

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ A

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN CHIMIE

par

ROXANE BERNIER

EFFET DE L'AMPHOTÉRICINE B SUR LA
MICROVISCOSITÉ DE MODÈLES MEMBRANAIRES

AVRIL 1989

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 mémoire a été réalisé
à l'Université du Québec à Trois-Rivières
dans le cadre du programme
de maîtrise en chimie extensionné
de l'Université du Québec à Montréal
à l'Université du Québec à Trois-Rivières

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier les laboratoires de madame I. Gruda et de monsieur M. Ringuet pour m'avoir fourni les sondes membranaires nécessaires à la bonne marche de ce projet.

Je voudrais aussi remercier madame I. Gruda pour son appui autant technique que théorique.

De plus, je dois toute ma reconnaissance aux personnes qui, de près ou de loin, m'ont encouragée et soutenue pour mettre à terme ce projet.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.	iii
INTRODUCTION	1
Théorie	3
CHAPITRE 1	3
Antibiotiques polyéniques	3
L'Amphotéricine B	6
Mécanisme d'activité	8
CHAPITRE 2	16
Les membranes cellulaires	16
Structure de la membrane cellulaire	16
CHAPITRE 3	21
Viscosité de modèles membranaires et de membranes naturelles	21
CHAPITRE 4	28
Sondes membranaires fluorescentes	28
CHAPITRE 5	31
Partie expérimentale	31
Produits	31
Sondes membranaires à profondeur programmée	32
Détermination de la viscosité: Séries de solvants polaires et apolaires.	33
Courbes Standard	36

CHAPITRE 6 41
 Résultats et discussion. 41

CHAPITRE 7 66
 Conclusion 66

RÉFÉRENCES 68

APPENDICE 73

TABLEAUX

Tableau 1:	Microviscosité de membranes naturelles	25
Tableau 2:	Microviscosité de modèles membranaires	26
Tableau 3:	Composition (v/v) de la série de solvants polaires ($E_T = 55.5 - 56$)	51
Tableau 4:	Composition (v/v) de la série de solvants apolaires ($E_T = 30$)	52
Tableau 5:	Valeurs de microviscosité de vésicules de DPPC trouvées expérimentalement et en littérature .	56
Tableau 6:	Effet de l'amphotéricine B, en fonction du temps, sur la microviscosité des vésicules simples et celles contenant de l'ergostérol ou du cholestérol. Étude en fluorescence.	63
Tableau 7:	Effet de l'amphotéricine B, en fonction du temps, sur la microviscosité des vésicules simples et celles contenant de l'ergostérol ou du cholestérol. Étude en fluorescence.	64

FIGURES

Figure 1:	Structure chimique de trois antibiotiques polyéniques	4
Figure 2:	Structure chimique du cholestérol et de l'ergostérol	11
Figure 3:	Schéma de l'hypothèse de pores et de demi-pores de Kruijff et Demel	13
Figure 4:	Modèle simple d'une bicouche phospholipidique	18
Figure 5:	Modèle de mosaïque fluide de la membrane cellulaire selon Singer et Nicolson	19
Figure 6:	Courbe standard du paramètre de polarité E_t en fonction de la longueur d'onde maximum d'absorption (nm) du ditertbutyl-2,6 (triphenyl-2',4',6'-pyridinium)-4 phénolate	35
Figure 7:	Spectre de fluorescence du hydroxyméthyl-1 pyrène en solution en milieu polaire	43
Figure 8:	Spectre de fluorescence du méthyl-1 pyrène en solution en milieu polaire	44
Figure 9:	Spectre de fluorescence du hydroxyméthyl-1 pyrène en solution en milieu apolaire	45
Figure 10:	Spectre de fluorescence du méthyl-1 pyrène en solution en milieu apolaire	46
Figure 11:	Courbe standard, dans des solvants polaires, de l'effet de la viscosité sur l'intensité de fluorescence	48

Figure 12:	Courbe standard, dans des solvants apolaires, de l'effet de la viscosité sur l'intensité de fluorescence	49
Figure 13:	Spectre de fluorescence de l'hydroxyméthyl-1 pyrène en milieu membranaire	54
Figure 14:	Spectre de fluorescence du méthyl-1 pyrène en milieu membranaire	55
Figure 15:	Effet de l'ergostérol sur la microviscosité des vésicules phospholipidiques. Etudes en fluorescence	59
Figure 16:	Effet du cholestérol sur la microviscosité des vésicules phospholipidiques. Etude en fluorescence	60
Figure 17:	Structure chimique du méthyl-1 pyrène et de l'hydroxyméthyl-1 pyrène	74

INTRODUCTION

L'amphotéricine B est un antibiotique polyénique produit par les "Streptomyces". Vers la fin des années 1950 et le début des années 1960, elle fut introduite sur le marché pharmaceutique. Présentement, l'amphotéricine B est utilisée en clinique comme agent antifongique, soit pour la lutte contre les mycoses profondes.

