

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE PRESENTE A
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
GAETAN L'HEUREUX

UTILISATION DE SONDES FLUORESCENTES
DANS LA DETERMINATION DE LA CONSTANTE
DIELECTRIQUE DE LA REGION HYDROCARBONEE
DE VESICULES LIPIDIQUES

FEVRIER 1987

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

"..., ce n'est pas dans la
science qu'est le bonheur,
mais dans l'acquisition de
la science!"

Edgar A.Poe

RESUME

Le but de ce travail était d'évaluer la polarité (constante diélectrique, ϵ), de la région hydrophobe de membranes biologiques. La détermination du gradient de polarité traversant les membranes est d'un intérêt particulier dans la caractérisation de ces systèmes biologiques, du transfert d'énergie membranaire en relation avec le processus de la photosynthèse, et du degré d'hydratation de la région hydrocarbonée des membranes. Le modèle membranaire utilisées était des vésicules unilamellaires de petit diamètre, constituées de phosphatidylcholine (PC) extrait de jaunes d'oeufs. Deux sondes fluorescentes sensibles à la polarité de leur environnement ont été utilisées, le pyrène et l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque (PY-16). Le spectre d'émission du monomère du pyrène se situe entre 360 et 400 nm et présente cinq bandes vibrationnelles distinctes. L'intensité de la première bande, située à environ 373 nm, est très sensible à la polarité de son environnement. La bande vibrationnelle la moins sensible à la polarité est la troisième, vers 384 nm; en conséquence l'indice de polarité utilisé est le rapport d'intensité I/III. Le spectre d'émission du PY-16 est légèrement décalé vers le rouge et les variations du rapport I/III sont moins importantes, par contre la localisation du fluorophore est certaine, celui-ci se retrouvant au coeur de la région hydrophobe. Le profil d'incorporation du pyrène libre, dans les vésicules, a été établi et démontre une très légère transition vers 1,0% mol. Au dessus de cette concentration une

large bande apparaît sur le spectre d'émission vers 480 nm, elle est attribuée à la formation d'excimères. En conséquence, l'utilisation du pyrène comme sonde de polarité doit s'effectuer à des concentrations inférieures à 1,0% mol. Le rapport I/III mesuré avec le pyrène dans les vésicules indique également une transition en fonction de la concentration de sondes incorporées vers 1,0% mol. Le rapport I/III du pyrène dans les vésicules s'accroît constamment au-dessus de 1,0% mol, en-dessous de cette concentration critique il est fixe à une valeur $I_{\text{exc}}/I_{\text{mon}}=1,21$. Suite à ces observations, nous concluons qu'il serait possible que la position du pyrène dans la bicouche lipidique varie selon la concentration de sondes incorporées. Au plus fortes concentrations de pyrène incorporé, nous avons également analysé les variations du rapport excimère/monomère ($I_{\text{exc}}/I_{\text{mon}}$). Les résultats démontrent une augmentation du rapport $I_{\text{exc}}/I_{\text{mon}}$ lorsque la concentration des vésicules en solution augmente. Ceci indique qu'il existe des interactions entre les molécules de pyrène lors de collisions entre vésicules. Avec le PY-16, le rapport $I_{\text{exc}}/I_{\text{mon}}$ ne varie pas avec la concentration de vésicules. Le rapport I/III mesuré avec le PY-16 à faible concentration dans les vésicules, et comparé avec divers rapports obtenus dans des solvants de diverses polarités, suggère une valeur de constante diélectrique comprise entre $\epsilon=4$ et 10 pour la région hydrocarbonée des vésicules de PC. Ce résultat est plus élevé que la valeur théorique généralement admise, soit $\epsilon \approx 2$. Ceci peut être expliqué en termes de perméabilité membranaire aux molécules d'eau. Le temps de résidence des molécules d'eau pouvant être suffisamment long pour augmenter la constante diélectrique de la région des chaînes hydrocarbonées. L'hypothèse de l'hydratation de la molécule de pyrène est également considérée.

AVANT PROPOS

Parfois je me demande quelle voix malicieuse m'a poussé vers une maîtrise en biophysique. Sans doute le hasard puisque je ne crois pas au destin.

Me voilà donc, après plus de deux ans de travail, à la limite de cette maîtrise. Deux années de recherche exaltante. Et puis il y a eu la rédaction du texte qui suit, stérile et ennuyeux. Mais qu'importe les événements, tant qu'il y aura des gens derrière eux. Ce sont ces personnes que je veux remercier maintenant.

D'abord mon directeur de thèse, Mario Fragata, pour son attention, sa grande disponibilité et sa confiance. Ensuite, un ami inestimable, François Bellemare, qui m'a toujours bien conseillé lors de ma recherche expérimentale. Je remercie également tous mes autres ami(e)s à la présence généreuse.

Finalement, je m'en voudrais d'oublier mes parents, qui m'ont toujours apporté un soutien chaleureux.

II. METHODES EXPERIMENTALES

II.1. Matériaux.....	13
II.2. Préparation des vésicules.....	14
II.3. Mesure de fluorescence.....	20
II.4. Dosage des lipides et du pyrène.....	24

III. FLUORESCENCE DU PYRENE ET DE L'ACIDE (PYRENYL-1)-16**HEXADECANOIQUE EN SOLUTION**

III.1. Généralités.....	28
III.2. Echelles de polarité.....	39

IV. FLUORESCENCE DU PYRENE ET DE L'ACIDE (PYRENYL-1)-16**HEXADECANOIQUE DANS DES VESICULES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE****IV.1. Le pyrène:**

IV.1.1. Incorporation de la sonde.....	43
IV.1.2. Effet de la concentration de pyrène et effet de la dilution des vésicules.....	45
IV.1.3. Effet de l'excimère.....	53
IV.1.4. Evaluation de la constante diélectrique.	54
IV.1.5. Localisation de la sonde.....	56
IV.2. Acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque.....	62

IV.3. Importance de la perméabilité membranaire à l'eau.....	69
IV.4. Discussion.....	71
V. CONCLUSION.....	74
REFERENCES.....	77

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux:

- | | |
|--|----|
| 1. Caractéristiques géométriques des vésicules unilamellaires..... | 8 |
| 2. Composition de la phosphatidylcholine de jaunes d'oeufs..... | 15 |
| 3. Valeurs du rapport I/III du pyrène dans méthanol et n-hexane... | 33 |
| 4. Variation du rapport I/III de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque (PY-16) en solution dans les solvants avec constante diélectrique, ϵ | 36 |
| 5. Différences spectrales entre le pyrène et l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque (PY-16) dans le méthanol..... | 38 |
| 6. Valeurs du rapport I/III dans des systèmes membranaires..... | 50 |
| 7. Valeurs du rapport I/III du pyrène en solution..... | 57 |
| 8. Rapport I/III pour l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque dans les vésicules et valeurs du rapport excimère/monomère..... | 64 |

LISTE DES FIGURES

Figures:

1. Membrane avec transporteurs d'électrons.....	3
2. Schéma d'une vésicule unilamellaire.....	5
3. Structures: phosphatidylcholine, pyrène et acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque.....	11
4. Méthode de préparation des vésicules unilamellaires.....	18
5. Profil d'élution des vésicules unilamellaires sur gel sépharose 4B.....	19
6. Courbe de correction du spectrofluorimètre "SPEX".....	21
7. Courbe standard pour dosage des phosphates	26
8. Courbe standard pour dosage du pyrène	27
9. Spectre d'absorption du pyrène en solution.....	29

10. Spectre d'absorption de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque en solution.....	30
11. Spectres de fluorescence du pyrène en solution.....	32
12. Spectres de fluorescence de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque en solution.....	35
13. Graphique du rapport I/III du pyrène en solution (valeurs littéraires) en fonction de la constante diélectrique ϵ	42
14. Graphique d'incorporation du pyrène dans les vésicules.....	44
15. Spectre de fluorescence du pyrène dans les vésicules.....	46
16. Graphique du rapport I/III en fonction de la concentration de pyrène dans les vésicules.....	49
17. Graphique du rapport excimère/monomère du pyrène en fonction de la concentration de vésicules.....	52
18. Localisation du pyrène dans une membrane.....	59
19. Spectre de fluorescence de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque dans les vésicules.....	63

20. Graphique du rapport I/III de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque en solution en fonction de la constante diélectrique.ε.....	67
21. Graphique du rapport eximère/monomère de l'acide (pyrenyl-1) -16 hexadécanoïque en fonction de la concentration des vésicules.....	68

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

Symboles:

ϵ : constante diélectrique

Abréviations:

PC : phosphatidylcholine

PY-16: acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque

Pi : phosphate

Ie : intensité de l'excimère

Im : intensité du monomère

DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

DCP : dicétyl phosphate

TA : tocophéryl acétate

INTRODUCTION.

I.1. Importance de la polarité des membranes.

La détermination des paramètres diélectriques des membranes naturelles et de leurs modèles est essentielle pour caractériser les propriétés de ces systèmes. Notons l'importance de ces paramètres dans l'organisation structurale des bicouches (Läuger, 1979; Tanford, 1980) ainsi que dans plusieurs processus membranaires tels que canaux ioniques, pompes à protons (Warschell et Russel, 1984) et de l'activité de transfert d'électrons (Ballard et Mauzerall, 1980; Fragata et Bellemare, 1982, 1983; Losev et Mauzerall, 1983).

Ce travail porte sur l'évaluation expérimentale de la polarité (constante diélectrique, ϵ) de la région hydrophobe de modèle membranaire (cf. figure 2). Il est généralement admis que cette région est caractérisée par une très faible polarité, soit $\epsilon \approx 2$; cette évaluation est d'abord basée sur des considérations théoriques (Huang et Levitt, 1977; Ashcroft *et al.*, 1980). Dans un chapitre ultérieur, nous analyserons quelques résultats expérimentaux de même nature.

D'un autre côté, la région des têtes polaires des bicouches possède une polarité beaucoup plus élevée, soit $\epsilon \approx 30$ pour des systèmes

membranaires dans l'état fluide (Bellemare et Fragata, 1980; Iwamoto et Sunamoto, 1981; Lessard et Fragata, 1986). Cette situation confère donc aux membranes un gradient de polarité décroissant des têtes polaires vers l'intérieur de la bicouche. Les variations du profil de polarité des membranes ne sont pas encore clairement élucidées, mais le fait demeure que la chute de polarité est drastique, soit de $\epsilon = 78,5$ (constante diélectrique de l'eau à 25° C, Handbook of Chemistry and Physics, 61st ed., 1980-81, p. E-55) à $\epsilon = 2-10$, puis de nouveau à $\epsilon = 78,5$ sur environ 40 Å, soit l'épaisseur d'une membrane avec ses couches d'hydratation (Huang et Mason, 1978).

L'évaluation de la polarité de la partie interne des bicouches a pour premier objectif une meilleure caractérisation des membranes, ceci en relation directe avec le rendement du transfert d'électrons.

La figure 1 présente un schéma d'une membrane de thylakoïde de chloroplaste comprenant une série de transporteurs d'électrons. C'est ce système qui capte l'énergie lumineuse qui sera ensuite transformée en énergie chimique lors du processus de la photosynthèse. Comme l'indique la figure 1, le transfert d'électrons s'effectue de part et d'autre de la membrane, il est donc important de connaître les propriétés diélectriques des différentes régions de cette membrane. Il va de soi que les reconstitutions membranaires effectuées en laboratoire ne sont pas encore aussi complexes que les systèmes naturels et qu'il doit exister des différences entre les propriétés mesurées dans un modèle et celles des membranes photosynthétiques.

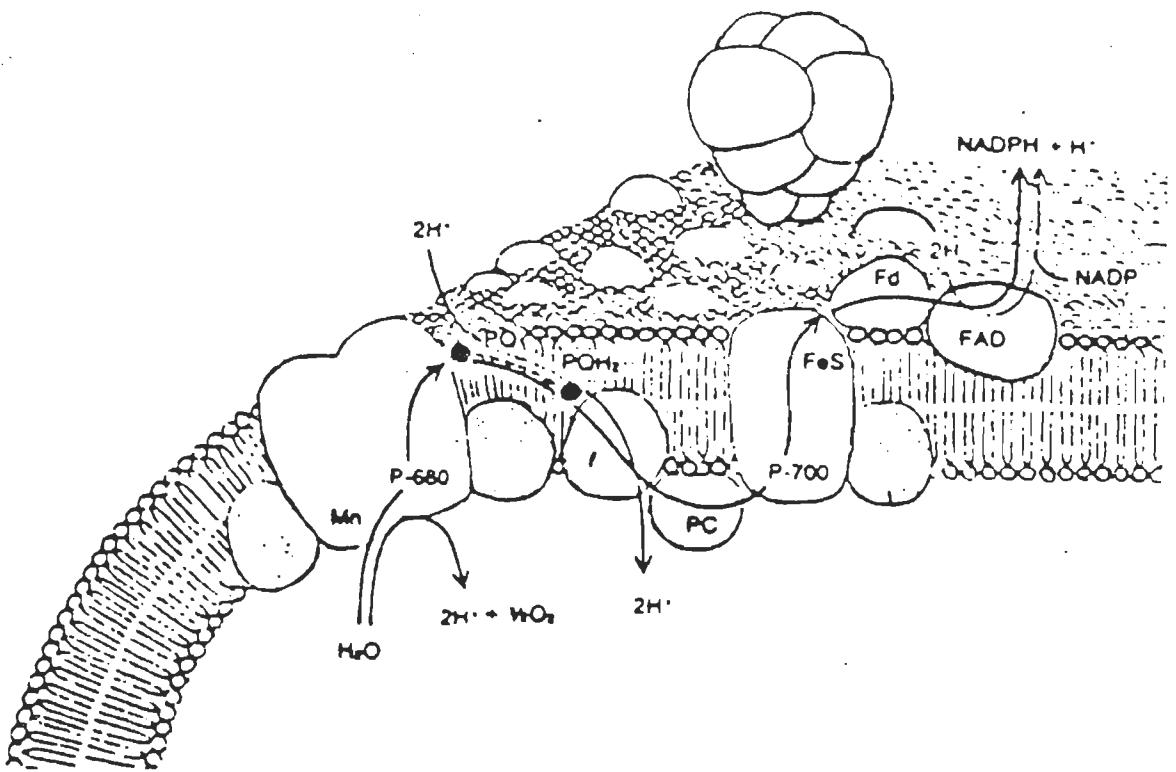


Figure 1. Schéma d'une membrane de chloroplaste avec transporteurs d'électrons. Tiré de : Hinkle P.C. & McCarty E., (1978). p.161.

I.2. Caractéristiques des vésicules unilamellaires.

Les vésicules unilamellaires sont composées d'un feuillet bilipidique formant une structure géométrique sphérique d'un rayon pouvant varier entre 100 et 125 Å (Huang, 1969; Cornell et al., 1982). La figure 2 présente un schéma simplifié d'une vésicule unilamellaire. Le poids moléculaire de ces structures est d'environ 2.0×10^6 g mol⁻¹.

Les vésicules sont formées spontanément lors d'une dispersion aqueuse de lipides à deux chaînes; les lipides à une chaîne hydrocarbonée auront plutôt tendance à former des micelles (Tanford, 1980). Lors de la dispersion, les liposomes produits seront multilamellaires et de rayons variables. Une sonication (traitement aux ultra-sons) permettra d'obtenir des structures unilamellaires et une filtration sur gel séparera les vésicules selon leur grosseur.

Les vésicules qui ont servi de modèles membranaires pour ce travail étaient composées de molécules de phosphatidylcholine (PC) extrait de jaunes d'oeufs dans notre laboratoire (voir structure de la PC à la figure 3 et méthode d'extraction à la section II.1).

Le tableau 1 présente une compilation des caractéristiques géométriques de vésicules unilamellaires préparées selon la méthode de Huang (1969).

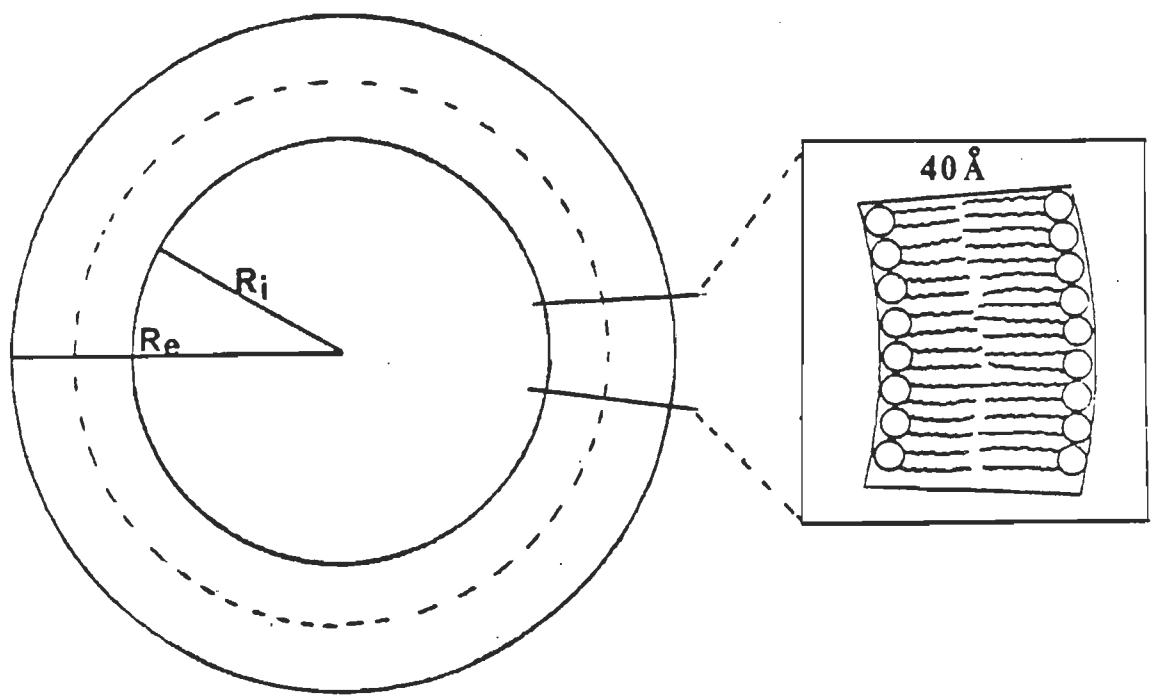


Figure 2. Schéma en coupe d'une vésicule unilamellaire.

R_i : rayon interne, R_e : rayon externe ; épaisseur de la bicouche 40 Å (voir également Tableau : 1).

Ajoutons pour compléter que la surface occupée par la tête polaire varie selon que le lipide se situe sur la face interne ou sur la face externe, les aires occupées sont respectivement 64 \AA^2 et 78 \AA^2 ; ceci est dû à l'encombrement géométrique plus important sur la face interne que sur la face externe. Ce phénomène d'encombrement provoque également une disproportion dans l'épaisseur de chaque monocouche du feuillet bilipidique; la monocouche interne s'étend sur environ 17 \AA alors que la monocouche de la face externe a une épaisseur approximative de 23 \AA (Bellamare, 1981).

Il est important de noter que ces paramètres géométriques varient quelque peu d'un auteur à l'autre selon le modèle et la technique de mesure utilisée (Levine et al., 1968; De Kruijff et al., 1975; Chrzeszczyk et al., 1977; Huang et Mason, 1978). Pour ce qui est de l'épaisseur des membranes les résultats oscillent entre 35 et 45 \AA (voir e.g. Tableau 1), mais ici il faut prendre en considération le fait que certains auteurs incluent les couches d'hydratation dans leur valeur d'épaisseur.

Un autre facteur important doit être examiné, il s'agit de l'état physique de la bicouche. Dû aux nombreuses insaturations de la lecithine (voir tableau 2), la température de transition de ces lipides est passablement basse, soit environ -7° C (Bach et Chapman, 1980). Lors de notre étude, les vésicules se retrouvaient donc toujours dans l'état fluide, assez loin de la température de transition. L'importance de ce paramètre ressort lors des considérations de perméabilité membranaire à

l'eau, la perméabilité augmentant avec la fluidité des membranes (voir discussion à la section IV.3).

Tableau 1

Caractéristiques géométriques de
vésicules unilamellaires*

Paramètre	Dimension
Rayon externe	100-125 Å
Rayon interne	60- 70 Å
Nombre total de molécules	2 600
Nombre de molécules, face externe	1 770
Nombre de molécules, face interne	830
Rapport des surfaces externe/interne	2,6

* D'après Huang C., Biochemistry (1969), 8, 344-352

I.3. Caractéristiques spectroscopiques du pyrène.

