans une solution de DPPC, l'addition de l'albumine bovine conduit à une augmentation du rapport I_{373}/I_{393} , ce qui semble signifier que le pyrène a migré vers des zones plus polaires.

On peut suggérer que l'albumine bovine "adhère" à la surface des liposomes entraînant ainsi, la diffusion du pyrène vers les têtes polaires des phospholipides. Ceci est compatible avec les résultats observés en excitation continue (cf. figure 3.2.15.).

De même, nous avons suivi l'évolution du rapport I_{373}/I_{393} avec l'addition de l'ATPase dans des vésicules de DPPC. Contrairement à l'albumine bovine, ce dernier a une valeur constante (0,73). Ce résultat signifie que l'ATPase n'entraîne pas un changement de la polarité de l'environnement du pyrène.

3.2.4.3.3. Influence des protéines sur l'anisotropie du DPH dans des vésicules de DPPC

A côté de la fluorescence du pyrène, nous avons utilisé l'anisotropie de fluorescence du DPH pour tester l'effet de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ sur la cohésion membranaire des liposomes de DPPC.

La figure 3.2.25. montre que l'influence de cette protéine sur l'anisotropie du DPH est double :

- * à $T < T_M$, on observe une diminution de l'anisotropie, ce qui est compatible avec une augmentation de la fluidité membranaire,

- * à $T > T_M$, l'anisotropie est légèrement augmentée par l'ATPase, ceci est compatible avec une diminution de la fluidité membranaire.

Ainsi, comme le cholestérol [ANTUNES-MADEIRA et MADEIRA, 1990; BACK et CHAPMAN, 1980; CHAPMAN, 1973], l'addition de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ entraîne un "aplatissement" de la courbe représentant l'anisotropie de fluorescence en fonction de la température. Ce résultat est conforme à d'autres travaux utilisant d'autres protéines (cf. tableau 1.1.3.).

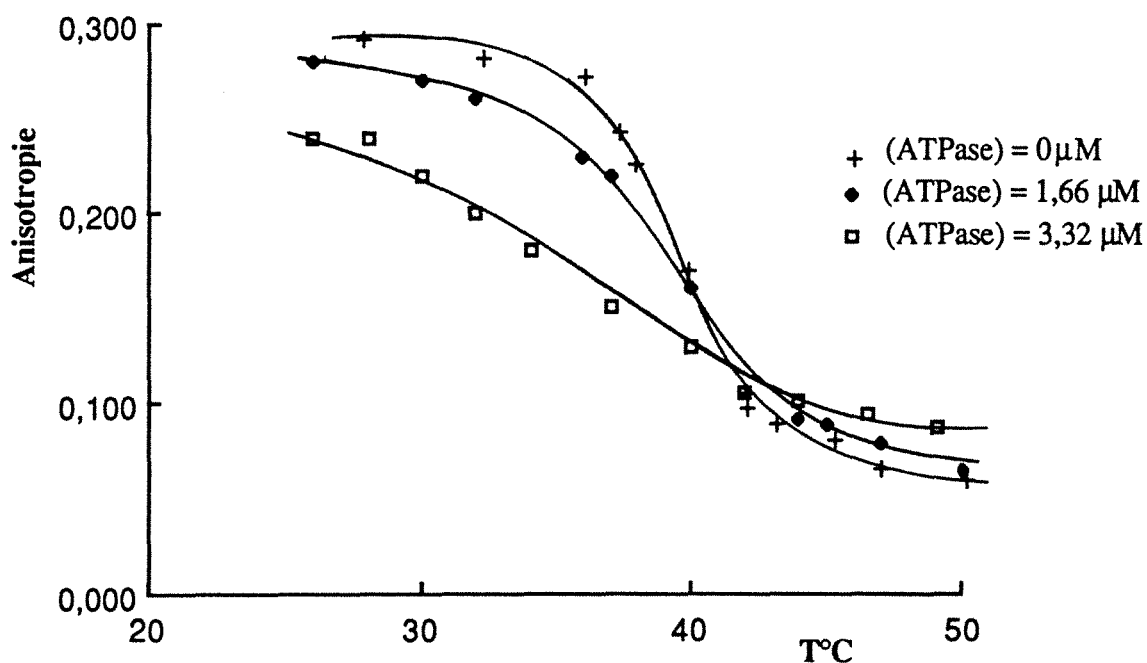


Figure 3.2.25.

Influence de la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ sur la variation de l'anisotropie de fluorescence du DPH en fonction de la température, dans des liposomes de DPPC.

3.2.4.3.4. Influence du saccharose sur la fluidité membranaire des vésicules de DPPC

Afin de tenir compte du saccharose contenu dans la préparation ATPasique utilisée dans nos expériences, et pour prévoir un éventuel effet de ce sucre sur la fluidité membranaire des bicouches lipidiques de DPPC, nous avons testé à des concentrations équivalentes à celles de la préparation ATPasique, son influence sur :

- * l'anisotropie de fluorescence du DPH,
- * le rapport I_E/I_M du pyrène au-dessus et en-dessous de T_M et enfin,
- * la durée de vie du pyrène excité.

a) Effet du saccharose sur l'anisotropie de fluorescence du DPH

La figure 3.2.26. montre que la courbe de transition de phase des liposomes de DPPC est inchangée en présence du saccharose.

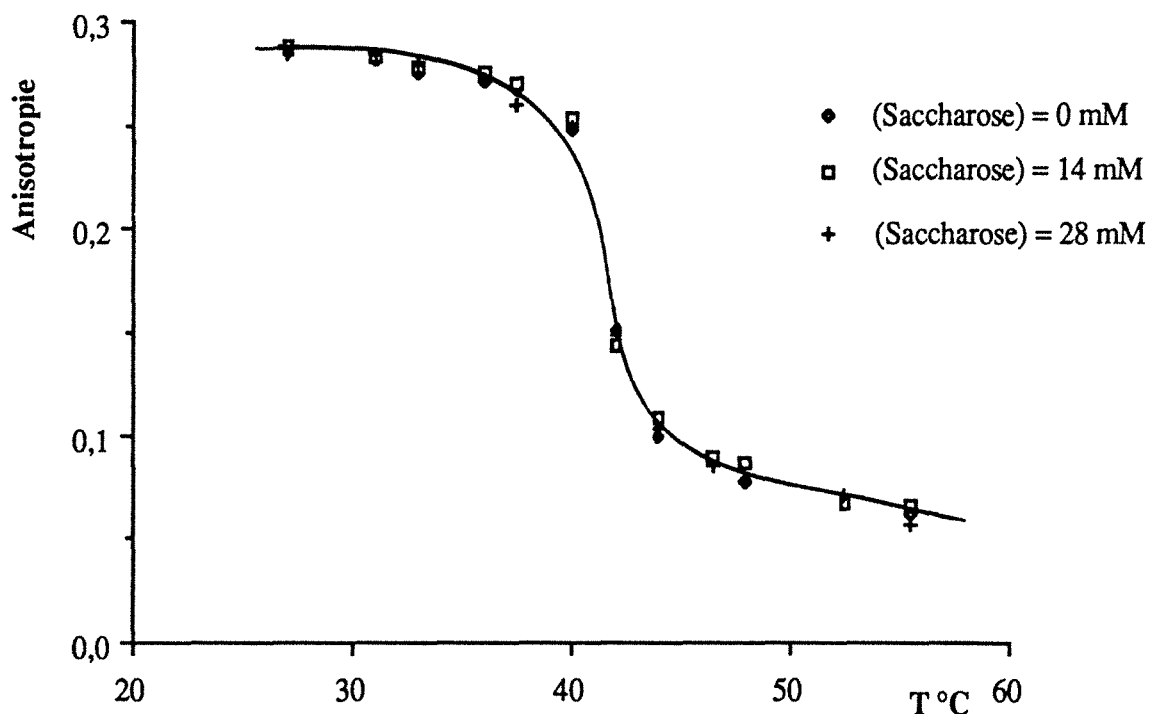


Figure 3.2.26.

Influence du saccharose sur la variation de l'anisotropie de fluorescence du DPH, en fonction de la température, dans des liposomes de DPPC.

b) Effet du saccharose sur la variation du rapport I_E/I_M du pyrène

Pour réaliser cette expérience, nous nous sommes contentés d'effectuer les mesures à 25 et à 50 °C, températures auxquelles nous avons mesuré le coefficient de diffusion du pyrène.

Le tableau ci-après (cf. tableau 3.2.5.) donne les valeurs de I_E/I_M à ces températures et pour trois concentrations en saccharose. Ainsi, ces valeurs restent quasiment constantes avec l'addition du sucre, pour chaque température considérée.

Tableau 3.2.5.

Influence du saccharose sur les valeurs du rapport I_E/I_M du pyrène, dans des liposomes de DPPC.

(Saccharose) mM T °C	0	7	14	28
25	0,60	0,67	0,59	0,63
50	0,86	0,84	0,88	0,82

c) Effet du saccharose sur la durée de vie du pyrène

A côté de ces expériences en excitation continue, nous avons testé l'influence du saccharose sur la durée de vie globale du pyrène.

Le tableau 3.2.6. suivant présente les durées de vie en déclin monoexponentiel et montre que le saccharose n'entraîne pas de variation significative de ces durées de vie.

Tableau 3.2.6.

Influence du saccharose sur la durée de vie du pyrène (en ns),
dans des vésicules de DPPC (déclin monoexponentiel).

(Saccharose) mM T °C	0	7	14	28
25	246	241	239	243
50	159	163	160	157

En se fondant sur les trois expériences décrites ci-dessus, on peut en déduire que le saccharose n'affecte pas l'ordre ni la fluidité membranaire des liposomes de DPPC, tels qu'ils sont estimés par ces techniques. Ce résultat peut être expliqué par le fait qu'étant hydrophiles, les sucres n'interagissent pas avec les bicouches lipidiques.

Par ailleurs, d'autres travaux [FABRIE et al., 1990] ont montré que le saccharose a un effet faible sur la température et l'enthalpie de transition de phase des liposomes de DMPC.

Les résultats acquis en excitation continue sont en accord avec ceux obtenus en excitation pulsée, lesquels sont compatibles avec une rigidification des bicouches phospholipidiques par les protéines.

De plus, les études effectuées sur la variation de la polarité locale ont montré qu'en présence d'albumine bovine la polarité de l'environnement du pyrène augmente. En effet, ceci suggère que l'albumine bovine s'adsorbe sur la surface des liposomes et attire le pyrène vers la face externe des bicouches où la polarité et la cohésion membranaire sont plus importantes qu'entre les feuillettes phospholipidiques. Dans le cas de l'ATPase, le rapport I_{373}/I_{393} reste constant avec l'addition de la protéine, ce qui laisse penser que le pyrène ne change pas de localisation quand l'ATPase est ajoutée et que la diminution du coefficient de diffusion est indépendante d'un tel changement de localisation, ce qui renforce l'hypothèse de l'incorporation de l'ATPase dans les bicouches lipidiques.

3.2.5. CONCLUSION

Les modèles proposés dans cette étude expliquent la tendance observée expérimentalement, à savoir, la diminution du coefficient de diffusion du pyrène avec l'augmentation de la concentration en protéines.

La mesure de ce coefficient nous permet de caractériser le déplacement latéral des phospholipides. Cependant, la diminution de la vitesse de diffusion du pyrène dans les liposomes par les protéines ne peut être obligatoirement liée à la diminution de fluidité membranaire.

En effet, la mesure de la diffusion du pyrène est fondée sur la fréquence de collisions d'une molécule de pyrène excitée avec une autre molécule à l'état fondamental. Or, la diminution de cette fréquence peut être due :

- * soit à une rigidification du milieu,
- * soit au fait que les protéines agissent comme "obstacles" immobiles, empêchant la libre circulation du pyrène et augmentant le trajet à parcourir avant la rencontre des deux entités réactives,
- * soit à la contribution des deux phénomènes,
- * soit enfin à l'adsorption d'une partie du pyrène par les protéines, diminuant ainsi, la concentration en pyrène diffusant, ce qui conduit à des valeurs de D sous-estimées.

Cependant, sachant que la polarité locale ne varie pas avec l'addition de l'ATPase, on peut penser que les molécules de pyrène ne changent pas de localisation en présence de protéines et que l'hypothèse d'une éventuelle adsorption de la sonde par ces dernières est au moins en première approximation, à exclure.

En ce qui concerne notre étude, nous supposons que les protéines sont des structures rigides et fixes dans une matrice fluide (cf. § 3.2.4.1.5.). Or, d'autres travaux ont conduit à la mesure de coefficients de diffusion latérale des protéines [VAZ et al., 1984; PETERS et CHERRY, 1982; SCHLESSINGER et al., 1977]. Les valeurs trouvées, comprises entre $5 \cdot 10^{-8}$ et $10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, sont compatibles avec la simplification de notre modèle.

Néanmoins, notons que les travaux de CHANG et al., 1981, donnent des valeurs de coefficients de diffusion des protéines comparables à celle des phospholipides, ce qui ne correspond pas aux calculs que l'on peut faire à partir des théories du transport, indiquant des effets sur D inversement proportionnels à la masse molaire à la puissance 1/3.

3.3. INTERACTIONS CYCLOSPORINE A - DPPC

3.3.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

La cyclosporine A est un immunosuppresseur récent, couramment utilisé ces dernières années. L'objectif de notre étude est de déterminer l'influence éventuelle de cette drogue sur l'ordre et la fluidité membranaire de membranes modèles (liposomes de DPPC), tels qu'ils sont estimés par les techniques d'émission moléculaire de fluorescence.

3.3.2. ETAT DES CONNAISSANCES

La cyclosporine A est un undécapéptide cyclique de poids moléculaire 1 203. C'est un composé neutre, riche en amino-acides hydrophobes et insoluble dans l'eau (cf. figure 3.3.1.).

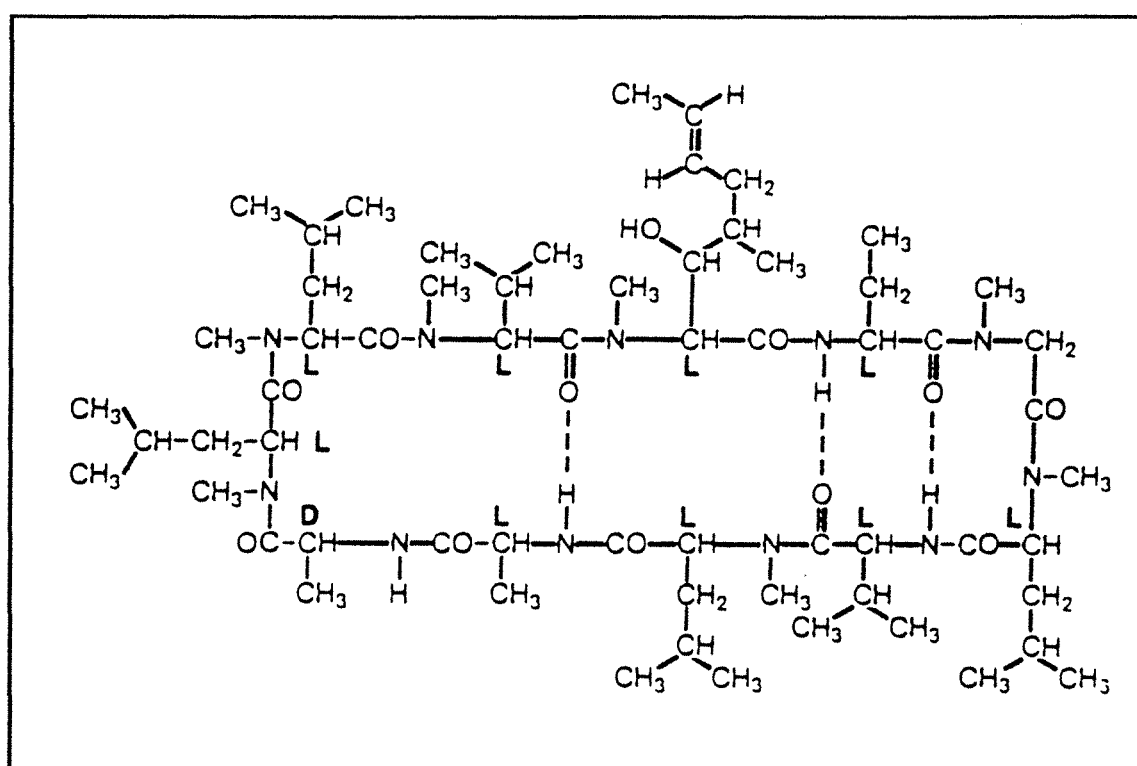


Figure 3.3.1.

Structure chimique de la cyclosporine A.

L'originalité de sa structure réside dans la présence d'un acide aminé dextrogyre (D-alanine) et d'un acide aminé qui lui est spécifique, dérivé de la N-méthylsérine.

Cette structure a fait de la cyclosporine A un immunosuppresseur original et d'un grand intérêt, ainsi depuis 1978, la cyclosporine A a révolutionné la thérapie des patients ayant subi une transplantation d'organes, du fait de son action suppressive de la réponse immunitaire [HIESTAND et MEKLER, 1986].

Malheureusement la cyclosporine A présente une certaine toxicité [REYFFEL, 1986], mais le rapport "avantages thérapeutiques/risques" est indiscutablement positif.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'interaction des protéines, des petits polypeptides et d'autres substances telles que les médicaments ou les hormones avec les lipides membranaires est responsable de nombreuses fonctions et implications physiologiques. Ceci est dû à leur influence sur les propriétés structurales et dynamiques des membranes.

La solubilité limitée de la cyclosporine dans l'eau laisse à penser que son association aux membranes *in vivo* est fort probable [CANAVAK et SUCKER, 1986].

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés aussi, au système cyclosporine A/phospholipides, lequel a attiré beaucoup d'attention récemment.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé deux techniques spectrofluorimétriques, la polarisation de fluorescence (en excitations continue et pulsée) et l'inhibition de fluorescence par formation d'excimères intramoléculaires.

3.3.3. MATERIELS ET METHODES

3.3.3.1. MATERIELS

La cyclosporine A, échantillon PPS-WHL (3142056) est un don de J.F. BOREL (SANDOZ, BALE).

Le DL-a-DPPC (P-5911) est un produit Sigma Chemical Company.

3.3.3.2. METHODES

Méthodes d'analyse : cf. § 1.2..

Préparation des liposomes : cf. § 3.2.3.2..

Notons que la cyclosporine est introduite (sous forme de poudre) à la solution chloroformique de phospholipides avant l'évaporation du solvant.

3.3.4. RESULTATS ET DISCUSSION

3.3.4.1. LA POLARISATION DE FLUORESCENCE (DPH et TMA-DPH)

Nous avons utilisé deux types de sondes émissives, le DPH et le TMA-DPH. En effet, comme nous l'avons déjà rappelé (cf. § 1.2.1.3.1.) le DPH est parmi les marqueurs les plus utilisés en polarisation de fluorescence pour l'investigation des membranes lipidiques, du fait de son incorporation facile dans celles-ci et du fait de sa fluorescence quasi nulle en milieu aqueux, alors que son rendement quantique est particulièrement élevé dans les lipides.

L'utilisation du TMA-DPH peut donner des renseignements supplémentaires puisque cette sonde se situe dans la bicouche phospholipidique au niveau d'une zone différente de celle où le DPH se place (cf. § 1.2.1.3.2.). Il semble que le TMA-DPH se localise dans une région plus organisée et plus structurée que celle du DPH (dans la zone polaire).

Par ailleurs, comme nous l'avons mentionné au § 1.2.1.2., pour pouvoir dire que l'anisotropie $\langle r \rangle$ varie proportionnellement à la microviscosité η , il est nécessaire que la durée de vie τ de la sonde soit pratiquement constante. Ceci nous a conduit à mesurer la durée de vie du DPH dans les liposomes de DPPC en présence et en absence de cyclosporine, au dessus et en dessous de la température de transition.

Ainsi, pour les deux concentrations en cyclosporine testées, le tableau 3.3.1. montre que τ ne varie pratiquement pas quand la cyclosporine est ajoutée.

Tableau 3.3.1.

Mesures des durées de vie du DPH dans des liposomes de DPPC, en absence et en présence de cyclosporine, en-dessous et au-dessus de la température de transition.

Les durées de vie sont exprimées en nanosecondes (ns).

T °C \ (DPPC)/(Cyclosp.)	0	20	100
25	9,4	10,0	9,8
50	7,8	8,2	7,9

3.3.4.1.1. Utilisation du DPH

Avant d'aborder cette série d'expériences, nous avons vérifié le pouvoir d'absorption et de fluorescence de la cyclosporine mise en solution dans une préparation de DPPC. Les spectres correspondant montrent que cette solution ne présente ni absorption, ni fluorescence dans les zones de longueurs d'onde où les différentes mesures sont faites.

La représentation graphique de l'anisotropie d'émission de fluorescence du DPH en fonction de la température (cf. figure 3.3.2.) montre que les concentrations croissantes en cyclosporine ne modifient pas les courbes de transition du DPPC et cela ni avant, ni au-delà de la température de transition. Ce résultat est confirmé dans le cas où la cyclosporine est ajoutée aux vésicules préformées (cf. figure 3.3.3.).

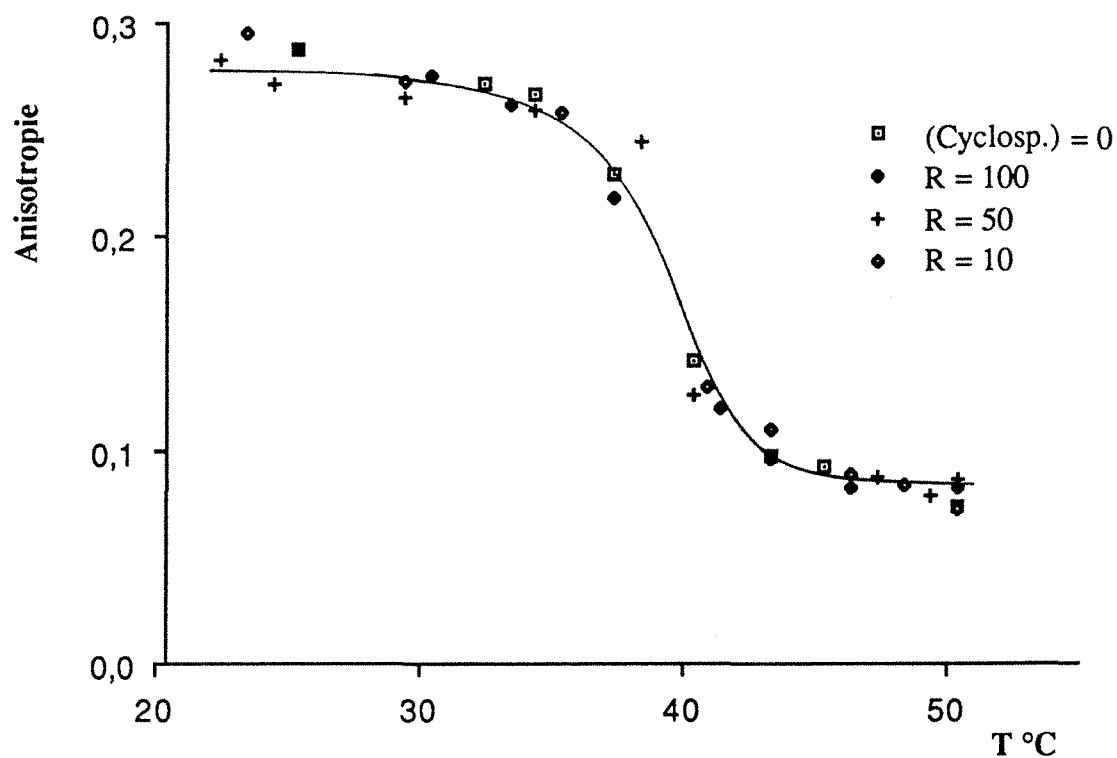


Figure 3.3.2.

Variations de l'anisotropie du DPH en fonction de la température dans des liposomes de DPPC, en absence et en présence de cyclosporine. $R = (\text{DPPC})/(\text{Cyclosporine})$.

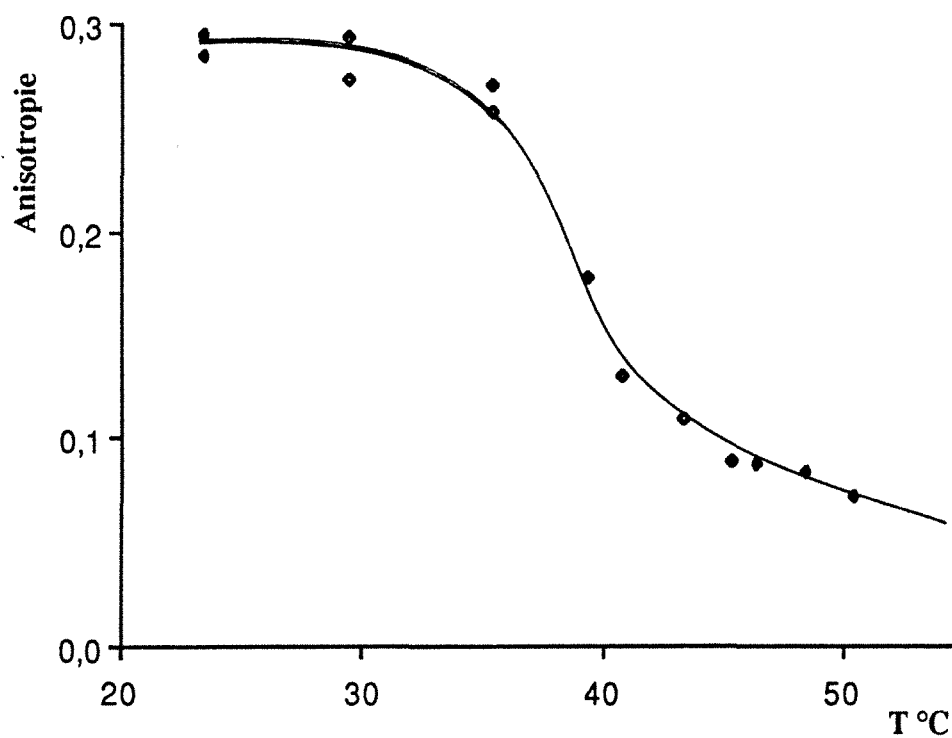


Figure 3.3.3.

Comparaison de l'influence de la cyclosporine, ajoutée avant (◇) et après (◆) la préparation des liposomes de DPPC, sur la variation de l'anisotropie de fluorescence du DPH, en fonction de la température. $(\text{DPPC})/(\text{Cyclosporine}) = 10$.

3.3.4.1.2. Utilisation du TMA-DPH

L'utilisation de ce traceur fluorescent conduit à des résultats identiques à ceux obtenus avec le DPH. En effet, la figure 3.3.4. montre que les courbes de transition des liposomes de DPPC, en absence et en présence de cyclosporine, sont quasiment confondues.