L'amphotéricine B, sous forme de fungizone, est la drogue la plus utilisée pour le traitement d'infection systémique par les champignons. Même si ce médicament, lorsque administré aux patients, occasionne des effets secondaires importants, il demeure le plus efficace de cette classe de médicaments. Les infections profondes du système par les champignons surviennent souvent chez les patients immunodéficients, par exemple, dans le cas du SIDA ou à la suite d'une chimiothérapie, d'où l'importance croissante de l'utilisation de cet agent.

Plus récemment, une autre propriété de l'amphotéricine B a été mise en évidence, soit une action synergique de l'amphotéricine B, à faible concentration, avec certains agents antitumoraux. Les résultats de cette action sont intéressants, soit une guérison presque complète de souris leucémiques. Chez l'être humain par contre, les résultats ne sont pas aussi spectaculaires.

Bien que plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'effet antifongique de l'amphotéricine B, celles-ci ne peuvent expliquer l'action synergique avec des agents antitumoraux. Cette synergie d'action étant suffisamment complexe, le mécanisme d'action de l'amphotéricine B à ce jour, n'a pas encore été totalement élucidé.

Une hypothèse possible, serait que l'incorporation de l'amphotéricine B altérerait certaines propriétés physico-chimiques de la membrane cellulaire ce qui faciliterait la pénétration des agents antitumoraux.

Dans ce mémoire, nous nous proposons d'étudier l'effet de petites concentrations de l'amphotéricine B sur les propriétés physico-chimiques de la membrane cellulaire, et plus particulièrement, sur la microviscosité. Les modèles membranaires utilisés seront des vésicules purement phospholipidiques ou contenant différentes proportions des stérols. Nous utiliserons comme outil de mesure, des sondes membranaires dérivés du pyrène, pour suivre les changements de microviscosité dus à la présence des stérols et de l'antibiotique. L'étude sera faite en spectroscopie de fluorescence.

Théorie

CHAPITRE 1

Antibiotiques polyéniques

A ce jour, il y a environ deux cents antibiotiques polyéniques de connus. La structure chimique de quarante d'entre eux est connue ou partiellement élucidée. De tous ces composés, seulement deux sont utilisés cliniquement, soit l'amphotéricine B et la nystatine ¹.

I. Structure chimique et activité pharmacologique

D'une façon générale, les molécules des antibiotiques polyéniques tel l'amphotéricine B, la nystatine, la filipine et l'étruscoïmycine (fig. 1), sont composées d'un macrocycle lactonique contenant un nombre variable de doubles liaisons. Ces doubles liaisons se retrouvent toutes d'un même côté du macrocycle, du côté ayant le caractère hydrophobe. De l'autre côté du macrocycle, nous retrouvons un nombre variable de groupements hydroxyles, donnant à ce côté du cycle un caractère hydrophile. Donc, ayant dans le cycle une partie hydrophobe et une autre hydrophile, les antibiotiques polyéniques sont des composés amphiphiles. De plus, sur le macrocycle nous pouvons avoir la présence d'un sucre aminé et/ou d'une composante aromatique.