Le pyrène a été utilisé comme sonde fluorescente dans une grande variété d'études des systèmes membranaires et micellaires. Notons à titre d'exemple, les études de perméabilité (Grätzel et Thomas, 1973), de diffusion (Vanderkooi et Callis, 1974; Vanderkooi et al., 1975; Schmidt et al., 1976; Yamauchi et Matsushita, 1979; Almgren et Swarup, 1982), de viscosité (Edwards et al., 1976), de gradient osmotique (Surewicz, 1983) et de transition de phase (Schmidt et al., 1976; Wakayama et Kondo, 1981; Sämerharju et al., 1985).

Les premières recherches des effets de solvants sur l'intensité des bandes d'absorption et de fluorescence du pyrène ont été effectuées par Nakajima (1971). Cet auteur a observé dans le spectre de fluorescence du pyrène, une augmentation de l'intensité (relative) de la transition 0-0 à environ 26 800 cm^{-1} lorsque la molécule se trouvait dans un environnement polaire. Depuis, plusieurs auteurs se sont intéressés à la dépendance entre la polarité et les bandes vibrationnelles du spectre de fluorescence du pyrène (Kalyanasundaram et Thomas, 1977a; Lianos et Georgiou, 1979; Lianos et al., 1980; Glushko et al., 1981; Dong et Winnik, 1982).

L'augmentation d'intensité des bandes vibrationnelles résultant d'interactions soluté-solvant a d'abord été décrite par Ham (1953). Les observations de cet auteur concernaient le benzène en mélange binaire

avec le tétrachlorure de carbone et le n-heptane ("Ham Effect", voir Durocher et Sandorfy, 1966). Depuis, l'effet a été observé avec plusieurs hydrocarbones aromatiques possédant une symétrie moléculaire élevée, e.g. le pyrène (Nakajima, 1971), le coronène, le triphénylène (Nakajima, 1974), le 1-12-benzopérylène et le naphtalène (Lianos et al., 1980).

De fait, l'état fondamental du pyrène est totalement symétrique: groupe ponctuelle: D_{2h} , état: A_{1g} . Le premier état électronique, du type $^1B_{3u}$, et le second, $^1B_{2u}$, sont respectivement polarisés le long du petit et du grand axe de la molécule (Kalyanasundaram et Thomas, 1977a) (Voir également la section III.1).

En ce qui concerne le pyrène, des études en spectroscopie infra-rouge et en fluorescence (Kalyanasundaram et Thomas, 1977a; Lianos et Georgiou, 1979) démontrent que l'augmentation relative de la transition 0-0 en milieu polaire résulte d'une réduction de la symétrie moléculaire. Des conclusions similaires ont été notées pour le 1-12-benzopérylène et le naphtalène (Lianos et al., 1980). Nous verrons plus loin l'importance de cette observation avec l'utilisation d'un dérivé du pyrène, l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque (PY-16); dans ce cas le pyrène subit déjà une forte réduction de sa symétrie dû à la présence d'un lien covalent (voir structure chimique dans figure 3).

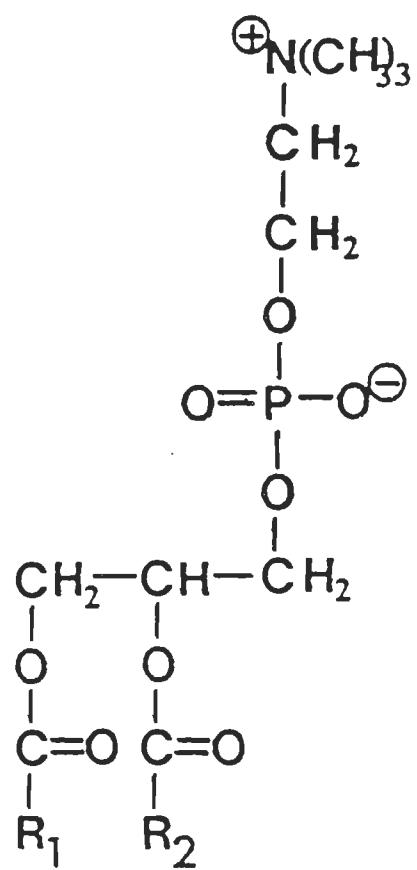


Figure 3a. Structure chimique de la lécithine
(voir composition des chaînes au Tableau : 2).

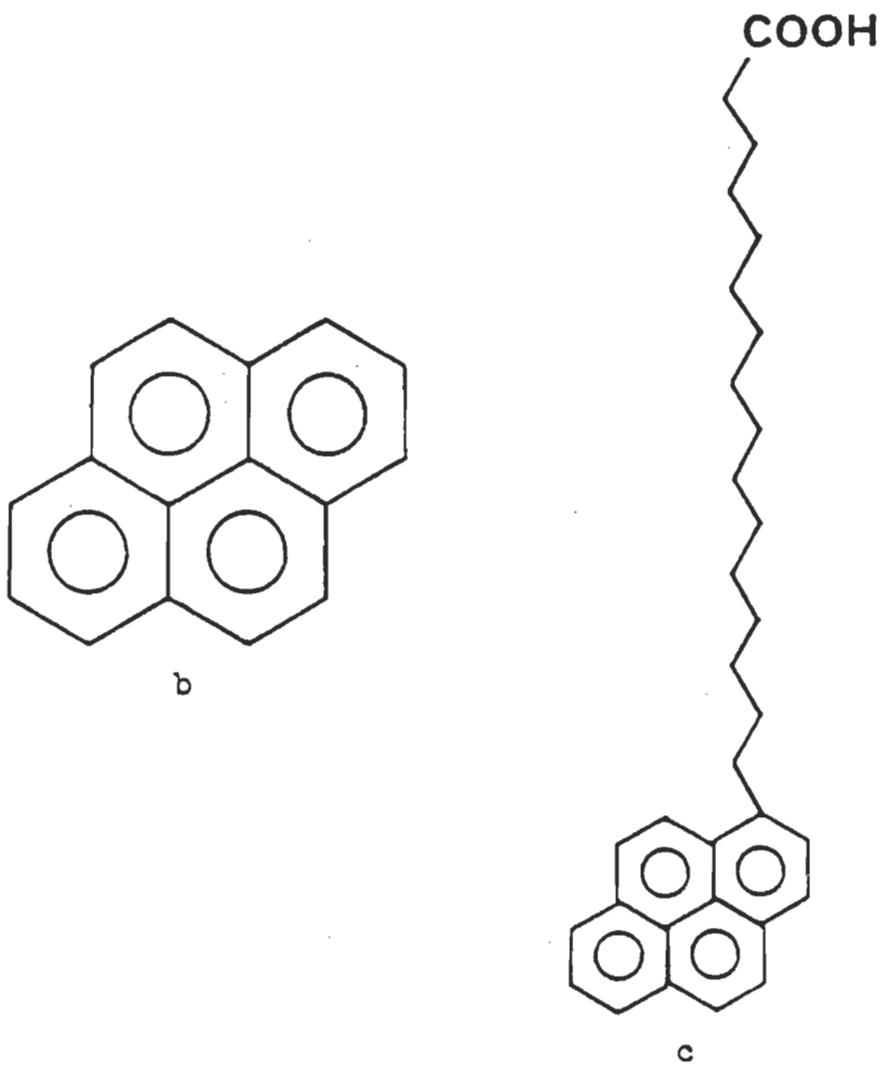


Figure 3b. Structure chimique du pyrène et c)
de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque.

II. METHODES EXPERIMENTALES.

II.2. Matériel.

Le pyrène utilisé au cours de cette étude était un produit de Sigma Chemical Co. (lot # 52F-0094) et il a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice (100-200 mesh, Fisher Scientifique Co.) par une méthode conventionnelle (Gratzel et Thomas, 1973; Kano et al., 1980). Le solvant d'élution était du cyclohexane (Fisher Scientifique Co., grade A.C.S.). Le point de fusion du produit purifié fut évalué à 151° C; les valeurs de la littérature sont 152-153° C (Birks et al., 1966) et 156° C (Handbook of Chemistry and Physics, 61^e éd., 1980-81, p. C-465).

L'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoate provenait de Molecular Probes Inc. et a été utilisé sans purification additionnelle.

Les solvants employés provenaient des endroits suivants: chloroforme: Anachemia, grade accusolv; n-hexane: Burdick and Jackson Lab., grade U.V.; méthanol: Anachemia, grade accusolv; éthanole: tel que fourni (Centre de Recherche en Photobiophysique, U.Q.T.R.); propanol-1 et hexanol-1: BDH, grade analytique. L'eau utilisée était déminéralisée et distillée.

La phosphatidylcholine ayant servi à la préparation des vésicules a été extraite de jaunes d'oeufs selon la méthode de Singleton (1965). La

première étape de l'extraction consiste à faire précipiter la lécithine avec de l'acétone pour éliminer le plus grand nombre de pigments; les phospholipides sont ensuite solubilisés dans l'éthanol, concentrés, puis redissous dans de l'éther de pétrole. Par la suite, les phospholipides sont purifiés par une précipitation à l'acétone froide suivie d'une solubilisation dans l'éther de pétrole; cette étape peut être répétée à quelques reprises. La purification finale consiste en une chromatographie sur alumine (80-200 mesh, Anachemia). La lécithine est injectée, dissoute dans le chloroforme, et éluée avec un mélange chloroforme/méthanol 9:1.

La pureté des fractions est vérifiée par chromatographie sur couche mince de gel de silice en utilisant le mélange chloroforme/méthanol/eau 65:25:4 comme éluant. Les phospholipides sont révélés avec le réactif de Dragendorf (Waldi, 1965).

Le tableau 2 présente la composition en chaînes hydrocarbonées de la lécithine extraite dans notre laboratoire; les données ont été obtenues en chromatographie en phase gazeuse (la PC était solubilisée dans l'hexane). Pour comparaison, les résultats de Singleton et al. (1965) et ceux d'une autre équipe utilisant la même technique d'extraction (Sunamoto et al., 1985) sont également présentés au Tableau 2; dans ces deux cas les résultats ont également été obtenus par chromatographie en phase gazeuse.

Tableau 2

Composition de la lécithine
extraite de jaunes d'oeufs.

Chânes	% (1)	% (2)	% (3)
16:0	37,9	31,0	37,7
16:1	2,1	1,4	3,1
18:0	9,8	14,4	9,2
18:1	34,0	31,1	32,9
18:2	14,0	14,8	17,0
20:4ω6	2,2	5,5	--

(1) Mesures effectuées par M. J.P. Richard, C.R.P., U.Q.T.R.

(2) Sunamoto et al. (1985)

(3) Singleton et al. (1965)

II.2. Préparation des vésicules unilamellaires.

La méthode de préparation utilisée est celle décrite par Huang (1969) avec quelques modifications. Environ 150 mg de PC, conservés à -20° C sous une couche d'acétone, sont dilués dans du chloroforme contenant la quantité désirée de sonde (pyrène ou PY-16). La solution est séchée sous un jet d'azote, puis dispersée dans 10 ml de tampon tris-HCl 0,01M pH:8 0,1M NaCl. La suspension aqueuse est alors constituée de vésicules multilamellaires de dimensions diverses (voir figure 4). La sonication qui suit la dispersion permet de briser les multilamelles pour ne conserver que des vésicules unilamellaires; elle s'effectue dans une cellule réfrigérée (4-10° C) pendant 15-20 minutes sous un jet d'azote pour éviter l'oxydation des lipides; l'appareil (Heat System-Ultrasonics) est réglé à 20 W à la sortie.

Le mélange est alors centrifugé pendant une heure à 100 000g pour éliminer les agrégats lipidiques et les particules de titane dégagées par la sonde à ultra-sons. L'étape suivante consiste à concentrer les vésicules pour donner un volume final de 1-2 ml dans une cellule Amicon. La dernière étape de la purification est une séparation sur un gel de sépharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals). Le volume de la colonne est de 250 ml. La figure 4 schématisme le processus global de la préparation des vésicules.

La figure 5 représente un profil d'élution typique des vésicules

(volume final de 250 ml); débit de la pompe: 15 ml/heure. La fraction I, indiquée sur la figure 5, est constituée de grosses vésicules, la fraction III est homogène en petites vésicules (diamètre: 200-250 Å); la fraction II est un mélange des types I et III. Uniquement les vésicules de la classe III sont conservées pour les mesures de fluorescence.

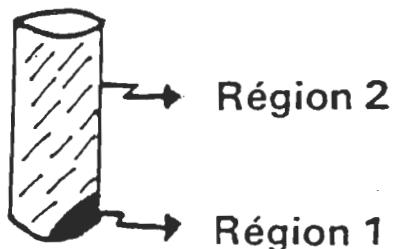
1. Dispersion dans tampon tris-HCl



2. Sonication 15-20 min.



3. Ultracentrifugation 1 Hr 100 000 g



4. Fractionnement sur sepharose 4-B

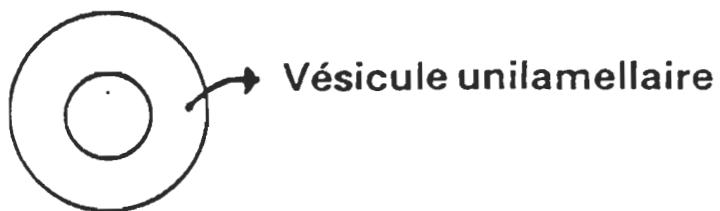


Figure 4. Méthode de préparation des vésicules unilamellaires.

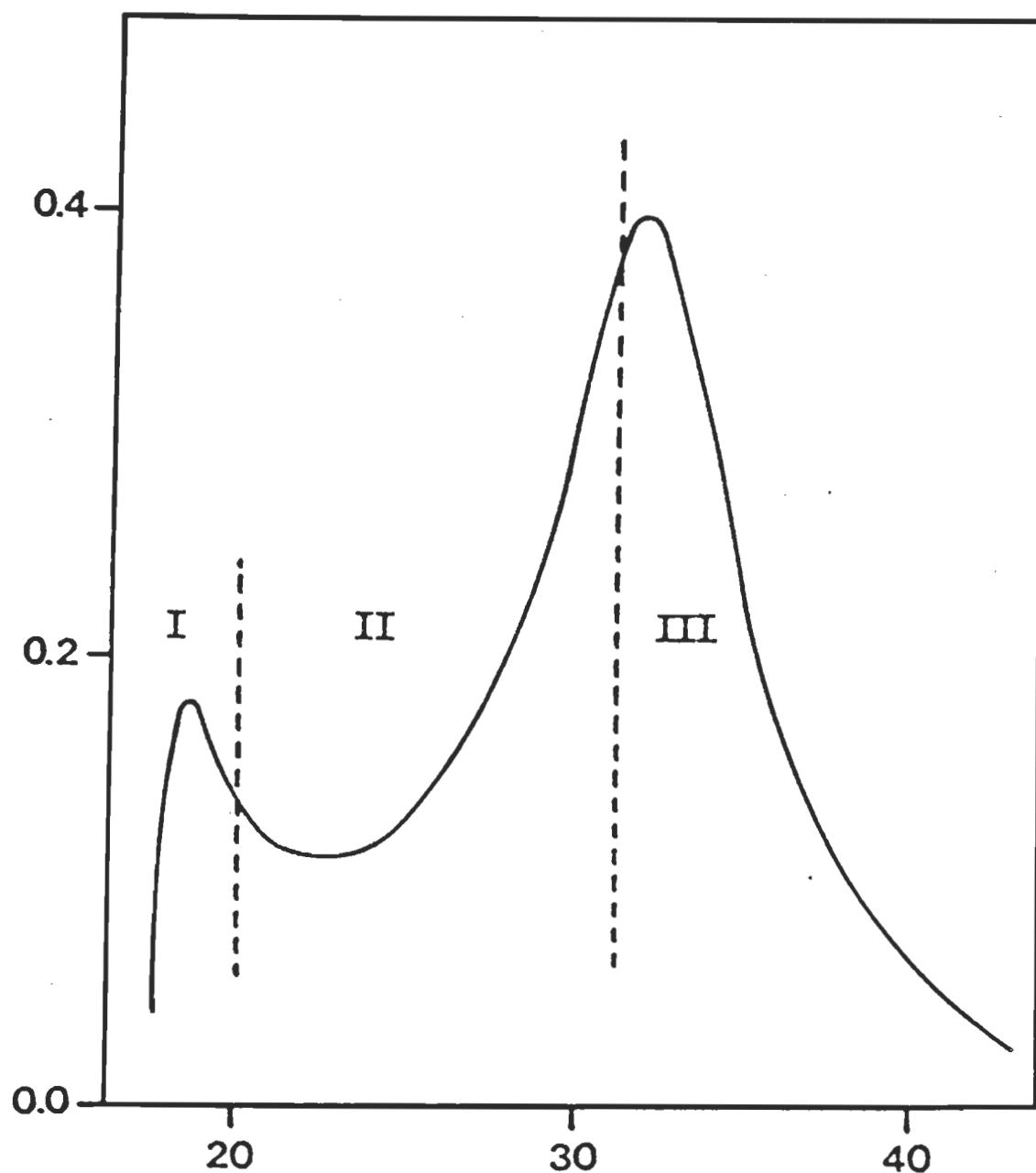


Figure 5. Profil d'élution des vésicules unilamelaires sur gel Sepharose 4B.

II.3. Mesures de fluorescence.

Les mesures de fluorescence ont été effectuées avec un spectrofluorimètre SPEX, Fluorolog 2 (SPEX Industries Inc., New-Jersey, U.S.A.). L'appareil est muni d'une lampe au xénon de 450 W, d'un tube photomultiplicateur R928 (Hamamatsu) et d'un compteur de photons.

Tous les spectres d'émission ont été corrigés à l'aide d'une courbe de correction qui compense pour les variations de sensibilité du tube photomultiplicateur selon les longueurs d'onde. Cette courbe est obtenue en prenant le spectre d'émission d'une lampe standard ayant un profil d'irradiation connu (Optronic Laboratories Inc., modèle 220M, # M-320). Ce profil d'irradiation (spectre d'émission réel) est divisé par le spectre d'émission enregistré par l'appareil et la courbe résultante est normalisée au point minimum, c'est-à-dire la longueur d'onde où le tube photomultiplicateur est le plus sensible. Les spectres d'émission enregistrés par la suite sont multipliés par cette courbe de correction.