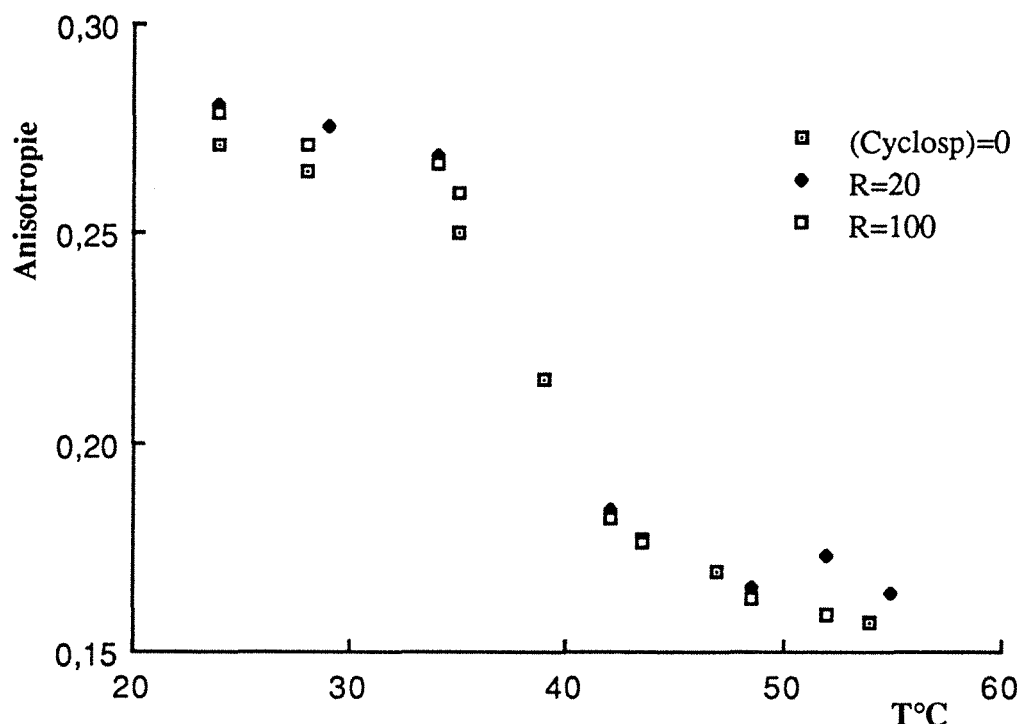


Figure 3.3.4.

Variations de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH en fonction de la température dans des liposomes de DPPC, en absence et en présence de cyclosporine.

$$R = (\text{DPPC})/(\text{Cyclosporine}).$$

D'après les résultats, à partir de l'anisotropie de fluorescence du DPH et du TMA-DPH, on peut en déduire qu'avec ce type de capteur d'environnement, la cyclosporine n'affecte pas l'organisation et la fluidité membranaire des liposomes de DPPC.

3.3.4.2. INHIBITION DE FLUORESCENCE PAR FORMATION D'EXCIMERES INTRAMOLECULAIRES DE P₃P EN EXCITATION CONTINUE

L'évolution du rapport I_E/I_M du P₃P avec la température est suivie en l'absence et en présence de cyclosporine dans des liposomes de DPPC.

La figure 3.3.5. montre bien que l'addition de la cyclosporine entraîne une diminution du rapport I_E/I_M , ceci au-delà de la température de transition du DPPC, alors qu'en-dessous de cette température l'effet de la cyclosporine est moins net.

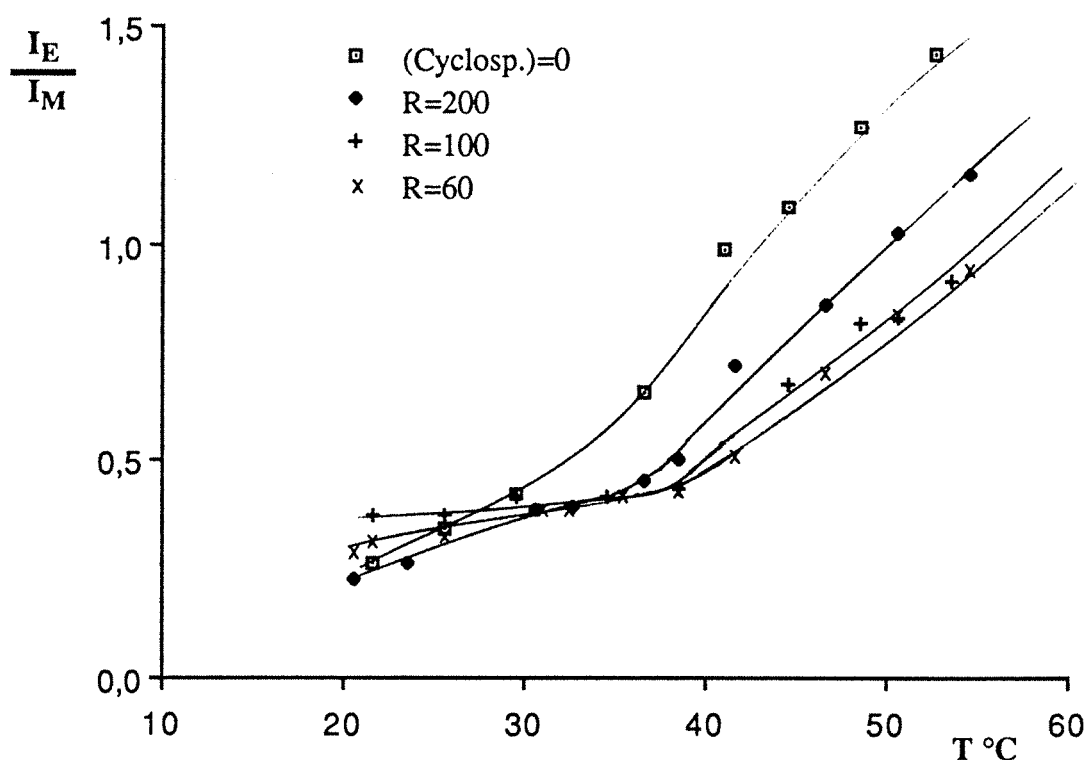


Figure 3.3.5.

Variations du rapport I_E/I_M du P_3P en fonction de la température dans des liposomes de DPPC en l'absence et en présence de cyclosporine. $R = (DPPC)/(Cyclosporine)$.

Ces données nous conduisent à penser immédiatement qu'au-delà de la température de transition l'addition de la cyclosporine aux liposomes de DPPC s'accompagne d'une "rigidification" de la bicouche lipidique, à la différence des observations relatives à la technique de polarisation de fluorescence du DPH et du TMA-DPH.

3.3.5. CONCLUSION

Les deux techniques utilisées pour l'étude de l'influence de la cyclosporine A sur la cohésion membranaire ont conduit à des observations contradictoires. En effet, d'après les résultats obtenus avec le DPH et le TMA-DPH, on peut en déduire que la cyclosporine n'affecte pas la structure et la microviscosité membranaire, alors que ceux obtenus par le P_3P laissent croire que la cyclosporine entraîne une rigidification de la bicouche lipidique et cela au-delà de la température de transition des liposomes de DPPC.

Ces résultats contradictoires peuvent être liés, d'une part aux distributions différentes des sondes fluorescentes utilisées dans les bicouches lipidiques et à la localisation de la cyclosporine dans ces membranes, d'autre part. Il semble que le DPH est localisé à

l'intérieur de la bicouche [ANDRICH et VANDERKOOI, 1976], alors que le P₃P et d'autres dérivés du pyrène se situeraient au niveau des têtes polaires [ALMEIDA et al., 1984].

Des constations analogues sont observées lors d'une étude récente [ANTUNES-MADEIRA et al., 1990], concernant l'influence du lindane sur la fluidité membranaire des liposomes de DPPC et de DMPC. En effet, l'utilisation du (2,P)₃(2,P), lui même préférant les régions extérieures des bicouches lipidiques, montre une augmentation de l'ordre des phospholipides dans la phase fluide, alors que, dans les mêmes conditions, la polarisation de fluorescence du DPH est quasi insensible à toute perturbation de l'organisation des bicouches lipidiques.

Par ailleurs, des travaux récents [WIEDMANN et al., 1990], ont montré que la cyclosporine serait localisée le long des chaînes acyles et que l'accumulation de cette drogue entre les deux feuillettes est peu probable. Ces hypothèses sont compatibles avec le fait que la cyclosporine est peu soluble dans les solvants complètement non-polaires, tels que le n-hexane [LOOSLI et al., 1985].

Cependant, WIEDMANN et ses collaborateurs ont montré, par utilisation de la résonance magnétique nucléaire du deutérium, ²H RMN, que la cyclosporine entraînerait une augmentation du paramètre d'ordre des chaînes acyles du DPPC dans l'état cristal-liquide. En revanche, l'utilisation de la calorimétrie différentielle (DSC) conduit à une faible diminution de la température de transition des liposomes de DPPC.

3.4. ETUDE DE SOLUTIONS AQUEUSES DE
MICELLES NON IONIQUES ($C_{12}(EO)_6$ ET $C_{12}(EO)_8$)

3.4.1. OBJECTIF DE L'ETUDE

Notre principal objectif a été d'étudier l'influence de la température sur la structure de micelles aqueuses de tensio-actifs non ioniques tels que $C_{12}(EO)_6$ et $C_{12}(EO)_8$.

Pour ce faire, trois méthodes spectroscopiques ont été utilisées : la fluorescence du dipyrénylpropane (P_3P), la polarisation de fluorescence du DPH et du TMA-DPH et enfin le déclin de fluorescence du pyrène en excitation pulsée (laser picoseconde).

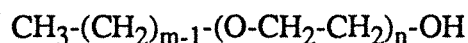
En fait, ce travail s'insère dans un ensemble d'études réalisées au GRAPP, et par conséquent, pour une meilleure compréhension de cette recherche, j'ai préféré décrire l'ensemble des travaux exécutés au GRAPP, par P. BARTOLI, O. LEGRINI, C. MAIRE et moi-même. Ce choix correspond aussi au fait que pour la compréhension du dipyrénylpropane dans les micelles (cf. § 3.4.4.1.), il faudra se référer à mes propres travaux dans des solvants classiques.

3.4.2. ETAT DES CONNAISSANCES

Je ferai quelques rappels sur les micelles non ioniques et expliquerai les raisons qui m'ont incitées à utiliser les méthodes de spectroscopie d'émission moléculaire pour étudier ces systèmes.

3.4.2.1. DESCRIPTION DES MICELLES AQUEUSES NON IONIQUES

Les tensio-actifs non ioniques étudiés sont du type $C_m(EO)_n$, lesquels sont des monoalkyléthers de polyoxyéthylène, de formule générale :



où m et n sont respectivement, le nombre de carbones de la chaîne alkyle hydrophobe et le nombre de groupes oxyéthylène.

Ainsi, ces molécules sont composées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe.

Les propriétés de ces tensio-actifs non ioniques dépendent de plusieurs paramètres (nombres m et n , température, concentration, etc...) qui définissent trois grandeurs essentielles :

* La balance hydrophile-lipophile (BHL) : elle permet de classer les tensio-actifs selon

leur hydrophobicité [OLSSON et al., 1986].

* La concentration micellaire critique (CMC) : l'organisation structurale d'une substance tensio-active en suspension dans l'eau dépend de sa concentration. En effet, à concentrations faibles, il se produit un équilibre entre les molécules de tensio-actif dispersées dans l'eau et celles adsorbées à l'interface air-eau. Plus la concentration en tensio-actif augmente, plus la monocouche formée est saturée. Ainsi, au-delà d'une concentration en tensio-actif appelée concentration micellaire critique, les molécules de tensio-actifs forment des agrégats (micelles) en équilibre avec les monomères (cf. figure 3.4.1.).

* Le point de trouble ou "cloud point" : il semble que la taille et la forme des micelles varient en fonction de la température. Ainsi, à partir d'une température dite température de point de trouble, l'augmentation de la température entraîne l'éclatement des micelles. Ceci est accompagné par un phénomène de démixtion en deux phases, l'une contenant la majorité du tensio-actif à l'état monomère, l'autre contenant la majorité du tensio-actif dissous dans l'eau. Notons aussi que la température de point de trouble est une fonction faiblement dépendante de la concentration en tensio-actif [RAVEY, 1985]. Pour les tensio-actifs considérés (et aux concentrations choisies), les Tp sont de l'ordre de 49 °C pour $C_{12}(EO)_6$ et de 78 °C pour $C_{12}(EO)_8$.

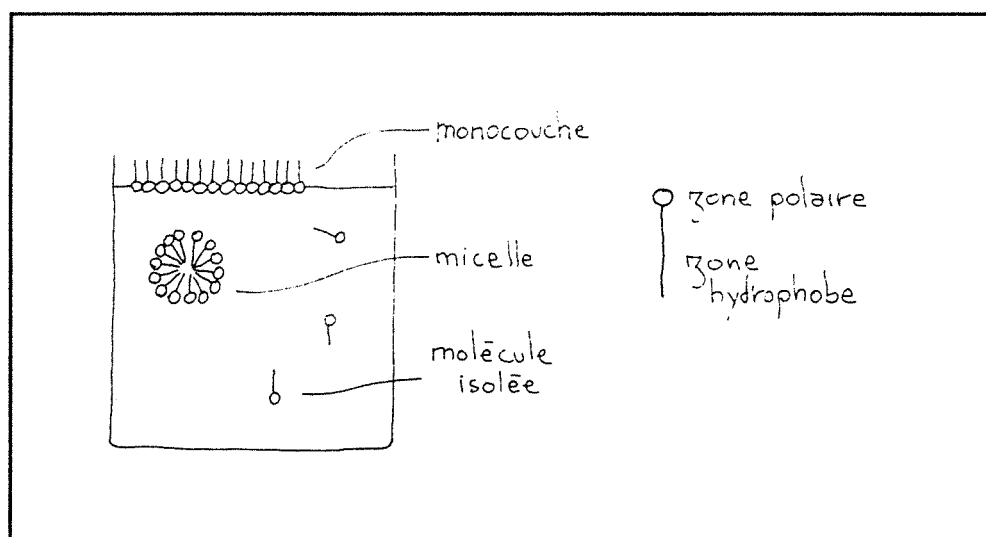


Figure 3.4.1.

Equilibre des différentes formes de composés amphiphiles dans l'eau :
dispersée, en monocouche et en micelles.

3.4.2.2. LA FLUORESCENCE COMME METHODE D'INVESTIGATION DE TENSIO-ACTIFS

Depuis plusieurs années, le GRAPP a développé des travaux concernant les techniques de spectroscopie d'émission moléculaire (cf. § 1.2.) pour étudier la structure de solutions aqueuses de tensio-actifs [KAUFFMANN, 1985; VIRIOT et al., 1983_b] et en particulier de tensio-actifs non ioniques, $C_m(EO)_n$.

Pour l'étude des tensio-actifs non ioniques, l'objectif était de mieux appréhender la cohésion de tels systèmes, soumis à des variations de température et de concentration en tensio-actifs [MAIRE, 1989; BARTOLI, 1986; LEGRINI, 1985] et, par les résultats de résoudre éventuellement, certaines questions posées quant à la détermination de la nature des systèmes.

Notons que cette recherche a été démarrée suite à des discussions avec J.C. RAVEY, DR CNRS, Université de Nancy I, qui étudiait plusieurs systèmes $C_m(EO)_n$ avec des méthodes de diffusion de lumière et de diffusion de neutrons [RAVEY, 1985 et 1983] et comme nous allons le préciser obtenait des résultats en opposition avec d'autres observations.

En effet, au démarrage de cette action, les solutions aqueuses de tensio-actifs non ioniques, $C_m(EO)_n$ avaient déjà fait l'objet de nombreuses études. En particulier, certaines caractéristiques de leur comportement (CMC; température de point de trouble, T_p ; Température d'Inversion de Phase, PIT) avaient donné lieu à un grand nombre de publications [BOSTOCK et al., 1984 et références citées].

Pourtant une importante controverse existait quant à leur structure à l'approche de la température de trouble, T_p ; plus exactement l'interprétation des résultats expérimentaux liés à chaque méthode physique considérée et aux modèles s'y rattachant ne conduisait pas à des conclusions identiques : par exemple y avait-il ou non augmentation de la taille des micelles ?

Relativement à cette question, nous avons regroupé dans le tableau 3.4.1, les divergences, qui existaient en 1984, pour par exemple le tensio-actif $C_{12}(EO)_6$, en faisant remarquer que même avec l'utilisation d'une technique identique des résultats opposés étaient décrits.

Les études du GRAPP ont eu pour but de suivre la cohésion des micelles de $C_{12}(EO)_6$ et de $C_{12}(EO)_8$ selon la température et la concentration en tensio-actifs en considérant :

* le comportement du dipyrénylpropane (P_3P), sonde pour laquelle la formation d'excimères intramoléculaires est liée à son environnement et représente une méthode d'investigation de la structure de milieux organisés (cf. § 1.2.3.),

* l'anisotropie de fluorescence du DPH et de son homologue le TMA-DPH en sachant que la polarisation de fluorescence est une technique qui renseigne en terme d'ordre et de mobilité, comme nous l'avons mentionné dans le § 1.2.1.,

* l'inhibition de fluorescence par formation d'excimères intermoléculaires, en considérant le déclin de fluorescence du pyrène, lié aux propriétés de transport en terme de translation des molécules de pyrène dans le milieu considéré (cf. § 1.2.2. et § 3.2.).

Parallèlement à nos investigations, des travaux utilisant les méthodes de fluorescence pour l'étude des $C_m(EO)_n$ ont été effectués. Ainsi TURLEY et OFFEN, 1985, ont utilisé le dipyrénylpropane dans des micelles de $C_{12}(EO)_6$ et ZANA et WEILL, 1985, ont décrit la fluorescence du pyrène dans différents $C_m(EO)_n$.

Tableau 3.4.1.

Influence de la température sur la structure de micelles non ioniques.

Références	Techniques utilisées	Observations
BALMBRA et al., 1964	Diffusion de Neutrons	Accroissement de la taille des micelles en fonction de la température
LOFROTH et ALMGREN, 1983	Inhibition de fluorescence du pyrène	L'élévation de la température entraîne soit une augmentation du nombre d'agrégation soit une seconde agrégation de petites micelles
RAVEY, 1983	Diffusion de Neutrons	Augmentation de la taille des micelles avec l'élévation de la température
CORTI et al., 1984	RMN Diffusion de Neutrons et Laser	Croissance substantielle des micelles avec l'augmentation de la température et de la concentration en tensio-actifs
DIMEGLIO et al., 1984	RPE	Agrégation des micelles sans croissance de taille avant et après le point de trouble
ZANA et WEILL, 1985	Inhibition de fluorescence du pyrène	L'élévation de la température entraîne soit une augmentation du nombre d'agrégation soit une seconde agrégation de petites micelles
ZULAUF et al., 1985	FEP Diffusion de Neutrons	Pas de croissance de la taille des micelles avec l'augmentation de la température
DANILO et LASIC, 1987	RPE	Formation uniquement d'agrégats "défaits", au-dessus de la température du point de trouble

3.4.3. MATERIELS ET METHODES

3.4.3.1. MATERIELS

Les tensio-actifs $C_{12}(EO)_6$ et $C_{12}(EO)_8$ sont des échantillons Nikko Chemicals (Tokyo) et sont utilisés sans purification complémentaire (pureté annoncée 98 %).

Le SDS est un échantillon Fluka (n° 71727) de pureté supérieure à 99 %.

Les solvants : éthanol, cyclohexane, cyclohexanol, isobutanol sont des produits Merck "Uvasol" (pour la spectroscopie de fluorescence).

3.4.3.2. METHODES

3.4.3.2.1. Méthodes spectroscopiques d'analyse

Les méthodes utilisées sont celles décrites aux § 1.2. et § 2.2. .

3.4.3.2.2. Préparation des micelles et conditions de travail

Les tensio-actifs sont dilués dans l'eau bidistillée et les concentrations sont déterminées par pesée, elles sont exprimées en %, poids/poids par rapport à l'eau.

Le P_3P , le DPH et le TMA-DPH en solutions concentrées dans le chloroforme, le THF et le DMSO respectivement, sont ajoutés aux solutions micellaires sous forme de microquantités. Pour les trois sondes fluorescentes les concentrations finales utilisées sont de l'ordre de 10^{-6} M.

Ensuite, les solutions micellaires sont dégazées par trois cycles de dégazage à basse température (pompe à diffusion du mercure). Cette procédure permet une meilleure solubilisation des sondes fluorescentes dans les micelles [KANO et al., 1984].

Les concentrations finales en tensio-actifs utilisées (varient entre 0,1 et 10 %) sont supérieures aux concentrations micellaires critiques qui sont de $0,85 \cdot 10^{-4}$ M (0,0036 %), et de $1,02 \cdot 10^{-4}$ M (0,0053 %) pour $C_{12}(EO)_6$ et $C_{12}(EO)_8$, respectivement.

3.4.4. RESULTATS ET DISCUSSION

Comme je l'ai précisé précédemment, nous décrirai l'ensemble des travaux exécutés au GRAPP, par P. BARTOLI, O. LEGRINI, C. MAIRE et moi-même.

3.4.4.1. FORMATION D'EXCIMERES INTRAMOLECULAIRES DU P₃P

3.4.4.1.1. Déterminations des valeurs du rapport I_E/I_M en fonction des variations de température, pour les tensio-actifs C₁₂(EO)₆ et C₁₂(EO)₈

En 1985, O. LEGRINI a suivi, en excitation continue, la formation d'excimères intramoléculaires du P₃P introduit dans :

- des solutions aqueuses de C₁₂(EO)₆, pour différentes concentrations en tensio-actifs (0,1; 2 et 10 % en poids) et différentes températures entre 14 et 75 °C (cf. figure 3.4.2.),
- des solutions aqueuses de C₁₂(EO)₈, pour une seule concentration (2 % en poids) et différentes températures entre 21 et 87 °C (cf. figure 3.4.3.).

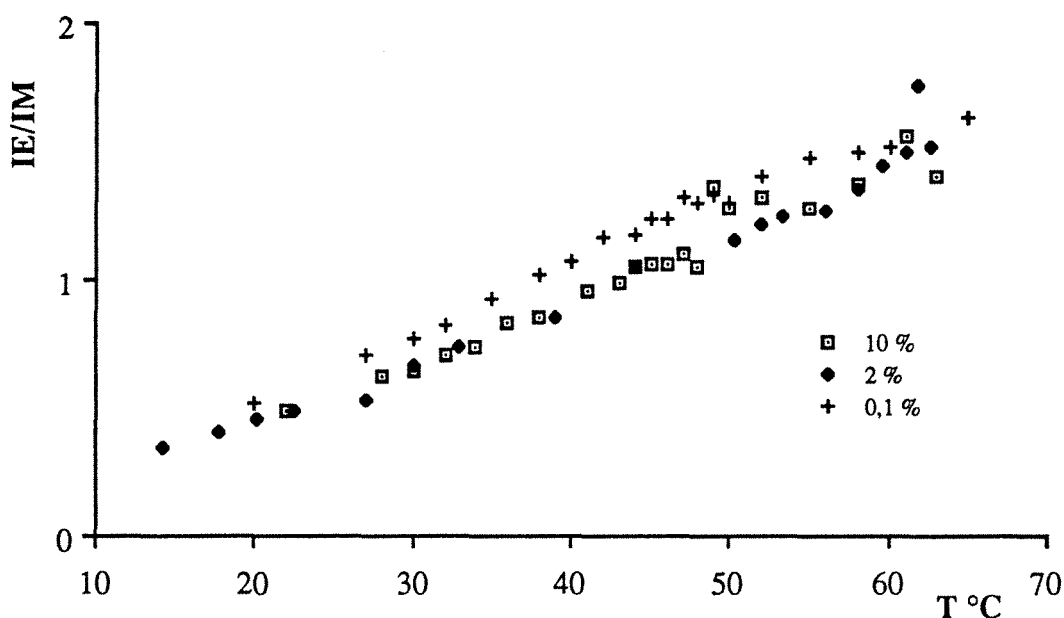


Figure 3.4.2.

Variation du rapport I_E/I_M pour le P₃P dans des micelles aqueuses de C₁₂(EO)₆, en fonction de la température et pour diverses concentrations (% en poids).

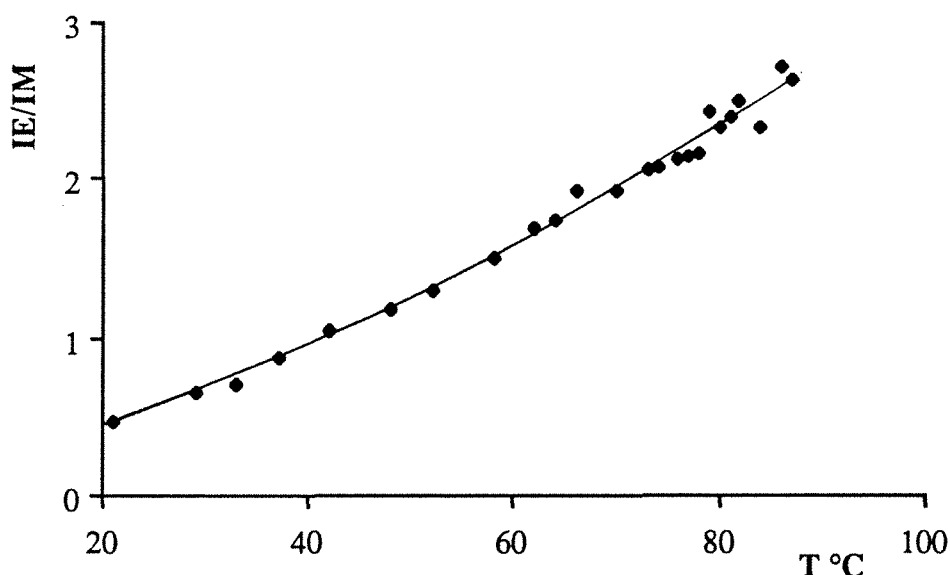


Figure 3.4.3.

Variation du rapport I_E/I_M pour le P₃P dans des micelles aqueuses de C₁₂(EO)₈, en fonction de la température et pour la concentration de 2 % (en poids).

Nous observons, pour chacun des tensio-actifs, une augmentation du rapport I_E/I_M avec l'élévation de la température. Cette augmentation peut être liée à :

- un effet direct de la température sur la cinétique de formation de l'excimère et/ou,
- une modification de la structure des micelles avec l'augmentation de la température (augmentation de la taille et par suite une mobilité accrue, cette hypothèse sera confirmée par les résultats relatifs à l'étude avec le pyrène, § 3.4.4.3. suivant).

Cependant, il était nécessaire de s'assurer que le dipyrénylpropane utilisé, soit dans tous les cas totalement incorporé dans les micelles et non pas en partie dans la phase aqueuse sous forme de cristallites, qui conduirait à une fluorescence d'excimère supplémentaire [VIRIOT et al., 1982].

Pour le tensio-actif C₁₂(EO)₆, pour lequel une étude en fonction de la concentration a été faite, il n'apparaît pas un effet important de cette variation sur les valeurs du rapport I_E/I_M (cf. figure 3.4.2.).