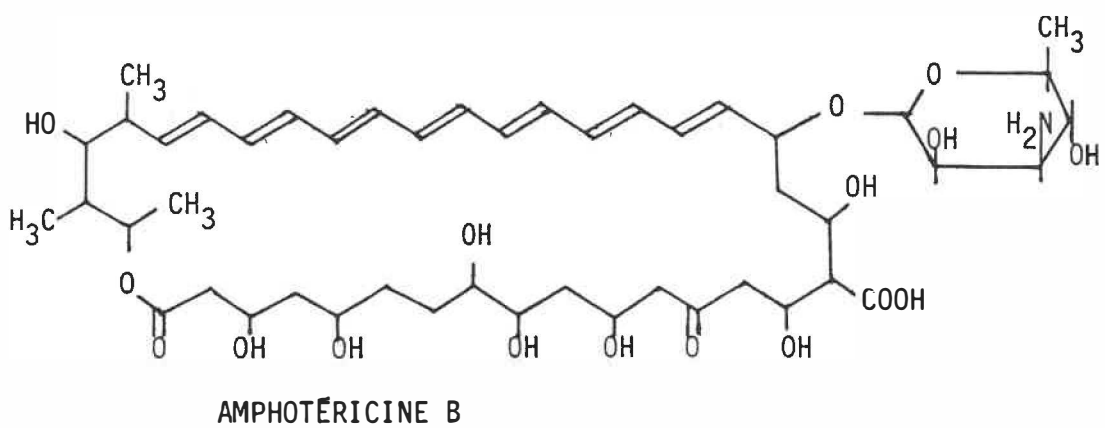
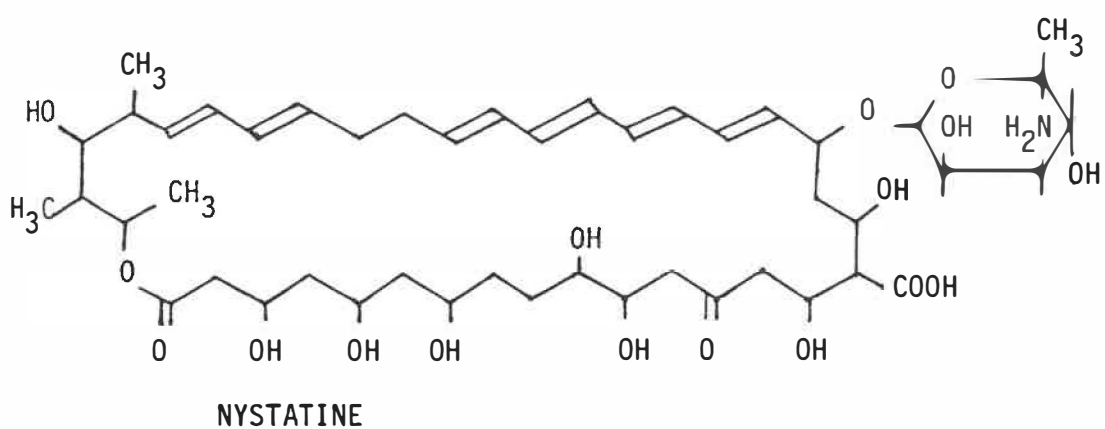
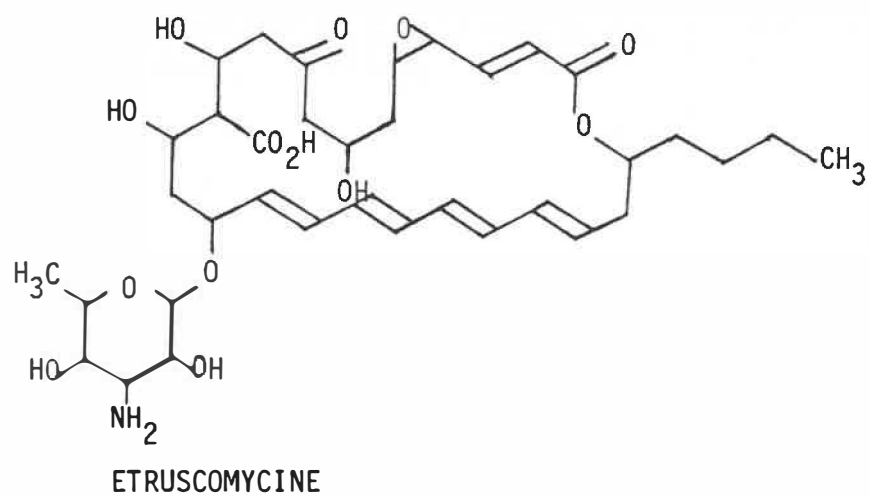


Figure 1: Structure chimique de trois antibiotiques polyéniques

La différence structurale entre des antibiotiques polyéniques réside dans:

- la grandeur du macrocycle
- le nombre de doubles liaisons
- le nombre de groupements hydroxyles (-OH)
- la présence ou l'absence d'un sucre aminé, plus précisément la mycosamine
- et la présence ou l'absence d'une composante aromatique

Par leur structure chimique, les antibiotiques polyéniques font partie de la classe des macrolides. Cette classe regroupe les antibiotiques formés par un aglycone de nature lactonique macrocyclique qui peut être lié glycosidiquement à une ou deux molécules de sucres, et ces sucres sont généralement très spécifiques.