La courbe ayant servi à corriger les spectres est présentée dans la figure 6; en encadré on donne la région d'émission des sondes utilisées. Il est à remarquer la perte de sensibilité de l'appareil vers les grandes longueurs d'onde. Cette méthode de correction est plus rapide et plus efficace que l'utilisation d'un standard fluorescent et permet de couvrir une large plage de longueurs d'onde. Une méthode connexe, permettant une vérification de l'exactitude de la méthode de correction, consiste en

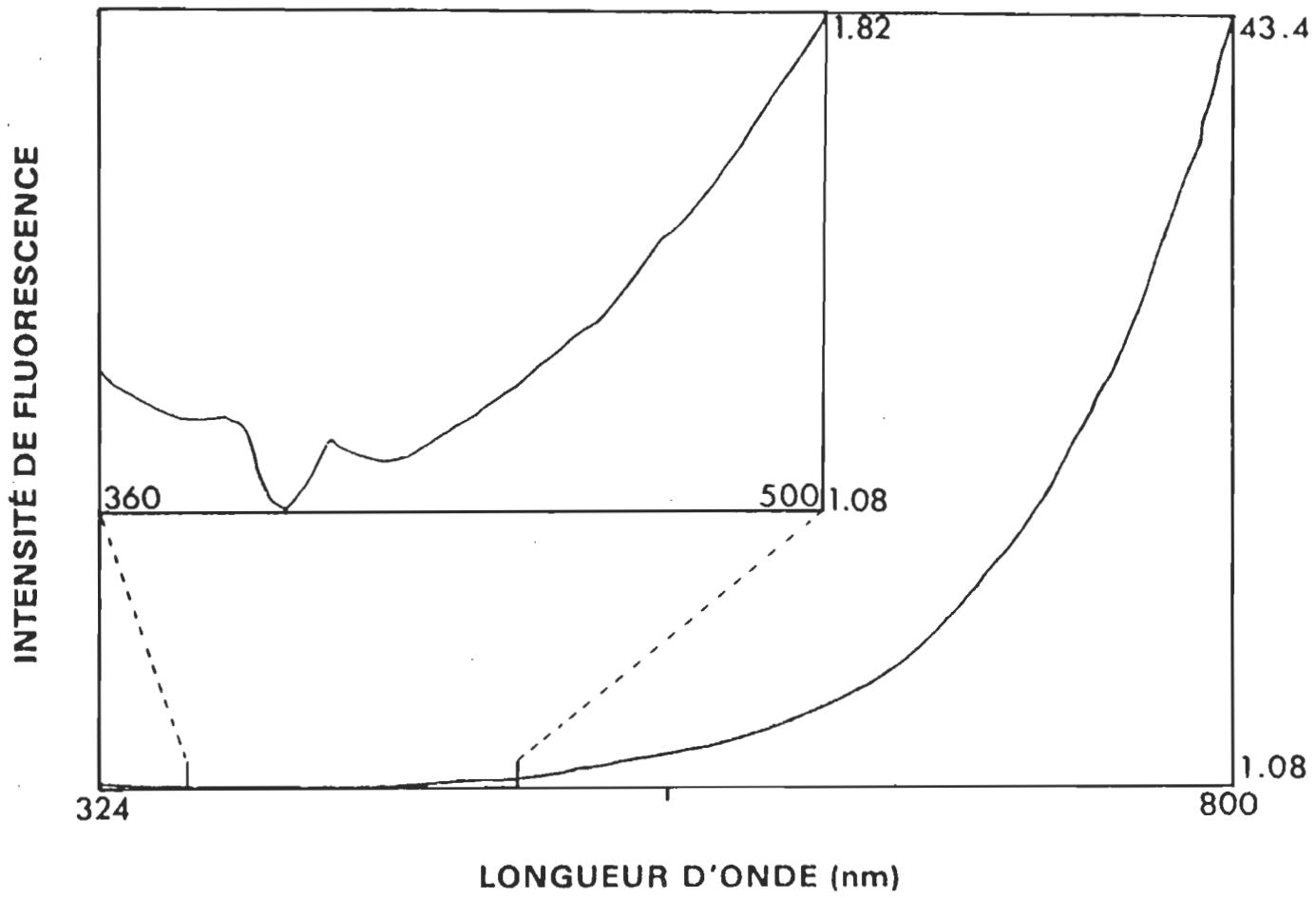


Figure 6. Courbe de correction du spectrofluorimètre "SPEX".

Encadré : région d'émission des sondes utilisées.

l'utilisation d'un détecteur standard placé à la fin du parcours optique et enregistrant un spectre d'émission. Cette technique a été utilisée pour vérifier l'exactitude de la courbe de correction obtenue avec la lampe standard; le détecteur était une photodiode PIN-10DP (United Detector Technology Inc.).

Au cours de ce travail, les conditions expérimentales reliées à l'utilisation du spectrofluorimètre ont été fixées et rigoureusement respectées d'une expérience à l'autre. La longueur d'onde d'excitation était à 335 nm pour le pyrène et à 345 nm pour le PY-16 (voir spectres d'absorption, figures 9 et 10); la bande passante de l'excitation était fixé à 5 nm et celle de l'émission à 2 nm. Nous avons démontré que ces bandes passantes conservaient intacte la structure fine du spectre d'émission du monomère du pyrène tout en donnant une intensité de fluorescence convenable; de plus les variations des rapports d'intensité des bandes vibrationnelles sont négligeables pour des bandes passantes d'excitation comprises entre 2,2 et 6,0 nm. Nous verrons au chapitre 3 (section 3.1) qu'un rapport d'intensité des bandes vibrationnelles peut être associé à un indice de polarité. Les résultats obtenus pour les bandes passantes sont en accord avec les travaux de Glushko et al. (1981). Les spectres d'émission étaient enregistrés par incrément de 0,2 ou 0,5 nm.

Les spectres d'émission des solvants et du tampon étaient soustraits des spectres correspondants avec les sondes grâce à l'utilisation d'un micro-ordinateur (Spectroscopy Laboratory Coordinator, modèle DMIB) qui

corrigeait également les spectres en temps réel avec la courbe de correction en mémoire.

II.4. Dosage des lipides et du pyrène.

Le contenu en PC des vésicules est exprimé en fonction de la teneur dosée en phosphates, selon la méthode de Bartlett (1959) légèrement modifiée. Les lipides subissent d'abord une digestion acide (H_2SO_4) pour libérer les phosphates; les carbones, qui forment un dépôt noir, sont oxydés en chauffant en présence de peroxyde d'hydrogène à 30%. La réaction colorimétrique a lieu entre les phosphates et une solution de molybdate d'ammonium 5% pour former du $(NH_4)_3P(Mo_3O_{10})_4$. Ce complexe est alors réduit par le sulfate de p-méthyl aminophénol (élon) 1%; du bisulfite de sodium 3% est également ajouté à la solution pour éviter la formation d'une coloration verte due à l'élimination incomplète du peroxyde d'hydrogène. La réaction prend une dizaine de minutes et une coloration bleue se développe, l'absorbance des échantillons est mesurée à 660 nm et comparée avec une courbe standard de KH_2PO_4 présenté à la figure 7; la pente de la droite est $0,625 \text{ ml mol}^{-1}$.

La concentration de pyrène dans les vésicules est dosée par fluorimétrie de la façon suivante. Une courbe étalon est obtenue à partir de mesures de fluorescence du pyrène dans un mélange méthanol:'eau, 95:5 en prenant la sommation des intensités de fluorescence du monomère du pyrène (360-400 nm) à chaque 0,2 nm. Les concentrations de pyrène varient entre 0,1 et 2,0 M pour la droite représentée à la figure 8, et la pente est évalué à $1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Par la suite, un volume d'une solution de vésicules est ajouté à 19 volumes de méthanol. Ceci est largement

suffisant pour briser les vésicules et assurer une solubilisation complète du pyrène dans le mélange méthanol:eau 95:5. Les spectres obtenus de cette façon étant identiques à ceux ayant servis à l'élaboration de la courbe standard, il s'agit alors de prendre la sommation des intensités de fluorescence et de comparer les valeurs avec la courbe étalon.

Pour éviter les variations de sensibilité de l'appareil d'une expérience à l'autre, un standard de fluorescence peut être employé. Dans notre cas il s'agissait d'une solution de fluoresceine 0,5 μ M dans NaOH 0,1N. Notons toutefois, que le spectrofluorimètre SPEX Fluorolog 2 est doté d'un standard interne de rhodamine B (Eastman Chemical) dans du propylène glycol (8,0 g l⁻¹) qui corrige pour les variations d'intensité à l'excitation. Dans le cours du travail, les deux méthodes ont été utilisées.

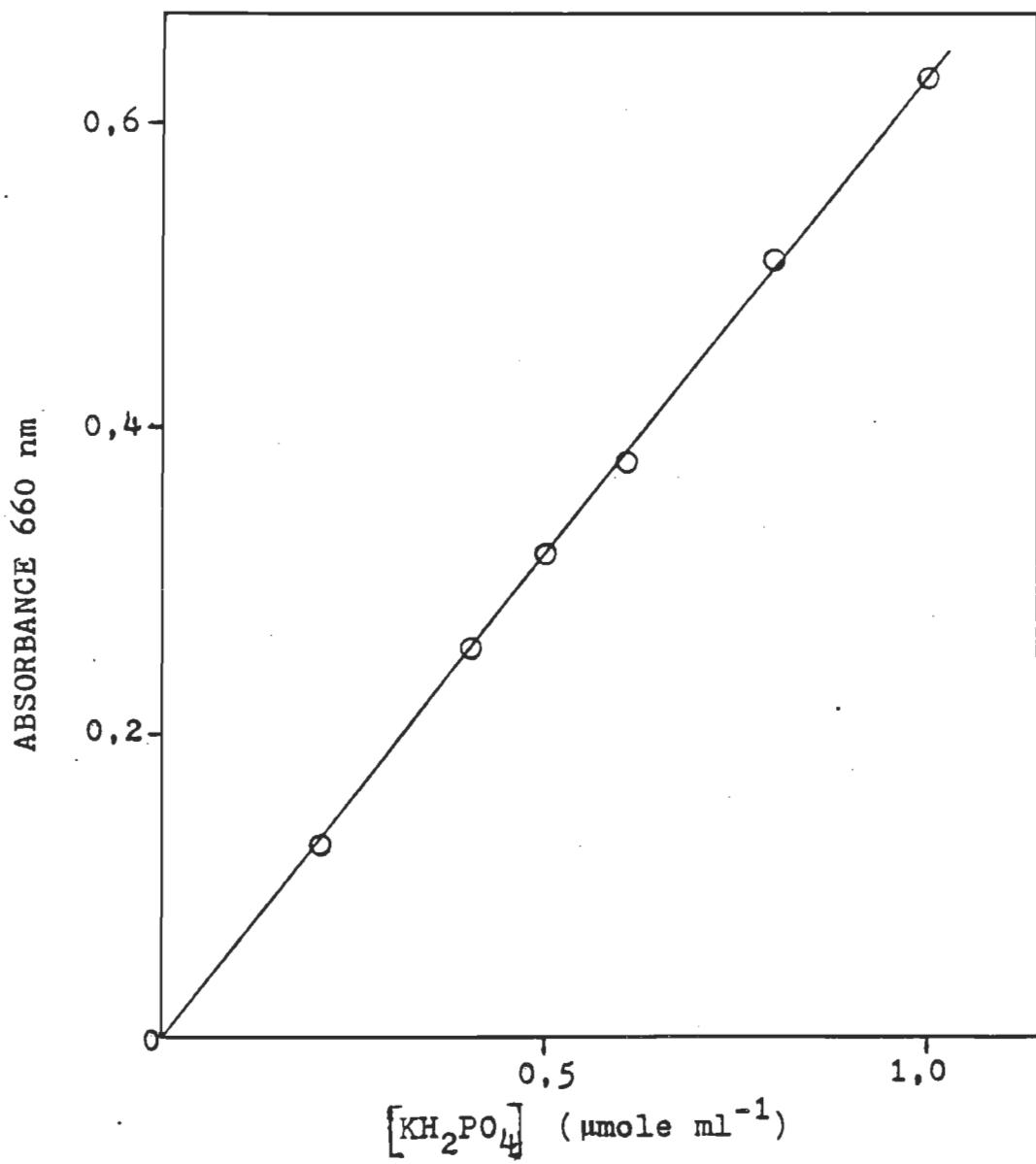


Figure 7. Courbe standard pour dosage des phosphates.

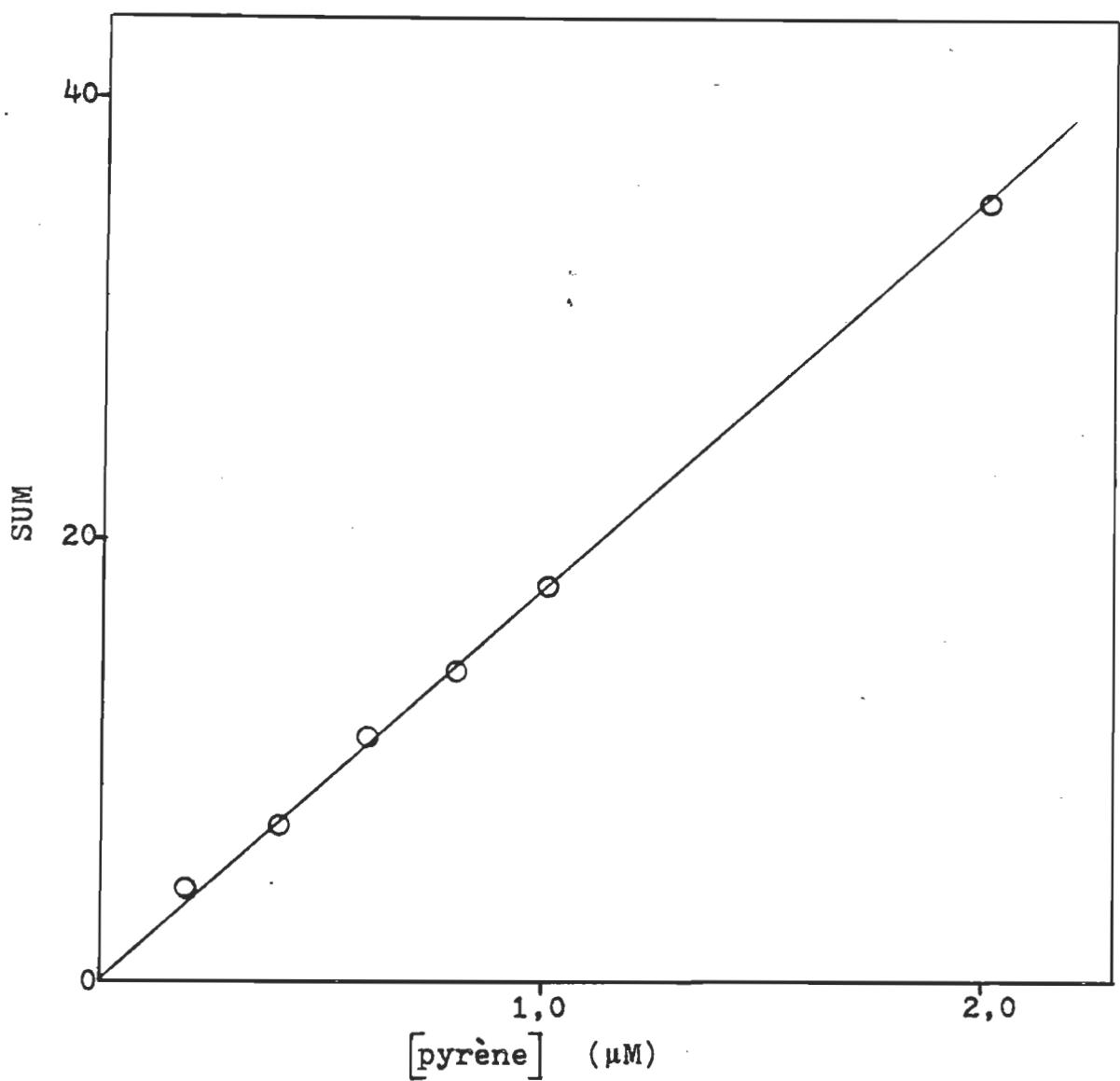


Figure 8. Courbe standard pour dosage du pyrène.

SUM : sommation des intensités de fluorescence
(unité arbitraire).

III. FLUORESCENCE DU PYRENE ET DE L'ACIDE (PYRENYL-1)-16 HEXADECANOIQUE EN SOLUTION.

III.1. Généralités.

Les figures 9 et 10 présentent respectivement les spectres d'absorption des deux sondes utilisées: pyrène et PY-16. On peut observer un léger déplacement bathochromique du PY-16 par rapport au pyrène, cet effet est provoqué par la chaîne à 16 carbones qui délocalise les électrons du groupe pyrenyl et contribue à diminuer l'énergie des transitions (Berlman, 1971).

La fluorescence du pyrène en solution est passablement différente de celle observée dans les membranes. Comme nous l'avons déjà mentionné, l'intensité des bandes vibrationnelles, particulièrement la transition 0-0, varie beaucoup avec la polarité de l'environnement. La façon usuelle pour analyser la variation du spectre de fluorescence en fonction de la polarité consiste à évaluer l'intensité de fluorescence de la transition 0-0 normalisée par l'intensité de la transition 0-2, on parle alors du rapport I/III; la séparation énergétique entre les deux bandes est d'environ 740 cm^{-1} (Glushko *et al.*, 1981; Dong et Winnik, 1982, Offen et Turley, 1982; Surewicz, 1983). Le spectre d'émission du monomère du pyrène comprend cinq transitions distinctes tel qu'indiqué à la figure 11; rappelons que les deux bandes qui nous intéressent sont dénotées par I, bande vibrationnelle interdite de vibration a_g , et III, une bande

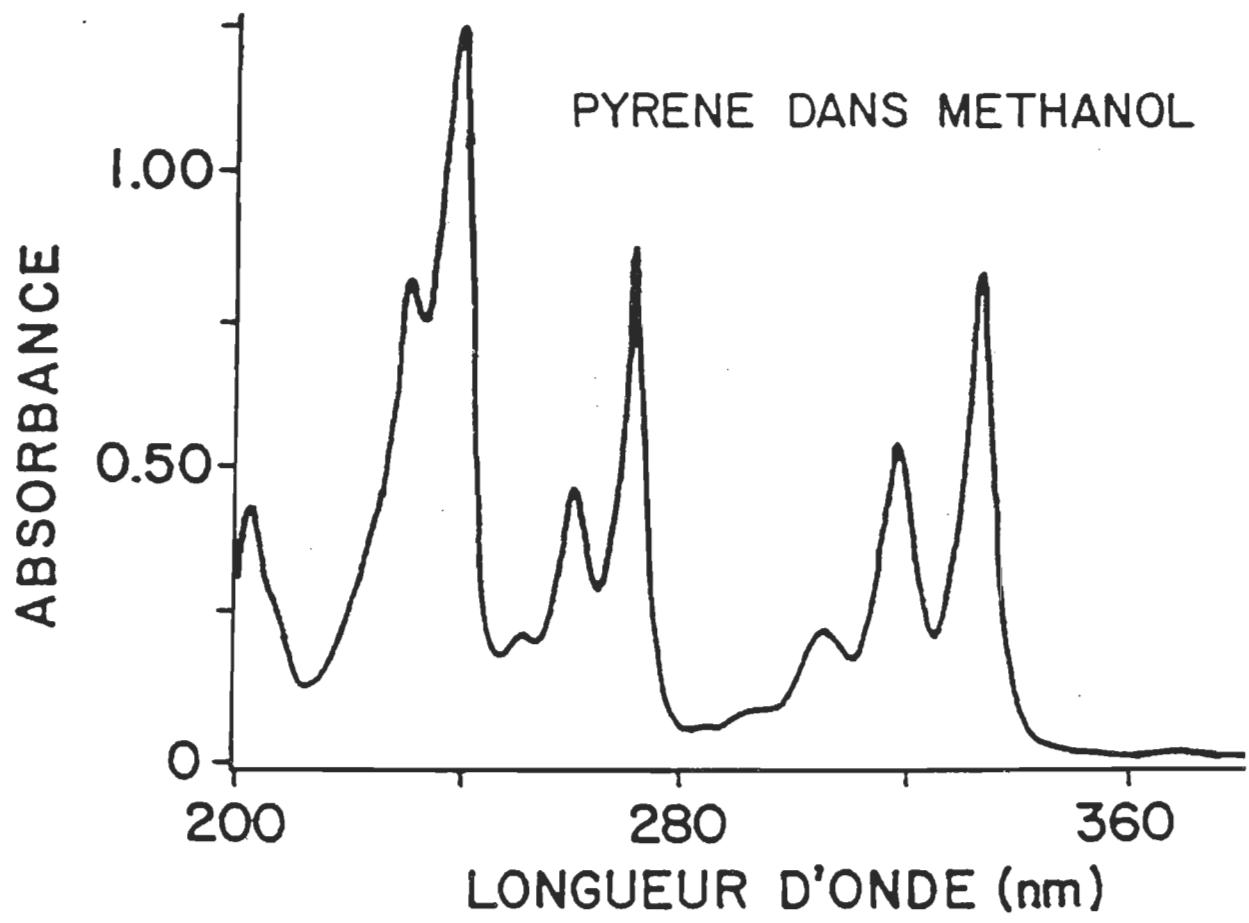


Figure 9. Spectre d'absorption, pyrène 5 μM
dans méthanol.