Pour pouvoir effectuer une comparaison du comportement des deux tensio-actifs étudiés, nous avons reporté, sur la même figure 3.4.4. et pour une concentration de 2 % en poids, les variations du rapport I_E/I_M avec l'élévation de la température. La similitude des valeurs pour une température donnée suggère un environnement équivalent du point de vue de la fluidité, telle qu'elle est perçue par le capteur P₃P.

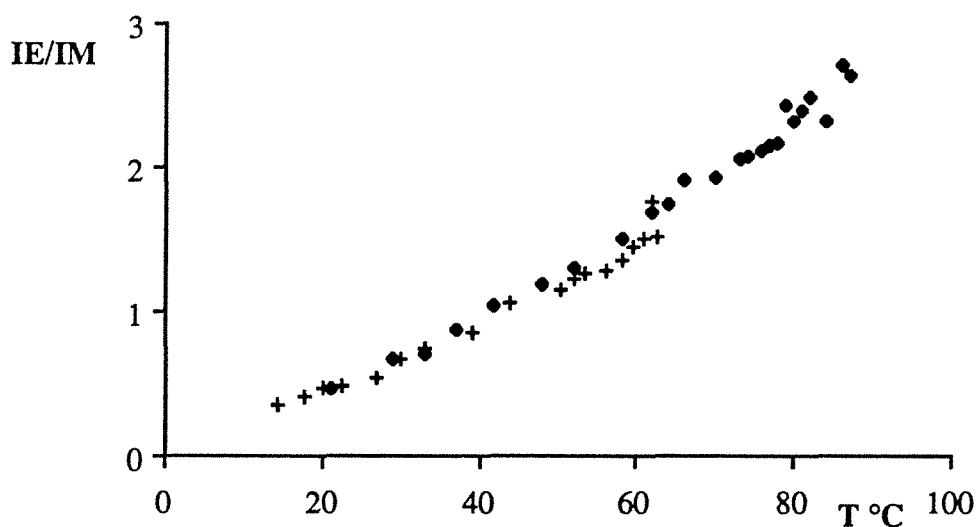


Figure 3.4.4.

Variation du rapport I_E/I_M pour le P_3P dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$ [+] et de $C_{12}(EO)_8$ [♦], en fonction de la température et pour la concentration de 2 % (en poids).

Pour suivre un éventuel phénomène d'hystérésis (lié à des modifications de l'agrégation), des mesures du rapport I_E/I_M ont été effectuées en opérant aussi bien par chauffage que par refroidissement de la solution aqueuse de tensio-actif. La figure 3.4.5. met en évidence la quasi absence de tels phénomènes dans la formation d'excimères intramoléculaires du P_3P dans les solutions aqueuses de $C_{12}(EO)_6$.

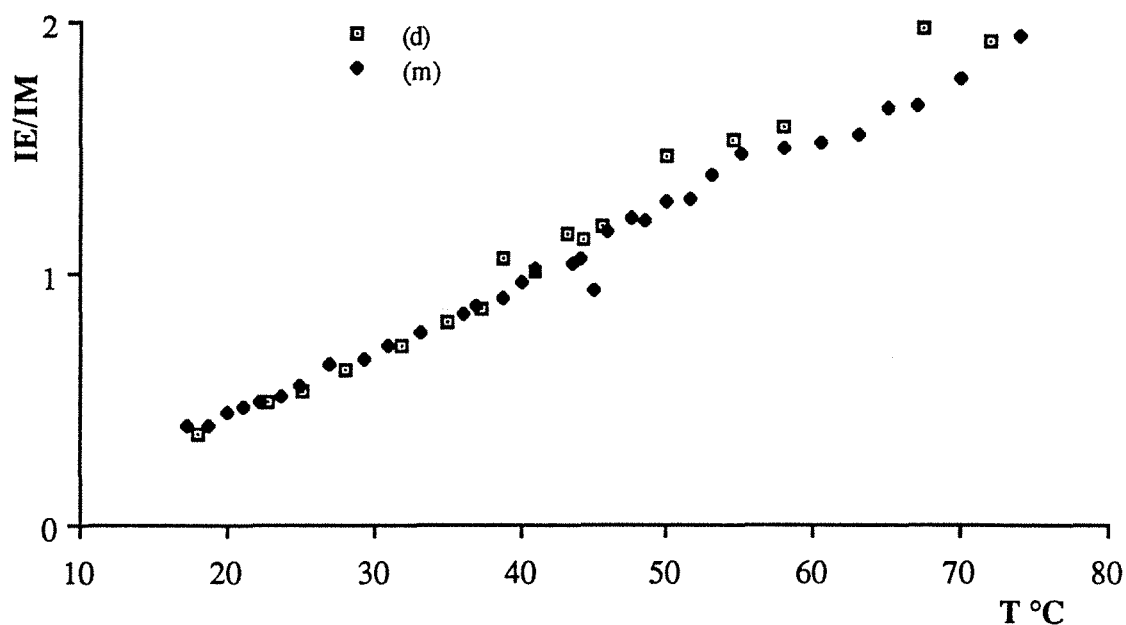


Figure 3.4.5.

Variation du rapport I_E/I_M pour le P_3P dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$ à 2,1 % (en poids) en fonction de la température et du mode de changement de température : d'abord en élevant la température (m) et ensuite en la diminuant (d).

Afin de connaître le rôle de l'oxygène, des mesures du rapport I_E/I_M ont été effectuées en opérant avec des solutions aqueuses de tensio-actif de $C_{12}(EO)_6$, à 2 %, respectivement aérées et dégazées (cf. figure 3.4.6.).

Pour interpréter le rôle de l'oxygène, qui est généralement un inhibiteur de la fluorescence, nous rappellerons que pour P_3P , le taux d'inhibition de fluorescence de l'excimère est supérieur à celui du monomère, particulièrement à faible viscosité [VIRIOT et al., 1983_b], par conséquent il n'est pas surprenant d'observer une diminution du rapport I_E/I_M en milieu aéré, lorsque la température augmente et de plus un écart croissant vers les hautes températures.

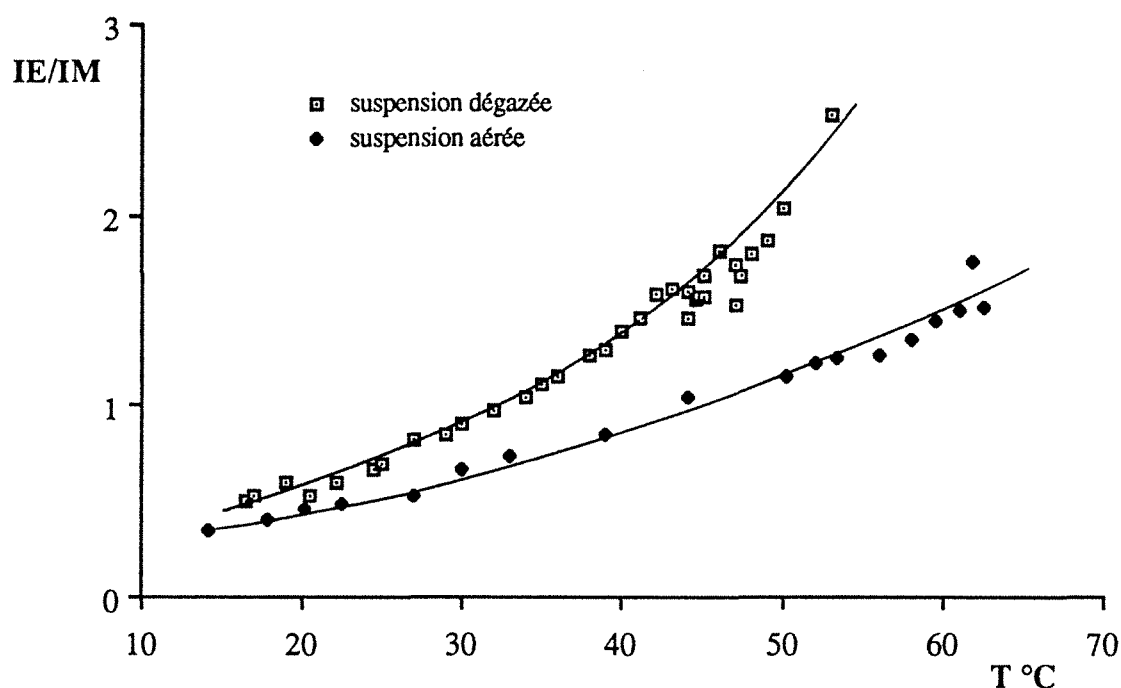


Figure 3.4.6.

Influence de la présence d'oxygène sur la variation du rapport I_E/I_M du P_3P dans des micelles de $C_{12}(EO)_6$ à 2 % (en poids) en fonction de la température.

3.4.4.1.2. Evaluation de la microviscosité des micelles de $C_{12}(EO)_6$ et de $C_{12}(EO)_8$

Notre but n'est ni de considérer la discussion de la validité de l'évaluation de microviscosités à partir d'abaques expérimentales (cf. § 1.2.3), ni de décrire à nouveau toutes les études concernant les dipyrénylpropanes (cf. tableau 1.2.3). Nous voulons seulement rappeler les quelques éléments indispensables pour argumenter notre discussion.

Comme nous l'avons rappelé au § 1.2.3., il est possible de tracer une abaque représentant la variation du rapport I_E/I_M en fonction de la viscosité macroscopique de milieux simples et ensuite d'utiliser cette abaque pour évaluer la viscosité équivalente d'un milieu complexe. Nous précisons tout de suite que cette approche qui semble être valable pour le P_3P , ne l'est plus pour des dipyrénylalcane possédant une chaîne alkyle plus longue (P_6P , P_9P [VIRIOT et al., 1983_b], $P_{10}P$ [HENDERSON et al., 1981]).

Pourquoi cette différence ? En effet, pour P_3P , par le mode de variation de la viscosité, qui repose sur l'utilisation soit de mélanges de solvants, soit de familles de solvants ayant des viscosités progressives, à iso-température et iso-pression, la courbe $I_E/I_M = f(\eta)$ est unique. A titre d'exemple, VIRIOT et al., 1983_b, ont obtenu une même courbe pour P_3P en faisant varier la viscosité avec soit des mélanges Ethanol-Glycérol, soit des mélanges Hexadécane-Paraffine liquide. Par contre, des courbes non superposables sont obtenues pour le P_6P et le P_9P en utilisant soit les mélanges d'alcools, soit les mélanges d'hydrocarbures.

Remarquons que ces abaques contiennent toujours un facteur d'appareil, qu'il est nécessaire de prendre en compte pour leur utilisation ultérieure.

Pour P_3P , d'autres abaques $I_E/I_M = f(\eta)$ ont été décrites. En effet, pour faire varier la viscosité de milieux, il est possible comme nous l'avons décrit précédemment de changer le solvant et garder la même température et la même pression, mais le changement de solvant se traduit par une modification des interactions d'environnement. D'autres voies de modification de la viscosité, pour un même solvant, peuvent être atteintes en modifiant soit la température à iso-pression, soit la pression à iso-température. Notons tout de suite que ces deux voies ne sont pas exemptes de **modifications directes** sur la cinétique de formation des excimères intramoléculaires, autre que la modification due à la variation de viscosité [HENDERSON et al., 1981] (cette remarque étant d'autant plus justifiée pour les interactions à faible viscosité).

Parmi les travaux relatifs au P_3P , rappelons pour les différentes approches de la variation de la viscosité, les études suivantes (cf. tableau 1.2.3.) :

- mélanges d'Ethanol-Glycérol, à T et P constantes : VIRIOT et al., 1983_a,
- mélanges d'Hexadécane-Paraffine liquide, à T et P constantes : VIRIOT et al., 1983_b,
- mélanges d'Hexadécane-Paraffine liquide, à T et P constantes : ZACHARIASSE et al., 1978,
- mélanges d'éthylène glycol-triéthylène glycol, à T et P constantes : HENDERSON et al., 1981,
- mélanges de n-Hexadécane-Paraffine liquide, à T et P constantes : HENDERSON et al., 1981,
- alcool iso-butylique, à pression variable et iso-température : SALLIO, 1986; TURLEY et OFFEN, 1985,
- mélanges d'acétate d'éthyle et de tripropionate de glycérol, à T et P constantes, WANG et al., 1984.

Pour ce travail, nous avons également étudié le comportement du P_3P , à iso-température et iso-pression, en faisant varier la viscosité par des mélanges cyclohexanol-cyclohexane, la figure 3.4.7. traduit la variation $I_E/I_M = f(\eta)$, à 25 °C et 1 bar.

Notre choix de l'utilisation du mélange cyclohexanol/cyclohexane est fondé sur le fait que ces deux solvants ont des tailles moléculaires similaires, ce qui permettrait une répartition homogène du P_3P . Cependant, ce mélange présente l'inconvénient d'être constitué par deux solvants de polarités opposées

Sur cette même figure, nous avons reporté les valeurs du rapport I_E/I_M du P_3P dans deux tensio-actifs en solution aqueuse (SDS à 0,07 M et $C_{12}(EO)_6$ à 2 %), à 25 °C et 1 bar. A partir de ces valeurs, il est possible d'estimer la microviscosité de ces systèmes :

- 47 cP, pour les micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$ à 2 %,
- 23 cP, pour les micelles de SDS (0,07 M).

Notons que ces valeurs sont comparables à celles présentées par d'autres auteurs, qui ont utilisé le P_3P , comme capteur de viscosité. Ainsi, TURLEY et OFFEN, 1985, proposent 57 cP, à 15 °C et 1 bar, pour $C_{12}(EO)_6$; ZACHARIASSE et al., 1978, proposent 19 cP, à 20 °C, pour le SDS.

Récemment, les travaux de HARA et SUZUKI, 1990, ont conduit à des valeurs de 32 et 24 cP dans des micelles de $C_{12}(EO)_6$ et de SDS respectivement, à la même température de 30 °C. Ces auteurs ont travaillé à iso-température et à pression variable.

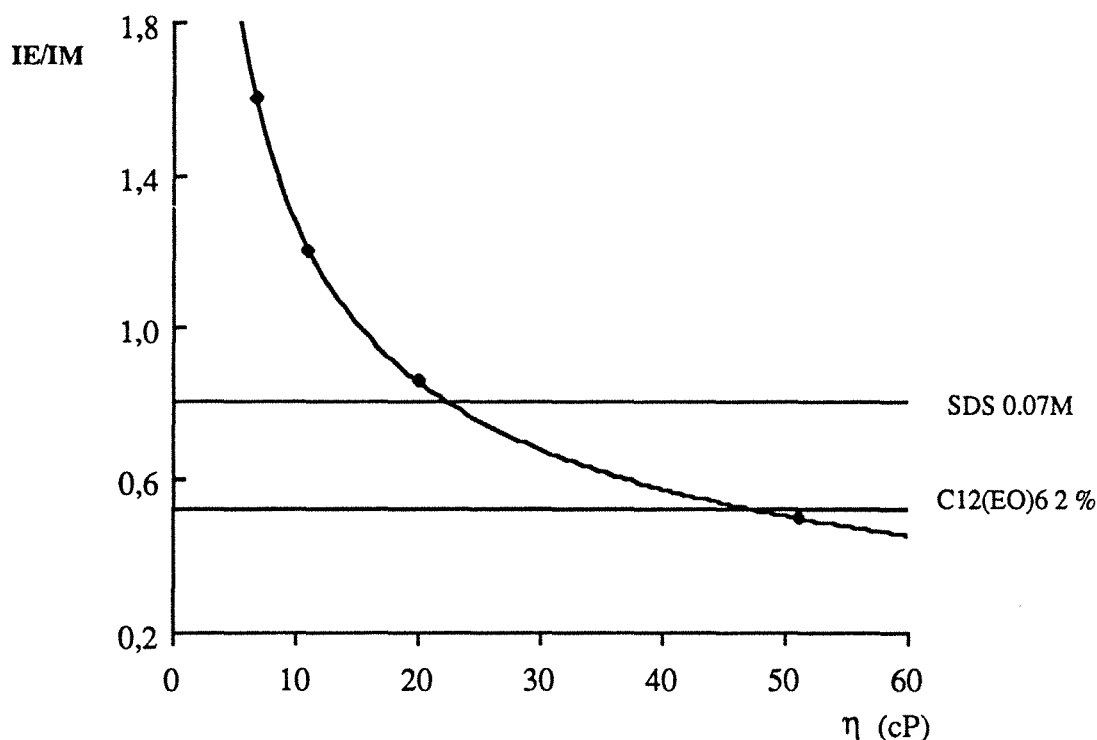


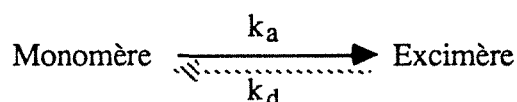
Figure 3.4.7.

Variation de I_E/I_M pour P_3P en fonction de la viscosité dans des mélanges cyclohexanol/cyclohexane, à 25 °C et 1 bar (solutions dégazées).

3.4.4.1.3. Comparaison de l'effet de la température sur la formation d'excimères intramoléculaires de P₃P dans des micelles de tensio-actifs et dans des solvants organiques. Courbes d'énergie d'activation

Nous présentons les résultats de ce paragraphe à titre comparatif, vu la complexité du mécanisme de formation d'excimères intramoléculaires du P₃P [COLLIN, 1987], ces résultats ne nous permettent pas encore d'émettre des interprétations définitives quant à l'influence de la "viscosité" sur ce mécanisme.

En se reportant au schéma cinétique (cf. figure 1.2.7.) de la formation d'excimère intramoléculaire du P₃P, et principalement à l'équilibre :



il est possible d'envisager l'influence de la température sur cet équilibre.

Dans des travaux antérieurs [ZACHARIASSE et al., 1981] et par le tracé des courbes de type ARRHENIUS, $\ln (I_E/I_M) = f(1/T)$, deux domaines de température sont visualisés : à basse température, il est admis que le processus de dissociation de l'excimère est peu important, par contre à haute température, ce processus doit être pris en compte dans la cinétique. La figure 3.4.8. correspond à l'étude du P₃P dans l'hexadécane.

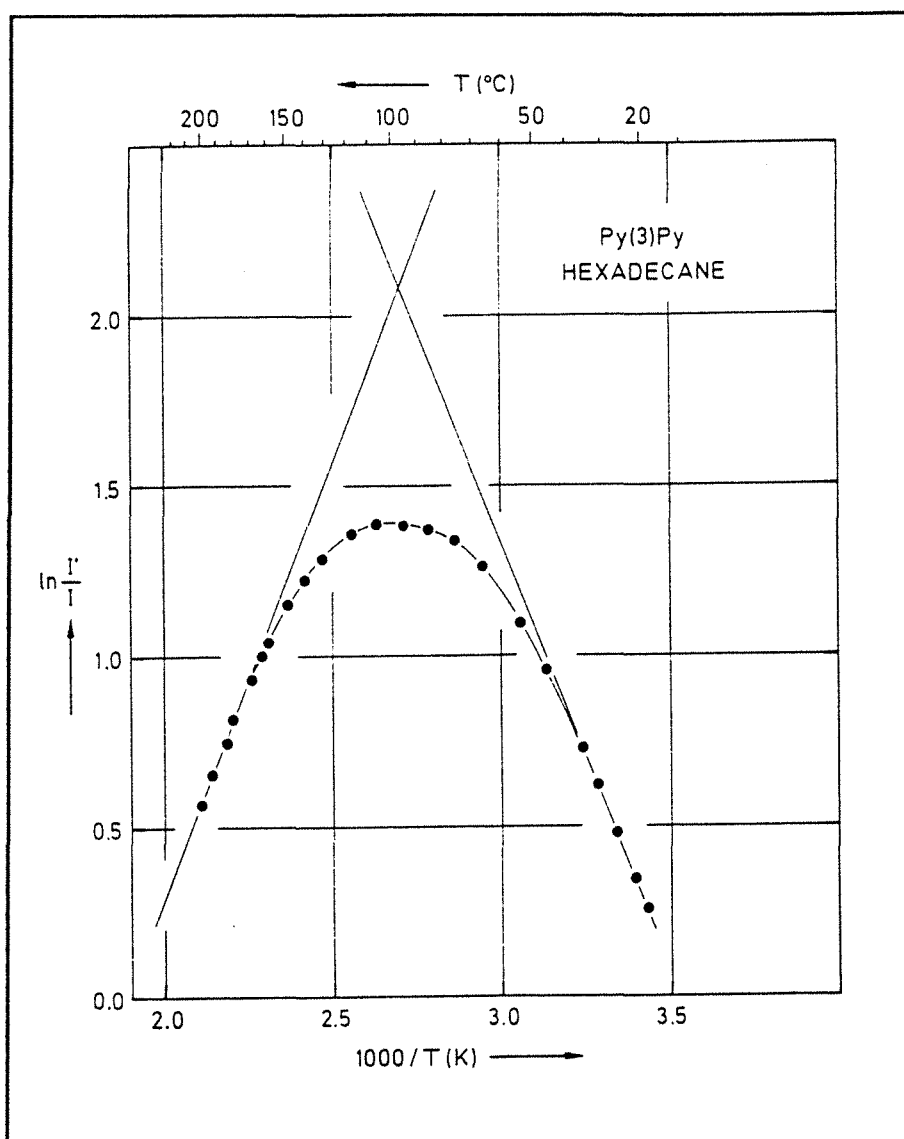


Figure 3.4.8.

Variation de $\ln(I'/I)$ avec $1/T$, pour le P_3P dans l'hexadécane
(I' et I sont les intensités de fluorescence de l'excimère et du monomère, respectivement)
[ZACHARIASSE et al., 1981].

Les mesures à basse température, où le processus de dissociation de l'excimère est négligé, permettent de déterminer l'énergie d'activation de la formation de l'excimère intramoléculaire (qui peut être la somme de plusieurs énergies : énergie de friction avec le solvant (ou le milieu) environnant, énergie de modification de conformations de P_3P , etc...).

Nous avons reporté, dans trois figures 3.4.9., 3.4.10. et 3.4.11., les résultats de nos principales études (toutes les expériences sont réalisées en solution dégazée pour s'affranchir des cinétiques d'inhibition des fluorescences du monomère et de l'excimère par l'oxygène) :

- la figure 3.4.9. représente la variation de $\ln(I_E/I_M) = f(1/T)$ pour P_3P , dans trois

solvants, éthanol (1,2 cP, à 20 °C), isobutanol (4,7 cP, à 15 °C) et cyclohexanol (68 cP, à 20 °C),

- la figure 3.4.10. représente la variation de $\ln(I_E/I_M) = f(1/T)$ pour le P₃P, dans des mélanges cyclohexanol/cyclohexane, de viscosités croissantes,

- la figure 3.4.11. représente la variation de $\ln(I_E/I_M) = f(1/T)$ pour le P₃P, dans les trois solvants de la figure 3.4.9., ainsi que dans les micelles aqueuses de tensio-actif C₁₂(EO)₆ à 2 %.

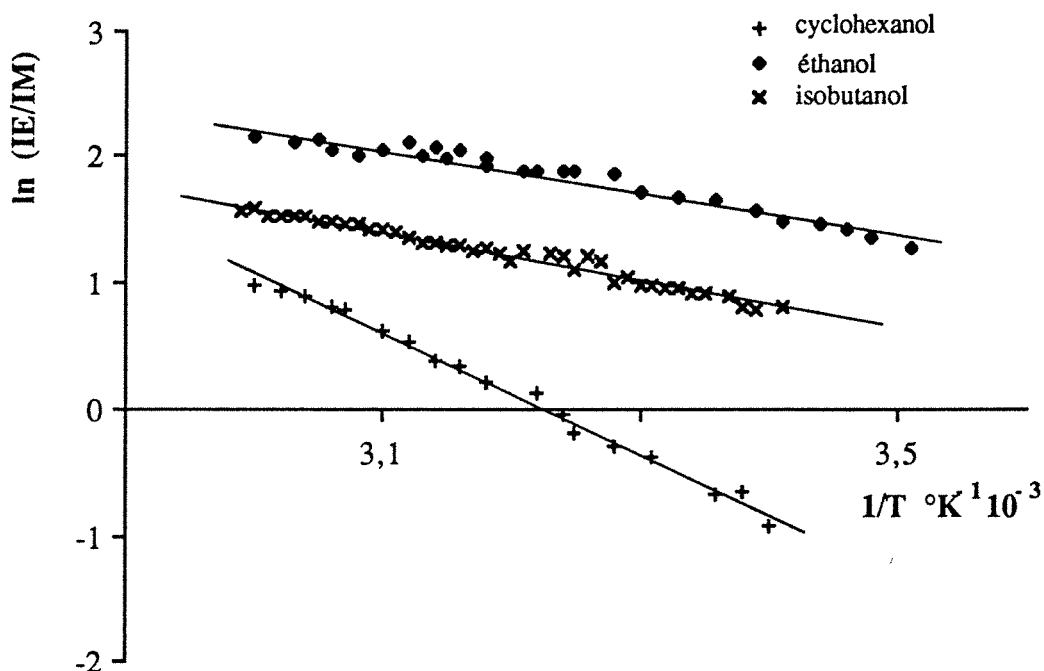


Figure 3.4.9.

Variation de $\ln I_E/I_M$ avec $1/T$ pour le P₃P, dans différents solvants organiques dégazés.

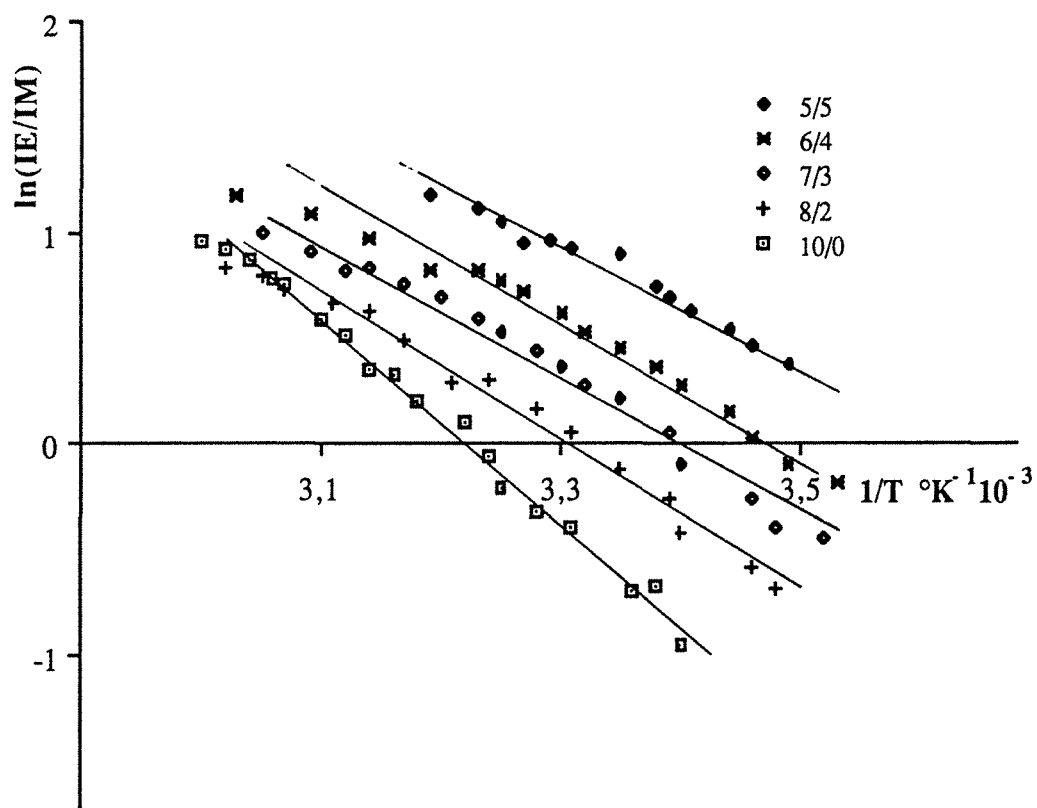


Figure 3.4.10.