L'amphotéricine B fait partie du sous-groupe des macrolides polyéniques, où le macrocycle contient au moins trois doubles liaisons conjuguées, toutes trans, peu ou pas de groupements méthyles rattachés au cycle, souvent de nombreux groupements hydroxyles. Parfois ils sont dépourvus de constituant osidique.

On peut aussi diviser les antibiotiques polyéniques en deux classes du point de vue de leur action ²;

Le Groupe I: on retrouve ici, les polyènes contenant moins de sept doubles liaisons et ne causant pas ou peu de changement de perméabilité de la membrane aux ions potassium (K^+)

Le Groupe II: on retrouve ici les polyènes contenant sept doubles liaisons ainsi que leurs dérivés causant à faible concentration un changement de perméabilité de la membrane aux ions potassium (K^+) et ce, d'une façon réversible et, à plus grande concentration, une lyse (irréversible) de la cellule.

Les antibiotiques polyéniques sont généralement peu solubles dans l'eau, mais se dissolvent relativement bien dans des solvants polaires, tel le diméthylsulphoxyde ^{3, 4}.

Deux de ces composés, l'amphotéricine B et la nystatine sont utilisés en clinique, en tant qu'agents antifongiques. La nystatine pour le traitement des infections cutanées et l'amphotéricine B pour le traitement des infections systémiques.

II. L'Amphotéricine B

Du point de vue de la structure chimique, le macrocycle de l'amphotéricine B est formé de trente-sept atomes de carbone et d'un atome d'oxygène. Le macrocycle contient sept doubles liaisons toutes trans ainsi que huit groupements hydroxyles donnant, à cette partie du cycle, le caractère polaire.

Ayant une partie de la molécule polaire et une autre apolaire, l'amphotéricine B est une substance amphiphile. De plus, comme nous pouvons le voir sur la figure 1, il y a aussi trois groupements méthyles, un groupe carboxyle ainsi qu'un hexosamine, qui sont reliés au macrocycle. Etant donné la présence du groupement amine sur le sucre et du groupe carboxyle sur le macrocycle, à pH neutre, il y aura un transfert de proton pour former un ion carboxylate (COO^-) et un ion ammonium (NH_4^+). L'amphotéricine B se présente à pH neutre sous la forme d'ions dipolaires ou zwitterions plutôt que sous la forme non ionisée. Donc, l'amphotéricine B en plus d'être un composé amphiphile est aussi un composé amphotère.

Par son grand nombre de doubles liaisons, l'amphotéricine B est un composé très instable à la lumière, à la chaleur, à l'air et au valeur extrême de pH. Par contre, lorsque l'amphotéricine B est conservée au réfrigérateur dans une bouteille ambrée, pour la protéger de la lumière, elle peut conserver son activité pour une période prolongée.

L'amphotéricine B possède une activité biologique très forte;

1. Elle inhibe la croissance d'un grand nombre de levures et champignons.
2. Elle n'a pas d'activité anti-bactérienne

3. Elle est très toxique pour les patients lorsque appliquée par voie intraveineuse.

Il a été constaté que l'activité biologique de l'amphotéricine B est reliée avec la présence des stérols dans la membrane cellulaire. Ainsi, les cellules eukariotes absorbent les antibiotiques polyéniques ce qui leur est fatal, tandis que les cellules prokariotes, dont les membranes ne contiennent pas des stérols, n'absorbent peu ou pas les antibiotiques polyéniques et ne sont pas affectées. Il a été également démontré, que les champignons résistants à l'amphotéricine B contiennent moins d'ergostérol que les champignons sensibles au traitement ⁵.

L'activité est amoindrie lorsque les cellules sont au repos et les parois riches en chitine pourraient être responsable d'une inhibition de l'activité de l'amphotéricine B sur les cellules ⁶.

III. Mécanisme d'activité

Beaucoup de travaux de recherche ont démontré que l'amphotéricine B agit principalement au niveau de la membrane cellulaire ^{1, 2, 4, 7}. Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont les membranes contenant des stérols qui sont sensibles aux antibiotiques polyéniques.

L'action de l'amphotéricine B au niveau de la membrane cellulaire serait due à une complexation de l'antibiotique avec les stérols de celle-ci 8, 9, 10. Cette complexation amphotéricine B-stérol entraînerait une augmentation de la perméabilité cellulaire, car l'interaction phospholipide-stérol dans la membrane ne se fait plus, en totalité ou en partie, ce qui amène une perte de la biostabilisation de la cellule. L'amphotéricine B engendre alors des dommages à la membrane, ce qui favorise la fuite d'un nombre important des constituants de la cellule tels le tétrose, le pentose et l'urée ainsi que les cations (K^+ , Mg^{2+} ...) et la vitesse de la fuite hors de la cellule dépend de la grosseur des molécules 2. Malgré l'effet de l'amphotéricine B, la membrane reste imperméable aux grosses molécules comme les protéines, le glucose-4-phosphate et le sucrose 11, 12.