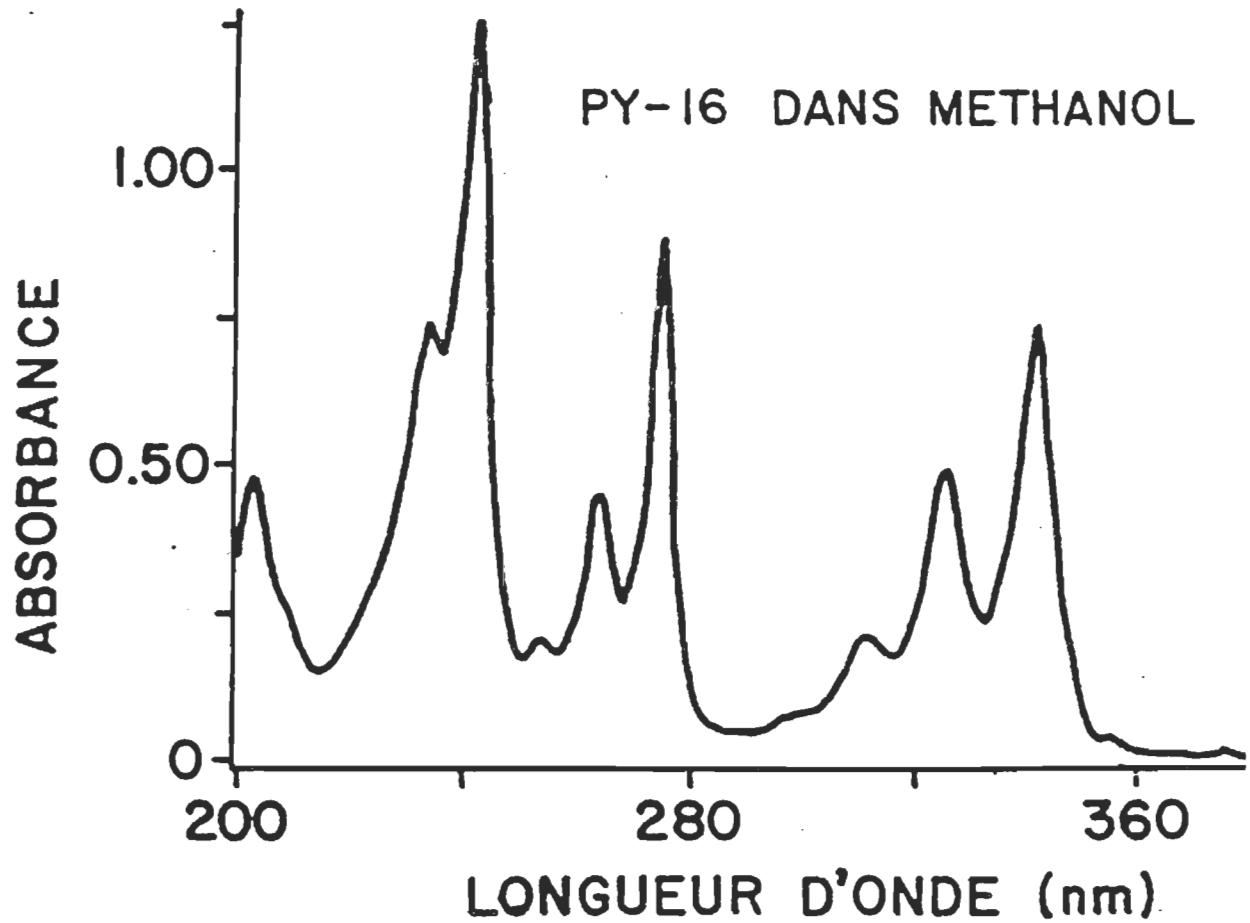


Figure 10. Spectre d'absorption, acide (pyrenyl-1)
-16 hexadécanoïque 5 μ M dans méthanol.

vibrationnelle permise de vibration b_{1g} (Kalyanasundaram et Thomas, 1977a).

A la figure 11 on peut voir l'importance de l'effet d'augmentation d'intensité de la transition O-O avec la polarité. Des solutions contenant 5 μM de pyrène ont été préparées dans deux solvants, un de faible polarité: le n-hexane, et un solvant polaire: le méthanol. Les constantes diélectriques sont respectivement $\epsilon = 1,88$ et $\epsilon = 32,6$ à 25°C (Fragata et Bellémare, 1985). Sur la figure 11, les spectres ont été normalisés au pic III, à environ 384 nm. Les valeurs obtenues pour les rapports I/III sont $0,60 \pm 0,02$ pour l'hexane et $1,40 \pm 0,02$ pour le méthanol. Ces rapports sont stables avec le temps et ne varient pas avec la concentration dans la région de 1-50 μM . De plus, ils sont aisément reproductibles.

Il est très important de souligner que les spectres présentés à la figure 11 sont corrigés; en conséquence, les rapports indiqués sont indépendants de l'appareillage utilisé.

Le tableau 3 résume quelques valeurs retrouvées dans la littérature concernant les rapports I/III du pyrène en solution dans le n-hexane et le méthanol. On peut observer des différences de l'ordre de 10% entre les divers résultats expérimentaux. Ces variations peuvent s'expliquer par des différences dans les conditions expérimentales et/ou par la présence d'impuretés dans le pyrène.

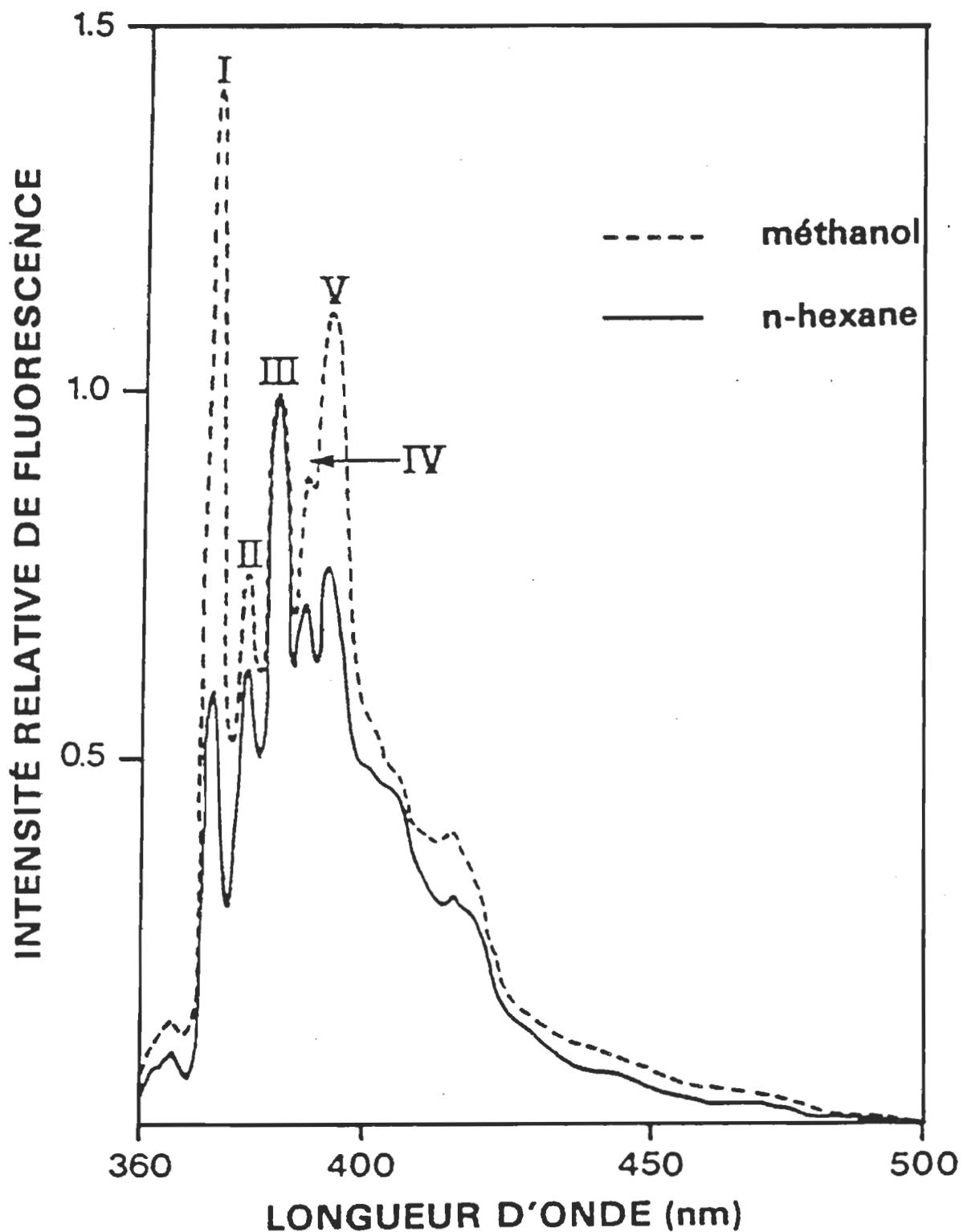


Figure 11. Spectres de fluorescence corrigés
du pyrène en solution.

Tableau 3

Valeurs du rapport I/III du pyrène dans méthanol et n-hexane.

SOLVANT	METHANOL	N-HEXANE	REFERENCE
	1,24	0,55	NAKAJIMA (1971)
	1,33	0,61	KALYANASUNDARAM ET THOMAS (1977)
	1,45	0,62	GLUSHKO ET AL. (1981)
	1,35	0,58	DONG ET WINNIK (1982)
	1,40	0,60	CE TRAVAIL

En ce qui concerne le PY-16, l'effet d'augmentation de la transition 0-0 est observable, mais de moindre intensité que dans le cas du pyrène. Ceci est provoqué par la liaison covalente de la chaîne grasse en position 1 sur le pyrène, cette liaison ayant pour effet de briser le haut niveau de symétrie moléculaire du pyrène et de provoquer une augmentation de l'intensité de la transition 0-0, même en milieu peu polaire.

La réduction de la symétrie, causée par complexation de l'état fondamental du pyrène avec le solvant (Lianos et Georgiou, 1979) est donc diminuée lorsque le pyrène possède un groupe lié.

Certains dérivés sont plus sensibles et montrent un effet de Ham plus marqué, c'est le cas du pyrène-1-méthanol, de l'acide pyrényldodécanoique (Jones et Lee, 1985), du di(1-pyrenylméthyl)éther et du (1-pyrenylméthyl) méthyl éther (Zachariasse *et al.*, 1982). Par contre, le 1,3-di(1-pyrenylméthyl)propane et le 1-méthylpyrène ont des effets moins marqués (Lianos et Georgiou, 1979; Zachariasse *et al.*, 1982).

Les spectres obtenus avec le PY-16 en solution sont présentés à la figure 12, les solvants employés étaient le méthanol, l'éthanol, le propanol-1, l'hexanol-1 et le n-hexane. Le tableau 4 compile les valeurs des rapports I/III pour chaque solvant avec sa valeur de constante diélectrique à 25° C, soit respectivement: 32,6; 24,3; 20,1; 13,3 et 1,88.

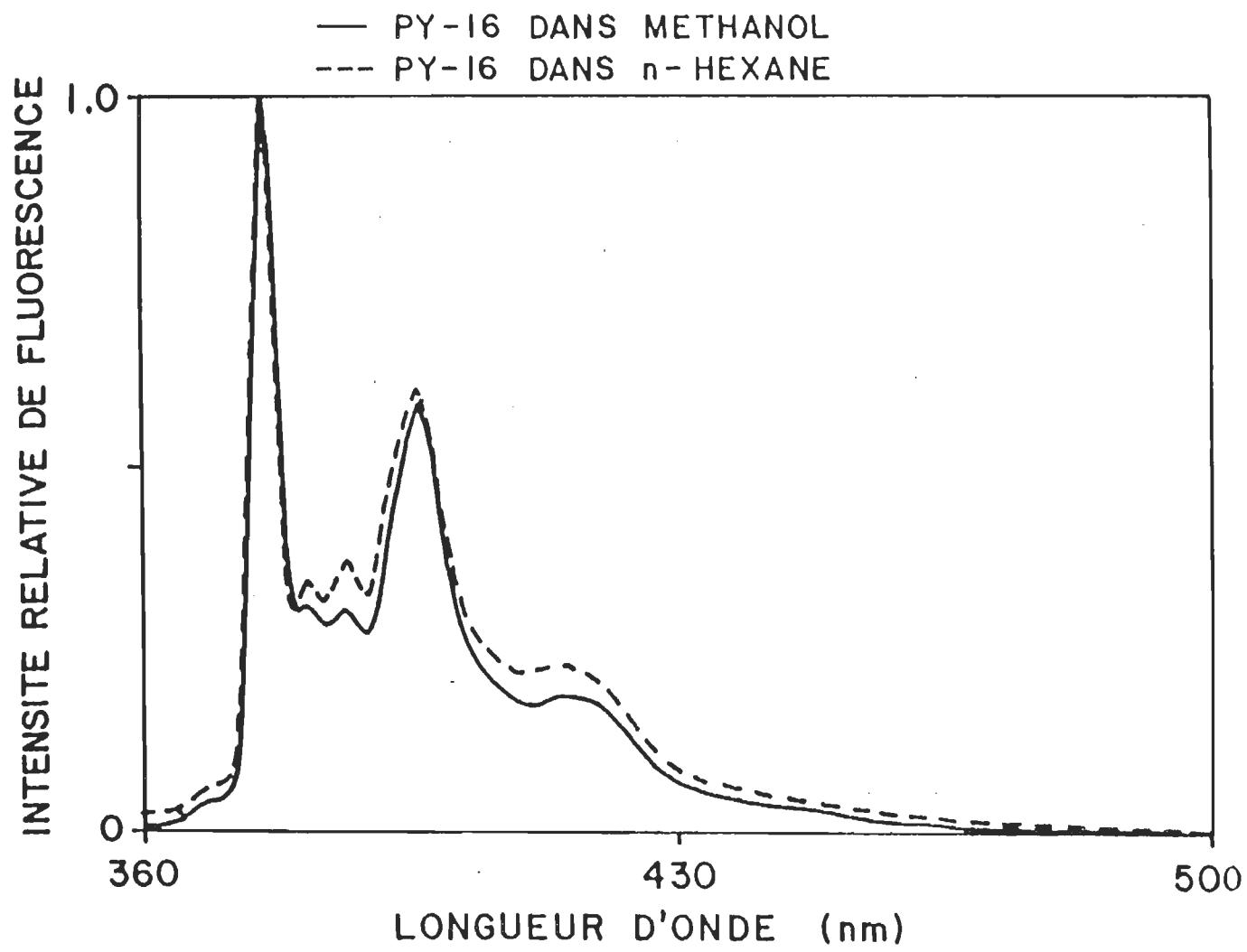


Figure 12. Spectres de fluorescence corrigés de l'acide
(pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque en solution.

Tableau 4

Variation du rapport I/III de l'acide (pyrenyl-1)-16
hexadécanoïque (PY-16) en solution dans les solvants
avec constante diélectrique ϵ .

SOLVANT	ϵ 25° C	I/III
Méthanol	32,6	3,27
Ethanol	24,3	3,19
Propanol-1	20,1	3,09
Hexanol-1	13,3	2,97
N-hexane	1,9	2,65

La principale différence entre les spectres du pyrène et ceux du PY-16 est l'intensité de la transition 0-0; les spectres du PY-16 présentent une bande beaucoup plus intense, ceci en relation avec la perte de symétrie due au lien covalent. Cet aspect est caractéristique des spectres d'émission des dérivés du pyrène (e.g. Lianos et Georgiou, 1979; Waka et al., 1980; Zachariasse et al., 1982; Anderson et al., 1983; Pownall et al., 1983; Jones et Lee, 1985; Kaneda et al., 1985; Somerharju et al., 1985).

Les différences spectrales de fluorescence entre le pyrène et le PY-16 en solution sont résumées au tableau 5. Il est à noter que dans le cas du PY-16, le pic IV se confond avec le pic V.

Tableau 5

Différences spectrales entre le pyrène et l'acide
(pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque (PY-16) dans le méthanol

BANDE	POSITION (nm) ($\pm 0,05$)	
	PY	PY-16
I	373,0	376,0
II	380,0	382,5
III	384,0	387,5
IV	389,5	---
V	393,5	396,5

III.2. Echelles de polarité.

Pour parvenir à associer une valeur de constante diélectrique à la région hydrophobe des membranes, on doit pouvoir comparer les résultats mesurés dans les bicouches (valeur du rapport I/III, voir chap. 4) avec ceux des systèmes modèles (solvants). Un lien, direct ou indirect, doit donc être établi entre le rapport I/III et la constante diélectrique. Rappelons que ce rapport peut être utilisé qualitativement comme une mesure de l'étendue des interactions entre les dipôles d'un solvant et l'état singulet excité du pyrène (Kalyanasundaram et Thomas, 1977a). Reste à déterminer si le rapport d'intensité de fluorescence des bandes vibrationnelles du pyrène peut être employé d'une façon quantitative.

Examinons d'abord le cas du pyrène libre. Nous avons vu que les variations du rapport I/III étaient assez importantes avec cette sonde (voir fig. 11). Plusieurs tentatives furent entreprises pour corrélérer un paramètre diélectrique avec le rapport I/III de la fluorescence du pyrène (Nakajima, 1971; Kalyanasundaram et Thomas, 1977a; Glushko et al., 1981; Dong et Winnik, 1982; Turro et al., 1986).

Des relations ont été obtenues pour des familles de solvants sur certaines échelles empiriques par Dong et Winnik (1982), soit la valeur E_ϵ de Dimroth et al. associé à l'énergie de transition de la bande solvatochromique du pyridinium-N-phénolbétaine, et le paramètre Y de Grunwald et Winstein relié à la vitesse de réaction du chlorure de

t-butyl dans un solvant. Les autres tentatives n'ont apporté aucune corrélation significative en fonction de divers paramètres, y compris la constante diélectrique, ϵ , le paramètre d'Onsager [$(\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$], la valeur Z de Kosower et d'autres (Nakajima, 1971; Kalyanasundaram et Thomas, 1977a).

Glushko et al. (1981), ainsi que Turro et al. (1986) ont déterminé des relations linéaires en fonction de ϵ . La relation de Glushko et al. est linéaire pour des constantes diélectriques supérieures à $\epsilon = 5$, ce qui correspond à des rapports I/III pour le pyrène plus grand que 0,73; ces résultats ont été obtenus avec des mélanges méthanol: décanol, propanol: cyclohexane et quelques solvants purs. La relation de Glushko et al. est représentée par l'équation suivante:

$$\epsilon = 49,8 \times (I/III) - 31,3 \quad (1)$$

L'équation de Turro et al. est passablement différente de la précédente, soit:

$$\epsilon = 86,2 \times (I/III) - 87,75 \quad (2)$$

La relation de Turro et al. est linéaire pour $\epsilon = 5-80$ et a été établi avec quatre solvants: éther, éthanol, méthanol et eau, et deux valeurs ont été prises avec des mélanges méthanol: eau.

La figure 13 présente les droites obtenus par Glushko et al. et Turro

et al., avec les résultats de Kalyanasundaram et Thomas (1977a) pour 30 solvants purs. Cette figure démontre d'abord l'ambiguité des divers résultats expérimentaux et la difficulté de relier convenablement l'indice I/III de la fluorescence du pyrène en solution avec une valeur de constante diélectrique.