Variation de $\ln I_E/I_M$ avec $1/T$ pour le P_3P ,
dans des mélanges cyclohexanol/cyclohexane dégazés.

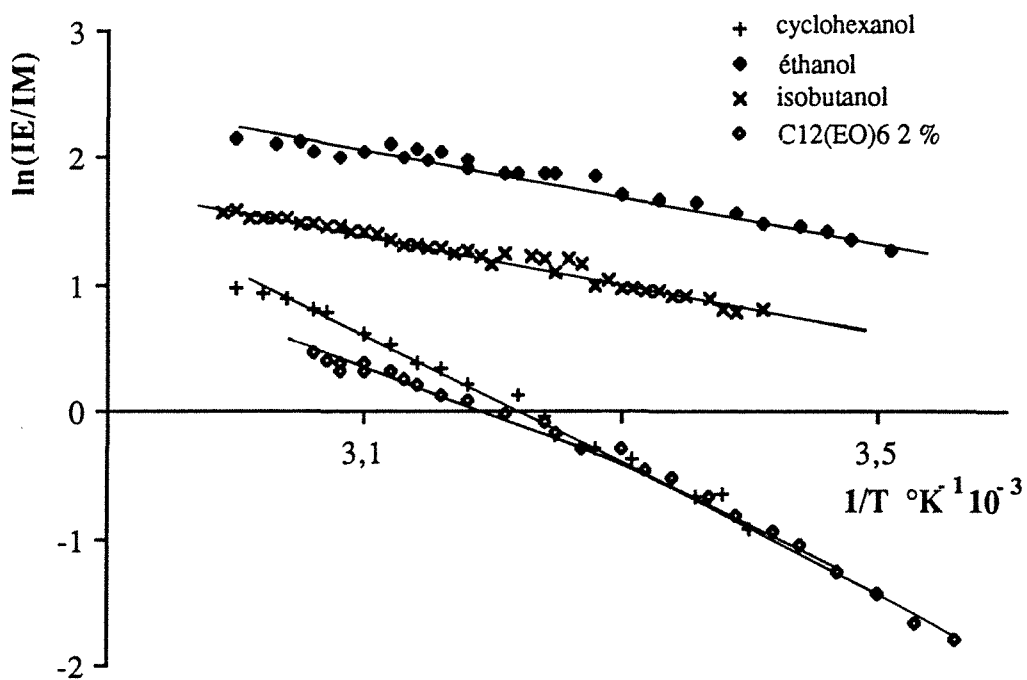


Figure 3.4.11.

Variation de $\ln I_E/I_M$ avec $1/T$ pour le P_3P ,
dans des solvants et des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$.

3.4.4.1.4. Conclusion

A partir des résultats obtenus en utilisant la technique de formation d'excimères intramoléculaires du P₃P dans l'étude des micelles aqueuses de C₁₂(EO)₆ et C₁₂(EO)₈, nous pouvons dégager les observations les plus importantes suivantes :

- * un effet direct de la température sur la cinétique de formation d'excimères, se traduisant par une augmentation du rapport I_E/I_M avec l'élévation de la température,
- * une quasi indépendance avec la concentration en tensio-actifs, des variations du rapport I_E/I_M en fonction de la température,
- * l'absence de phénomène d'hystérésis.

A la suite de ces observations, l'augmentation de la vitesse de formation d'excimères intramoléculaires de P₃P avec la température est-elle due :

- * à un effet exclusivement thermique,
- * à une diminution de la microviscosité (η) des micelles quand la température augmente,
- * ou enfin, à une modification de la structure des micelles ?

Pour essayer de répondre à cette question, les méthodes fondées sur la polarisation de fluorescence (DPH et TMA-DPH) et la formation d'excimères intermoléculaires du pyrène ont été utilisées. Nous décrirons leur application dans l'étude des tensio-actifs considérés dans les paragraphes suivants (§ 3.4.4.2. et § 3.4.4.3.).

3.4.4.2. POLARISATION DE FLUORESCENCE

3.4.4.2.1. Polarisation de fluorescence du DPH et du TMA-DPH en excitation continue

Des études [LEGRINI, 1985] concernant deux types de tensio-actifs, $C_{12}(EO)_6$ (cf. figures 3.4.12. et 3.4.13.) et $C_{12}(EO)_8$ (cf. figures 3.4.14. et 3.4.15.) ont été effectuées, en utilisant respectivement deux marqueurs de polarisation de fluorescence, le DPH ($5 \cdot 10^{-6}$ M) et le TMA-DPH ($5 \cdot 10^{-6}$ M), en faisant varier la concentration du tensio-actif dans l'eau et la température. Pour donner un exemple de la précision des mesures d'anisotropie de fluorescence en excitation continue obtenues sur l'appareil automatique de polarisation de fluorescence (cf. § 2.2.3.2.), la figure 3.4.16. décrit une expérience type avec le domaine d'erreurs, sachant que 10 lectures sont faites pour chaque mesure.

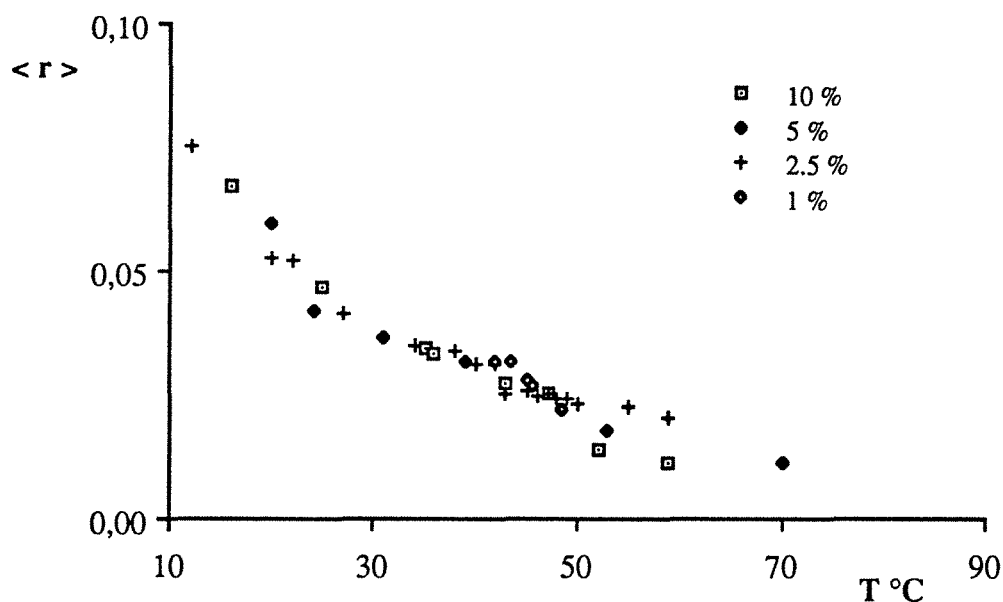


Figure 3.4.12.

Variation de l'anisotropie moyenne statique de fluorescence du DPH, dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$, en fonction de la température et pour diverses concentrations (% en poids).

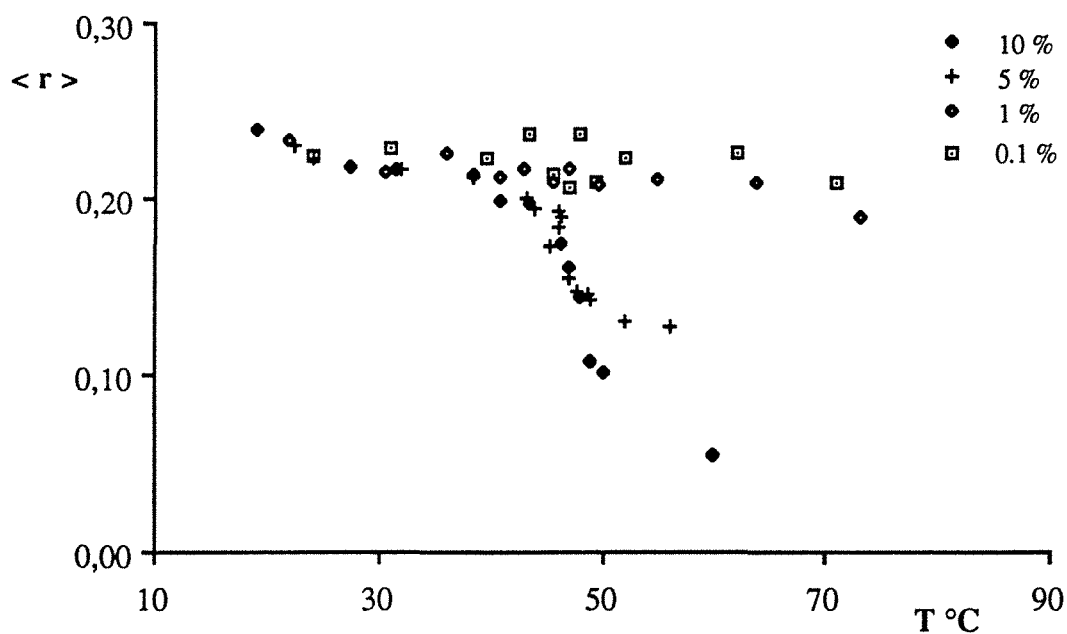


Figure 3.4.13.

Variation de l'anisotropie moyenne statique de fluorescence du TMA-DPH, dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$, en fonction de la température et pour diverses concentrations (% en poids).

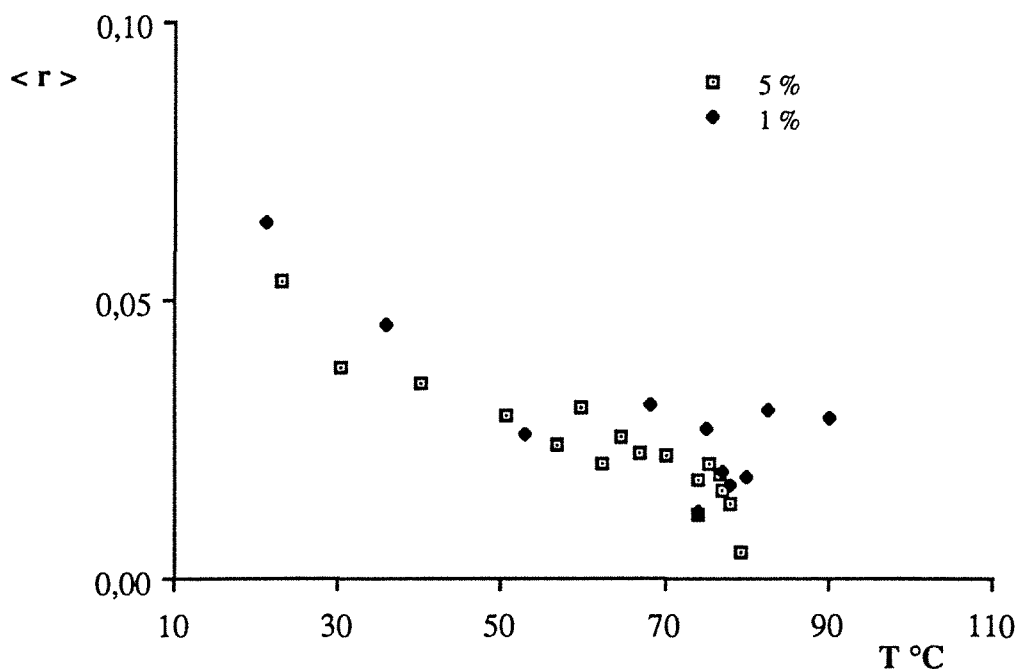


Figure 3.4.14.

Variation de l'anisotropie moyenne statique de fluorescence du DPH, dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_8$, en fonction de la température et pour diverses concentrations (% en poids).

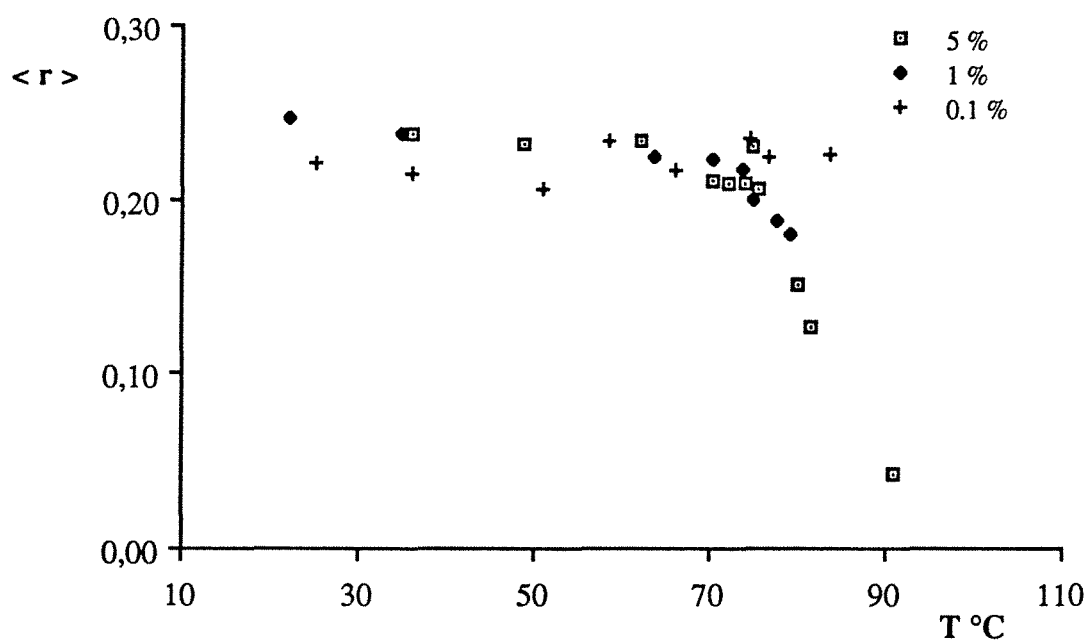


Figure 3.4.15.

Variation de l'anisotropie moyenne statique de fluorescence du TMA-DPH, dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_8$ en fonction de la température et pour diverses concentrations (% en poids).

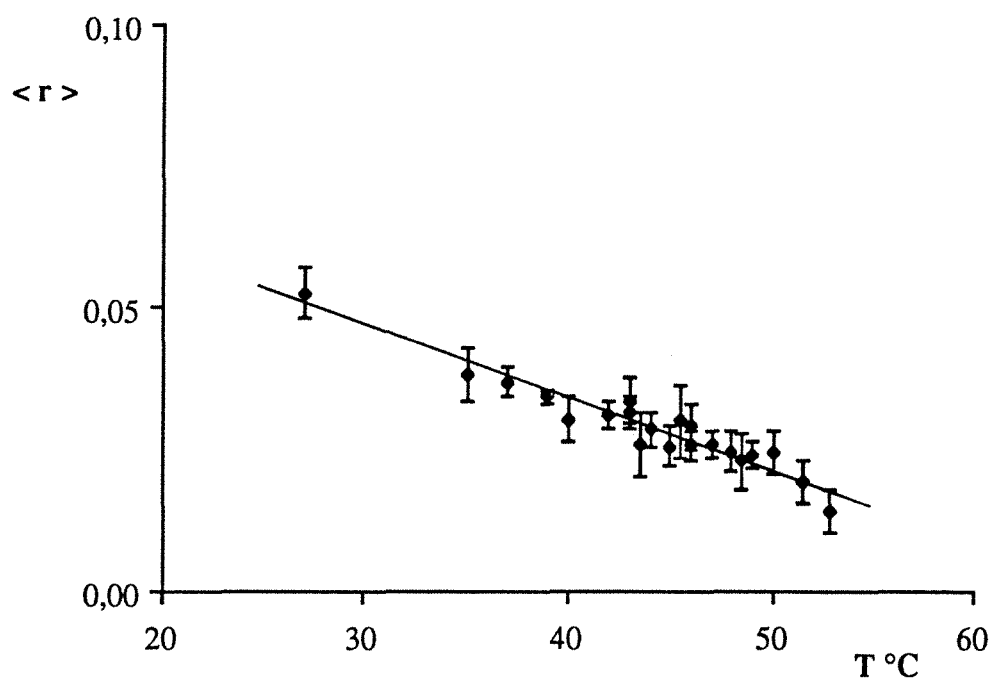


Figure 3.4.16.

Variation de l'anisotropie moyenne statique de fluorescence du DPH dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$ à 1 % (en poids) en fonction de la température. Les barres d'erreur pour chaque température représentent les valeurs extrêmes relatives à 10 mesures effectuées en analyse automatique (cf. appareil décrit au § 2.2.3.2.).

Nous avons observé pour les expériences à concentration élevée en tensio-actifs une baisse importante de l'anisotropie à la température du point de trouble. Cette baisse est probablement liée à l'augmentation de la diffusion de lumière à l'apparition du trouble et à son effet dépolarisant.

Deux séries d'expériences ont été réalisées pour expliquer qualitativement ces phénomènes :

1) La première concerne la mise en évidence d'une augmentation importante de l'absorbance apparente de la solution de tensio-actif à T_p , en relation avec une augmentation de la diffusion. A la température du point de trouble la solution devient blanchâtre. La figure 3.4.17. se rapporte au tensio-actif $C_{12}(EO)_8$, pour lequel $T_p = 78\text{ }^{\circ}\text{C}$.

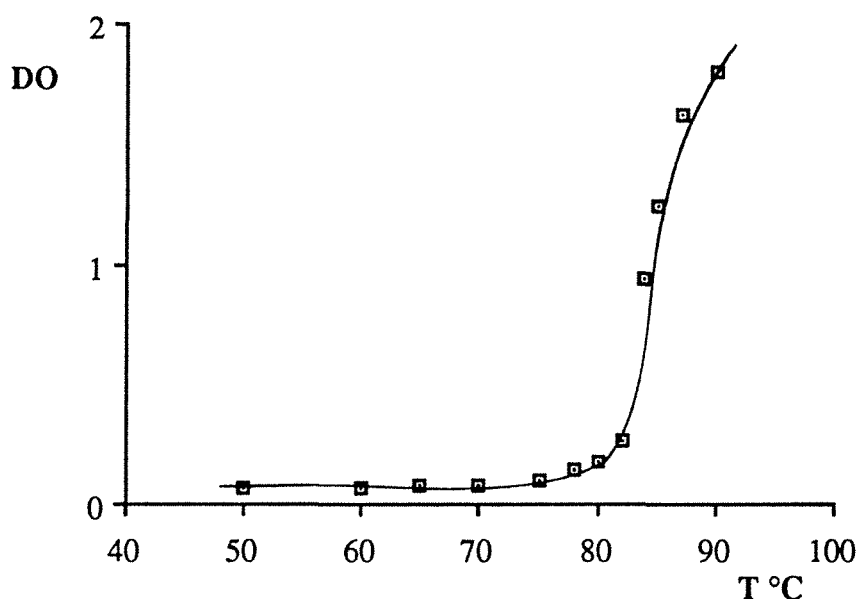


Figure 3.4.17.

Variation de la Densité Optique apparente ($\lambda_{\text{analyse}} = 440\text{ nm}$) de $C_{12}(EO)_8$, à 2 % dans l'eau, en fonction de la température.

2) La deuxième concerne la mise en évidence de la diminution de l'anisotropie de fluorescence du DPH avec une augmentation de la diffusion de lumière dans deux exemples simples :

(i) la figure 3.4.18., courbe (1) montre la diminution de l'anisotropie du DPH dans un mélange constitué d'hexadécane et de paraffine liquide additionné de quantités

croissantes de bentonite pour augmenter la diffusion;

(ii) la figure 3.4.18., courbe (2) montre la variation de l'anisotropie du DPH, incorporé dans des liposomes multilamellaires de DPPC, à concentration variable.

Dans les cas où la densité optique apparente des suspensions augmente, une importante diminution de l'anisotropie est observée.

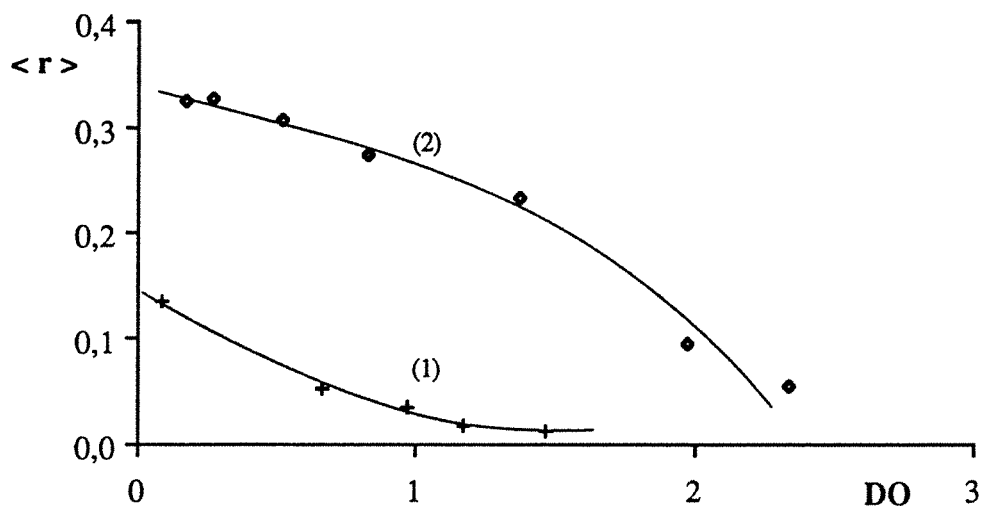


Figure 3.4.18.

Effet dépolarisant de la diffusion : variation de l'anisotropie statique du DPH, en fonction de la densité optique de diffusion des solutions :
+, DPH dans une solution d'Hexadécane-Paraffine liquide, additionnée de bentonite;
◊, DPH dans une suspension multilamellaire de liposomes de DPPC.

Il est certain que la dépolarisation est dépendante de la taille et de la nature des particules créant la diffusion et que par conséquent les expériences relatives à l'utilisation de la bentonite et des liposomes de DPPC (cf. figure 3.4.18.) ne peuvent constituer qu'une approche qualitative pour la compréhension du phénomène.

Cependant, l'augmentation de la diffusion dans la solution à la température du point de trouble qui entraîne une diminution de l'anisotropie, semble exclure une corrélation entre la diminution brutale de l'anisotropie du DPH dans les tensio-actifs non ioniques et un phénomène coopératif lié à une transition de phase (à l'image des changements de phases observés avec les lipides).

Si l'on admet le point précédent (relativement à la diminution de l'anisotropie de fluorescence du DPH avec l'augmentation de la diffusion au point de trouble) et la précision de l'expérimentation, en excitation continue (cf. figure 3.4.16.), il apparaît :

* une quasi indépendance de la variation de l'anisotropie du DPH en fonction de la température relativement à la concentration en tensio-actif pour le domaine étudié, à savoir de 0,1 à 10 %,

*et une influence très restreinte de la température sur la cohésion du système micellaire (cf. figures 3.4.1.2. et 3.4.1.4.).

L'utilisation de la sonde TMA-DPH conduit à des observations analogues : à savoir une faible diminution de l'anisotropie, en excitation continue, avec l'augmentation de la température, sans influence notable de la concentration en tensio-actif (cf. figures 3.4.13. et 3.4.15.).

3.4.4.2.2. Polarisation de fluorescence du DPH en excitation pulsée

Les valeurs de l'anisotropie moyenne, déterminées avec des mesures en excitation continue ne pourront être interprétées en terme de cohésion, concepts de fluidité et de viscosité équivalente (voir la discussion pour la validité de ces concepts, § 1.2.1.2.2.), que si des mesures en excitation pulsée sont réalisées parallèlement [MAIRE, 1989].

Ainsi, la figure 3.4.19. correspond à l'effet de la température sur la durée de vie du DPH incorporé dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$ et met en évidence une quasi indépendance de τ avec l'augmentation de la température.

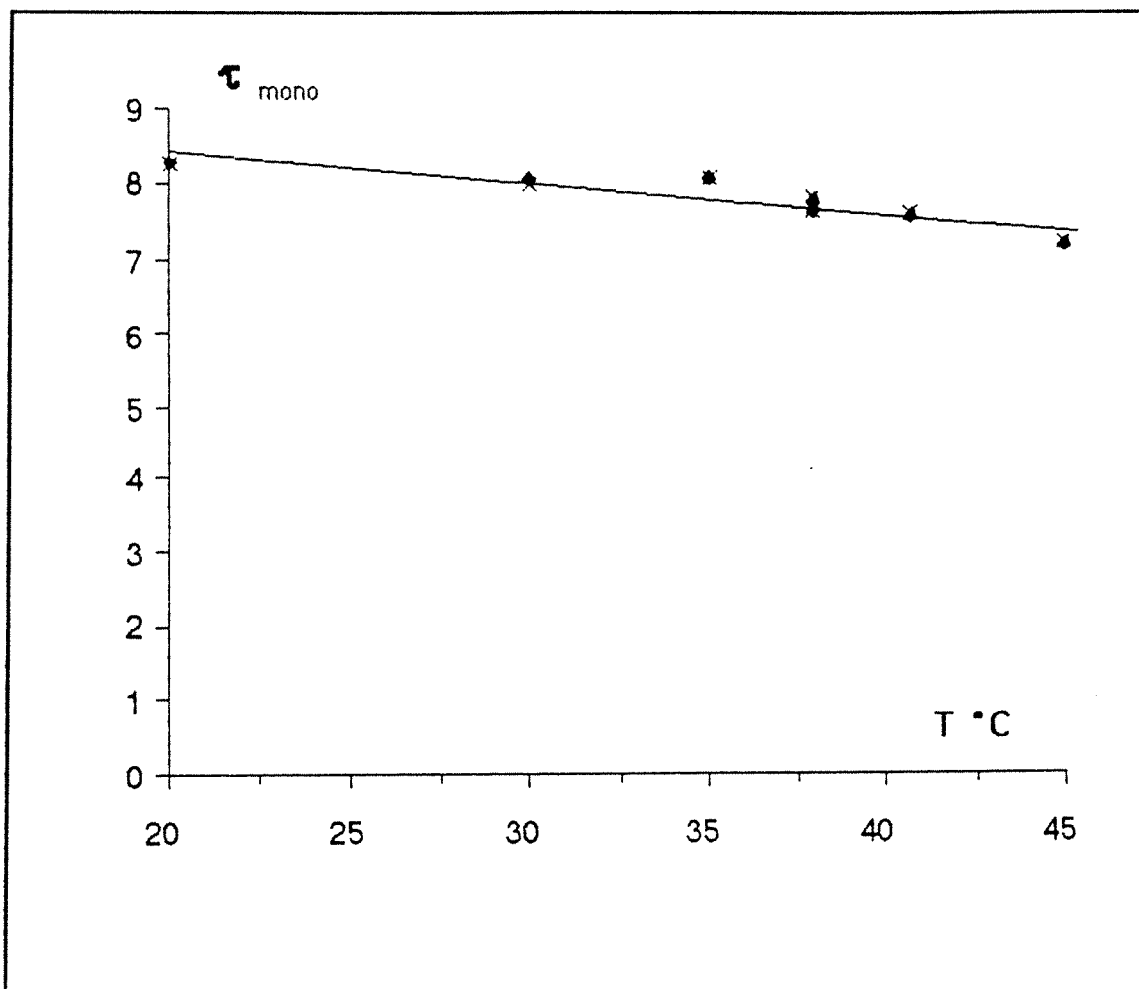


Figure 3.4.19.