Comme nous l'avons vu plus tôt, l'amphotéricine B a une certaine capacité de se complexer avec les stérols et, un point déterminant la sensibilité d'une membrane cellulaire, serait le niveau de stérol dans celle-ci 2. Par exemple, les cellules résistantes à l'amphotéricine B sont celles ayant un bas niveau de stérol et dont la vitesse de synthèse du stérol est environ deux fois plus petite que celles des cellules sensibles.

L'amphotéricine B présente aussi une toxicité sélective entre

les organismes eukariotes et les cellules animales; ce qui est relié à la présence d'ergostérol dans la membrane des champignons par rapport au cholestérol dans les cellules animales ^{13, 14}. Donc l'amphotéricine B aurait une plus grande affinité pour l'ergostérol et ceci serait dû à la distribution des doubles liaisons dans les molécules des stérols, (fig. 2) ¹⁴.

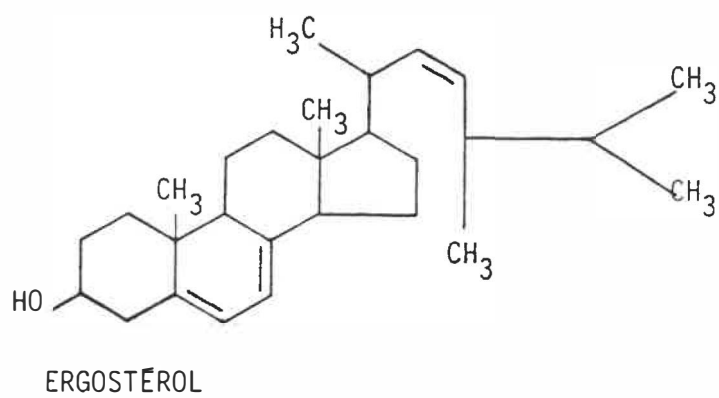
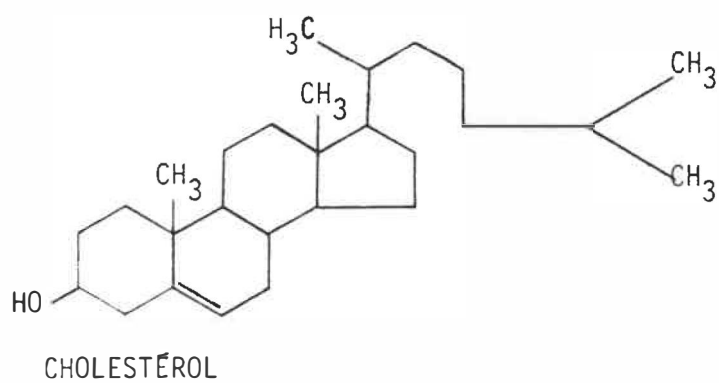


Figure 2: Structure chimique du cholestérol et de l'ergostérol

La concentration d'amphotéricine B dans le milieu est un facteur déterminant de son activité. Par exemple, à faible concentration, il y aura fuite de certains constituants de la cellule. Cet effet est réversible lorsque l'amphotéricine B est retirée. Plus on augmentera la concentration d'amphotéricine B, plus l'action sera différente, allant de la fuite irréversible de constituants vitaux, jusqu'à la lyse et la mort de la cellule ^{2, 4}.

Pour expliquer cette fuite des constituants indispensables vers l'extérieur de la cellule, il y a plusieurs hypothèses d'émissions et la plus répandue est celle de la formation de pores. D'après cette hypothèse, le complexe amphotéricine B-stérol se présente sous forme d'un canal ou pore passant à travers de la membrane ⁸. Ce pore serait formé de huit molécules d'amphotéricine B et de huit molécules de stérol alternativement (fig. 3). Le pore ainsi formé est hydrophobe vers l'extérieur, soit la série de doubles liaisons de l'amphotéricine B vers l'extérieur et l'intérieur du pore est hydrophile donc les groupements hydroxyles (OH) vers l'intérieur. Ce pore est cylindrique d'un diamètre intérieur d'environ huit Å.