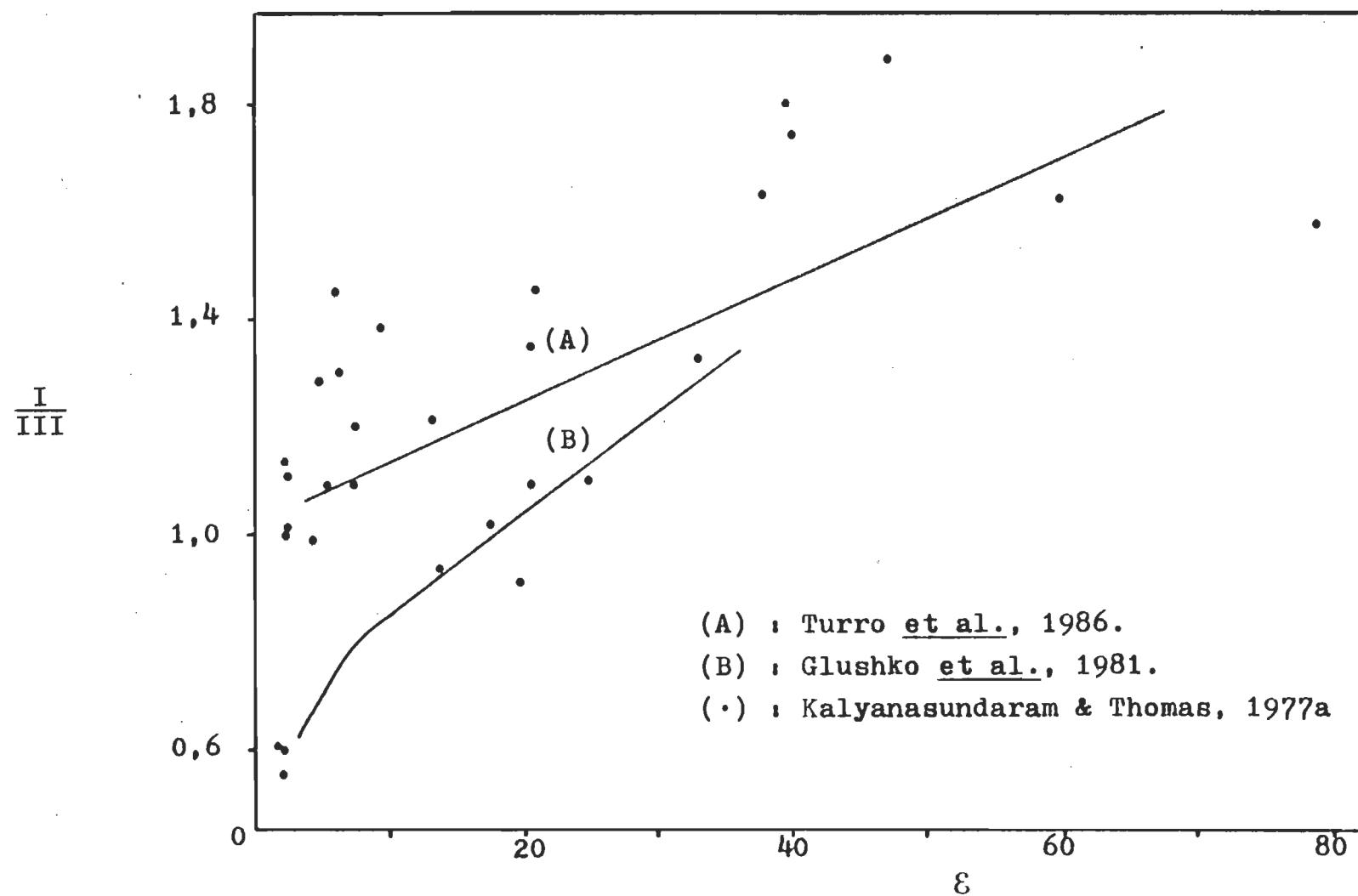


Figure 13. Rapports I/III du pyrène en solution (valeurs littéraires) en fonction de la constante diélectrique, ϵ .

IV. FLUORESCENCE DU PYRENE ET DE L'ACIDE (PYRENYL-1)-16 HEXADECANOIQUE
DANS DES VESICULES DE PC.

IV.i. Le pyrène.

IV.i.1. Incorporation de la sonde.

Un des points importants à considérer lors de l'interprétation des résultats concernant l'utilisation de sondes dans des membranes biologiques est le nombre relatif de molécules présentes dans le système. Ce paramètre peut être exprimé en un pourcentage de rapport molaire; le % mol de pyrène incorporé est donné par $[PY] \times 100 / [PC]$ où $[PY]$ et $[PC]$ représentent respectivement le nombre de molécules de pyrène et de PC, ou plus simplement, la concentration molaire de chaque espèce. Ces valeurs sont mesurées selon les méthodes décrites à la section 2.4.

Nous avons étudié la variation du % mol de pyrène incorporé en fonction du pourcentage présent dans le mélange initial. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 14.

Ce graphique indique que l'incorporation de la sonde est linéaire jusqu'à 1,0% mol; une légère transition est observée à cette concentration. D'autres études (Fragata *et al.*, 1985) ont démontré que la chlorophylle *a* incorporée dans des systèmes membranaires identiques possédait un profil d'incorporation similaire; par contre, l' α -tocophérol

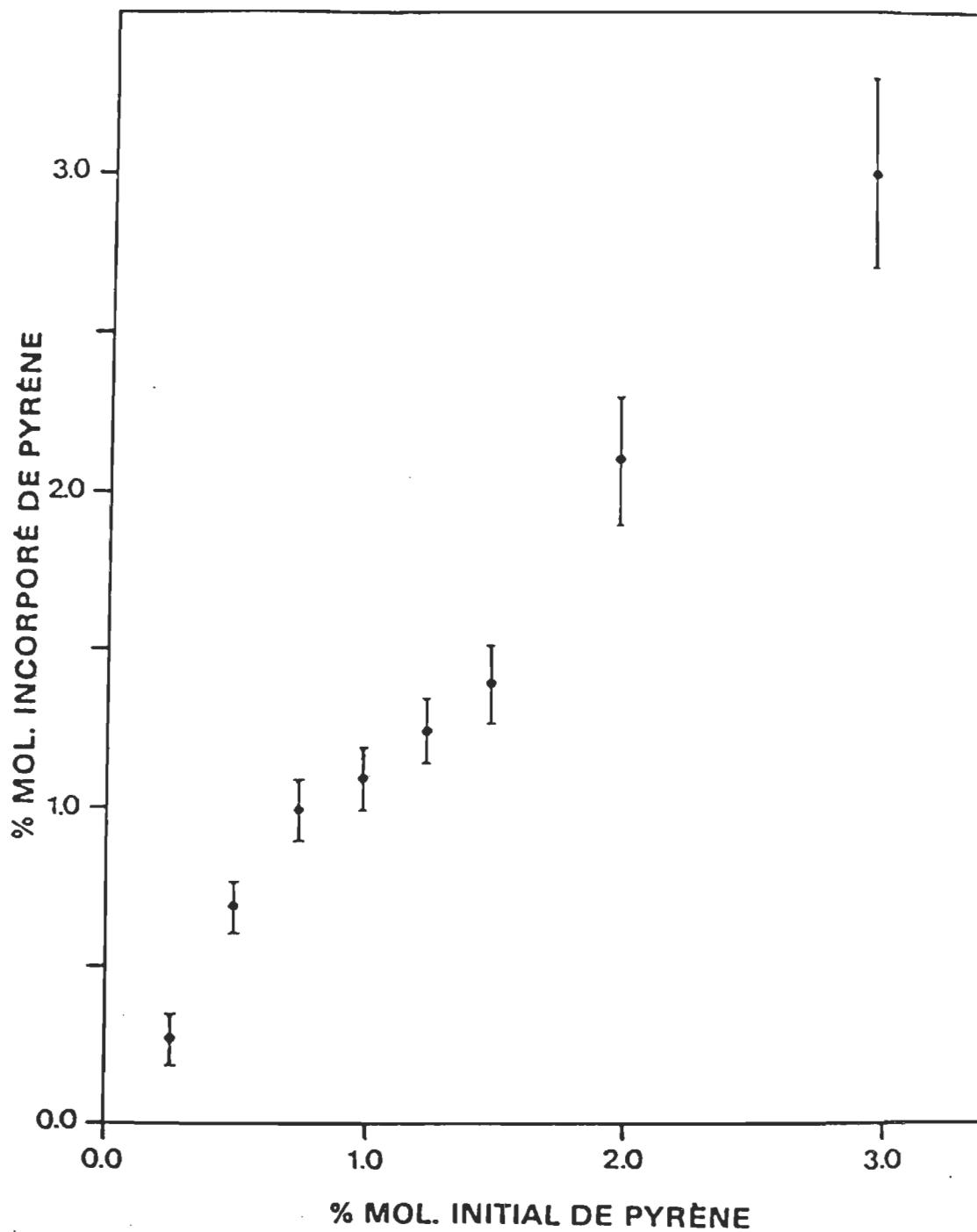


Figure 14. Graphique d'incorporation du pyrène dans les vésicules unilamellaires de phosphatidylcholine. Les traits représentent la déviation standard des mesures.

s'incorpore différemment dans les vésicules unilamellaires (Bellemare et Fragata, 1981).

Nous verrons dans les sections suivantes d'autres arguments en faveur d'une transition dans l'incorporation du pyrène dans la région de 1,0% mol.

IV.1.2. Effet de la concentration de pyrène et effet de la dilution des vésicules.

La figure 15 représente deux spectres d'émission du pyrène incorporé dans des vésicules unilamellaires de PC. Les concentrations finales sont 1,0% mol et 3,7% mol en pyrène. Les différences dominantes des deux spectres sont: i) un déplacement bathochromique d'environ 2 nm du spectre à plus forte concentration; ii) une large bande centrée à environ 480 nm, toujours sur le spectre à 3,7% mol de pyrène; cette bande est identifiée comme étant celle de l'excimère du pyrène (Soutar *et al.*, 1974; Edwards *et al.*, 1976; Surewicz, 1983).

L'excimère résulte de la formation d'un complexe entre une molécule de pyrène se trouvant dans l'état fondamental et une molécule excitée. Le mot excimère provient de la contraction des mots "excited dimer". L'excimère existe seulement dans l'état excité et se dissocie en monomères après une émission fluorescente, une désactivation thermique ou une dissociation; l'ensemble de ces processus peuvent être représentés de

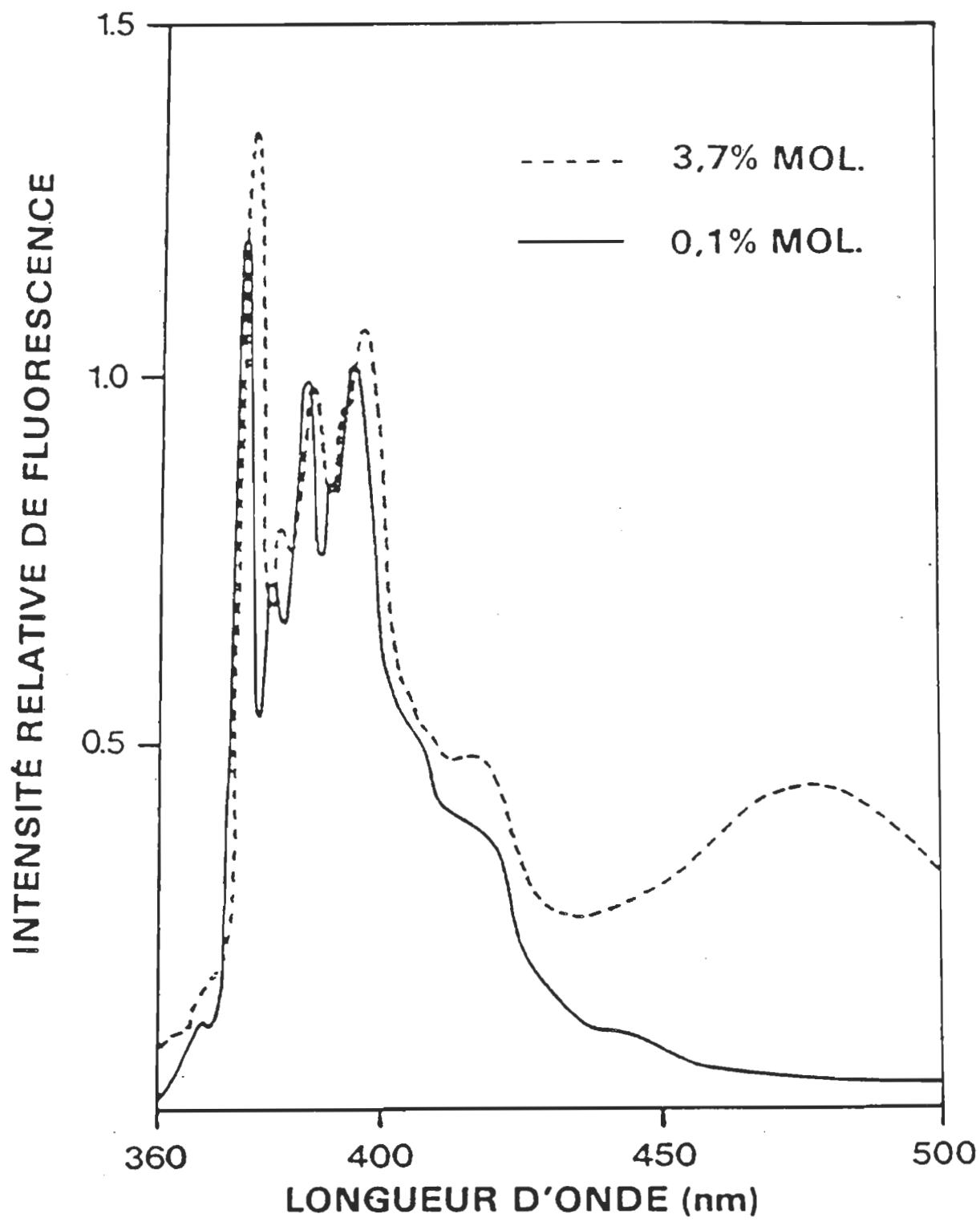
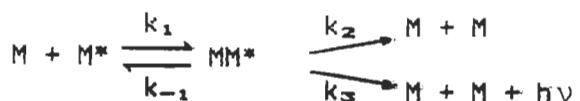


Figure 15. Spectres de fluorescence corrigés du
pyrène dans les vésicules unilamellaires de
phosphatidylcholine.

la façon suivante:



ou:

M : monomère

M^* : monomère excité

MM^* : excimère

k_1 : constante de formation de l'excimère.

k_{-1} : constante de dissociation de l'excimère.

k_2 : constante de désactivation thermique de l'excimère.

k_3 : constante d'émission de l'excimère.

L'émission de l'excimères se produit à des fréquences plus basses (environ $5\ 000 - 6\ 000\ cm^{-1}$) relativement à l'émission du monomère. Notons également que la formation d'excimère est une processus dépendant de la diffusion. En effet, il a été vérifié que la viscosité y joue un rôle important (Birks, 1973).

La présence d'excimères dans le spectre à plus forte concentration de pyrène de la figure 15 indique donc qu'il existe des interactions entre les molécules de pyrène dans les vésicules ou entre les vésicules lors de collisions. Ces deux mécanismes sont en effet probables pour la formation d'excimères dans des systèmes de vésicules. Deux facteurs sont donc importants pour estimer la quantité d'excimères: i) la concentration

finale de pyrène incorporée dans les vésicules, et ii) la concentration de vésicules dans la solution.

Examinons d'abord l'effet de la concentration finale sur le rapport I/III du pyrène. Ce résultat est présenté à la figure 16 pour de très faibles concentrations de vésicules, ceci pour minimiser les interactions entre vésicules.

La figure 16 indique que pour des concentrations de pyrène incorporé inférieures à 1,0% mol, la valeur moyenne du rapport I/III pour des vésicules unilamellaires de PC est stable à environ 1,21. Le tableau 6 compare ce résultat avec d'autres, obtenus dans des systèmes membranaires similaires. Ce tableau montre que le résultat que nous avons obtenu, soit $I/III = 1,21$, est approximativement 10% plus élevé que les plus faibles rapports I/III. i.e. 1,08 de Morris et al. (1980) et 1,09 de Schmidt et al. (1976). La valeur $I/III = 1,21$ est assez près des résultats publiés par Almgren (1980) avec $I/III = 1,15$ et par Lianos et al. (1980) avec $I/III = 1,18$. Il est cependant important de noter que ces comparaisons, à l'instar de celles faites avec les solvants, doivent être examinées avec soin, le rapport I/III étant sensible aux conditions expérimentales.

La figure 16, par exemple, démontre la dépendance du rapport I/III vis-à-vis la concentration de pyrène incorporé dans les vésicules de PC.

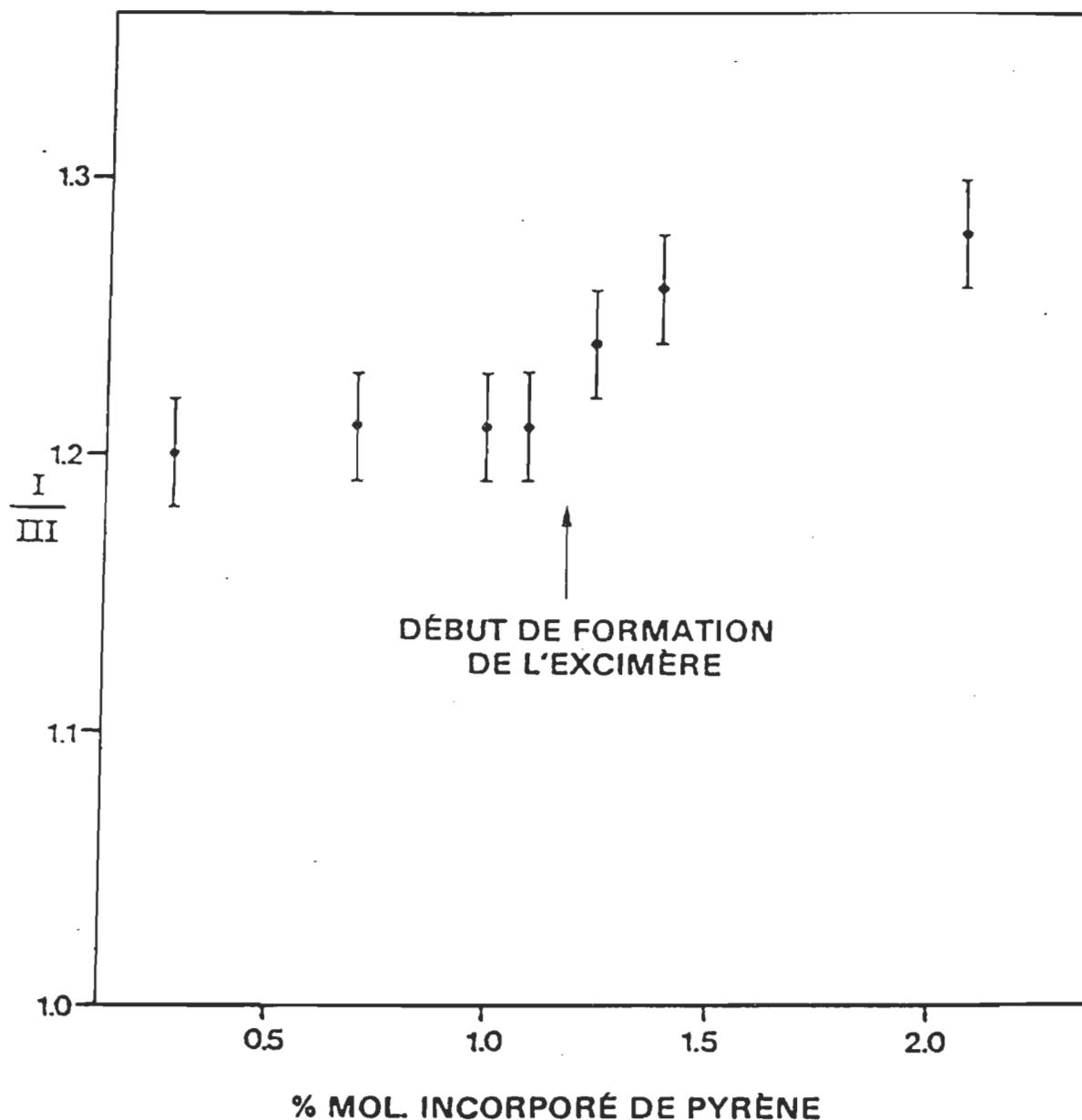


Figure 16. Graphique du rapport I/III du pyrène en fonction de la concentration de pyrène incorporé dans les vésicules.

Tableau 6

Valeurs du rapport I/III dans
des systèmes membranaires

Systèmes	XPY/PC	I/III	Réf.
Vésicules multilamellaires DPPC-TA	1,0	1,09	Schmidt <u>et al.</u> (1976)
Vésicules PC-DCP	2,5	1,15	Almgren (1980)
Vésicules PC-DCP	1,3	1,15	Almgren (1980)
Liposomes PC	0,2	1,18	Lianos <u>et al.</u> (1980)
Liposomes PC	-	1,08	Morris <u>et al.</u> (1980)
Vésicules PC	≤ 1,0	1,21	Ce travail

Cette figure montre une transition de la valeur du rapport I_E/I_M pour des concentrations supérieures à 1,0% mol en pyrène. C'est à ces mêmes concentrations de pyrène dans les vésicules que l'excimère peut être détecté, même avec des solutions de vésicules très diluées. Il semble donc qu'à ces concentrations il existe des interactions possibles entre molécules de pyrène dans l'espace membranaire. Rappelons que pour obtenir la formation d'un excimère, deux molécules doivent être situées très près lors de l'absorption d'un photon par une molécule, ceci permettant la formation du complexe entre la molécule excitée et celle se trouvant dans l'état fondamental. Cependant, il est également possible qu'il existe des agrégats de pyrène dans l'espace membranaire favorisant l'existence d'excimères. Le travail de Kaneda et al. (1985), sur la formation d'excimères de N-(1-pyrenesulfonyl)-dipalmitoyl-L- α -phosphatidyléthanolamine à l'interface lipide-eau de membranes plasmiques montre qu'environ 50% de la fluorescence de l'excimère provient de dimères existant déjà dans l'état fondamental et excités pour former des excimères.