Influence de la température sur la durée de vie de l'état excité du DPH, dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$, pour la concentration de 2,1 % [MAIRE, 1989].
x, durée de vie monoexponentielle; ♦, durée de vie pondérée.

Par ailleurs, la figure 3.4.20. correspond à la comparaison des variations, avec la température, des anisotropies de fluorescence du DPH dans des micelles de $C_{12}(EO)_6$, en excitations continue et pulsée et met en évidence une bonne concordance des résultats.

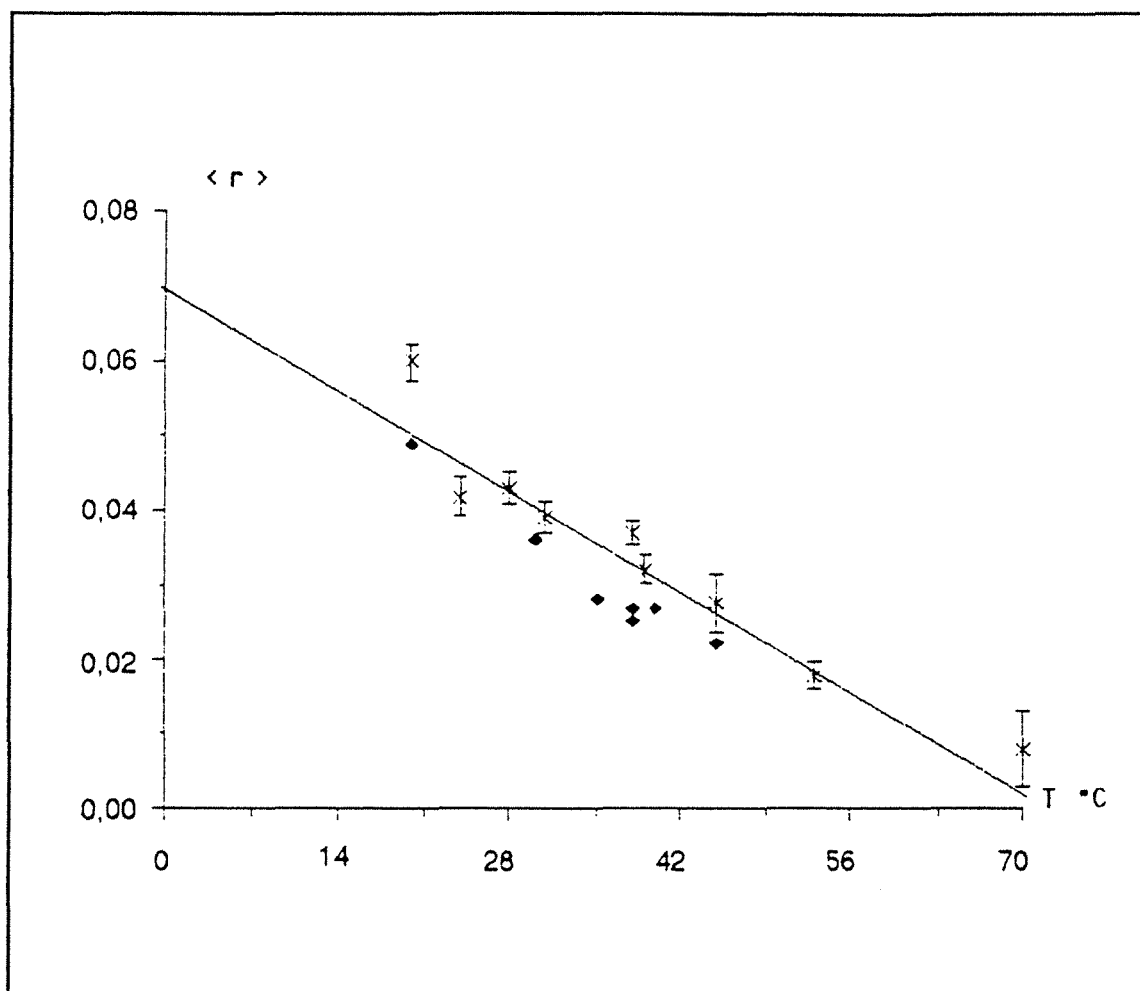


Figure 3.4.20.

Comparaison de la variation en fonction de la température, de l'anisotropie de fluorescence du DPH dans des micelles aqueuses de $C_{12}(EO)_6$, pour la concentration de 2,1 %, en excitations continue (x) et pulsée (♦) [MAIRE, 1989].

3.4.4.2.3. Conclusion

L'équation de PERRIN (cf. § 1.2.1.2.2.) peut s'exprimer aussi par la relation suivante :

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} - 1 = \frac{R T \tau}{V \eta}$$

Or, dans le cas de notre étude, la durée de vie (τ) du DPH dans les micelles de $C_{12}(EO)_6$ est à peu près constante avec l'augmentation de la température, et sachant que r_0 , R et V sont des constantes, nous remarquons que si l'on suppose que la microviscosité η des micelles reste constante avec l'augmentation de la température, la courbe représentant $[(r_0/\langle r \rangle) - 1]$ en fonction de la température serait une droite passant par l'origine. Les figures 3.4.21. et 3.4.22. représentent la variation de $[(r_0/\langle r \rangle) - 1]$ en fonction de la température, pour le DPH dans des micelles de $C_{12}(EO)_6$ et de $C_{12}(EO)_8$.

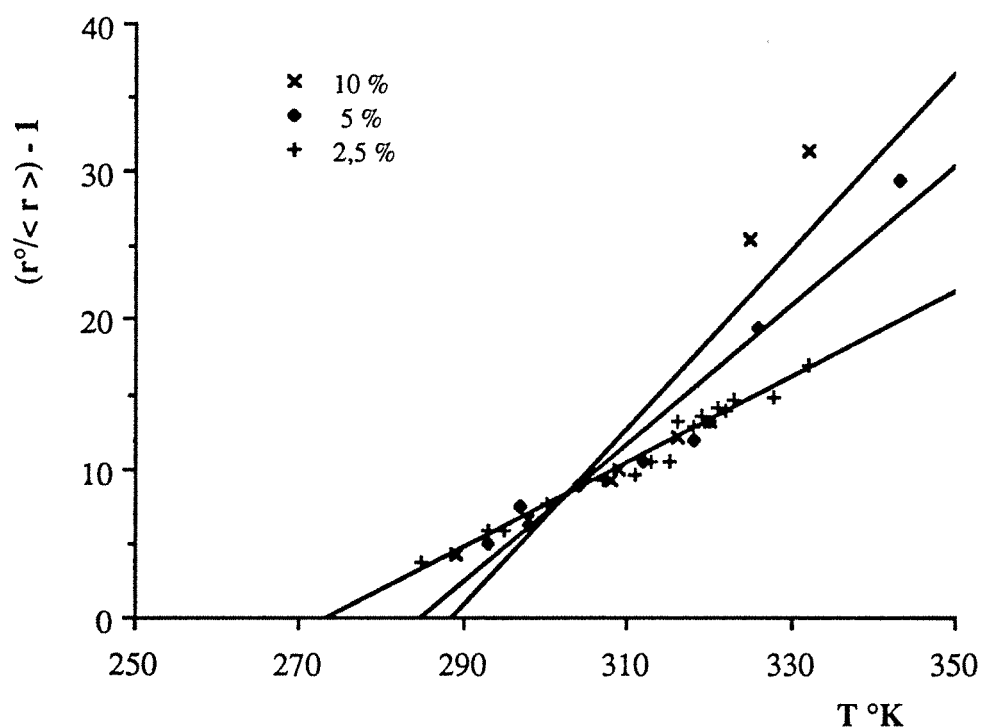


Figure 3.4.21.

Variation de $[(r_0/\langle r \rangle) - 1]$ en fonction de la température pour le DPH, dans des micelles de $C_{12}(EO)_6$ à diverses concentrations (% en poids). Mise en évidence de l'effet de la microviscosité sur la diminution de l'anisotropie de fluorescence.

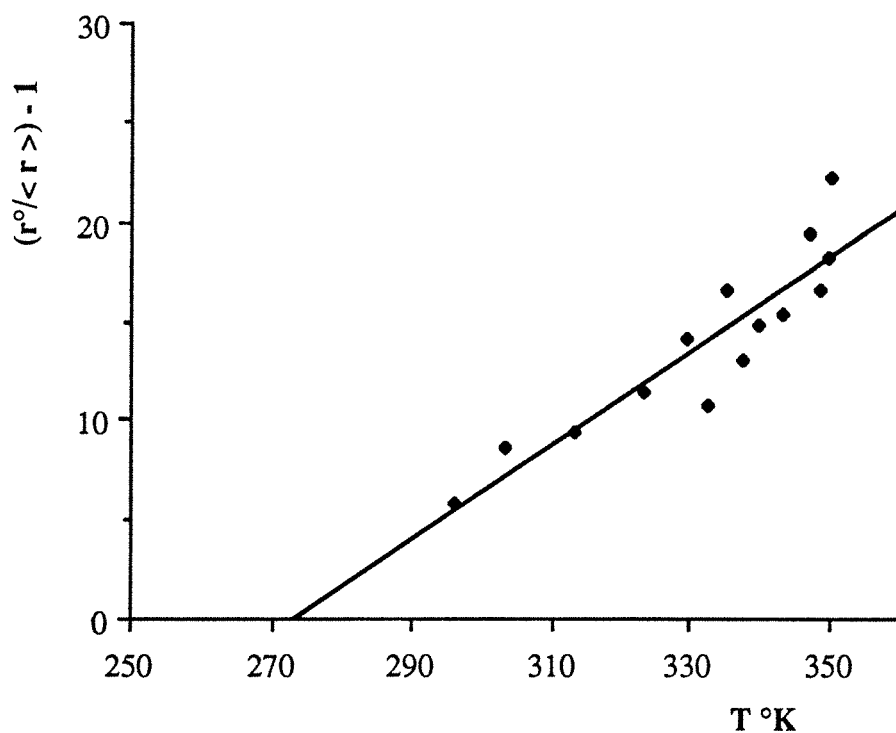


Figure 3.4.22.

Variation de $[(r_0/\langle r \rangle) - 1]$ en fonction de la température pour le DPH, dans des micelles de $C_{12}(EO)_8$ à 5 % (en poids). Mise en évidence de l'effet de la microviscosité sur la diminution de l'anisotropie de fluorescence.

Pour les deux tensio-actifs, nous pouvons remarquer que les courbes ainsi obtenues, ne peuvent être des droites passant par l'origine, ce qui semble en faveur d'une influence de la microviscosité η sur la variation de l'anisotropie quand la température augmente.

On peut donc en déduire que la diminution de l'anisotropie de fluorescence du DPH et du TMA-DPH avec l'augmentation de la température, dans des micelles de $C_{12}(EO)_6$ et $C_{12}(EO)_8$ est due à une diminution de la microviscosité de ces tensio-actifs.

Examinons maintenant, dans le paragraphe suivant, l'effet de la température et de la concentration sur le nombre d'agrégation de tensio-actifs non-ioniques.

3.4.4.3. FORMATION D'EXCIMERES INTERMOLECULAIRES DU PYRENE

Comme nous l'avons souligné ci-dessus, l'augmentation de la fluidité des micelles avec l'augmentation de la température peut être due à une augmentation de leur taille. Pour répondre à cette question, nous avons mesuré le nombre d'agrégation des micelles, soit le nombre de molécules de tensio-actif par micelle, en fonction de l'augmentation de la température.

Ainsi, afin de confirmer les premiers résultats de BARTOLI, 1986, nous avons poursuivi cette étude en utilisant une source d'excitation laser plutôt qu'une lampe "flash".

3.4.4.3.1. Principe de la détermination du nombre d'agrégation de micelles

Nous avons utilisé une méthode fondée sur l'inhibition de fluorescence du pyrène par la formation d'excimères intermoléculaires à l'intérieur des micelles [GRIESER et DRUMMOND, 1988; INFELTA et GRATZEL, 1979].

Ainsi, le nombre d'agrégation est estimé à partir de la différence entre le départ du déclin biexponentiel du pyrène excité et l'extrapolation de ce dernier aux temps longs (cf. figure 3.4.23.).

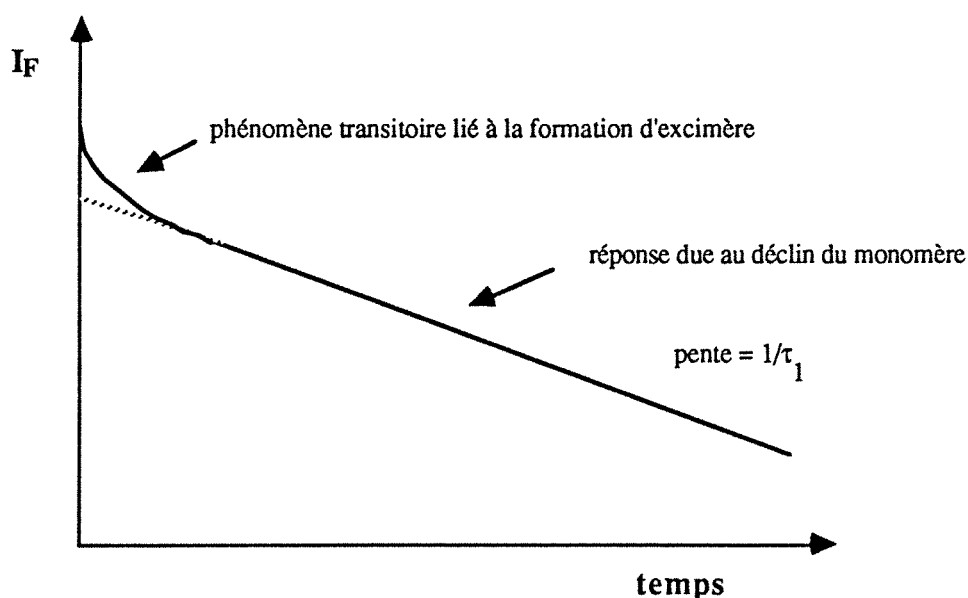
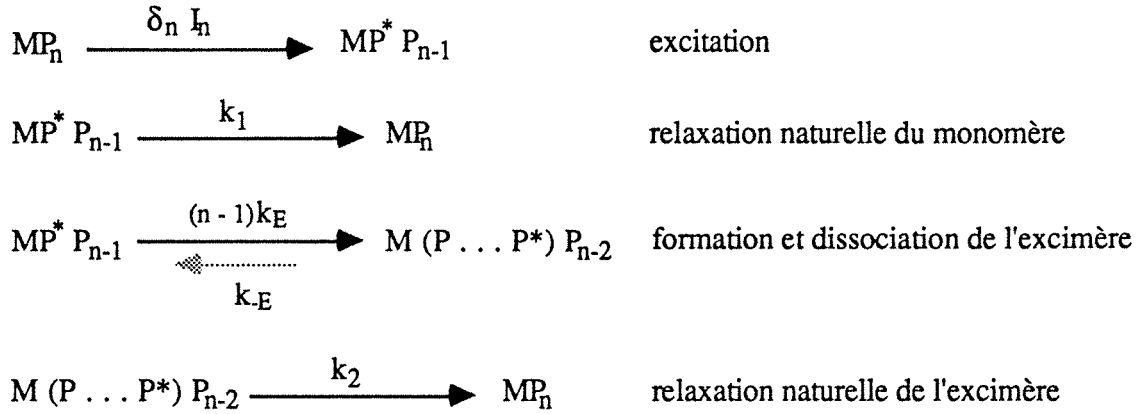


Figure 3.4.23.

Représentation schématique du déclin de fluorescence du pyrène excité, dans des micelles de tensio-actif.

Si MP_n représente une micelle possédant n molécules de pyrène, nous considérons le schéma classique pour lequel les échanges intramicellaires sont exclus (ces échanges étant lents par rapport à la durée de vie de la molécule de pyrène excitée) :



δ_n représente la fraction de pyrène inclus dans la micelle MP_n , soit :

$$\delta_n = \frac{n \alpha_n}{\sum_{i=1}^{\infty} i \alpha_i}$$

et α_n représente la probabilité (d'après la statistique de POISSON) d'avoir n molécules de pyrène dans une micelle, elle est exprimée par la relation suivante :

$$\alpha_n = \frac{(\bar{n})^n e^{-\bar{n}}}{n!}$$

où $\bar{n}$ est le nombre moyen de molécules de pyrène par micelle,

$\bar{n} = \frac{[P_T]}{[M_T]}$ où $[P_T]$ et $[M_T]$ sont les concentrations globales en pyrène et en micelles respectivement.

Dans des conditions expérimentales où la probabilité α_3 , soit trois molécules de pyrène par micelle, est très faible, l'expression analytique du déclin du monomère devient :

$$\frac{I}{I_0} = \exp \left[\bar{n} \exp(-k_E t) - 1 \right] - k_1 t$$

soit $\ln \left(\frac{I}{I_0} \right) = -\bar{n} - k_1 t$ aux temps longs (1)

Les déclin expérimentaux obtenus par comptage monophotonique ont été traités avec un déclin a priori biexponentiel du type :

$$\frac{I}{I_0} = \frac{C_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + C_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}}}{C_1 + C_2}$$

donnant aux temps longs :

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = \ln\left(\frac{C_1}{C_1 + C_2}\right) - \frac{t}{\tau_1} \quad (2)$$

La comparaison des relations (1) et (2) conduit à l'expression de n :

$$n = -\ln\left(\frac{C_1}{C_1 + C_2}\right)$$

ce qui conduit au nombre d'agrégation N_A :

$$N_A = \frac{n}{R} \quad \text{avec} \quad R = \frac{[P_T]}{[M]}$$

où $[M]$ représente la concentration en tensio-actif.

3.4.4.3.2. Résultats et discussions

Pour arriver à des valeurs de C_1 et C_2 avec une bonne précision, nous avons traité les déclin par déconvolution biexponentielle dans laquelle la valeur de τ_1 est imposée.

Ainsi, pour déterminer de manière convenable la valeur de τ_1 , nous avons effectué une première série d'expériences à différentes températures et à concentration faible en pyrène ($5 \cdot 10^{-6}$ M), afin d'éviter la formation d'excimères. Ce qui conduit à un déclin monoexponentiel.

Notons que τ_1 est déterminé pour chaque concentration en tensio-actif, nous présentons sur la figure 3.4.24. la variation de τ_1 avec la température dans des micelles de $C_{12}(EO)_6$ à 2 % (en poids).

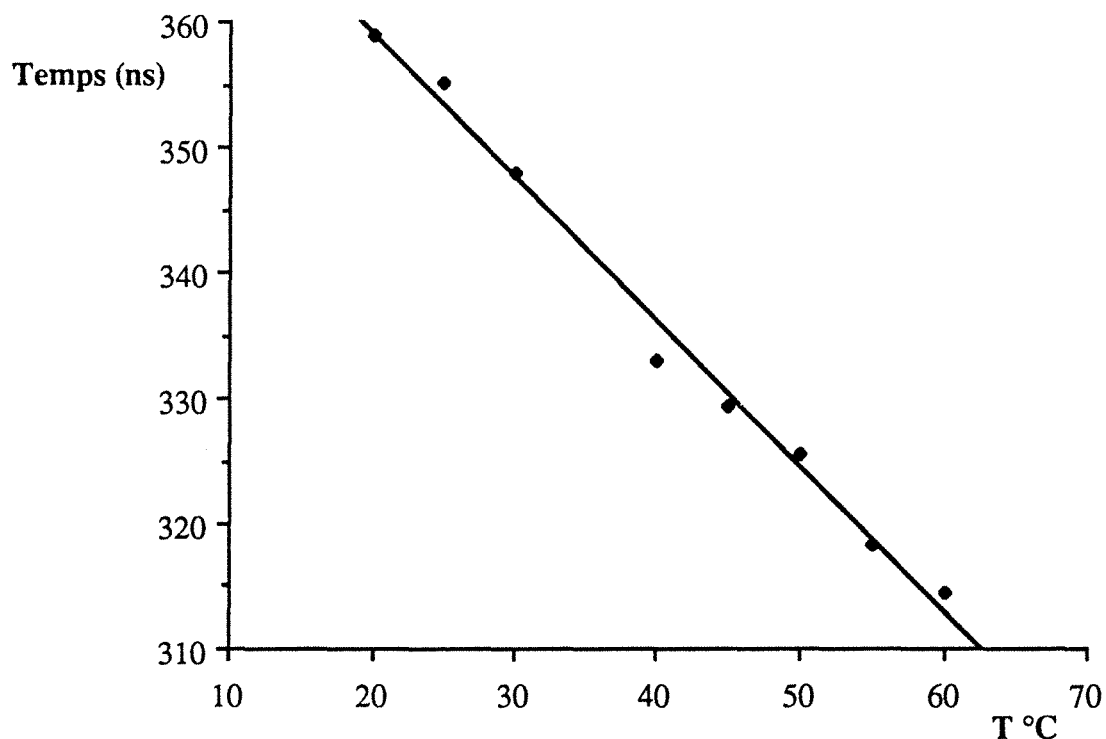


Figure 3.4.24.

Variation de τ_1 en fonction de la température (déclin monoexponentiel de Py*), dans des micelles de $C_{12}(EO)_6$ à 2 % (en poids) et à $5 \cdot 10^{-6}$ M en pyrène (temps/canal = 3,7 ns).

Une deuxième série d'expériences aux mêmes températures mais à des concentrations en pyrène suffisamment élevées pour favoriser la formation d'excimères intermoléculaires conduit à un déclin biexponentiel dont la déconvolution conduit aux valeurs de τ_2 , C_1 et C_2 .

Nous présentons dans le tableau 3.4.2., sur un exemple ($C_{12}(EO)_6$ à 10 %) les valeurs des différents paramètres permettant de calculer le nombre d'agrégation, où χ_2 est la fonction d'erreur quadratique normalisée.

Nous avons utilisé des concentrations en $C_{12}(EO)_6$ variant entre 0,5 et 10 % en poids et une variation de la température entre 20 et 60 °C (cf. figure 3.4.25.).

Tableau 3.4.2.
 Paramètres conduisant au calcul du nombre d'agrégation (N_A) de micelles non-ioniques.
 Cas de $C_{12}(EO)_6$ à 10 % (en poids).

T (°C)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	C_1	C_2	χ_2	$\bar{n}$	N_A	α_2	α_3
20	358	177	0,147	0,107	1,00	0,55	109	0,087	0,016
25	355	176	0,234	0,242	1,14	0,71	142	0,124	0,029
30	348	185	0,096	0,226	1,33	1,21	242	0,218	0,088
35	341	163	0,094	0,218	1,23	1,19	239	0,215	0,085
40	333	158	0,061	0,236	1,60	1,58	316	0,262	0,014
45	329	147	0,048	0,228	1,40	1,75	350	0,266	0,155
50	325	135	0,038	0,292	1,58	2,16	432	0,269	0,194
55	319	126	0,016	0,273	1,35	2,89	578	0,232	0,224
60	314	123	0,015	0,356	1,58	3,21	642	0,208	0,223

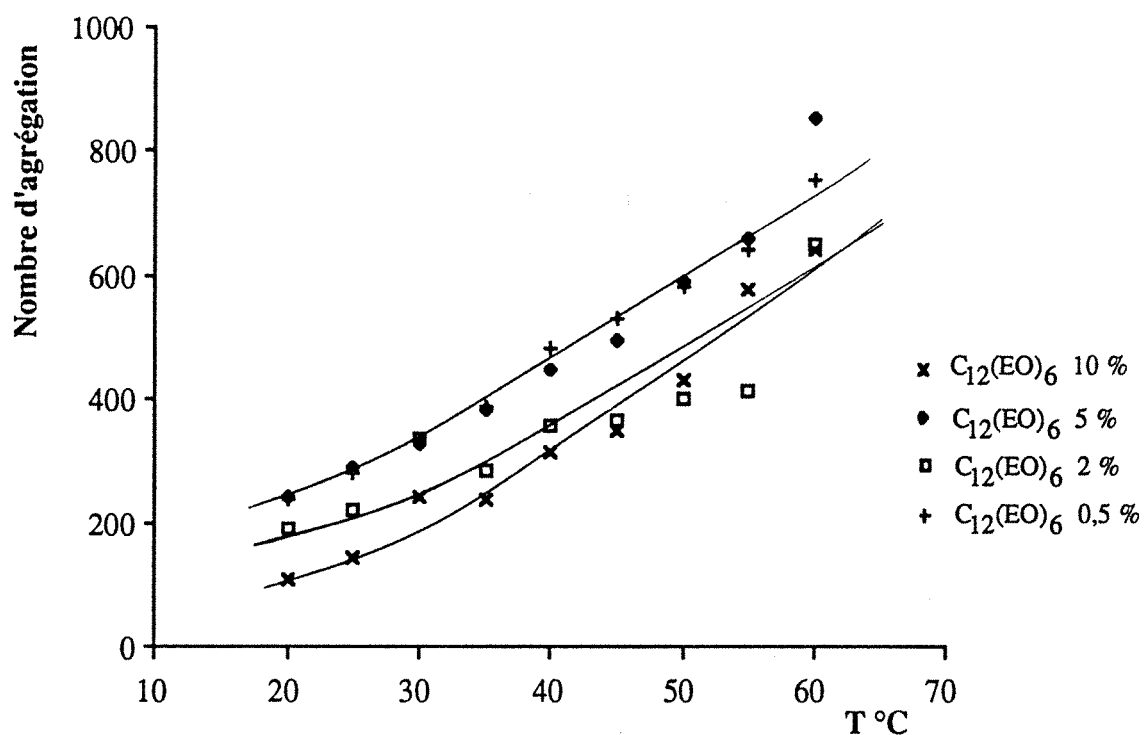


Figure 3.4.25.

Variations du nombre d'agrégation de $C_{12}(EO)_6$ à diverses concentrations (% en poids) en fonction de la température.

Par ailleurs, la figure 3.4.26. montre les résultats de deux expériences effectuées dans les mêmes conditions en utilisant $C_{12}(EO)_6$ à 10 %, en poids.