Selon certains auteurs, dépendamment des conditions expérimentales il y a formation de pores ou encore de demi-pores ¹⁵. Le pore est formé lorsque l'amphotéricine B est ajouté des deux côtés de la bicouche lipidique à la fois et est sélectif aux

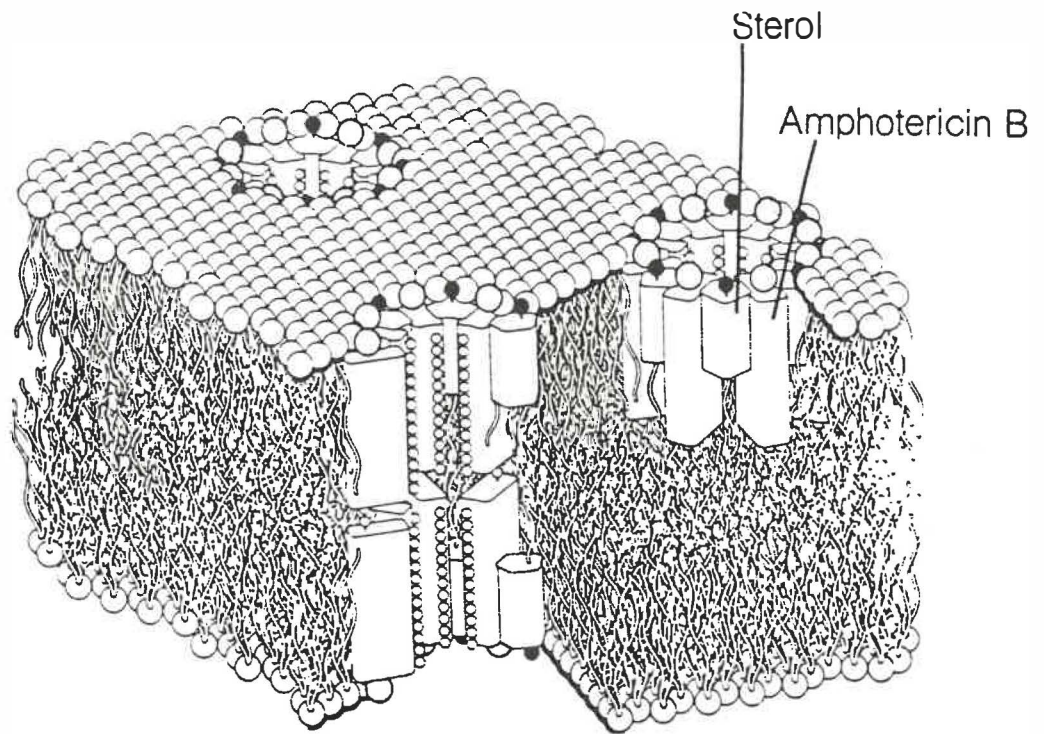


Figure 3: Schéma de l'hypothèse de pore et de demi-pores de Kruijff et Demel

cations. Le demi-pore, pour sa part, est formé, lorsque l'amphotéricine B est ajouté d'un seul côté de la bicouche lipidique et est sélectif aux anions ¹⁶. Les canaux trans-membranaires formés des demi-pores ont une ouverture intermittente qui est provoquée par le mouvement latéral de la membrane qui produit l'alignement transitoire des deux demi-pores ce qui permet la fuite des cations ¹⁷.

On pourrait aussi penser que la fuite des ions potassium (K^+) et magnésium (Mg^{2+}) serait due à une altération des propriétés physico-chimiques de la membrane cellulaire. Par exemple, le complexe amphotéricine B-stérol diminuant les interactions naturelles phospholipide-stérol réduirait l'activité des enzymes membranaires, spécialement l'ATPase, ce qui peut entraîner aussi une fuite ionique ¹. La fuite des ions potassium (K^+) et magnésium (Mg^{2+}) entraîne aussi un plus grand pompage des cations ce qui rend nécessaire une plus grande synthèse de l'ATP. Il y aurait aussi une stimulation du transport de l'uridine et de la synthèse de l'ADN et de l'ARN ². Donc, l'amphotéricine B en plus d'altérer les propriétés physico-chimiques de la membrane altère aussi les propriétés biologiques, morphologiques et fonctionnelles ⁷.

Il est à noter que, même si le mécanisme d'action de l'amphotéricine B n'est pas complètement élucidé, il a été mentionné que pour avoir une activité optimale, l'amphotéricine B doit être

inclus dans des micelles de petites tailles présentant une structure labile et aptes à se complexer avec les stérols membranaires ⁶.