Nous avons également observé une forte dépendance du taux d'excimères en fonction de la concentration des vésicules dans le tampon. Ces résultats sont présentés à la figure 17. Le graphique indique la variation du rapport d'intensité de l'excimère sur le monomère (I_E/I_M) en fonction de la concentration de phosphate, qui est une mesure directe de la concentration de PC, donc de vésicules (voir section II.4). I_E et I_M correspondent aux intensités de fluorescence du pyrène à 480 et 395 nm respectivement, soit le maximum d'émission de la bande de l'excimère et le pic V de l'émission du monomère (voir figure 11) (Soutar et al., 1974;

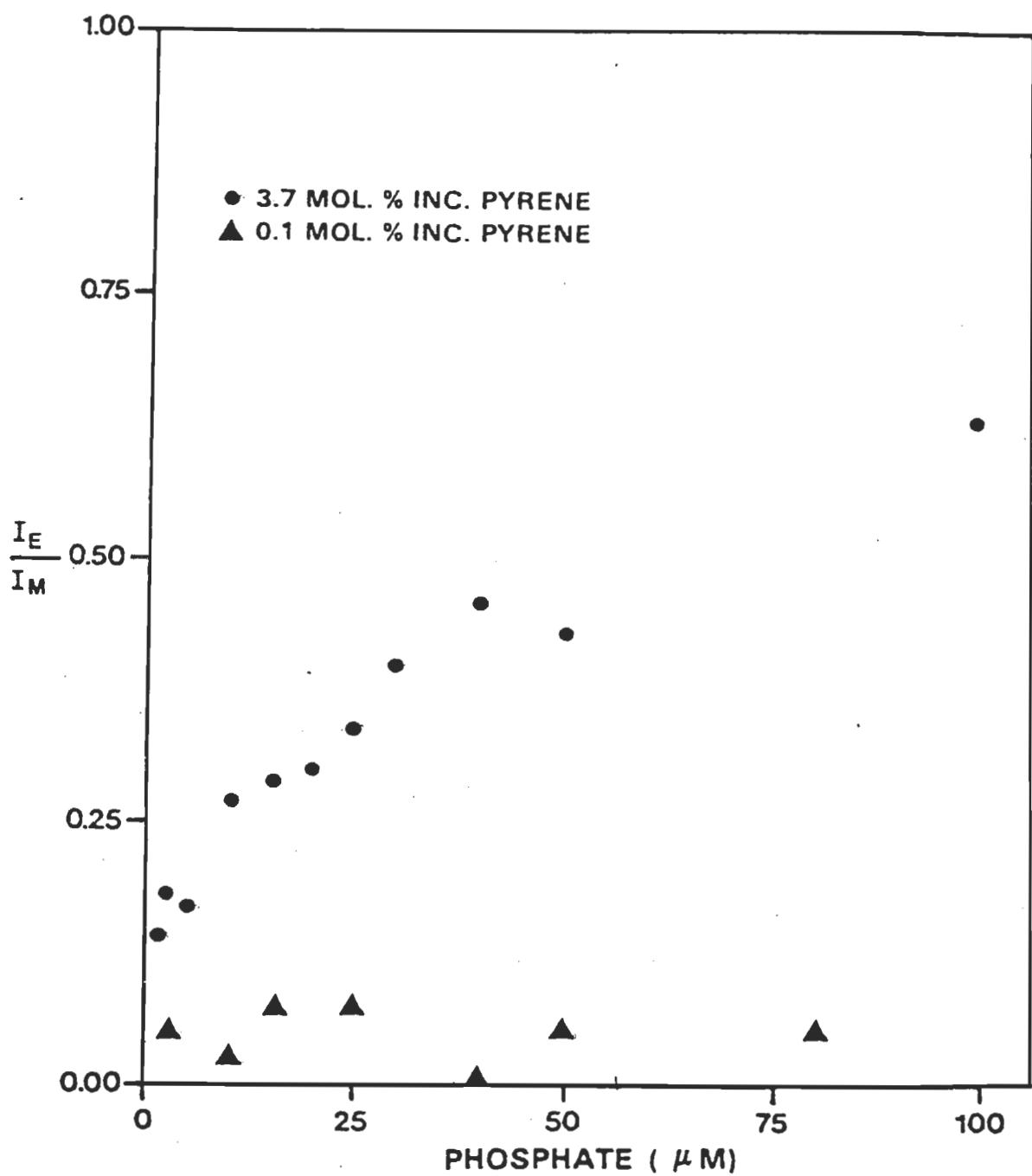


Figure 17. Graphique du rapport excimère/monomère (I_E/I_M) du pyrène en fonction de la concentration de vésicules.

Edwards et al., 1976; Surewicz, 1983). La figure 17 montre une diminution progressive du rapport I_a/I_m en fonction de la dilution de vésicules pour une concentration de pyrène incorporé équivalente à 3,7% mol. Au plus faible taux de pyrène incorporé dans les vésicules, 0,1% mol, on n'observe aucune variation du rapport I_a/I_m en fonction de la concentration de phosphate; notons qu'à ce faible taux d'incorporation, nous n'observons jamais la formation d'excimères quelles que soient les conditions. Ces résultats indiquent clairement que la formation d'excimères par interactions des vésicules entre elles est possible, en accord avec Almgren (1980).

IV.1.3. Effet de l'excimère.

Une première conclusion peut être déduite suite aux observations concernant la présence d'excimères dans les vésicules. La valeur du rapport I/III , l'indice de polarité du pyrène, utilisé pour l'évaluation de la constante diélectrique des vésicules, doit être mesuré à très faible concentration de pyrène, i.e. en absence d'excimères; la présence d'excimères étant une preuve d'interactions entre les molécules-sondes. De plus, les spectres du monomère et de l'excimère se recouvrent et des complications surviennent (Edwards et Thomas, 1978). La bande de l'excimère étant très large (cf. fig. 15), elle recouvre en partie le spectre du monomère, ceci ne permet pas d'évaluer correctement le rapport d'intensité des bandes vibrationnelles. De plus, nous avons vu que le rapport I/III du pyrène n'est plus stable aux concentrations supérieures

à 1,0% mol incorporée (figure 16); des résultats similaires ont été observés avec le PY-16 (voir section 4.2 tableau 8). Cette condition de haut niveau de dilution constitue un principe de base lors de l'utilisation de sondes, quelles que soient leur nature et leur fonction, afin de diminuer autant que possible les perturbations éventuelles provoquées par une trop grande quantité de molécules étrangères présentes dans le système étudié.

Dans le cas particulier du pyrène incorporé dans des vésicules unilamellaires de PC, nous avons démontré qu'une trop haute concentration de pyrène dans l'espace membranaire ($>1,0\%$ mol) provoquait la formation d'excimères et, indirectement, une variation du rapport I/III (voir figure 16). Pour évaluer la constante diélectrique ϵ de la région hydrophobe des membranes avec l'aide du pyrène nous devons donc utiliser le rapport I/III obtenu à faible concentration de sondes incorporées, soit $I/III = 1,21$ (voir figure 15).

Les résultats concernant l'excimère demeurent très importants, et nous verrons ultérieurement leur utilisation en regard de la localisation de la sonde dans la bicouche.

IV.1.4. Evaluation de la constante diélectrique, ϵ .

Nous avons vu à la section III.2 qu'aucune échelle de polarité n'avait été établie pour relier la valeur du rapport I/III du pyrène avec

une valeur de ϵ , du moins de façon satisfaisante.

Si nous revenons à la relation proposée par Glushko *et al.* (1981) (éq. I, p. 40), pour déterminer la valeur de ϵ , en fonction du rapport I/III du pyrène, nous obtenons pour $I/III = 1,21$, $\epsilon \approx 29$. Cette valeur est beaucoup trop élevée pour la région hydrophobe des bicouches lipidiques. Il s'agit en fait de la valeur de polarité qui caractérise l'interface têtes polaires/chaînes hydrocarbonées (Bellemare et Fragata, 1980; Iwamoto et Sunamoto, 1981).

Lianos *et al.* (1980) associent le spectre d'émission du pyrène incorporé dans des liposomes de PC avec celui du butanol; ceci correspond à un rapport d'intensité $I/III = 1,18$ (voir tableau 6) et $\epsilon = 17,5$. D'une part, la valeur de 1,18 pour le rapport I/III est assez près de notre valeur de $I/III = 1,21$; mais d'autre part, une constante diélectrique de 17,5 correspond à une valeur trop élevée pour la région hydrophobe des vésicules de PC. La valeur de ϵ calculée selon l'équation de Turro *et al.* (1986) (éq. 2, p. 40), nous donne un résultat similaire à celui de Lianos *et al.* (1980), soit $\epsilon \approx 16$.

Une des conclusions qui se dégage de ces observations est la difficulté d'associer le rapport I/III obtenu dans les vésicules avec celles mesurées dans les solvants. Cet état de choses est résumé dans le tableau 7 où sont représentés divers rapports I/III du monomère du pyrène en solution avec les constantes diélectriques correspondantes pour chaque solvant. Le tableau 7 présente des rapports I/III retrouvés dans

la littérature près de la valeur que nous avons obtenu pour les vésicules unilamellaires de PC I/III = 1,21. Des données plus complètes sont compilées dans les travaux de Kalyanasundaram et Thomas (1977a, tableau 2, p. 2041); et Dong et Winnik (1982, tableau 1, p. 18) (voir aussi figure 13).

Le tableau 7 révèle donc la difficulté d'associer sans controverse une valeur de constante diélectrique avec le rapport I/III du pyrène dans les vésicules.

Néanmoins, il semble que la valeur théorique généralement admise de $\epsilon=2$ pour la région des chaînes hydrocarbonées de bicouches lipidiques (Huang et Levitt, 1977; Ashcroft et al., 1980) soit trop faible. Nous présenterons ultérieurement des arguments pour justifier ces conclusions.

IV.1.5. Localisation de la sonde.

Nous avons vu dans la section précédente qu'il pouvait être difficile d'évaluer avec précision la valeur de ϵ associée au rapport I/III du spectre d'émission du monomère du pyrène incorporé dans des vésicules unilamellaires. Selon les diverses observations effectuées avec les solvants, nous avons conclu que la constante diélectrique devait quand même être plus élevée que $\epsilon=2$. Un autre paramètre d'une très grande importance est directement relié à ces conclusions, il s'agit de la localisation du pyrène libre dans la bicouche. Effectivement le fort

Tableau 7
 Valeurs du rapport I/III du
 pyrène en solution

SOLVANT	ϵ (25° C)	I/III	REFERENCE
Ethanol	24,5	1,18	Dong et Winnik (1982)
Propanol	20,3	1,19	Glushko <u>et al.</u> (1981)
THF	7,58	1,20	Kalyanasundaram & Thomas (1977)
Alcool benzylique	13,1	1,22	Kalyanasundaram & Thomas (1977)
Ethanol	24,5	1,23	Glushko <u>et al.</u> (1981)
Al. benzylique	13,1	1,24	Dong et Winnik (1982)
Chloroforme	4,8	1,25	Dong et Winnik (1982)
Chloroforme	4,8	1,28	Kalyanasundaram & Thomas (1977)
Ac. acétique (gl.)	6,15	1,30	Kalyanasundaram & Thomas (1977)

gradient de polarité traversant les membranes cause une grande dépendance position-polarité.

La figure 18, tirée du travail de Vanderkooi et al. (1975), propose un emplacement pour le pyrène incorporé dans une bicouche de lécithine; la position moyenne de la sonde serait à l'intérieur de la zone hydrophobe à quelques carbones de l'interface têtes polaires/chaînes hydrocarbonées. Ces résultats ont été obtenus en spectroscopie RMN. Des résultats en fluorescence (Kano et al., 1981) par interaction du pyrène avec un extincteur ("quencheur") incorporé dans des liposomes de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) situe le pyrène d'une façon prédominante au milieu de la chaîne à 16 carbones, soit légèrement plus enfoncé dans la bicouche que ne le montrent les résultats de Vanderkooi et al. (1975), (voir également Galla et Sackmann, 1974; Barber et al., 1976; Podo et Blasie, 1977).

Notons que les résultats de Vanderkooi et al. (1975) ont été obtenus à partir de solutions contenant de fortes concentrations initiales de pyrène, soit des ratios lipides: pyrène supérieurs à 10:1; les mesures de fluorescence de Kano et al. (1981) ont été effectuées avec des rapports initiaux DPPC: pyrène de 400:1, donc des concentrations comparables à celles que nous avons utilisées pour évaluer notre indice de polarité, le rapport I/III, lorsque celui-ci était constant.

Ces observations deviennent plus significatives lorsqu'on effectue une comparaison avec l'ensemble des résultats, soit le graphique d'incorporation (figure 14) avec une légère inflexion à environ 1,0%

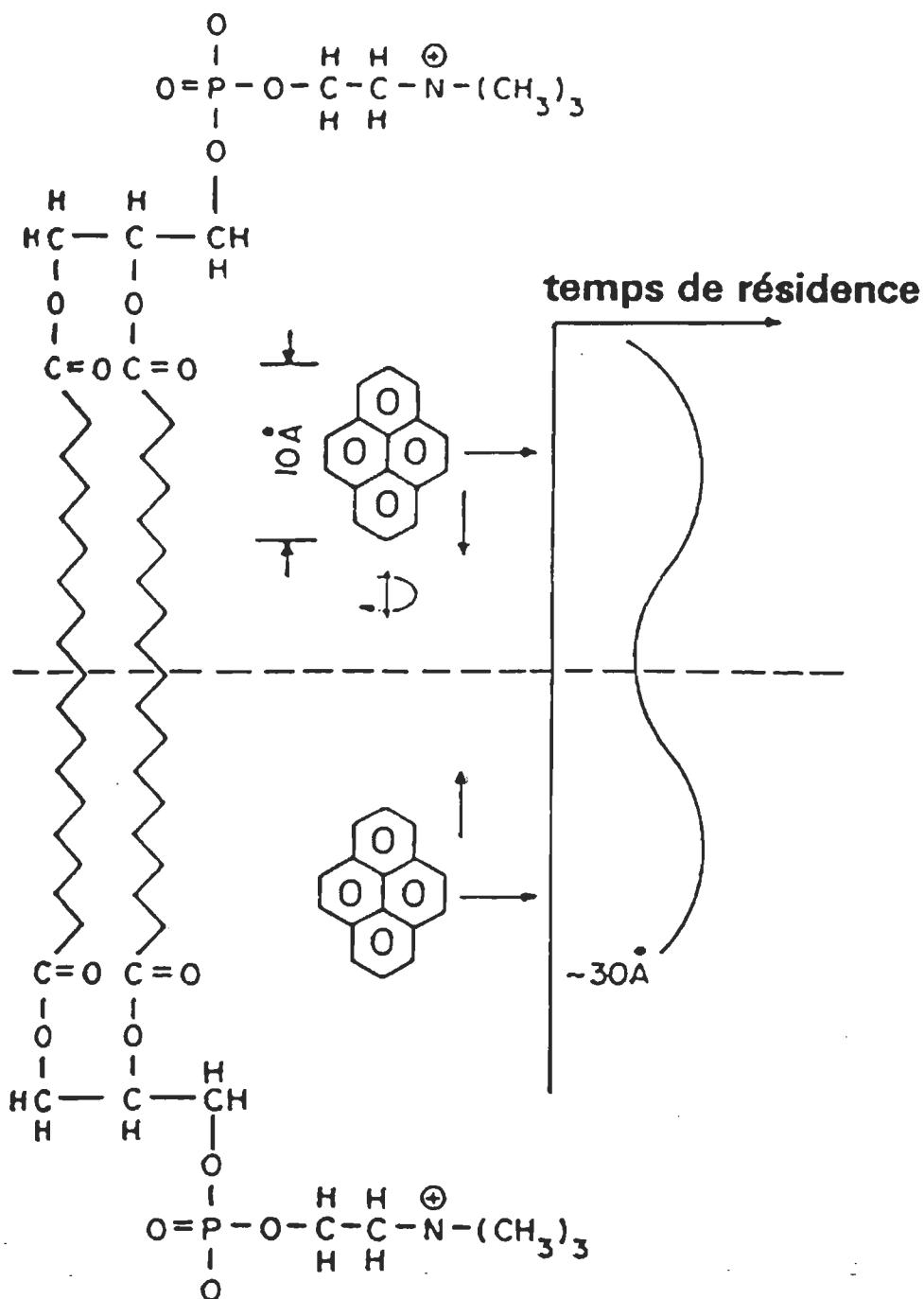


Figure 18. Localisation du pyrène dans une bicouche. Tiré de : Vanderkooi et al., 1975, p. 3665.

mol, concentration correspondante à l'apparition d'excimères dans les vésicules (figure 16). On doit également prendre en considération la variation du taux d'excimères (I_e/I_m) en fonction de la concentration de vésicules (figure 17). Cette dernière figure, comme nous l'avons mentionné, nous révèle la possibilité d'interaction entre les molécules de pyrène lors de collisions entre vésicules.

En regard de ces considérations, nous croyons que le pyrène libre pourrait occuper deux sites différents dans la bicouche. A haute concentration ($>1,0\% \text{ mol}$) le pyrène se situerait assez près des têtes polaires, du moins une fraction de la concentration incorporée, et serait accessible pour la formation d'excimère entre vésicules. A plus faible concentration ($<1,0\% \text{ mol}$), la sonde serait plus profondément enfoncée dans la région hydrophobe de la bicouche et ne pourrait pas interréagir avec une autre molécule lors d'une collision efficace entre deux vésicules.

Ce déplacement du pyrène vers les têtes polaires avec l'augmentation de la concentration locale peut être expliqué par des considérations géométriques. En effet, même si la sonde se solubilise préférentiellement dans les chaînes hydrocarbonées à cause de son caractère hydrophobe, cette région ne peut pas accomoder une quantité illimitée de sonde. On peut donc formuler l'hypothèse suivante: après une concentration critique de pyrène dans la zone hydrophobe de la bicouche ($\approx 1,0\% \text{ mol}$), l'excédent des molécules se solubiliseraient plus près de l'interface tête polaire/chaînes hydrocarbonées; cette sur-concentration locale

provoquerait la formation d'excimères dans l'espace membranaire sans interaction entre vésicules, ce qui expliquerait la présence constante d'excimères même à de très faible concentrations de vésicules (voir figure 16).

Les différences observées sur les spectres d'émission du monomère entre forte et faible concentration (figure 15) pourraient être expliquées par une localisation différente de la sonde selon sa concentration dans les vésicules.

IV.2. Acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque.

Les problèmes reliés à la localisation du pyrène libre dans la bicoche nous ont amené à utiliser le PY-16 comme sonde pour évaluer la constante diélectrique de la région hydrophobe des membranes. Le groupe polaire (-COOH) du PY-16 permet une orientation convenable de la sonde dans la bicoche, ainsi le groupe pyrenyl se retrouve profondément enfoncé dans la région des chaînes hydrocarbonées (voir structure figure 3). Notons ici qu'à pH=8.0, nous nous retrouvons assez loin des pKa du PY-16 et de la PC. Le pKa de surface du groupe carboxyle de la PC est d'environ 4 (Seimiya et Ohki, 1973; Tsui et al., 1986) et celui du PY-16 est <4 (Noller, 1965).

Comme nous l'avons vu au chapitre III, l'augmentation de la transition O-O en milieu polaire (effet de Ham) est beaucoup moins marquée avec le PY-16 par rapport au pyrène (comparer figures 11 et 12). L'utilisation du PY-16 constitue en fait un compromis, soit une plus grande certitude sur la position de la sonde incorporée dans les vésicules, mais une plus grande incertitude dans l'évaluation de ϵ .

La figure 19 présente un spectre d'émission du PY-16 incorporé dans des vésicules unilamellaires de PC (1,0% mol). Le rapport I/III mesuré avec cette sonde dans ces conditions est de $2,8 \pm 0,1$ (comparer avec les valeurs en solution, tableau 4). Ce rapport est stable à faible concentration de PY-16 et ne varie pas avec la dilution des vésicules.