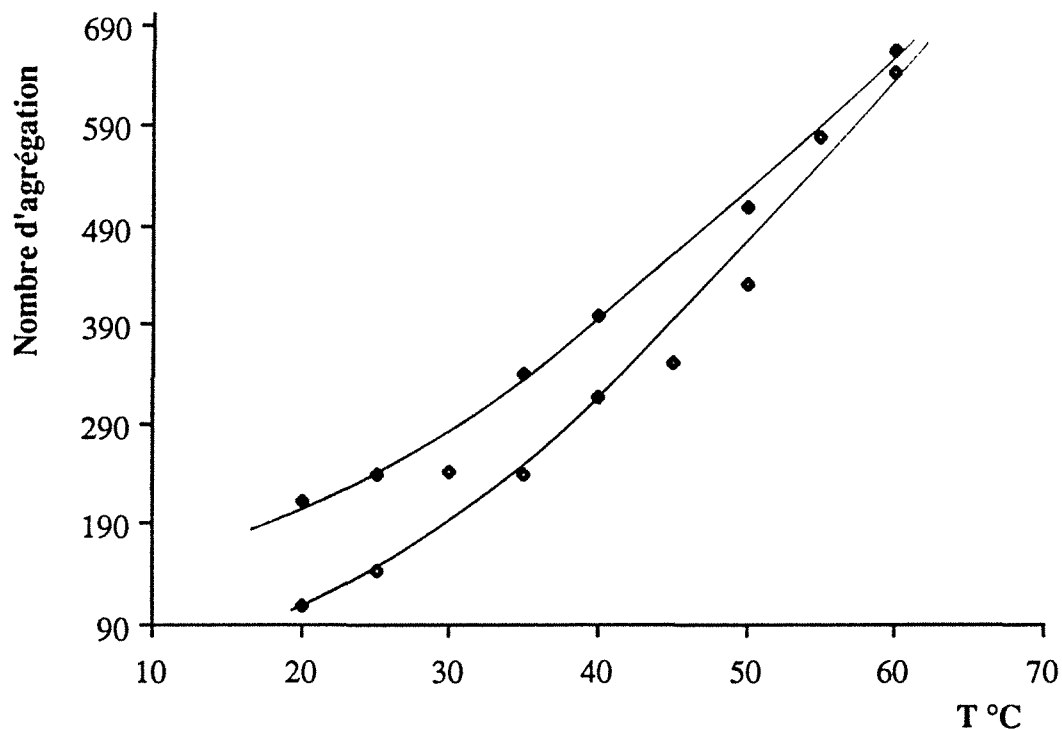


Figure 3.4.26.

Variation du nombre d'agrégation de $C_{12}(EO)_6$ à 10 % en poids avec la température.
Résultats sur deux séries d'expériences.

Sur la figure 2.4.27. nous présentons une comparaison de nos résultats (variations de N_A avec la température) pour deux concentrations (2 et 5 %) en $C_{12}(EO)_6$ avec ceux publiés par ZANA et WEILL, 1985, pour le même tensio-actif à 3 %. Ainsi, les valeurs obtenues dans les deux cas sont comparables et semblent confirmer les résultats présentés sur la figure 3.4.25., à savoir l'accroissement de la taille des micelles avec l'élévation de la température et la quasi indépendance entre cet accroissement et la concentration en tensio-actifs.

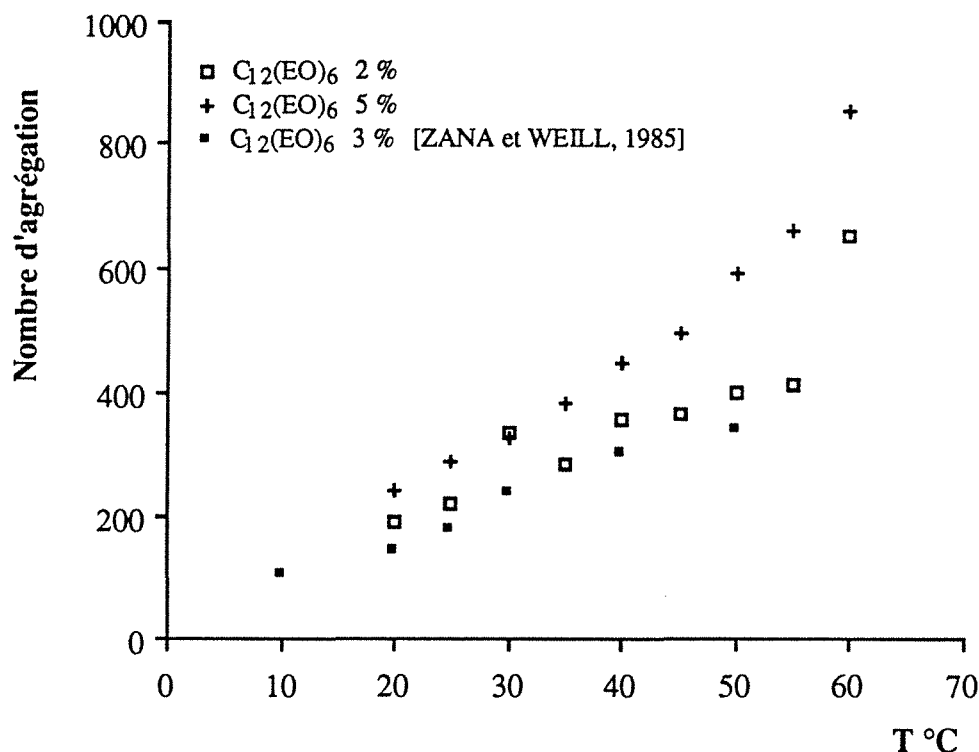


Figure 3.4.27.

Variation du nombre d'agrégation du C₁₂(EO)₆ (% en poids) avec la température.
Comparaison avec les travaux de ZANA et WEILL, 1985.

3.4.4.3.3. Conclusion

Deux observations peuvent être dégagées de la figure 3.4.25. :

- * la taille des micelles croît avec l'augmentation de la température avant et après le point de trouble, en accord avec les résultats de ZANA et WEILL, 1985 et de RAVEY, 1983,
- * contrairement à des résultats d'autres travaux (cf. tableau 3.4.1.), l'accroissement du nombre d'agrégation avec l'élévation de la température semble être quasiment indépendant de la concentration en tensio-actifs.

3.4.5. CONCLUSION

En se fondant sur les résultats obtenus par l'utilisation des trois approches spectroscopiques pour l'étude des micelles aqueuses de tensio-actifs non ioniques tels que C₁₂(EO)₆ et C₁₂(EO)₈, nous tirons les conclusions suivantes :

* la première série d'expériences utilisant la cinétique de formation d'excimères intramoléculaires de P₃P montre que le rapport I_E/I_M augmente avec l'élévation de la température. Cette observation nous a poussés à poser la question suivante : l'augmentation du rapport I_E/I_M avec l'augmentation de la température est-elle due à un effet exclusivement thermique, à une diminution de la microviscosité des micelles ou à un changement de la structure micellaire ?

Par l'utilisation de la polarisation de fluorescence du DPH et du TMA-DPH, nous avons montré, qualitativement, que la microviscosité des micelles diminue quand la température augmente.

Par ailleurs, la mesure de la variation du nombre d'agrégation (N_A) de C₁₂(EO)₆ avec l'augmentation de la température par la méthode de formation d'excimères intermoléculaires du pyrène révèle une augmentation de N_A avec l'élévation de la température. Ce qui signifie que l'augmentation de la température entraîne un changement dans la structure ou dans la taille micellaire.

Ainsi suite à ces observations, nous pensons que l'élévation de la température est accompagnée d'une diminution de la microviscosité des micelles d'une part, et d'une augmentation de leur nombre d'agrégation d'autre part,

* les variations avec la température, des grandeurs mesurées (I_E/I_M du P₃P, l'anisotropie de fluorescence de DPH et du TMA-DPH, N_A) sont quasiment indépendantes de la concentration en tensio-actifs,

* les valeurs des microviscosités des micelles trouvées par l'utilisation de P₃P dépendent du type de solvant (ou mélange de solvants) utilisé comme référence, pour tracer la courbe d'étalonnage représentant la variation du rapport I_E/I_M en fonction de η . En effet, la forme de cette courbe dépend du solvant de référence utilisé [VIRIOT et al., 1983_b; HENDERSON et al., 1981].

CONCLUSION

L'étude des membranes biologiques et des cellules entières vivantes par les techniques d'analyse physico-chimique (spectroscopies, rayons X, etc...) est délicate, sinon impossible et le nombre de variables à maîtriser est considérable, ce qui compromet l'interprétation fine des résultats.

Pour cette raison, des assemblages simples, constitués d'un nombre restreint d'éléments mais possédant néanmoins des analogies profondes de structure avec les systèmes *in vivo*, ont servi de modèles pour aborder l'étude physico-chimique de membranes dans leur diversité (cf. tableau 1.1.3.). De fait, beaucoup de données descriptives concernant l'organisation des membranes ont pu être acquises grâce à l'expérimentation fondée sur l'utilisation de ces "modèles de membranes".

Par ailleurs, le développement des concepts actuels concernant la structure de la membrane tient compte de l'importance des interactions entre les constituants membranaires. Les interactions peuvent être rangées en trois classes : interactions lipides-lipides, lipides-protéines et protéines-protéines.

La définition précise de ces interactions et les conséquences qui en découlent pour l'organisation de la membrane apparaissent fondamentales. Les paramètres majeurs nécessaires à la description de ces systèmes sont les termes d'orientation relative des divers constituants et les caractéristiques de mobilité. Par exemple, de la fluidité des lipides dépend la modulation des activités d'enzymes intrinsèques. De même, les mouvements des divers constituants de la membrane sont essentiels pour assurer de nombreuses fonctions membranaires.

Le travail présenté dans ce mémoire concerne plus particulièrement des études des interactions protéines-lipides et drogues-lipides, nécessaires à la compréhension de nombreux processus biologiques et des modes d'action des substances médicamenteuses, respectivement.

Ainsi, pour aborder l'étude des **interactions protéines-lipides**, la méthode d'inhibition de fluorescence du pyrène (en excitation pulsée) dans des membranes constituées par un seul type de phospholipide, liée à une modélisation des phénomènes de transport a permis :

- * de déterminer la distance de réaction entre deux molécules de pyrène (σ) et son coefficient de diffusion latérale (D_L),

- * de mesurer l'influence de deux protéines, la γ -glutamyltransférase et la (Na^+, K^+) -ATPase, sur D_L et de mettre en évidence une décroissance de ce coefficient avec l'augmentation de la concentration en protéines.

En se fondant sur cette dernière observation, la question suivante s'est imposée : la

diminution du coefficient de diffusion latérale du pyrène consécutive à la présence de protéines est-elle due :

- * à une rigidification du milieu,
- * au fait que les protéines agissent comme "obstacles" immobiles, empêchant la libre circulation du pyrène et augmentant ainsi, le trajet à parcourir avant la rencontre des deux entités réactives,
- * à la contribution de ces deux précédentes influences,
- * ou enfin à l'adsorption d'une partie du pyrène par les protéines, diminuant ainsi, la concentration du pyrène diffusant, ce qui conduit à des valeurs de D_L peut-être sous-estimées ?

Pour essayer de répondre à cette question tout en tenant compte des données existantes, des expériences complémentaires en fluorescence en excitation continue ont été considérées et permettent les assertions suivantes :

- tout d'abord, l'hypothèse d'une éventuelle adsorption de la sonde par les protéines peut être exclue, au moins en première approximation, puisque la polarité locale (décelée par le pyrène) ne varie pas avec l'addition de l'ATPase,
- en outre, les observations suivantes sont en faveur d'une rigidification des bicouches lipidiques par les protéines :
 - * la diminution du rapport I_E/I_M du pyrène,
 - * et particulièrement, l'influence des protéines sur l'anisotropie de fluorescence du DPH. En effet, l'effet de l'ATPase sur les courbes de transition de phase des liposomes de DPPC ("aplatissement" des courbes avec l'augmentation de la concentration en protéines) est comparable à celui provoqué par le cholestérol, à savoir une rigidification des membranes, au dessus de leur température de transition [ANTUNES-MADEIRA et MADEIRA, 1990; BACK et CHAPMAN, 1980; CHAPMAN, 1973],
 - * et enfin, l'analyse des résultats de la littérature, présentée dans le tableau 1.1.3..

Néanmoins, il faut revenir sur les inconvénients liés à l'utilisation du pyrène, qui sont en majeure partie dus à la difficulté de connaître avec exactitude la concentration réelle du pyrène dans les bicouches lipidiques. Même si dans la précédente étude, nous avons pu en principe exclure l'adsorption du pyrène sur les protéines, il est généralement difficile de connaître la part du pyrène qui reste en suspension dans la phase aqueuse.

Pour contourner ces difficultés, et pour maîtriser la concentration de la sonde émissive et sa localisation à l'intérieur des bicouches lipidiques, il est possible d'utiliser des dérivés pyrényles tels que des phospholipides liés au pyrène par des liaisons covalentes [JONES et LEE, 1985]. Mais, dans ce cas, le coefficient de diffusion latérale de ce dérivé pyrényle peut être trop faible pour pouvoir déceler l'effet des protéines sur ce coefficient.

Il semblerait d'après des travaux récents [MONTICH et COSA, 1990] que ce problème puisse être résolu par l'utilisation d'inhibiteurs de fluorescence autres que le

dérivé pyrényle lui-même, tels que l'ion iodure ou l'oxygène.

La précédente discussion repose essentiellement sur la nature des phospholipides utilisés et sur la répartition du pyrène dans l'ensemble "protéines-lipides". Il ne faudrait pas passer sous silence les difficultés liées à la nature des protéines et surtout à leur degré de purification. Il est certain que le recours à la synthèse chimique, aussi sophistiquée soit elle, ne pourra apporter qu'une réponse partielle, dans la mesure où cette chimie ne sera efficace que pour construire des unités polypeptidiques, et pas la protéine dans son ensemble et surtout avec sa structure tridimensionnelle.

Quant à la purification de protéines membranaires, elle repose souvent sur l'utilisation de détergents. Ainsi, il faut s'assurer lors de l'emploi ultérieur des protéines qu'il ne subsiste aucune trace de détergents (les traces de ces derniers entraînent généralement une diminution de la cohésion membranaire). Il faut également savoir si la "protéine reconstituée" est bien le reflet de la protéine native.

Concernant les **interactions drogues-lipides**, les études suivantes ont été réalisées : les interactions cyclosporine A/DPPC d'une part, et hormones thyroïdiennes et composés thyromimétiques apparentés/membranes microsomales, d'autre part.

Dans le premier cas, la polarisation de fluorescence du 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et du 1[4-(triméthylammonium)phényl]-6-phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH) montre que la cyclosporine A est sans effet sur la transition de phase des liposomes, alors que, cette drogue entraîne une diminution du rapport I_E/I_M (I_E , intensité de fluorescence de l'excimère; I_M , intensité de fluorescence du monomère) du dipyrénylpropane (P_3P) à $T > T_M$, ce qui est compatible avec un effet fluidifiant. Ces résultats contradictoires peuvent être liés, d'une part aux distributions différentes des sondes fluorescentes utilisées dans les bicouches lipidiques et à la localisation de la cyclosporine A dans ces membranes, d'autre part. Il semble que le DPH est localisé à l'intérieur de la bicouche [ANDRICH et VANDERKOOI, 1976], alors que le P_3P et d'autres dérivés du pyrène se situent au voisinage des têtes polaires [ALMEIDA et al., 1984]. Dans le même sens, des travaux récents de WIEDMANN et al., 1990, ont montré, par l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire du deutérium, 2H RMN, que la cyclosporine A entraîne une augmentation du paramètre d'ordre des chaînes acyles du DPPC dans l'état cristal-liquide. Alors que, l'utilisation de la calorimétrie différentielle (DSC) conduit à une faible diminution de la température de transition des liposomes de DPPC.

Dans le second cas, les mesures de la polarisation de fluorescence du DPH dans des microsomes de foie de rats témoins et de rats traités par des hormones thyroïdiennes et composés thyromimétiques apparentés montrent que ces produits n'ont aucun effet sur la

fluidité membranaire, telle qu'elle est estimée par cette méthode. Ceci suggère que les variations des activités de l'UDP-glucuronosyltransférase provoquées par ces produits (augmentation de la glucuroconjugaison du 4-nitrophénol et diminution de celle de la bilirubine) ne semblent pas associées à des modifications de l'organisation lipidique des membranes microsomales. Probablement, elles seraient liées à une stimulation ou à une diminution de la biosynthèse protéique de l'isoenzyme correspondante [CHOWDHURY et al., 1983], ou à une différence de stabilité des ARN messagers codant pour ces deux isoformes. Des études complémentaires sont en cours au Centre du Médicament pour tenter d'expliquer ces différences.

Comme il a été rappelé au début de cette conclusion, appréhender l'étude des systèmes biologiques complexes n'est pas facile. De plus, lors de l'utilisation des méthodes photophysiques, il est encore nécessaire de réaliser des études complémentaires pour maîtriser les paramètres liés au comportement des sondes fluorescentes dans les milieux organisés complexes. Dans cet esprit, se situent les travaux du GRAPP concernant l'utilisation des trois approches spectroscopiques pour l'étude de systèmes plus simples, comme les micelles et particulièrement les micelles aqueuses de tensio-actifs non ioniques, tels que $C_{12}(EO)_6$ et $C_{12}(EO)_8$ (monododécyléther de polyoxyéthylène) et aussi les études de fluorescence dans des solvants homogènes.

Ma participation à ces études a eu une double portée, à savoir d'une part, contribuer à la compréhension du comportement des sondes fluorescentes (en particulier le dipyrénylpropane) dans des environnements différents, et d'autre part, me permettre d'acquérir les bases nécessaires à l'utilisation des méthodes photophysiques dans toutes leurs diversités d'excitation (lumières naturelle et polarisée, excitations continue et pulsée).

Pour terminer, je dirai que cette étude qui se voulait être un lien entre la photophysique et l'étude des biomembranes a, par les diverses expériences réalisées, tout à fait confirmé l'intérêt des méthodes de spectroscopie d'émission moléculaire pour explorer la membrane lipidique, et à plus forte raison, les systèmes modèles des membranes biologiques.

Et bien sûr, je rappellerai que pour situer cette étude dans un contexte plus général, j'ai analysé de nombreux résultats de la littérature s'y apparentant, ce qui constitue une base importante de références pour les travaux futurs.

BIBLIOGRAPHIE

ALMEIDA L.M., VAZ W.L.C., ZACHARIASSE K.A. and MADEIRA V.M.C.
Modulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump activity by membrane fluidity.
Biochemistry, **23**, 4714-4720 (1984).

AMLER E., TEISINGER J. and SVOBODA P.
 Mg^{2+} -induced changes of lipid order and conformation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$.
Biochim. Biophys. Acta, **905**, 376-382 (1987).

ANDERS M.W.
Enhancement and inhibition of microsomal drug metabolism.
Dans : "Progress in drug research", Jucker C. ed., 11-28, Birkhauser Verlag, Basel 17, (1973).

ANDRE J.C., BOUCHY M., VIRIOT M.L. and DONNER M.
Relations between diffusion and microviscosity : problems arising in the determination of the diffusion coefficients in membranes.
Dans : "Fluorescent techniques and membranes markers", P. VIALLET, B. SERROU and C. ROSENFELD Eds, 95-171 (1985).

ANDRE J.C., BOUCHY M. and VIRIOT M.L.
La fluorescence moléculaire. Son application à l'étude de mouvements à l'échelle moléculaire dans des membranes lipidiques.
Dans : "Techniques Avancées en Hémothéologie", DPIC-INPL Ed., Nancy, 708-752 (1983).

ANDRE J.C., BOUCHY M. and VIRIOT M.L.
Simulations of the effects of obstacles on the determination of coefficients of translational diffusion in biological membranes.
Int. J. Modelling & Simulation, **2**, 222-225 (1982).

ANDRE J.C., BOUCHY M. and WARE W.
Kinetics of partly diffusion controlled reactions. II. Competition between physical and chemical kinetics. Theoretical treatment.
Chem. Phys., **37**, 103-117 (1979).

ANDRE J.C., NICLAUSE M. and WARE W.
Kinetics of partly diffusion controlled reactions. I. Transient and apparent transient effect in fluorescence quenching.
Chem. Phys., **28**, 371-377 (1978).

ANDRICH M.P. and VANDERKOOI J.M.
Temperature dependence of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene fluorescence in phospholipid artificial membranes.
Biochemistry, **15**, 1257-1261 (1976).

ANNER B.M.
Interaction of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ with artificial membranes. I. Formation and structure of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ - liposomes.
Biochim. Biophys. Acta, **822**, 319-334 (1985).

ANTUNES-MADEIRA M.C., ALMEIDA L.M. and MADEIRA V.M.C.
Effects of lindane on membrane fluidity : intramolecular excimerization of a pyrene derivative and polarization of diphenylhexatriene.
Biochim. Biophys. Acta, **1022**, 110-114 (1990).

ANTUNES-MADEIRA M.C. and MADEIRA V.M.C.
Membrane fluidity as affected by the organochlorine insecticide DDT.
Biochim. Biophys. Acta, **1023**, 469-474 (1990).

- BACH D. and CHAPMAN D.
Calorimetric studies of biomembranes and their molecular components.
Dans : "Biological microcalorimetry", Beezer A. E., ed., Academic Press, London, 275 (1980).
- BAGINSKI E.S., FOA P.P. and ZAK B.
Determination of phosphate : study of labile organic phosphate interference.
Clin. Chim. Acta, **15**, 155-158 (1967).
- BAKOURI R., FINIDORI J., CHOBERT M.N., AGGERBECK M., LAPERCHE Y. and HANOUNE J.
Biosynthesis and processing of γ -glutamyl trypsin in hepatoma tissue culture cells.
J. Biol. Chem., **259**, 7970-7974 (1984).
- BALMBRA R.R., CLUNIE J.S., CORKILL J.M. and GOODMAN J.F.
Variations in the micelle size of non-ionic detergents.
Trans. Faraday Soc., **60**, 979-985 (1964).
- BALMBRA R.R., CLUNIE J.S., CORKILL J.M. and GOODMAN J.F.
Effect of temperature on the micelle size of a homogeneous non-ionic detergent.
Trans. Faraday Soc., **58**, 1661-1667 (1962).
- BANGHAM A.D., STANISH M.M. and WATHINS J.C.
Diffusion of univalent ions across the lamellas of swollen lipids.
J. Molec. Biol., **13**, 238-252 (1965).
- BARENHOLZ Y. and THOMPSON T.E.
Sphingomyelins in bilayers and biological membranes.
Biochim. Biophys. Acta, **604**, 129 (1980).
- BAROS F. and ANDRE J.C.
Kinetics of partly diffusion controlled reactions, XVIII. The use of liquid state physics concepts for bimolecular quenching models in bidimensional space.
React. Kinet. Catal. Lett., **36**, 1-7 (1988).
- BARTOLI P.
Détermination du nombre d'agrégation de micelles par des techniques photophysiques.
DEA, GRAPP, Nancy (1986).
- BAUT F., VIRIOT M.L., FICK M. and ANDRE J.C.
Fluorescent measurement in fermentation.
8th International Biotechnology Symposium, Paris, 17-22 juillet 1988.
- BEDDARD G.S. and WEST M.A.
Fluorescent probes. BEDDARD G.S. and WEST M.A. eds., Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco (1981).
- BESCHIASCHVILI G. and SEELIG J.
Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes.
Biochemistry, **29**, 52-58 (1990).
- BEST L., JOHN E. and JAHNIG F.
Order and fluidity of lipid membranes as determined by fluorescence anisotropy decay.
Eur. Biophys. J., **15**, 87-102 (1987).

BEVERS E.M., VERHALLEN P.F.J., VISSER A.J.W., COMFURIUS P. and ZWAAL R.F.

Bidirectional transbilayer lipid movement in human platelets as visualized by the fluorescent membrane probe 1-(4-[trimethylammonio]phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene. *Biochemistry*, **29**, 5132-5137 (1990).

BIRKS J. B.

Dans : "Photophysics of aromatic molecules". Chap. 7, Wiley-interscience, New York (1970).

BOELSTERLI U.A., RAKHIT G. and BALAZS T.

Modulation by S-adenosyl-L-methionine of hepatic Na⁺,K⁺-ATPase, membrane fluidity, and bile flow in rats with ethinyl estradiol-induced cholestasis. *Hepatology*, **3**, n° 12 (1983).

BOHORQUEZ M. and PATTERSON L.K.

Effects of molecular organisation on photophysical behavior. Time-resolved fluorescence of a pyrene-labeled phosphatidylcholine in spread monolayers of dioleoylphosphatidylcholine.

J. Phys. Chem., **92**, 1835-1839 (1988).

BOGGS J.M.

The hydrophobic and electrostatic effects of proteins on lipid fluidity and organisation.

Dans : "Membrane fluidity in biology", Vol. 2, Aloia ed., Academic Press, New York, 89 (1983).

BOSTOCK J.A., McDONALD M.P. and TIDOY G.J.T.

Surfactants in solution, Vol. 3, K.L. Mittal and B. Lindman, Eds, Plenum Press, New York (1984).

BOUNTING S.L. and DE PONT J.J.H.M.

Dans : "Membrane transport". BOUNTING S.L. et DE PONT J.J.H.M. Eds., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1981).

BRETSCHER M.

Les molécules de la membrane cellulaire.

Pour la science, **98**, 66-78 (1985).

BRONNER C., LANDRY Y., FONTENEAU P. and KUHRY J.G.

A fluorescent hydrophobic probe used for monitoring the kinetics of exocytosis phenomena.

Biochemistry, **25**, 2149-2154 (1986).

BROWN L.

Dans : "Papers on biological membrane structure". Edited by D. BRANTON and R. B. PARK, Boston (1968).

BRYSEWSKA M. and LEYKO W.

Effect of insulin on human erythrocyte membrane fluidity in diabetes mellitus.

Diabetologia, **24**, 311-313 (1983).

CAMPBELL I.D. and DWEK R.A.

Dans : "Biological spectroscopy", Benjamin/cummings, New York (1984).

CANAVAK T. and SUCKER H.

Formulation of dosage forms.

Dans : "Progress in allergy", Ciclosporin, Borel J.F. ed., Karger, Basel, **38**, 65-72 (1986).