Dans les essais faits sur des animaux concernant la synergie d'action de l'amphotéricine B avec des agents antitumoraux, plusieurs résultats intéressants ont été obtenus. Par exemple, lorsque que l'amphotéricine B est administrée avec des agents antitumoraux à des souris leucémiques, la guérison est presque complète ^{18, 19}. Selon certaines hypothèses, la membrane serait plus perméable et faciliterait ainsi la pénétration de la deuxième drogue ².

Il est très probable que cette augmentation de la perméabilité s'exprime par un changement des propriétés physiques générales de la membrane comme par exemple sa fluidité. Dans cette ligne de pensée s'inscrit ce travail où l'on s'est proposé d'étudier l'effet de l'amphotéricine B sur la microviscosité de la bicouche lipidiques.

CHAPITRE 2

Les membranes cellulaires

Comme nous l'avons vu plus tôt, il a été démontré que l'action de l'amphotéricine B se fait au niveau de la membrane cellulaire. Il est donc nécessaire de bien connaître la structure de la membrane cellulaire pour élucider le mécanisme exact de l'action biologique de l'amphotéricine B.

I. Rôle dans le fonctionnement de la cellule

Même si la membrane cellulaire n'a qu'une épaisseur de quelques nm, elle est la pièce maîtresse de l'organisation fonctionnelle de la cellule. Elle est une barrière extrêmement sélective, laissant entrer d'une part les nutriments et excréant d'autre part les déchets du métabolisme et les substances synthétisées.

II. Structure de la membrane cellulaire

Les membranes cellulaires sont constituées de phospholipides dont une extrémité porte des charges électriques et l'autre est constituée de chaînes aliphatiques d'acides gras neutres. Ces

phospholipides forment une bicouche, c'est-à-dire que les extrémités polaires sont tournées vers le milieu aqueux à l'extérieur et à l'intérieur de la cellule et les chaînes d'acides gras neutres se trouvent face à face au sein de cette bicouche (fig. 4). Ce schéma est beaucoup trop simplifié pour représenter la structure de la membrane.

Les membranes contiennent aussi des stérols, soit le cholestérol en milieu animal et entre autre l'ergostérol dans les tissus végétaux. Vraisemblablement, les stérols se situeraient entre les chaînes d'acide gras des phospholipides en modifiant les propriétés physico-chimiques de la membrane ²⁰.

Il y a un autre constituant essentiel dans la membrane, soit les protéines qui forment la majeure partie de la masse sèche non lipidique de la membrane. Ces protéines se combinent, par l'intermédiaire de leurs chaînes latérales d'acides aminés, avec les molécules d'eau et les extrémités non polaires des phospholipides des membranes ²⁰.

Selon le modèle le plus répandu les protéines recouvrent les faces internes et externes de la bicouche lipidique. Ce modèle est celui de Singer et Nicolson (fig. 5) ²¹. Il est à noter que les chaînes d'acides gras sont très mobiles animées d'oscillations sur place de sorte que l'intérieur de la membrane est pratiquement à l'état liquide tandis que les extrémités polaires des