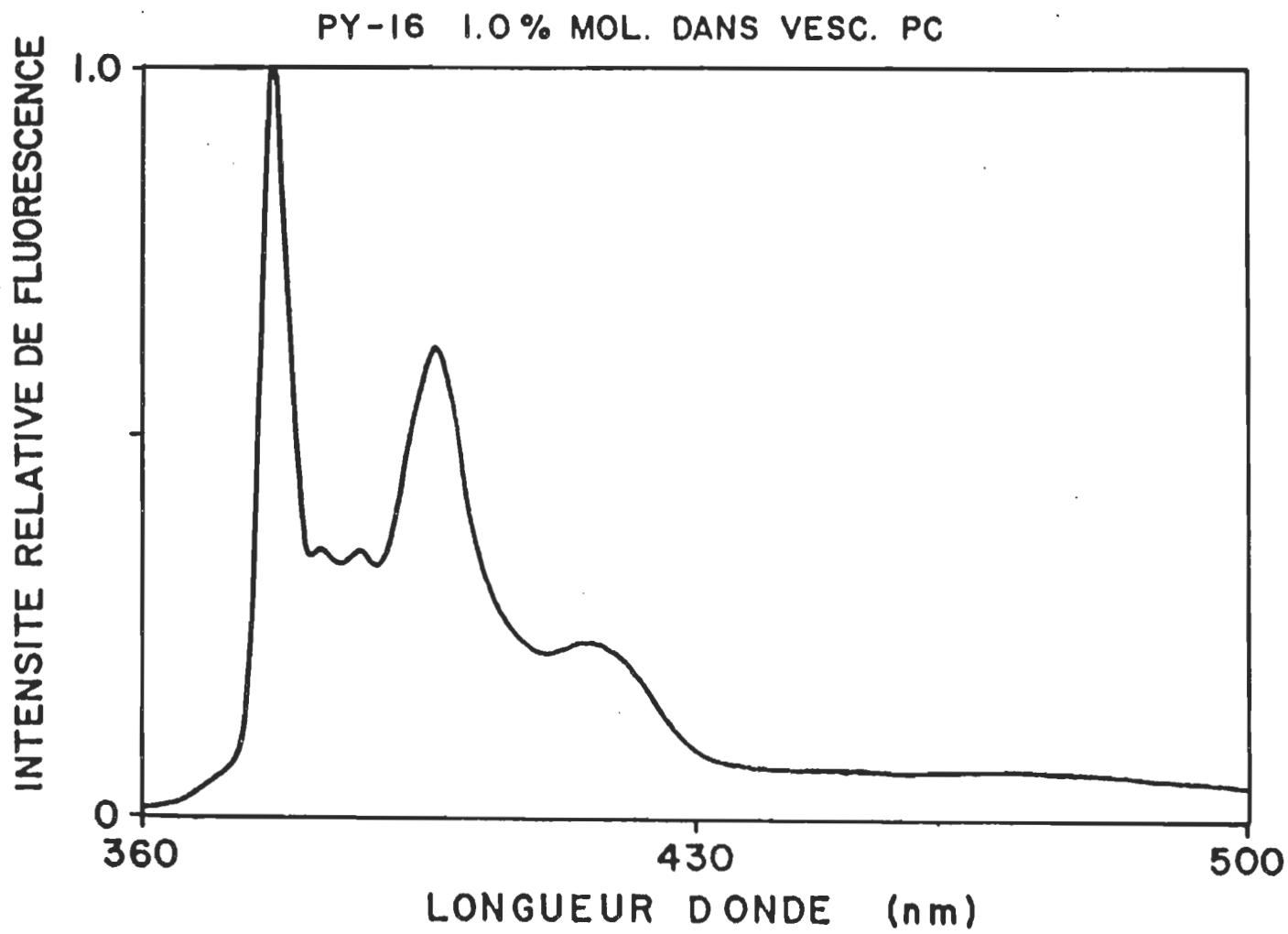


Figure 19. Spectre de fluorescence corrigé de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque dans les vésicules de phosphatidylcholine.

Tableau 8

Rapport I/III pour l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque
dans les vésicules et valeurs du rapport excimère/monomère.

% mol PY-16 init.	I/III	$I_{\text{ex}}/I_{\text{M}}$
3,0	3,10	0,18-0,19
2,0	3,03	0,15-0,16
1,5	2,85	0,15
1,0	2,82	0,10
0,5	2,78	0,05
0,25	2,80	0,05

comme le cas du pyrène libre.

L'ensemble des résultats obtenus avec le PY-16 dans les vésicules est compilé au tableau 8. Les phénomènes observés avec le pyrène libre se répètent avec le PY-16, i.e. augmentation progressive du rapport I/III au dessus de 1,0% mol, et apparition significative de l'excimère aux plus fortes concentrations.

En conséquence, la valeur du rapport I/III retenu pour fin de comparaisons avec les systèmes modèles est I/III=2,8. La figure 20 indique les différents rapports I/III du PY-16 mesurés dans les solvants en fonction de la constante diélectrique à 25° C (cf. tableau 4); le cercle à $\epsilon=7$ correspond à la valeur mesurée dans les vésicules de PC. En tenant compte de l'erreur expérimentale, on voit que la valeur correspondante pour la constante diélectrique peut se situer entre $\epsilon=4-10$.

Les résultats avec le PY-16 nous indiquent également qu'il n'y a pas formation d'excimères lors de collisions entre vésicules, contrairement à l'observation faite avec le pyrène libre. Effectivement, comme le démontre la figure 21, le rapport d'intensités I_{ex}/I_m ne varie pas avec la concentration de vésicules en solution, même lorsque l'excimère peut se former dans l'espace membranaire par sur-concentration locale (comparer figures 17 et 21). Ceci nous indique que le groupe pyrenyl enfoncé dans la bicouche est inaccessible à un autre groupe similaire lors de collisions entre vésicules. Cette conclusion est très importante en

regard de l'hypothèse selon laquelle le pyrène libre pourrait se situer plus près des têtes polaires lorsque la concentration de pyrène incorporé excède 1,0% mol.

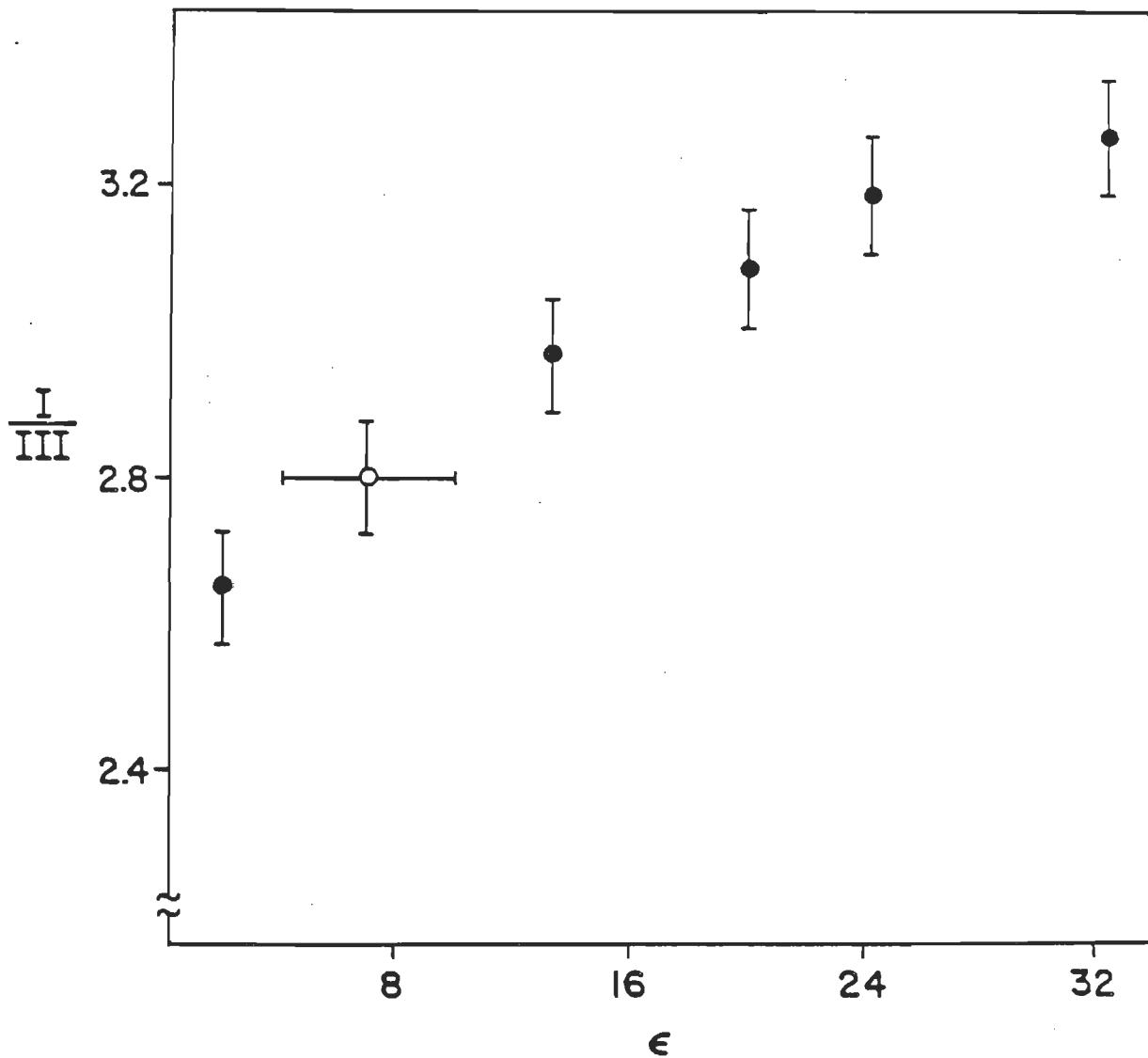


Figure 20. Graphique du rapport I/III de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque en solution (●) et dans les vésicules (○) en fonction de la constante diélectrique.

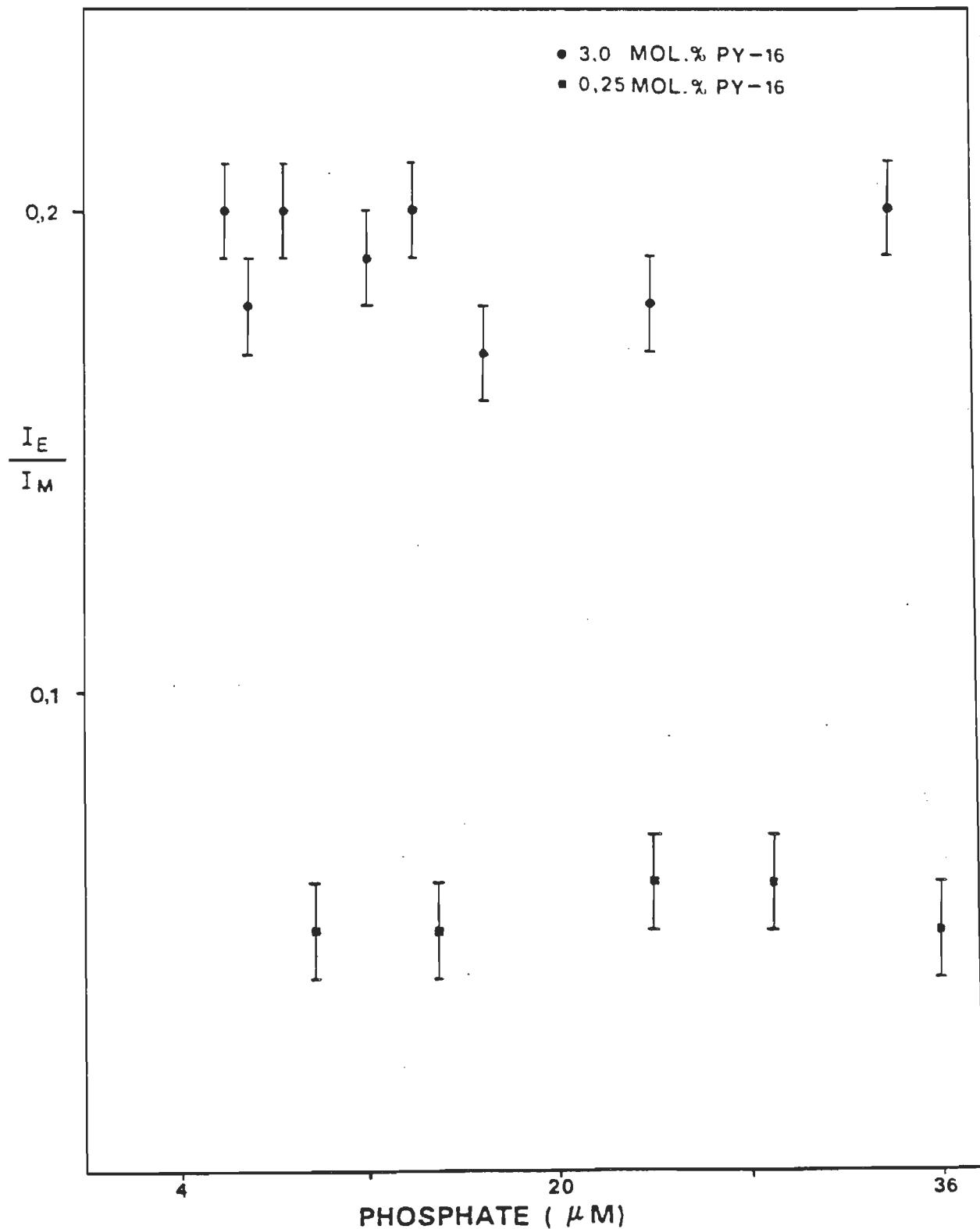


Figure 21. Graphique du rapport excimère/monomère (I_E/I_M) de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque en fonction de la concentration de vésicules.

IV.3. Importance de la perméabilité membranaire à l'eau.

Les travaux de Griffith et al. (1973) et de Nichols et Deamer (1980) ont démontré la possibilité de pénétration de molécules d'H₂O dans la région hydrocarbonée de bicouches lipidiques par des techniques de résonnance du spin électronique (ESR) et de titration acide-base, respectivement. Le coefficient de perméabilité (P) d'eau "tritiée" au travers des films de PC d'oeuf a été évalué à $2,4 \times 10^{-3}$ cm/s à 25° C par Finkelstein et Cass (1968). Des études de diffusion avec des vésicules de PC d'oeuf ont donné des valeurs de P $4-5 \times 10^{-3}$ cm/s (Reeves et Dowben, 1970) et P = $2,9 \times 10^{-3}$ cm/s (Lipschitz-Farber et Degani, 1980) à 25° C (voir également la revue de Fettiplace et Haydon, 1980). L'ordre de grandeur pour le coefficient de perméabilité de l'eau au travers des modèles membranaires au-dessus de leur température de transition (Tc) est de 10^{-3} cm/s à 25° C. Ceci peut être considéré comme un "passage" rapide au travers la membrane. Pour comparaison mentionnons que le coefficient de perméabilité du glucose pour des membranes au-dessus de Tc est de l'ordre de 10^{-10} cm/s (Brunner et al., 1980; Bresselers et al., 1984), et la perméabilité aux ions Na⁺ a été évalué à environ 10^{-13} cm/s dans les mêmes conditions (Brunner et al., 1980).

En regard de ces considérations, il serait possible que le temps de résidence des molécules d'eau dans la région hydrocarbonée soit suffisamment long pour augmenter la constante diélectrique de $\epsilon = 2$ à $\epsilon = 6-8$ ou 10 (voir également les conclusions de Offen et Turley, 1982). En

conséquence, le pyrène sous forme monomérique pourrait se situer dans la région des chaînes hydrocarbonées tel que proposé par Galla et Sackmann (1974); Vanderkooi et al. (1975); Barber et al. (1976), Podo et Blasie (1977) et Kano et al. (1980) et non pas localisé dans la région glycérol (Lianos et al., 1980).

Ces considérations de perméabilité membranaire à l'eau peuvent également être observées sous un angle différent en tenant compte du caractère hygroscopique du pyrène. En fait, le système d'électrons π de la molécule pourrait favoriser la formation de liens hydrogène avec les molécules d' H_2O de l'environnement. En conséquence le pyrène serait légèrement hydraté et amènerait avec lui quelques molécules d' H_2O dans la région hydrocarbonée de la bicouche; il s'agirait évidemment d'eau liée. Mais même dans cet état l'eau pourrait augmenter la polarité de la zone hydrophobe d'une façon significative et/ou directement diminuer la symétrie moléculaire du pyrène pour augmenter la transition vibrationnelle O-O. Dans ce cas, il faut éviter de confondre la faible solubilité du pyrène dans l'eau (caractère hydrophobe, solubilité: 2-3 μM , Kalyanasundaram et Thomas, 1977a) qui nécessite la solvatation complète de la molécule, et le caractère hygroscopique où seulement quelques molécules d'eau peuvent être associées à une molécule par interaction avec les électrons π du système conjugué du pyrène. Il est également important de noter que selon cette hypothèse l'eau présente dans les chaînes hydrocarbonées se retrouverait à proximité de la sonde.

IV.4. Discussion.

Les résultats que nous avons obtenus avec le pyrène libre incorporé dans les vésicules de PC ont apporté plusieurs conclusions et autant d'hypothèses concernant la polarité de la zone hydrophobe des bicouches. Nous avons vu que la constante diélectrique ne pouvait pas être déterminée avec précision du principalement à deux problèmes: i) l'imprécision des échelles de polarité; ii) l'incertitude sur la position de la sonde. Le point le plus intéressant qui est ressorti de cette étude concerne l'effet de la concentration, relié à l'hypothèse du changement de position de la sonde avec la concentration membranaire de pyrène. Ceci devient important en regard de réactions de transfert d'énergie. En effet, ce type de comportement serait intéressant avec certaines molécules d'intérêt biologique impliquées dans des réactions de transfert d'énergie dans des membranes.

La formation d'excimères du pyrène par collision entre vésicules (voir figure 17) est également un point important. Nous avons observé que ce phénomène ne se produit pas avec le PY-16 (figure 21), cette sonde étant probablement trop enfoncée dans l'intérieur de la bicouche. Notons également qu'à faible concentration de pyrène libre, l'excimère n'est jamais détecté. Il devient alors nécessaire de faire la distinction entre les deux processus de formation de l'excimère dans les vésicules, soit i) la concentration locale (concentration de pyrène incorporé) est assez élevée pour que deux molécules se retrouvent assez près l'une de l'autre

durant l'absorption d'un photon par une des molécules et/ou des agrégats (peut-être sous forme de dimères) soient préalablement formés dans l'état fondamental; ii) le nombre de collisions efficaces entre vésicules est suffisamment élevé pour que lors d'une collision deux molécules, une excitée ($*M$) et l'autre dans l'état fondamental (M), se retrouvent à l'intérieur de la distance d'interaction pour la formation d'un excimère; ce dernier processus est typiquement dynamique. Pour une concentration fixe de pyrène, le taux d'excimères est donc dépendant du nombre de collisions efficaces entre vésicules. Mentionnons que la distance d'interaction est évaluée à environ 8 Å (Galla et Sackmann, 1974; Galla et al., 1979) et que la distance entre les deux plans moléculaires de l'excimère est de 3.37 Å (Birks, 1970); l'excimère étant dans une configuration "sandwich" partiellement éclipsé, la distance totale le long du grand axe est de 10,7 Å comparativement à 9.2 Å pour le monomère (Soutar et al., 1974).

Le premier processus de formation d'excimères dans les vésicules est comparable au comportement en solution concentrée. Le second est beaucoup plus particulier et intéressant. Si la distance d'interaction de 8 Å est correcte, le pyrène doit se trouver assez près des têtes polaires pour que deux molécules soient séparées par une si petite distance lors d'une collision; bien entendu, on doit tenir compte de la nature de ces collisions qui pourraient éventuellement permettre une déformation importante des vésicules et provoquer une inter-pénétration de la région des têtes polaires des phospholipides pour permettre une proximité convenable à la formation d'un excimère. Mentionnons également que le

temps de vie de l'état excité du pyrène est passablement élevé dans les membranes (>100ns, Edwards et al., 1976), ce qui augmente la probabilité de collisions efficaces entre deux vésicules pour la formation d'excimères.