- CARBONNEAU M.A., MONTAUDON D. and CLERC M.
Fluidité membranaire et polarisation de fluorescence.
Spectra Biologie, **87/4**, 31-38 (1987).
- CASTUMA C.E. and BRENNER R.R.
Effect of dietary cholesterol on microsomal membrane composition, dynamics and kinetic properties of UDPglucuronyl transferase.
Biochim. Biophys. Acta, **855**, 231-242 (1986).
- CHABANEL A., ABBOTT R.E., CHIEN S. and SCHACHTER D.
Effects of benzyl alcohol on erythrocyte shape, membrane hemileaflet fluidity and membrane viscoelasticity.
Biochim. Biophys. Acta, **816**, 142-152 (1985).
- CHAPMAN D., GOMEZ-FERNANDEZ J.C. and GONI F.M.
Intrinsic protein-lipid interactions. Physical and biochemical evidence.
FEBS Lett., **98**, 211-223 (1979).
- CHAPMAN D.
Recent studies of lipids, lipid cholesterol and membrane system.
Dans : "Biological membranes", Vol.2, Chapman D. and Wallach D.F. eds., Academic Press, New York, 91 (1973).
- CHARVOLIN J.
Hétérogénéités structurales dans les cristaux liquides lyotropes. SFC : "Approches récentes de la structure moléculaire, influence de l'environnement", Paris, 20-22 Mai (1985).
- CHEFURKA W., CHATELIER R.C. and SAWYER W.H.
Perturbation of phospholipid bilayers by DDT.
Biochim. Biophys. Acta, **896**, 181-186 (1987).
- CHEN P.S., TORIBARA T.Y. and WARNER H.
Microdetermination of phosphorus.
Anal. Chem., **28**, 1756-1758 (1956).
- CHONG P.L. and COSSINS A.R.
Interacting effects of temperature, pressure and cholesterol content upon the molecular order of dioleoylphosphatidylcholine vesicles.
Biochim. Biophys. Acta, **772**, 197-201, (1984)
- CHONG P.L. and COSSINS A.R.
A differential polarized phase fluorometric study of the effects of high hydrostatic pressure upon the fluidity of cellular membranes.
Biochemistry, **22**, 409-415 (1983).
- CHONG P.L., SHINITZKY M., COSSINS A. and WEBER G.
Pressure effects of lipid bilayers and biological membranes.
Biophys. J., **33**, 161_a (1981).
- CHOWDHURY J.R., CHOWDHURY N.R., MOSCIONI A.D., TUKEY R., TEPHLY T. and ARIAS I.M.
Differential regulation by triiodothyronine of substrate-specific uridinediphosphoglucuronate glucuronosyl transferases in rat liver.
Biochim. Biophys. Acta, **761**, 58-65 (1983).
- CHRISTON R., EVEN V., DAVELOOSE D., LEGER C.L. and VIRET J.
Modification of fluidity and lipid-protein relationships in pig intestinal brush-border membrane by dietary essential fatty acid deficiency.
Biochim. Biophys. Acta, **980**, 77-84 (1989).

COLLIN T.

Les excimères intramoléculaires comme capteurs de viscosité et de cohésion.
Thèse, INPL (GRAPP), Nancy (1987).

COLLINS F.C. and KIMBALL G.E.

J. Colloid. Sci., **4**, 425 (1949).

CORTI M., DEGIORGIO V., HAYTER J.B. and ZULAUF M.

Micelle structure in isotropic C₁₂E₁₈ amphiphile solutions.
Chem. Phys. Lett., **109**, 579-583 (1984).

CORTIJO M., ALONSO A., GOMEZ-FERNANDEZ J.C. and CHAPMAN D.

Intrinsic protein-lipid interactions : infrared spectroscopic studies of gramicidin A, bacteriorhodopsin and Ca⁺⁺ATPase in biomembranes and reconstituted systems.
J. Mol. Biol., **157**, 597-618 (1982).

CRANNEY M., CUNDALL R.B., JONES G.R., RICHARDS J.T. and THOMAS E.W.

Fluorescence lifetime and quenching studies on some interesting Diphenylhexatriene membrane probes.

Biochim. Biophys. Acta, **735**, 418-425 (1983).

CUMMINGS J., GRAHAM A.B. and WOOD G C.

Biochim. Biophys. Acta, **771**, 127141 (1984).

CURTHOYS N.P. and HUGHEY R.P.

Characterization and physiological function of rat renal gamma-glutamyl transpeptidase.
Enzyme, **24**, 383-403 (1979).

DALE R.E., CHEN L.A. and BRAND L.

Rotational relaxation of the "microviscosity" probe diphenylhexatriene in paraffin oil and egg lecithin vesicles.

J. Biol. Chem., **252**, 7500-7510 (1977).

DANIELLI J.F. and DAVSON H.

A contribution to the theory of permeability of thin films.
J. Cell. Comp. Physiol., **5**, 495-508 (1935).

DAVELOOSE D., SABLAYROLLES M., MOLLE D. and LETERRIER F.

Interaction of ticlopidine with the erythrocyte membrane.
Biochemical Pharmacology, **31**, 3949-3954 (1982).

DE FORESTA B., ROGARD M., LE MAIRE M. and GALLAY J.

Effects of temperature and benzyl alcohol on the structure and adenylate cyclase activity of plasma membranes from bovine adrenal cortex.

Biochim. Biophys. Acta, **905**, 240-256 (1987).

DEMBO M., GLUSHKO V., ABERLIN M. and SONENBERG M.

A method for measuring membrane microviscosity using pyrene excimer formation.
Application to human erythrocyte ghosts.

Biochim. Biophys. Acta, **522**, 201-211 (1979).

DEMPSEY C., BITBOL M. and WATTS A.

Interaction of melittin with mixed phospholipid membranes composed of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylserine studied by deuterium NMR.

Biochemistry, **28**, 6590-6596 (1989).

- DE PAILLERETS C., GALLAY J. and ALFSEN A.
Effect of cholesterol and protein content on membrane fluidity and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in mitochondrial inner membranes of bovine adrenal cortex.
Biochim. Biophys. Acta, **772**, 183-191 (1984).
- DICKENS B.F., SNOW T. R., GREEN V. and WEGLIICKI W.B.
The effect of erythrocyte associated light scattering on membrane fluorescence polarization.
Mol. Cell. Biochem., **79**, 91-94 (1988).
- DI MEGLIO J.M., PAZ L., DVOLAITZKY M, and TAUPIN C.
Local curvature in non ionic amphiphilic films. Effect of temperature at the cloud-point and in the lamellar phases.
J. Phys. Chem., **88**, 6036-6047 (1984).
- DONNER M., ANDRE J.C. and BOUCHY M.
Kinetics of partly diffusion controlled reactions.VII. Pyrene excimer formation in erythrocyte membranes.
Biochem. Biophys. Res. Comm., **97**, 1183-1191 (1980).
- DOWNER N.W., ROBINSON N.C. and CAPALDI R.A.
Characterization of a seventh different subunit of beef heart cytochrome *c* oxidase. Similarities between the beef heart enzyme and that from other species.
Biochemistry, **15**, 2930-2936 (1976).
- DUFOUR J.P., NUNNALLY R., BUHLE L. and TSONG T.Y.
Comparative study of an adenosine triphosphatase trigger-fused lipid vesicle and other vesicle forms of dimyristoylphosphatidylcholine.
Biochemistry, **20**, 5576-5586 (1981).
- DUFOURCQ J., DASSEUX J.L. and FAUCON J.F.
An ullustrative model for lipid-protein interactions in membranes. A review of melittin-phospholipid systems.
F.E.M.S. Symp., **24**, 127-138 (1984).
- DUPORTAIL G. and WEINREB A.
Photochemical changes of fluorescent probes in membranes and their effect on the observed fluorescence anisotropy values.
Biochim. Biophys. Acta, **736**, 171-177 (1983).
- DUTTA-ROY A.K., RAY T.K. and SINHA A.K.
Control of erythrocyte membrane microviscosity by insulin.
Biochim. Biophys. Acta, **816**, 187-190 (1985).
- EIBL H.
Phospholipids as functional constituents of biomembranes.
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **23**, 257-271 (1984).
- ESMANN M., HIDEK K. and MARSH D.
Novel spin-labels for the study of lipid-protein interactions. Application to $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ membranes.
Biochemistry, **27**, 3913-3917 (1988).
- ESMANN M., HORVATH L.I. and MARSH D.
Saturation-transfer electron spin resonance studies on the mobility of spin-labeled sodium and potassium ion activated adenosine triphosphatase in membranes from *Squalus acanthias*.
Biochemistry, **26**, 8675-8683 (1987).

- FABRIE C.H.J.P., DE KRUIJFF B. and DE GIER J.
Protection by sugars against phase transition-induced leak in hydrated dimyristoyl-phosphatidylcholine liposomes.
Biochim. Biophys. Acta, **1024**, 380-384 (1990).
- FEIJGE M.A.H., HEEMSKERK J.W.M. and HORNSTRA G.
Membrane fluidity of non-activated and activated human blood platelets.
Biochim. Biophys. Acta, **1025**, 173-178 (1990).
- FERNANDEZ-MORAN and FINEAN
Dans : "Papers on biological membrane structure", D. Branton and R.B. PARK eds., Little Brown and Co, Boston (1968).
- FERRER-MONTIEL A.V., GONZALEZ-ROS J.M. and FERRAGUT J.A.
Association of daunomycin to membrane domains studied by fluorescence resonance energy transfer.
Biochim. Biophys. Acta, **937**, 379-386 (1988).
- FINEAN J. B. and MICHELL R. H.
Dans : "Isolation, composition and general structure of membranes. Membrane structure", Finean/Michel éditeurs, Elsevier (1981).
- FIORINI R.M., VALENTINO M., GLASER M., GRATTON E. and CURATOLA G.
Fluorescence lifetime distributions of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene reveal the effect of cholesterol on the microheterogeneity of erythrocyte membrane.
Biochim. Biophys. Acta, **939**, 485-492 (1988).
- FIORINI R.M., VALENTINO M., WANG S., GLASER M. and GRATTON E.
Fluorescence lifetime distributions of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene in phospholipid vesicles.
Biochemistry, **26**, 3864-3870 (1987).
- FOURNEL S., MAGDALOU J., THOMASSIN J., VILLOUTREIX J., SIEST G., CALDWELL J. and ANDRE J.C.
Structure-dependent induction of bilirubin glucuronidation and lauric acid 12-hydroxylation by arylcarboxylic acids chemically related to clofibrate.
Biochim. Biophys. Acta, **842**, 202-213 (1985).
- GABRIJELCIC V., SENTJURC M. and KRISTL J.
Evaluation of liposomes as drug carriers into the skin by one-dimensional EPR imaging.
Int. J. Pharm., **62**, 75-79 (1990).
- GALLA H.J., HARTMANN W., THEILEN U. and SACKMANN E.
On two-dimensional passive random walk in lipid bilayers and fluid pathways in biomembranes.
J. Membrane Biol., **48**, 215-236 (1979).
- GALLA H.J., HARTMANN W. and SACKMANN E.
Lipid-protein interaction in model membranes : Binding of melittin to lecithin bilayer vesicles.
Ber. Bunsenges. Phys., Chem. **82**, 918-922 (1978).
- GALLA H.J. and SACKMANN E.
Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes : use of pyrene excimers as optical probes.
Biochim. Biophys. Acta, **339**, 103-115 (1974).

GARCIN E.

Couplage transport réactivité dans les milieux organisés.
Thèse, INPL (GRAPP), Nancy (1989).

GEORGE R., LEWIS R.N.A.H. and McELHANEY R.N.

Studies on the purified $\text{Na}^+ + \text{Mg}^{2+}$ -ATPase from *Acholeplasma laidlawii* B membranes : a differential scanning calorimetric study of the protein-phospholipid interactions.
Biochem. Cell. Biol., **68**, 161-168 (1990).

GEORGE R. and McELHANEY R.N.

Affinity labeling of the $(\text{Na}^+ + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase from *Acholeplasma laidlawii* B membranes by the 2',3'-dialdehyde derivative of adenosine 5'-triphosphate.
Biochim. Biophys. Acta, **813**, 161-166 (1985).

GIBSON E.E., ORTON T.C and TAMBURINI P.P.

Biochem. J., **203**, 161-168 (1982).

GOLDBERG D.M.

Structural, fonctionnal and clinical aspects of γ -glutamyltransferase.
CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., **12**, 1-58 (1980).

GOMEZ-FERNANDEZ J.C., GONI F.M., BACH D., RESTALL C. and CHAPMAN D.
Protein-lipid interactions. A study of $(\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+})$ ATPase reconstituted with synthetic phospholipids.

FEBS Lett., **98**, 224-228 (1979).

GORTER E. and GRENDL F.

On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood.
J. Exp. Med., **41**, 439-443 (1925).

GOUDONNET H., MAGDALOU J., MOUNIE J., NAOUMI A., VIRIOT M.L., ESCOUSSE A., SIEST G. and TRUCHOT R.

Differential action of thyroid hormones and chemically related compounds on the activity of UDP-glucuronosyl- transferases and cytochrome P-450 isozymes in rat liver.
Biochim. Biophys. Acta, **1035**, 12-19 (1990).

GOUDONNET H., MOUNIE J. and TRUCHOT R.

Effets de l'acide 3,5,3'-triiodothyroacétique et de la dextrothyroxine sur l'activité de diverses enzymes microsomaux hépatiques induites par le phénobarbital.
J. Pharmacol., **11**, 245-256 (1980).

GOW A., AUTON W. and SMITH R.

Interactions between bovine myelin basic protein and zwitterionic lysophospholipids.
Biochemistry, **29**, 1142-1147 (1990).

GRIESER F. and DRUMMOND C.J.

The physicochemical properties of self-assembled surfactant aggregates as determined by some molecular spectroscopic probe techniques.
J. Phys. Chem., **92**, 5580-5593 (1988).

HANSENS I., VAN CEUNEBROECK J.C., POTTEL H., PREAUX G. and VAN CAUWELAERT F.

Influence of the protein conformation on the interaction between α -lactalbumin and dimyristoylphosphatidylcholine vesicles.
Biochim. Biophys. Acta, **817**, 154-164 (1985).

- HARA K. and SUZUKI H.
High-pressure studies of intramolecular viscosity determined by intramolecular excimer forming probe.
J. Phys. Chem., **94**, 1079-1081 (1990).
- HARRIS R.A., MITCHELL M.A. and HITZEMANN R.J.
Physical properties of brain membranes from ethanol tolerant-dependent mice.
Neurosci. Abst., Boston (1983).
- HARRIS R.A. and SCHROEDER F.
Effects of barbiturates and ethanol on the physical properties of brain membranes.
J. Pharmacol. Exp. Ther., **233**, 424 (1982).
- HAYASHI Y., MIMURA K., MATSUI H. and TAKAGI T.
Minimum enzyme unit for Na⁺/K⁺-ATPase is the $\alpha\beta$ -protomer. Determination by low-angle laser light scattering photometry coupled with high-performance gel chromatography for substantially simultaneous measurement of ATPase activity and molecular weight.
Biochim. Biophys. Acta, **983**, 217-229 (1989).
- HENDERSON C.N., SELINGER B.K. and WATKINS A.R.
Solvent effects on intramolecular excimer formation of dipyrrenylalcanes.
J. Photochem., **16**, 215-222 (1981).
- HERMONI-LEVINE M. and RAHAMIMOFF H.
Role of the phospholipid environment in modulating the activity of the rat brain synaptic plasma membrane Ca²⁺-ATPase.
Biochemistry, **29**, 4940-4950 (1990).
- HIESTAND P.C. AND MEKLER P.
Mechanism of action : ciclosporin- and prolactin-mediated control of immunity.
Dans : "Progress in allergy", Ciclosporin, Borel J.F. ed., **38**, 181-197, (1986), Karger, Basel.
- HINZ H.J. and STURTEVANT J.M.
Calorimetric studies of dilute aqueous suspensions of bilayers formed from synthetic L- α -lecithins.
J. Biol. Chem., **247**, 6071-6075 (1972).
- HIRATA F. and AXELROD J.
Phospholipid methylation and biological signal transmission.
Science, **209**, 1082 (1980).
- HITZEMANN R.J.
Effects of non-electrolyte molecules with anesthetic activity on the physical properties of DMPC multilamellar liposomes.
Biochim. Biophys. Acta, **983**, 205-211 (1989).
- HOKIN L.E. and DIXON J.F.
Parameters of reconstituted Na⁺ and K⁺ transport in liposomes in which purified Na,K-ATPase is incorporated by "freeze-thaw-sonication".
Dans : "Na,K-ATPase. Structure and kinetics", Skou J. C. and Norby J. eds., 47-67, (1979), Academic Press, New York.
- HUANG C., LAPIDES J. and LEVIN I.
Phase-transition behaviour of saturated, symmetric chain phospholipid bilayer dispersions determined by raman spectroscopy : correlation between spectral and thermodynamic parameters.
J. Am. Chem. Soc., **104**, 5926-5930 (1982).

INFELTA P.P. and GRATZEL M.

Statistics of solubilizate distribution and its application to pyrene fluorescence in micellar systems. A concise kinetic model.

J. Chem. Phys., **70**, 179-186 (1979).

INGELMAN-SUNDBERG M. and GLAUMANN H.

Incorporation of purified components of the rabbit liver microsomal hydroxylase system into phospholipid vesicles.

Biochim. Biophys. Acta, **599**, 417-435 (1980).

JAIN M. K. and ZAKIM D.

The spontaneous incorporation of proteins into preformed bilayers.

Biochim. Biophys. Acta, **906**, 33-68 (1987).

JANIAK M.J., SMALL D.M. and SHIPLEY G.G.

Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids : dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin.

Biochemistry, **15**, 4575-4580 (1976).

JELICKS L.A., BROIDO M.S., BECKER J. M. and NAIDER F. R.

Interaction of the *Saccharomyces cerevisiae* α -factor with phospholipid vesicles as revealed by proton and phosphorus NMR.

Biochemistry, **28**, 4233-4240 (1989).

JONES O.T. and LEE A.G.

Interactions of pyrene derivatives with lipid bilayers and with $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase.

Biochemistry, **24**, 2195-2202.

JONES R.P. and GREENFIELD P.F.

Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane.

Yeast, **3**, 223-232 (1987).

JORGENSEN P.L.

Mechanism of Na^{+},K^{+} pump. Protein structure and conformation of the pure $(Na^{+}+K^{+})$ -ATPase.

Biochim. Biophys. Acta, **694**, 27-68 (1982).

KANO K., YAMAGUCHI T. and OGAWA T.

Fluorescence studies on morphological change of oil-in-water microemulsions upon dilution with water.

J. Phys. Chem., **88**, 793-796 (1984).

KANO K., KAWAZUMI H., OGAWA T. and SUNAMOTO J.

Fluorescence quenching in liposomal membranes. Exciplex as a probe for investigating artificial lipid membrane properties.

J. Phys. Chem., **85**, 2204-2209 (1981).

KAUFFMANN I.

Etude par des méthodes photophysiques du transport moléculaire dans des milieux organisés.

Thèse, INPL (GRAPP), Nancy (1985).

KAUFFMANN I, BAROS F., VIRIOT M.L., BOUCHY M. ANDRE J.C. et SIEST G.

Influence de la structure organisée de vésicules sur la cinétique de formation d'excimères intermoléculaires.

Colloque : relation structure-reactivité dans les assemblages d'amphiphiles, aspects fondamentaux et applications au "Premier Congrès National de la Société Française de Chimie", Nancy, 17-21 sep. (1984).

- KAWATO S., IKEGAMI A., YOSHIDA S. and ORII Y.
Fluorescent probe study of temperature-induced conformational changes in cytochrome oxidase in lecithin vesicle and solubilized systems.
Biochemistry, **19**, 1598-1603 (1980).
- KAWATO S., KINOSITA K.J. and IKEGAMI A.
Effect of cholesterol on the molecular motion in the hydrocarbon region of lecithin bilayers studied by nanosecond fluorescence techniques.
Biochemistry, **17**, 5026 (1978).
- KEEFE E.B., SCHARSCHMIDT B.F., BLANKENSHIP N.M. and OCKNER R.K.
Studies of relationships among bile flow, liver plasma membrane Na,K-ATPase, and membrane microviscosity in the rat.
J. Clin. Invest., **64**, 1590-1598 (1979).
- KIDO N., TANAKA F., KANEDA N. and YAGI K.
Pulse fluorimetry of N-(1-pyrenesulfonyl)dipalmitoyl-L- α -phosphatidyl-ethanolamine in concanavalin A-stimulated human lymphocytes.
Biochim. Biophys. Acta, **603**, 255-265 (1980).
- KIMELBERG H.K.
Alterations in phospholipid-dependent ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPase activity due to lipid fluidity : effects of cholesterol and Mg^{+2} .
Biochim. Biophys. Acta, **413**, 143-148 (1975).
- KIMELBERG H.K. and PAPAHA DJOPOULOS D.
Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transition and cholesterol on ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-stimulated adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem., **249**, 1071-1080 (1974).
- KITAGAWA S., KAMETANI F., TSUCHIYA K. and SAKURAI H.
ESR analysis with long-chain alkyl spin labels in bovine blood platelets. Relationship between the increase in membrane fluidity by alcohols and phenolic compounds and their inhibitory effects on aggregation.
Biochim. Biophys. Acta, **1027**, 123-129 (1990).
- KREBS J. J. R.
The topology of phospholipids in artificial and biological membranes.
J. Bioenergetics & Biomembranes, **14**, 141-157 (1982).
- KUBINA M., LANZA F., CAZENAVE J.P., LAUSTRIAT G. and KUHR Y J.G.
Parallel investigation of exocytosis kinetics and membrane fluidity changes in human platelets with the fluorescent probe, trimethylammonio-diphenylhexatriene.
Biochim. Biophys. Acta, **901**, 138-146 (1987).
- KUCHINKA E. and SEELIG J.
Interaction of melittin with phosphatidylcholine membranes. Binding isotherm and lipid head-group conformation.
Biochemistry, **28**, 4216-4221 (1989).
- KUHR Y J. G., DUPO RTAIL G., BRONNER C. and LAUSTRIAT G.
Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene.
Biochim. Biophys. Acta, **845**, 60-67 (1985).
- KUHR Y J. G., FONTENEAU P., DUPO RTAIL G., MACCHLING C. and LAUSTRIAT G.
TMA-DPH : A suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells .
Cell. Biophys., **5**, 129-140 (1983).

LAKOWICZ J.R., PRENDERGAST F.G. and CHAN S.I.
J. Chem. Phys., **66**, 4092 (1976).

LAROCHE G., CARRIER D. and PEZOLET M.
Study of the effect of poly(L-lysine) on phosphatidic acid and phosphatidylcholine/phosphatidic acid bilayers by raman spectroscopy.
Biochemistry, **27**, 6220-6228 (1988).

LAVIALLE F., LEVIN I. and MOLLAY C.
Interaction of mellitin with dimyristoylphosphatidylcholine liposomes.
Biochim. Biophys. Acta, **600**, 62-71 (1980).

LEGRINI O.
Etude de tensio-actifs non ioniques par des techniques photophysiques.
DEA, INPL (GRAPP), Nancy (1985).

LENTZ B.R., MOORE B.M., KIRKMAN C. and MEISSNER G.
Lipid-protein interactions in sarcoplasmic reticulum. A disrupted secondary lipid layer surrounds the Ca^{2+} -ATPase.
Biophys. J., **37**, 30-32 (1982).

LETERRIER F. et GARY-BOBO C.M.
Biologie membranaire : Structure et dynamique des membranes biologiques. Hermann, éditeurs des sciences et des arts (1989).

LETERRIER F., MENDYK A., BRETON K. and VIRET J.
Membranes biologiques et actions pharmacologiques. Effet des phenothiazines.
J. Fr. Biophys. et Med. Nuc., **1**, 61-69 (1977).

LETO T.L., ROSEMAN M.A. and HOLLOWAY P.W.
Mechanism of exchange of cytochrome b_5 between phosphatidylcholine vesicles.
Biochemistry, **19**, 1911-1916 (1980).

LOFROTH J.E. and ALMGREN M.
Dans : "Fluorescence quenching aggregation numbers in a non-ionic micelles solution in surfactant in solution". K.L. MITTAL and B. LINDMAN ed, Plenum Press, New-York, **1**, 627-643 (1983).

LOOSLI H.R., KESSLER H., OSCHKINAT H., WEBER H.P., PETCHER T.J. and WIDMER A.
The conformation of cyclosporin A in the crystal and in solution.
Helv. Chim. Acta, **68**, 682-703 (1985).

LULY P., BALDINI P. and TRIA E.
Insulin effect *in vitro* on human erythrocyte plasma membrane.
Experientia, **37**, 431-433 (1981).

LULY P., CRIFO C. and STROM R.
Effect of insulin on lateral diffusion of pyrene in rat liver plasma membrane.
Experientia, **35**, 1300-1301 (1979).

LUZATTI V.
X-ray diffraction of lipid water systems.
Dans : "Biological membranes, physical facts and functions". D. Chapman, ed. Academic Press, New York, pp.71-123 (1968).

MacDONALD A.G., WAHLE K. W.J., COSSINS A.R. and BEHAN M.K.
Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity; a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes.
Biochim. Biophys. Acta, **938**, 231-242 (1988).

- MacDONALD P. M. and SEELIG J.
Dynamic properties of gramicidin A in phospholipid membranes.
Biochemistry, **27**, 2357-2364 (1988).
- MacELHANEY R.N.
Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems.
Biochim. Biophys. Acta, **864**, 361-421 (1986).
- MACHY P. and LESERMAN L.
Composition, propriétés et préparation des liposomes.
Dans : "Les liposomes en biologie cellulaire et pharmacologie". Les éditions INSERM/John Libbey Eurotext, 1-25 (1987).
- MAGDALOU J., HOCHMAN Y. and ZAKIM D.
Activity of UDP-glucucuronosyltransferase as a function of aglycone structure and lipid environment.
J. Biol. Chem., **257**, 13624-13629 (1982).
- MAIER and SAUPE
Dans : "Introduction to liquid state physics". C. CROXTON, J. Wiley Ed. (1975).
- MAIRE C.
Etudes de milieux organisés par polarisation de fluorescence résolue dans le temps.
Thèse, INPL (GRAPP), Nancy (1989).
- MARBREY S. and STURTEVANT J.M.
High sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related systems.
Methods in membrane biology, **9**, 237-274 (1976).
- MARCUS M.M., APPEL H.J., ROUDNA M., SCHWENDENER R.A., WEDER H.G. and LAUGER P.
(Na⁺+K⁺)-ATPase in artificial lipid vesicles : influence of lipid structure on pumping rate.
Biochim. Biophys. Acta, **854**, 270-278 (1986).
- MATSUDA Y., TSUJI A. and KATUNUMA N.
Studies on the structure of γ -glutamyltranspeptidase. III. Evidence that the amino terminus of the heavy subunit is the membrane binding segment.
J. Biochem., **93**, 1427-1433 (1983).
- MEISTER A. and TATE S.S.
Glutathione and related gamma-glutamyl compounds: biosynthesis and utilization.
Rev. Biochem., **45**, 559-604 (1976).
- MENDZ G.L., BROWN L.R. and MARTENSON R.E.
Interactions of myelin basic protein with mixed dodecylphosphocholine/palmitoyllysophosphatidic acid micelles.
Biochemistry, **29**, 2304-2311 (1990).
- MONTICH G.G. and COSA J.J.
The fluorescence and fluorescence quenching of pyrène derivatives in neutral and charged and charged small unilamellar vesicles.
Bol. Soc. Chil. Quim., **35**, 97-103 (1990).
- MOSSA G., GIULIO A.D. and FINAZZI-AGRO M.
Interaction of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol vesicles with ascorbate oxidase.
Biochim. Biophys. Acta, **986**, 310-314 (1989).

MULLER S., REGNAULT V., DONNER M., RIVAT C. and STOLTZ J.F.
Etude par polarisation de fluorescence de populations leucocytaires du sang périphérique.
Interaction avec des molécules d'intérêt biologique.
Innov. Tech. Biol. Med., **8**, 271-282 (1987).

MULLER S., DONNER M. and STOLTZ J.F.
Fluidité lipidique de populations leucocytaires: Etude comparative par polarisation de fluorescence avec le DPH et le TMA-DPH.
Dans : "Techniques en hémorhéologie clinique et applications". Chateaubriant, 1 juin 1985, DPIC-INPL Ed., Nancy, (1986).

NAGLE J.
Theory of the main lipid bilayer phase transition.
Ann. Rev. Phys. Chem., **31**, 157-195 (1980).

NEEDHAM D., McINTOSH T.J. and EVANS E.
Thermomechanical and transition properties of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers.
Biochemistry, **27**, 4668-4673 (1988).

NEMZEK T.L. and WARE W.R.
Kinetics of diffusion- controlled reactions : transient effects in fluorescence quenching.
J. Chem. Phys., **62**, 477-489 (1975).

NICHOLS J.W.
Kinetics of fluorescent-labeled phosphatidylcholine transfer between nonspecific lipid transfer protein and phospholipid vesicles.
Biochemistry, **27**, 1889-1896 (1988).

NICOLSON G.L., POSTE G. and JI T.H.
The dynamics of cell membrane organisation. Dans : "Cell Surface Reviews" Vol. 3, G. L. Nicolson Eds., Elsevier/North-Holland (1977).

NITHIPATIKOM K. and McGOWN L.B.
Studies of sodium taurocholate micelles using fluorescent probe molecules.
Photochem. Photobiol., **47**, 797-802 (1988).

NOYES R.M.
J. Am. Chem. Soc., **78**, 5486 (1956).

OLDFIELD E. and CHAPMAN D.
Dynamics of lipids in membranes : heterogenicity and the role of cholesterol.
FEBS Lett., **23**, 285 (1972).

OLSSON U., SHINODA K. and LINDMAN B.
Change of the structure of microemulsions with the hydrophile-lipophile balance of nonionic surfactant as revealed by NMR self-diffusion studies.
J. Phys. Chem., **90**, 4083-4088 (1986).

OTH D., BEGIN M., BISCHOFF P., LEROUX J.Y., MERCIER G. and BRUNEAU C.
Induction, by adriamycin and mitomycin C, of modifications in lipid composition, size distribution, membrane fluidity and permeability of cultured RDM4 lymphoma cells.
Biochim. Biophys. Acta, **900**, 198-208 (1987).

OVERTON
Dans : "Papers on biological membrane structure", D. Branton and R.B. PARK eds., Little Brown and Co, Boston (1968).

- PAL R., BARENHOLZ Y. and WAGNER R.R.
Pyrene phospholipid as a biological probe for studying fusion of virus membrane with liposomes.
Biochemistry, **27**, 30-36 (1988).
- PAPAHADJOPOULOS D.
J. Colloid Interface Sci., **58**, 459-473 (1977).
- PAPAHADJOPOULOS D., MOSCARELLO M., EYLAR E.H. and ISAC T.
Effect of proteins on thermotropic phase changes of phospholipid membranes.
Biochim. Biophys. Acta, **401**, 316, (1975).
- PAPAHADJOPOULOS D., JACOBSON K., NIR S. and ISAC T.
Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarisation and permeability measurement concerning the effect of temperature and cholesterol.
Biochim. Biophys. Acta, **330**, 330-348 (1973).
- PAPAHADJOPOULOS D. and MILLER N.
Phospholipid model membranes. Structural characteristics of hydrated liquid crystals.
Biochim. Biophys. Acta, **135**, 624-638 (1967).
- PARKER C.A.
Dans : "Photoluminescence of solutions". pp. 26-345, Elsevier, Amsterdam, London, New York. (1968).
- PEHOWICH D.J., MacDONALD P.M., McELHANEY R.N., COSSINS A.R. and WANG L.C.H.
Calorimetric and spectroscopic studies of lipid thermotropic phase behavior in liver inner mitochondrial membranes from a mammalian hibernator.
Biochemistry, **27**, 4632-4638 (1988).
- PERRIN F.
Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité.
J. Phys. Radium, **7**, 390-401 (1926).
- PETERS R. and CHERRY R.J.
Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers : experimental test of the Saffman-Delbrück equations.
Proc. Natl. Acad. Sci., **79**, 4317-4321 (1982).
- PHILP R.B., MacIVER D.J.L. and WONG P.T.T.
Pressure distortion of an artificial membrane and the effect of ligand/protein binding.
Biochim. Biophys. Acta, **1021**, 91-95, (1990).
- PINK D.A. and MacDONALD A. L.
Theoretical studies of phospholipid-glycophorin bilayer membranes using electron spin resonance and fluorescent probes.
Biochim. Biophys. Acta, **863**, 243-252 (1986).
- PLASEK J., CERMAKOVA D. and JAROLIM P.
Fluidity of intact erythrocyte membranes. Correction for fluorescence energy transfer from diphenylhexatriene to hemoglobin.
Biochim. Biophys. Acta, **941**, 119-122 (1988).
- POWELL G.L., KNOWLES P.F. and MARSH D.
Incorporation of cytochrome oxidase into cardiolipin bilayers and induction of nonlamellar phases.
Biochemistry, **29**, 5127-5132 (1990).

POWNALL H.J. and SMITH L.C.

Viscosity of hydrocarbon region of micelles. Measurement by excimer fluorescence.
J. Amer. Chem. Soc., **95**, 3136-3140 (1973).

PRENDERGAST F.G., LU J., WEI G.J. and BLOOMFIELD V A.

Lipid order-disorder transitions in complexes of melittin and ditetra and dipentadecanoyl-glycerophosphocholines.
Biochemistry, **21**, 6963-6971 (1982).

PRENDERGAST F.G., HAUGLAND R.P. and CALLAHAN P.J.

1-[4-(trimethylamino)-6-phenyl]-hexa-1,3,5-triene; synthesis, fluorescence properties and use as a fluorescent probe of lipid bilayers.
Biochemistry, **20**, 7333-7338 (1981).

PRINGLE M.J. and MILLER K.W.

Structural isomers of tetradecenol discriminate between the lipid fluidity and phase transition theories of anesthesia.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **85**, 1192 (1978).

PUISIEUX F.

Les liposomes et leurs emploi en thérapeutique. Bilan des recherches réalisées.
Dans : "Liposomes, applications thérapeutiques". LAVOISIER, Paris, pp. 205-253 (1985).

RAVEY J.C., BUZIER M. and DUPONT G.

Phase behaviour and structures by neutron scattering of aqueous hydrocarbon/water/non-ionic surfactant systems.
Dans : "Microemulsion systemes", Surfactant Science Series, **24**, 163-182, édité par H. ROSANO et M. CLAUSSE (1987).

RAVEY J.C.

Lower consolute curve related to micellar structure of nonionic surfactants.
J. Colloid Interface Sci., **94**, 289-191 (1983).

REHOREK M., DENCHER N.A. and HEYN M.P.

Long-range lipid-protein interactions. Evidence from time-resolved fluorescence depolarization and energy-transfer experiments with bacteriorhodopsin-dimyristoyl-phosphatidylcholine vesicles.
Biochemistry, **24**, 5980-5988 (1985).

REICHARDT C. and HARBUSCH-GORNERT E.

Erweiterung, korrektur und neudefinition der E_T -Lösungs-mittelpolaritätsskala mit hilfe eines lipophilen penta-*tert*-butyl-substituierten pyridinium-*N*-phenolat-betain farbstoffes.
Liebigs Annalen der Chemie, **5**, 721-743 (1983).

RICE D., MEADOWS M., SCHEINMANN A., GONI F., GOMEZ-FERNANDEZ J., MOSCARELLO M., CHAPMAN D. and OLFIELD E.

Protein-lipid interactions. A nuclear magnetic resonance study of sarcoplasmic reticulum (Ca^{++} , Mg^{++})-ATPase, lipophilin and proteolipid apoprotein-lecithin systems and a comparison with the effects of cholesterol.
Biochemistry, **18**, 5893-5902 (1979).

ROBERTSON J.D.

Protoplasma, **63**, 218 (1967).

ROOZEMOND R.C. and URLI D.C.

Fluorescence of polarization studies and biochemical properties of membranes exfoliated from the cell surface of rabbit thymocytes in situ.
Biochim. Biophys. Acta, **643**, 327, (1981).

ROSEMAN M.A. and THOMPSON T.

Mechanism of the spontaneous transfer of phospholipids between bilayers.

Biochemistry, **19**, 439-444 (1980).

RYFFEL B.

Toxicology-experimental studies.

Dans : "Progress in allergy", Ciclosporin, Borel J.F. ed., Karger, Basel, **38**, 181-197 (1986).

SACKMANN E., TRÄUBLE H., GALLA H. and OVERATH P.

Lateral diffusion, protein mobility and phase transitions in *Escherichia coli* membranes.

A spin label study.

Biochemistry, **12**, 5360-5368 (1973).

SALESSE R., GARNIER J., LETERRIER F., DAVELOOSE D. and VIRET J.

Modulation of adenylate cyclase activity by the physical state of pigeon erythrocyte membrane. 1. Parallel drug-induced changes in the bilayer fluidity and adenylate cyclase activity.

Biochemistry, **21**, 1581-1586 (1982).

SALESSE R., GARNIER J. and DAVELOOSE D.

Modulation of adenylate cyclase activity by the physical state of pigeon erythrocyte membrane. 2. Fluidity-controlled coupling between the subunits of the adenylate cyclase system.

Biochemistry, **21**, 1587-1590 (1982).

SALLIO D.

Mise au point d'un capteur optique de viscosité.

DEA, INPL (GRAPP), Nancy (1986).

SCHACHTER D., COGAN D. and ABBOTT R.

Asymmetry of lipid dynamics in human erythrocyte membranes studied with permeant fluorophores.

Biochemistry, **21**, 2146-2150 (1982).

SCHULER I., DUPORTAIL G., GLASSER N., BENVENISTE P. and HARTMANN M.A.

Soybean phosphatidylcholine vesicles containing plant sterols : a fluorescence anisotropy study.

Biochim. Biophys. Acta, **1028**, 82-88 (1990).

SCHULZE J., MISCHECK U., WIGAND S. and GALLA H.J.

Incorporation of highly purified melittin into phosphatidylcholine bilayer vesicles.

Biochim. Biophys. Acta, **901**, 101-111 (1987).

SCOTTO A.W. and ZAKIM D.

Reconstitution of membrane proteins : catalysis by cholesterol of insertion of integral membranes proteins into preformed lipid bilayers.

Biochemistry, **25**, 1555-1561 (1986).

SCOTTO A.W. and ZAKIM D.

Reconstitution of membrane proteins : spontaneous association of integral membrane proteins with prefomed unilamellar lipid bilayers.

Biochemistry, **24**, 4066-4075 (1985).

SEVERS N.J. and ROBENEK H.

Detection of microdomains in biomembranes. An appraisal of recent developments in freeze-fracture cytochemistry.

Biochim. Biophys. Acta, **737**, 373-408 (1983).

SHERIDAN N.P. and BLOCK E.R.

Plasma membrane fluidity measurements in intact endothelial cells : Effect of hyperoxia on fluorescence anisotropies of 1-[4-(trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene.
J. Cell. Physiol., **134**, 117-123 (1988).

SHERIDAN N.P. and BLOCK E.R.

Serotonin transport and fluidity in plasma membrane vesicles : Effect of hyperoxia
Am. J. Physiol., **254**, C781-C787 (1988).

SHECHTER E.

Dans : "Membranes biologiques : structure - transports - bioénergétique", Masson Editeur (1984).

SHEW R.L. and DEAMER D.W.

A nouvel method for encapsulation of macromolecules in liposomes.
Biochim. Biophys. Acta, **816**, 1-18 (1985).

SHINITZKY M.

Membrane fluidity and cellular functions.

Dans : "Physiology of membrane fluidity", Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1-39 (1984).

SINGER S.J. and NICOLSON G.L.

The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science, **175**, 720-731 (1972).

SMOLUCHOWSKY M.V.

Z. Physik. Chem. **92**, 129- (1917).

SQUIER T.C., HUGHES S.E. and THOMAS D.D.

Rotational dynamics and protein-protein interactions in the Ca-ATPase mechanism.
J. Biol. Chem., **263**, 9162-9170 (1988).

SRIVASTAVA S., PHADKE R.S. and GOVIL G.

Effect of incorporation of drugs, vitamins and peptides on the structure and dynamics of lipid assemblies.
Mol. Cel. Biochem., **91**, 99-109 (1989).

STEVENS B.

Solute reencounter effects.

J. Phys. Chem., **85**, 3552-3554 (1981).

STUBBS C.D., KOUYAMA T., KINOSITA K.J. and IKEGAMI A.

Effect of double bonds on the dynamic properties of the hydrocarbon region of lecithin bilayers.
Biochemistry, **20**, 4257 (1981).

SUNAMOTO J., NAGAI K., GOTO M. and LINDMAN B.

Deuterium nuclear magnetic resonance studies on the interaction of glycophorin with 1,2-dimyristoylamido-1,2-deoxyphosphatidylcholine.
Biochim. Biophys. Acta, **1024**, 220-226 (1990).

TATE S.S. and MEISTER A.

γ -glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects.
Mol. Cell. Bioch., **39**, 357-368 (1981).

TENCHOV B.G., YANEV T.K., TIHOVA M.G. and KOYNOVA R.D.

A probability concept about size distributions of sonicated lipid vesicles.
Biochim. Biophys. Acta, **816**, 122-130 (1985).

TOPLAK H., BATCHIULIS V., HERMETTER A., HUNZIKER T., HONEGGER U.E. and WIESMANN U.N.

Effects of culture and incubation conditions on membrane fluidity in monolayers of cultured cells measured as fluorescence anisotropy using trimethylammoniumdiphenylhexatriene (TMA-DPH).

Biochim. Biophys. Acta, **1028**, 67-72 (1990).

TRITTMATER P., ENOCH H.G. and FLEMING P.

Methods Enzymol., **52C**, 206-211 (1978).

TROTTER P.J. and STORCH J.

3-[*p*-(6-phenyl)-1,3,5-hexatrienyl]phenylpropionic acid (PA-DPH) : characterization as a fluorescent membrane probe and binding to fatty acid binding proteins.

Biochim. Biophys. Acta, **982**, 131-139 (1989).

TRUCHOT R., GOUDONNET H. and MOUNIE J.

Effets d'inducteurs sur le cytochrome P-450 microsomal et la glycérophosphate deshydrogénase hépatique chez le rat normal ou thyroïdectomisé traité ou non par la 3,5,3'-triiodo-L-thyronine.

J. Pharmacol., **10**, 325-336 (1979).

TURLEY W.D. and OFFEN H.W.

Micellar microfluidities at high pressures.

J. Phys. Chem., **89**, 2933-2937 (1985).

VAN BLITTERSWIJK W.J., VAN HOEVEN R.P. and VAN DER MEER B.W.

Lipid structural order parameters in biomembrane derived from steady-state fluorescence polarization measurements.

Biochim. Biophys. Acta, **644**, 323 (1981).

VANCE D.E. and VANCE J.E.

Biochemistry of lipids and membranes. Benjamin/cummings, New York (1985).

VAN DEN ZEGEL M., BOENS N. and DE SCHRYVER F.C.

Fluorescence decay of 1-methylpyrene in small unilamellar L- α -dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. A temperature and concentration dependence study.

Biophys. Chem., **20**, 333-345 (1984).

VAN DER AUWERAER M., DEDEREN J.C., GELADE E. and DE SCHRYVER F.C.

Fluorescence quenching in micelles : a theoretical model for the intramolecular first order quenching rate constant.

J. Chem. Phys., **74**, 1140-1147 (1981).

VANDERKOOI J.M., FISCHKOFF S., ANDRICH M., PODO F. and OWEN C.S.

Diffusion in two dimensions : comparison between diffusional fluorescence quenching in phospholipid vesicles and in isotropic solution.

J. Chem. Phys., **63**, 3661-3666 (1975).

VANDERKOOI J.M. and CALLIS J.

Pyrene : a probe of lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes.

Biochemistry, **13**, 4000-4006 (1974).

VAN ETCELD C., DE KRUIFF B., VERKLEIJ A., LEUNISSEN-BIJVELT J. and DE GIER J.

Gramicidin induces the formation of non bilayer structures in phosphatidylcholine dispersions in a fatty acid chain length dependent way.

Biochim. Biophys. Acta, **692**, 126-138 (1982).

VAZ W.L.C., STUMPEL J., HALLMANN D., GAMBACORTA A. and DE ROSA M.

Bounding fluid viscosity and translational diffusion in a fluid lipid bilayer.

Eur. Biophys. J., **15**, 111-115 (1987)

- VAZ W.L.C., DERZKO Z. and JACOBSON K.
Photobleaching measurements of the lateral diffusion of lipids and proteins in artificial phospholipid bilayer membranes.
Cell. Surf. Rev., **8**, 83-135 (1982).
- VEIRO J.A., NAMBI P., HEROLD L.L. and ROWE E.S.
Effect of *n*-alcohols and glycerol on the pretransition of dipalmitoylphosphatidylcholine.
Biochim. Biophys. Acta, **900**, 230-238 (1987).
- VEKSHIN N.L.
On measuring biomembrane microviscosity using pyrene luminescence in aerobic conditions.
J. Biochem. Biophys. Methods, **15**, 97-104 (1987).
- VEREB G., PANYI G., BALAZS M., MATYUS L., MATKO J. and DAMJANOVICH S.
Effect of cyclosporin A on the membrane potential and Ca^{2+} level of human lymphoid cell lines and mouse thymocytes.
Biochim. Biophys. Acta, **1019**, 159-165 (1990).
- VERKLEIJ A.J., ZWAAL R.F.A., ROELOFSEN B., COMFURIUS P., KASTELIJN D. and VAN DEENEN L.L.M.
The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze etching electron microscopy.
Biochim. Biophys. Acta, **323**, 178-193 (1973).
- VINCENT S.J.
Interaction of ferricytochrome *c* with zwitterionic phospholipid bilayers : a raman spectroscopic study.
Biochemistry, **27**, 3438-3446 (1988).
- VIRET J. and LETERRIER F.
Le concept de fluidité membranaire.
Dans : "Techniques en Biorhéologie", Vol. **3**, INSERM Ed., Paris, 283-288 (1986).
- VIRIOT M.L., GUILLARD R., KAUFMANN I., ANDRE J.C. and SIEST G.
Pressure effects on the apparent viscosity of the artificial DPPC and DMPC membranes using intramolecular excimer probe.
Biochim. Biophys. Acta, **733**, 34-38, (1983_a).
- VIRIOT M.L., BOUCHY M., DONNER M. and ANDRE J.C.
Kinetics of partly diffusion controlled reactions. XII. Intramolecular excimers as fluorescent probes of the "microviscosity" of living cells.
Photobiochem. Photobiophys., **5**, 293-306 (1983_b).
- VIRIOT M.L., BOUCHY M., DONNER M. and ANDRE J.C.
Problèmes posés par l'emploi de dipyrénylalcane comme sondes fluorescentes pour caractériser la cohésion lipidique de membranes biologiques.
J. de Chimie Physique, **79**, 525-529 (1982).
- VOGEL H.
Incorporation of melittin into phosphatidylcholine bilayers. Study on binding and conformational changes.
FEBS Lett., **134**, 37-42 (1981).
- VOLLHERBST-SCHNECK K., SANDS J.A. and MONTENECOURT B.S.
Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824.
Appl. Environ. Microbiol., **47**, 193-194 (1984).

- WANG F.W., LOWRY R.E. and GRANT W.H.
Novel excimer fluorescence method for monitoring polymerization : 1. Polymerization of methyl methacrylate.
Polymer, **25**, 690-692 (1984).
- WIEDMANN T.S., TROUARD T., SHEKAR S.C., POLIKANDRITOU M. and RAHMAN Y.
Interaction of cyclosporin A with dipalmitoylphosphatidylcholine.
Biochim. Biophys. Acta, **1023**, 12-18 (1990).
- WILLIAMS B.W., SCOTTO A.W. and STUBBS C.D.
Effect of proteins on fluorophore lifetime heterogeneity in lipid bilayers.
Biochemistry, **29**, 3248-3255 (1990).
- WILLIAMS B.W. and STUBBS C.D.
Properties influencing fluorophore lifetime distributions in lipid bilayers.
Biochemistry, **27**, 7994-7999 (1988).
- WU E.S. and YANG C.S.
Lateral diffusion of cytochrome P-450 in phospholipid bilayers.
Biochemistry, **23**, 28-33 (1984).
- YONEI S., TODO T. and KATO M.
Evidence for a change in the fluidity of erythrocyte membranes following X irradiation by measurements of pyrene excimer fluorescence.
Radiation Res., **80**, 484-493 (1979).
- ZACHARIASSE K.A., VAZ W.L.C., SOTOMAYOR C. and KUHNLE W.
Investigation of human erythrocyte ghost membranes with intramolecular excimer probes.
Biochim. Biophys. Acta, **688**, 323-332 (1982).
- ZACHARIASSE K.A.
Intramolecular excimer formation with diarylalkanes as a microfluidity probe for sodium dodecylsulphate micelles.
Chem. Phys. Lett., **57**, 429-432 (1978).
- ZACHARIASSE K.A. and KUHNLE W.
Intramolecular excimers with α,ω -diarylalkanes.
Z. Physik. Chem. Neue Folge, **101**, 267-276 (1976).
- ZANA R. and WEILL C.
Effect of temperature on the aggregation behaviour of nonionic surfactants in aqueous solutions.
J. Physique Lett., **46**, L953-L960 (1985).
- ZULAUF M., WECKSTROM K., HAYTER J.B., DEGIORGIO V. and CORTI M.
Neutron scattering study of micelle structure in isotropic aqueous solutions of poly(oxyethylene) amphiphiles.
J. Phys. Chem., **89**, 3411-3417 (1985).

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur MAGDALOU, Directeur de recherches CNRS, Centre du Médicament Nancy,
Monsieur DUPORTAIL, Chargé de Recherche CNRS, ULP Illkirsch.

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur NAOUMI Abderrahim

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse
intitulée :

"Effets de biomolécules sur la diffusion de sondes fluorescentes dans des milieux organisés"

en vue de l'obtention du titre de :

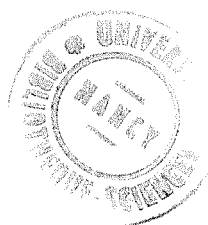
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **"GENIE DES PROCEDES"**

Fait à Vandoeuvre le, 30 Novembre 1990

Le Président de l'I.N.P.L.,
M. GANTOIS





Summary



D 095 054633 1

Proteins-lipids interactions govern numerous physiological functions. So, a better knowledge of these interactions would be the key for understanding an important number of biological processes.

To study such systems and simultaneously avoid the complexity of the membrane structure, photophysic investigations were carried out on pure phospholipids assemblies, as models for lipidic matrix of biological membrane.

By fluorescence decay studies of the emissive molecular pyrene probe, lateral diffusion coefficient of pyrene, D_L , was determined in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes : $D_L = 5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, at $T > T_t$ (T_t , phase transition temperature). Further, we have measured the effect of two proteins, $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ and γ -glutamyltransferase, on this coefficient, in DPPC liposomes and shown diminution of D_L with protein concentration increasing.

To do that, D_L was obtained by using a kinetic model, which gives information on transport from fluorescence decay data.

Moreover, fluorescence polarisation and intramolecular excimer fluorescence of dipyrenylpropane (P_3P) were applied to study two types of interactions : first, cyclosporin A-DPPC and second, thyroid hormones and thyromimetic analogs-microsomal membranes.

In the first case, we observed that cyclosporin A was ineffective on liposomes phase transition, by using fluorescence polarisation of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and 1-[4-(trimethylammonio)phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH). But, this drug induced a decreasing of the ratio I_E/I_M of P_3P (I_E , excimer fluorescence intensity; I_M , monomer fluorescence intensity), which agrees with a fluidizing effect.

In the second case, DPH fluorescence polarisation measurements in liver microsomes from witness rats and thyroid hormones and analogs treated rats have shown that these compounds did not change the fluidity of the microsomal membrane (according to the ability of the sensor used).

Finally, we applied these three spectroscopic approaches to investigate the effects of temperature and concentration on the structure and microviscosity of non-ionic surfactants, such as $\text{C}_{12}(\text{EO})_6$ and $\text{C}_{12}(\text{EO})_8$ (dodecylpolyoxyethyleneglycol monoether).

Résumé

Les interactions protéines-lipides sont responsables de nombreuses fonctions physiologiques; une meilleure connaissance de ces interactions est la clef de la compréhension de nombreux processus biologiques.

Pour étudier de tels systèmes mais éviter la complexité de la structure membranaire, nous avons choisi de réaliser une étude photophysique sur des membranes modèles constituées de phospholipides purs, prises comme support de la matrice lipidique de la membrane biologique.

Ainsi, par l'étude du déclin de fluorescence du pyrène, sonde moléculaire émissive utilisée dans le présent travail, nous avons déterminé le coefficient de diffusion latérale (D_L) du pyrène dans des liposomes de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), $D_L = 5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, à $T > T_M$ (T_M , température de transition de phase). Ensuite, nous avons mesuré l'effet de deux protéines, la $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$ et la γ -glutamyltransférase sur ce coefficient dans des liposomes de DPPC et mis en évidence la décroissance de D_L avec l'augmentation de la concentration en protéines.

Pour ce faire, D_L est obtenu à l'aide d'un modèle cinétique qui permet d'extraire une information sur le transport dans des déclins de fluorescence.

Par ailleurs, l'utilisation de la polarisation de fluorescence et la fluorescence d'excimères intramoléculaires du dipyrénylpropane (P_3P) nous a permis d'étudier les interactions cyclosporine A/DPPC d'une part, et hormones thyroïdiennes et composés thyromimétiques apparentés/membranes microsomaux, d'autre part.

Dans le premier cas, la polarisation de fluorescence du 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) et du 1[4-(triméthylamino)phényl]-6-phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH) montre que la cyclosporine A est sans effet sur la transition de phase des liposomes, alors que, cette drogue entraîne une diminution du rapport I_E/I_M (I_E , intensité de fluorescence de l'excimère; I_M , intensité de fluorescence du monomère) du P_3P à $T > T_M$, ce qui est compatible avec un effet fluidifiant.

Dans le second cas, les mesures de la polarisation de fluorescence du DPH dans des microsomes de foie de rats témoins et de rats traités par des hormones thyroïdiennes et analogues montrent que ces produits n'ont aucun effet sur la fluidité membranaire, telle qu'elle est estimée par cette méthode.

Enfin, nous avons utilisé les trois approches spectroscopiques pour étudier l'influence de la température et de la concentration sur la structure et la microviscosité de tensio-actifs non ioniques, tels que $\text{C}_{12}(\text{EO})_6$ et $\text{C}_{12}(\text{EO})_8$ (monododécyléther de polyoxyéthylène).