L'utilisation du PY-16 pour déterminer la polarité de la zone hydrophobe des bicouches n'a pas apporté beaucoup plus d'information sur la valeur de la constante diélectrique; selon les résultats la valeur pourrait se situer entre $\epsilon = 4-10$. Le point marquant concerne évidemment la position de cette sonde. Selon des considérations géométriques et thermodynamiques, le fluorophore du PY-16 se situe en plein cœur de la zone hydrophobe entre les deux couches lipidiques. En considérant que la valeur minimale est évaluée à $\epsilon = 4$, et en regard de nos conclusions, il est raisonnable de croire que la constante diélectrique des chaînes hydrocarbonées des membranes pourrait être plus élevé que $\epsilon = 2$. Cette différence de la polarité par rapport à celle d'hydrocarbures ($\epsilon = 2$) nous a amené à considérer la possibilité de présence de molécules d'eau pouvant affecter la constante diélectrique, ceci en relation avec la perméabilité membranaire à l'eau (Griffith et al., 1973; Reeves et Dowben, 1970; Finkelstein et Cass, 1968; Nichols et Deamer, 1980; Lipschitz-Farber et Degani, 1980; Fettiplace et Haydon, 1980).

Conclusion

Examinons d'abord les grandes lignes qui se sont dégagées de ce travail pour ensuite apporter quelques commentaires sur la suite de cette étude.

Les conclusions obtenues avec le pyrène libre sont les suivantes: i) l'utilisation de cette sonde pour des mesures de polarité membranaire doit s'effectuer à des concentrations inférieures à 1,0% mol de pyrène incorporé i.e. en absence d'excimères; ii) aucune échelle de polarité reliant la constante diélectrique avec le rapport I/III du spectre d'émission du monomère du pyrène ne peut être exactement déterminée, il est cependant important de noter qu'il existe une relation entre la polarité de l'environnement et le rapport I/III; iii) le graphique d'incorporation du pyrène libre dans des vésicules unilamellaires de PC indique une faible transition dans la région de 1,0% mol incorporé; c'est à cette concentration que l'excimère apparaît dans l'espace membranaire; iv) aux plus fortes concentrations de pyrène incorporé, le taux d'excimères par rapport au monomère (I_{ex}/I_M) s'accroît avec la concentration des vésicules en solution; ceci est une indication qu'il y a interaction entre les vésicules pour former l'excimère lors de collisions. D'après les conclusions précédentes, nous formulons l'hypothèse selon laquelle le pyrène pourrait occuper une position différente dans la bicouche lipidique en fonction de la concentration de sonde; c'est-à-dire, aux plus faibles concentrations, le pyrène se

situerait dans la région des chaînes hydrocarbonées à une hauteur non-précisément déterminée, tandis qu'aux plus fortes concentrations, la sonde se retrouverait plus près de la région des têtes polaires, accessible à la formation d'excimères par collision entre vésicules. Le pyrène pourrait également être sous forme d'agrégats pré-formés dans l'état fondamental (Blackwell *et al.*, 1986; Yamazaki *et al.*, 1986).

L'emploi du PY-16 a confirmé les résultats obtenus avec le pyrène libre, soit, en conclusion générale, que la constante diélectrique de la région hydrophobe de vésicules de PC se situerait entre $\epsilon = 4-10$, ce qui est plus élevé que la valeur théorique généralement admise. Les résultats du PY-16 ont également démontré qu'il ne pouvait pas y avoir formation d'excimères par collisions entre vésicules lorsque le fluorophore se trouve enfoui dans les chaînes hydrocarbonées des vésicules. L'augmentation de polarité par rapport aux valeurs d'hydrocarbures purs pourrait être expliquée par la présence de quelques molécules d'eau dans les membranes. Cette eau pourrait être présente d'une façon naturelle ou apportée dans la membrane par le pyrène lui-même, à la suite de l'interaction de l'eau avec le système d'électrons π de la sonde. Les deux phénomènes que nous venons de discuter pourraient également être concomitants.

Pour solutionner les problèmes concernant la liaison possible de molécules d'eau au pyrène et la formation d'agrégats de pyrène, d'autres méthodes spectroscopiques que la fluorescence seraient nécessaires. Mentionnons le Raman et l'infra-rouge, ces deux méthodes nous permettant

de sonder au niveau des liaisons moléculaires, et le temps de vie de fluorescence nous permettrait de mieux comprendre le phénomène de l'excimère et de détecter les agrégats éventuellement formés à l'état fondamental.

Il serait également possible d'étendre le travail de la polarité à d'autres dérivés du pyrène afin d'effectuer une étude comparée. Par exemple, les résultats du PY-16 pourraient être comparés avec les valeurs de sondes analogues avec différentes longueurs de chaînes, ainsi le groupe pyrenyl se situerait à diverses hauteurs des chaînes hydrocarbonées et un profil de polarité pourrait être élaboré. Cette étude permettrait également de mieux connaître la position relative du pyrène libre. Mentionnons aussi que l'utilisation du "pyrene-3-carboxaldehyde" s'appliquerait également à compléter les résultats, cette sonde possédant un maximum de fluorescence dont la position varie avec la polarité de l'environnement (Kalyanasundaram et Thomas, 1977b).

Pour analyser l'effet des doubles liaisons dans la chaînes hydrocarbonées de la PC, les résultats pourraient être comparés avec ceux mesurés dans des systèmes similaires de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) par exemple. Dans la même ligne de pensée, toutes les variations dans la constitution, l'état ou l'environnement des lipides formant les membranes pourraient être étudiées; par exemple, les effets de la tête polaire, de la température de transition, de la force ionique ou de la longueur des chaînes, entre autres.

REFERENCE

- Almgren, M. Migration of pyrene between lipid vesicles in aqueous solution. A stopped-flow study. Chem. Phys. Lett., 1980, 71, 539-543.
- Almgren, M., & Swarup, S. Fluorescence stopped-flow study of the interaction of alkylpyridinium salts and pyrene-substituted fatty acids with lecithin vesicles. Chem. Phys. Lipids, 1982, 31, 13-22.
- Anderson, V.C., Craig, B.B. & Weiss, R.G. Liquid-crystalline solvent as mechanistic probes. 10. Dynamics of intramolecular quenching of pyrenyl fluorescence in the liquid-crystalline and isotropic phase of cholesteric solvent. Mol. Cryst. Liq. Cryst., 1983, 97, 351-363.
- Ashcroft, R.G., Thulborn, K.R., Smith, J.R., Coster, H.G.L. & Sawyer, W.H. Perturbations to lipid bilayers by spectroscopic probes as determined by dielectric measurements. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 602, 299-308.
- Bach, D. & Chapman, D. Calometric studies of biomembranes and their molecular components. In A.E. Beezer (Ed.), Biological Microcalorimetry, London: Academic Press, 1980, pp. 275-309.

Ballard, S.G. & Mauzerall, D.C. Photochemical ionogenesis in solutions of zinc octaethyl porphyrin. J. Chem. Phys., 1980, 72, 933-947.

Barber, D.J.W., Morris, D.A.N. & Thomas, J. K. Laser induced photoionization in lipid aggregates. Chem. Phys. Lett., 1976, 37, 481-484.

Bartlett, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem., 1959, 234, 466-468.

Bellemare, F. Distribution de l'α-tocophérol dans les vésicules lipidiques et caractérisation de l'environnement polaire du noyau chromanol. Mémoire de maîtrise, U.Q.T.R., 1981.

Bellemare, F. & Fragata, M. Polarity studies on the head group of single-layered phosphatidylcholine- α -tocopherol vesicles. J. Colloid Interface Sci., 1980, 77, 243-252.

Bellemare, F. & Fragata, M. Transmembrane distribution of α -tocopherol in single-lamellar mixed lipid vesicles. J. Membrane Biol., 1981, 58, 67-74.

Berlman, I.B. Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules, (2nd ed.), New-York: Academic Press, 1971.

Birks, J.B. (Ed.) Photophysics of aromatic molecules.
London: Wiley-Interscience, 1970.

Birks, J.B. (Ed.) Organic molecular photophysics (Tome I-II). London:
Wiley-Interscience, 1973.

Birks, J.B., Kazzaz, A.A. & King, T.A. Excimer fluorescence. IX. Lifetime studies of pyrene crystals. Proc. R. Soc. London Ser. A, 1966, 291, 556-560.

Blackwell, M.F., Gournaris, R. & Barber, J. Evidence that pyrene excimer formation in membranes is not diffusion-controlled. Biochim. Biophys. Acta, 1986, 858, 221-234.

Bresseleers, G.J.M., Goderis, H.L. & Tobback, P.P. Measurement of the glucose permeation rate across phospholipid bilayers using small unilamellar vesicles. Effect of membrane composition and temperature. Biochim. Biophys. Acta. 1984, 772, 374-382.

Brunner, J., Graham, D.E., Hauser, H. & Semenza, G. Ion and sugar permeabilities of lecithin bilayers: comparison of curved and planar bilayers. J. Membrane Biol.. 1980, 57, 133-141.

Chrzeszczyk, A., Wishnia, A. & Springer, Jr. C.S. The intrinsic structural asymmetry of highly curved phospholipid bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta. 1977, 470, 161-169.

Cornell, B.A., Fletcher, G.C., Middlehurst, J. & Separovic, F. The lower limit to the size of small sonicated phospholipid vesicles. Biochim. Biophys. Acta. 1982, 690, 15-19.

De Kruijff, B., Cullis, P.R. & Radda, G.K. Differential scanning calorimetry and ^{31}P NMR studies on sonicated and unsonicated phosphatidylcholine liposomes. Biochim. Biophys. Acta. 1975, 406, 6-20.

Dong, D.C. & Winnik, M.A. The Py scale of solvent polarities. Solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with Et and Y values. Photochem. Photobiol. 1982, 35, 17-21.

Durocher, G. & Sandorfy, C. On the general occurrence of the Ham effect in the electronic spectra of aromatic hydrocarbons. J. Mol. Spectrosc. 1966, 20, 410-424.

Edwards, H.E. & Thomas, J.K. A fluorescence-probe study of the interaction of cycloheptaamylose with arenes and amphiphilic molecules. Carb. Res., 1978, 65, 173-182.

Edwards, H.E., Thomas, J.K., Burleson, G.R. & Kulpa, C.F. The study of rous sarcoma virus-transformed baby hamster kidney cells using fluorescent probes. Biochim. Biophys. Acta. 1976, 448, 451-459.

Fettiplace, R. & Haydon, D.A. Water permeability of lipid membranes.
Physiol. Rev., 1980, 60, 510-550.

Finkelstein, A. & Cass, A. Effect of cholesterol on the water permeability of thin lipid membranes. J. Gen. Physiol., 1968, 52, 1455-1725.

Fragata, M. & Bellemare, F. Dielectric constant dependence of biological oxidation-reduction. I. A model of polarity-dependent ferrocytocchrome c oxidation, Biophys. Chem., 1982, 15, 111-119.

Fragata, M. & Bellemare, F. Toward a multistep mechanism of cytochrome c reactivity. Answer to a comment. Biophys. Chem., 1983, 18, 207-210.

Fragata, M. & Bellemare, F. Micropolarities of lipid bilayers and micelles. II. Application limits of dielectric constant determinations with the polarity probe α -tocopherol. J. Colloid Interface Sci., 1985, 107, 553-559.

Fragata, M., El-Kindi, M & Bellemare, F. Mixing of single-chain amphiphiles in two-chain lipid bilayers. 2. Characteristics of chlorophyll a and α -tocopherol incorporation in unilamellar phosphatidylcholine vesicles. Chem. Phys. Lipids, 1985, 37, 117-125.

Galla, H.-J. & Sackmann, E. Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 339, 103-115.

Galla, H.-J., Theilen, U. & Hartmann, W. Transversal mobility in bilayer membrane vesicles: use of pyrene lecithin as optical probe. Chem. Phys. Lipids, 1979, 23, 239-251.

Glushko, V., Thaler, M.S.R. & Karp, C.D., Pyrene fluorescence fine structure as a polarity probe of hydrophobic regions: behavior in model solvents. Arch. Biochem. Biophys., 1981, 210, 33-42.

Gratzel, M. & Thomas, J.K. On the dynamics of pyrene fluorescence quenching in aqueous ionic micellar systems. Factors affecting the permeability of micelles. J. Am. Chem. Soc., 1973, 95, 6885-6889.

Griffith, O.H., Dehlinger, P.J. & Van, S.P. Shape of the hydrophobic barrier of phospholipid bilayers (Evidence for water penetration in biological membranes). J. Membrane Biol., 1973, 15, 159-192.

Ham, J.S. A new electronic state in benzene. J. Chem. Phys., 1953, 21, 756-758.

Hinkle, P.C. & McCarty, E. How cells make ATP. In Molecules to living cells, San-Fransisco: Freeman and Compagny, 1978, p. 161.

Huang, C. Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. Biochemistry, 1969, 8, 344-352.

Huang, C. & Mason, J.T. Geometric packing constrains in egg phosphatidylcholine vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1978, 75, 308-310.

Huang, W.T. & Levitt, D.G. Theoretical calculation of the dielectric constant of a bilayer membrane. Biophys. J., 1977, 17, 111-128.

Iwamoto, K. & Sunamoto, J. liposomal membranes . IX. Fluorescence depolarization studies on N-dansyl-hexadecylamine in liposomal bilayers. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1981, 54, 399-403.

Jones, O.T. & Lee, A.G. Interactions of pyrene derivatives with lipid bilayers and with $(Ca^{+2}-Mg^{+2})ATPase$. Biochemistry, 1985, 24, 2195-2202.

Kalyanasundaram, K. & Thomas, J.K. Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems. J. Am. Chem. Soc., 1977, 99, 2039-2044.
(a)

Kalyanasundaram, K. & Thomas, J.K. Solvent-dependent fluorescence of pyrene-3-carboxaldehyde and its applications in the estimation of polarity at micelle-water interfaces. J. Phys. Chem., 1977, 81,

2176-2180. (b)

Kaneda, N., Tanaka, F., Kido, N. & Yagi, K. Excimer formation of N-(1-pyrenesulfonyl)-dipalmitoyl-L- α -phosphatidylethanolamine at the lipid-water interface of fat cell plasma membranes. Photochem. Photobiol., 1985, 41, 519-525.

Kano, K., Kawazumi, H., Ogawa, T. & Sunamoto, J. Fluorescence quenching of pyrene and pyrenedecanoic acid by various kinds of N,N-dialkylanilines in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. Chem. Phys. Lett., 1980, 74, 511-514.

Läuger, P. Dielectric noise in membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 557, 283-294.

Lessard, J.G. & Fragata, M. Micropolarities of lipid bilayers and micelles. 3. Effect of monovalent ions on the dielectric constant of the water-membrane interface of unilamellar phosphatidylcholine vesicles. J. Phys. Chem., 1986, 90, 811-817.

Levine, Y.K., Bailey, A.I. & Wilkins, H.M.F. Multilayers of phospholipid bimolecular leaflets. Nature, 1968, 220, 577-580.

Lianos, P. & Georgiou, S. Solute-solvent interaction and its effect on the vibronic and vibrational structure of pyrene spectra. Photochem. Photobiol., 1979, 30, 355-362.

Lianos, P., Mukhopadhyay, A.K. & Georgiou, S. Microenvironment of aromatic hydrocarbons employed as fluorescent probes of liposomes. Photochem. Photobiol., 1980, 32, 415-419.

Lipschitz-Farber, C. & Degani, H. Kinetics of water diffusion across phospholipid membranes. ¹H- and ¹⁷O-NMR relaxation studies. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 600, 291-300.

Losev, A. & Mauzerall, D. Photoelectron transfer between a charged derivative of chlorophyll and ferricyanide at the lipid bilayer-water interface. Photochem. Photobiol., 1983, 38, 355-361.

Morris, D.A.N., McNeil, R., Castellino, F. & Thomas, J.K. Interaction of lysophosphatidylcholine with phosphatidylcholine bilayers. A photo-physical and NMR study. Biochim. Biophys. Acta, 1980, 599, 380-390.

Nakajima, A. Solvent effect on the vibrational structures of the fluorescence and absorption of pyrene. Bull. Chem. Soc. Jpn., 1971, 44, 3272-3277.

Nakajima, A. Solvent effect on the vibrational structures of the fluorescence spectra of coronene and triphenylene. J. Lumin., 1974, 8, 266-269.

Nichols, J.W. & Deamer, D.W. Net proton-hydroxyl permeability of large unilamellar liposomes measured by an acid-base titration technique. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1980, 77, 2038-2042.

Noller, C.R. Chemistry of organic compounds, (3rd ed.), Philadelphia: W.B. Saunders Compagny, 1965.

Offen, H.W. & Turley, W.D. Pyrene fluorescence spectra in micelles at high pressures. J. Phys. Chem., 1982, 86, 3501-3503.

Podo, F. & Blasie, J.K. Nuclear magnetic resonance studies of lecithin bimolecular leaflets with incorporated fluorescent probes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1977, 74, 1032-1036.

Pownall, H.J., Hickson, D.L. & Smith, L.C. Transport of biological lipophiles: effect of lipophile structure. J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 2440-2445.

Reeves, J.P. & Dowben, R.M. Water permeability of phospholipid vesicles. J. Membrane Biol., 1970, 3, 123-141.

Schmidt, D., Steffen, H. & Von Planta, C. Lateral diffusion, order parameter and phase transition in phospholipid bilayer membranes containing tocopheryl acetate. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 443, 1-9.

Seimiya T. & Ohki, S. Ionic structure of phospholipid membranes and binding of calcium ions. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 298, 546-561.

Singleton, W.S., Gray, M., Brown, M.L. & White, J.L. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. J. Am. Oil Chem. Soc., 1963, 42, 53-56.

Somerharju, P.J., Virtanen, J.A. & Eklund, K.K. 1-Palmitoyl-2-pyrenedecanoyl glycerophospholipids as membrane probes: evidence for regular distribution in liquid-crystalline phosphatidylcholine bilayers. Biochemistry, 1985, 24, 2773-2781.

Soutar, A.K., Pownall, H.J., Hu, A.S. & Smith, L.C. Phase transitions in bilamellar vesicles. Measurements by pyrene excimer fluorescence and effect on transacylation by lecithin: cholesterol acyltransferase. Biochemistry, 1974, 13, 2828-2836.

Sunamoto, J., Baba, Y., Iwamoto, K. & Kondo, H. Liposomal membranes. XX. Autoxidation of unsaturated fatty acids in liposomal membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 833, 144-150.

Surewicz, W.K., Effect of osmotic gradient on the physical properties of membrane lipids in liposomes. Chem. Phys. Lipids, 1983, 33, 81-85.

Tanford, C. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes, (2nd ed.). New-York: Wiley-Interscience, 1980.

Tsui, F.C., Ojcius, D.M. & Hubbel, W.L. The intrinsic pKa values for phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in phosphatidyl-choline host bilayers. Biophys. J., 1986, 49, 459-468.

Turro, N.J., Kuo, P.L., Somasundaran, P. & Wong, K. Surface and bulk interactions of ionic and non-ionic surfactants. J. Phys. Chem., 1986, 90, 288-291.

Vanderkooi, J.M. & Callis, J.B. Pyrene. A probe of lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes. Biochemistry, 1974, 13, 4000-4006.

Vanderkooi, J.M., Fischkoff, S., Andrich, M., Podo, F. & Owen, C.S. Diffusion in two dimensions: comparison between diffusional fluorescence quenching in phospholipid vesicles and in isotropic solution. J. Chem. Phys., 1975, 63, 3661-3666.

Waka, Y., Mataga, N. & Tanaka, F. Behavior of heteroexcimer systems in single bilayers liposomes. Photochem. Photobiol., 1980, 32, 335-340.

Wakayama, N. & Kondo, Y. Delayed luminescence of pyrene in phosphatidylcholine dispersions. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 647, 155-158.

Waldi, D. Spray reagents for thin-layer chromatography. In E. Stahl (Ed.), Thin-layer chromatography. A laboratory handbook. Berlin: Springer-Verlag and New-York: Academic Press, 1965.

Warshel, A. & Russel, S.T. Calculation of electrostatic interactions in biological systems and in solutions. Quart. Rev. Biophys., 1984, 17, 283-422.

Yamauchi, R. & Matsuchita, S. Lateral Diffusion in the hydrophobic region of phospholipid liposomes containing tocopheryl acetates. Agric. Biol. Chem., 1979, 43, 357-362.

Yamazaki, T., Tamai, N. & Yamazaki, I. Molecular association of pyrene in the langmuir-blodgett monolayer film: analysis of picosecond time-resolved fluorescence spectra. Chem. Phys. Lett., 1986, 124, 326-330.

Zachariasse, K.A., Vaz, W.L.C., Sotomayor, C. & Kühnle, W. Investigation of human erythrocyte ghost membranes with intramolecular excimer probes. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 688, 323-332.