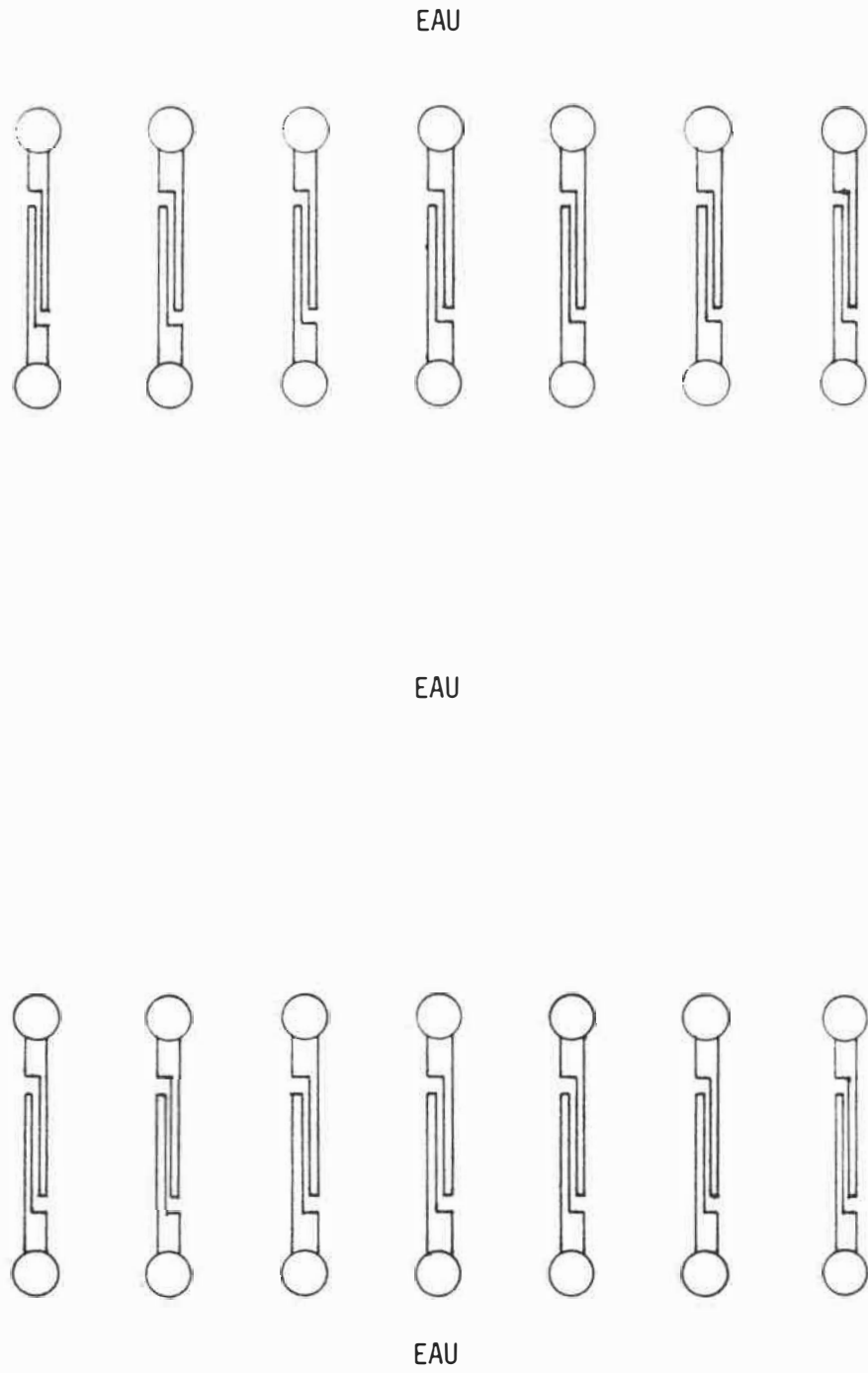


Figure 4: Modèle simple d'une bicouche phospholipidique

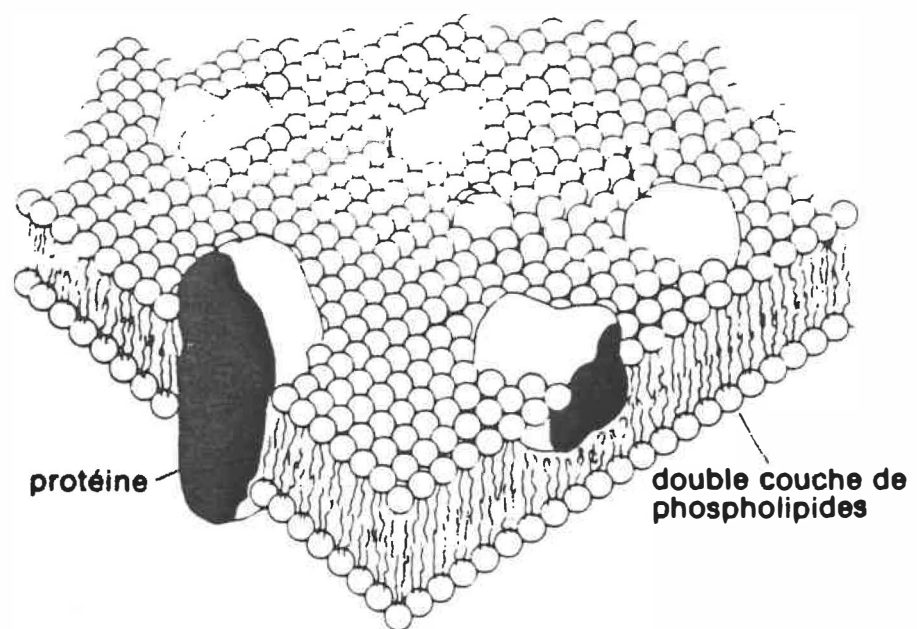


Figure 5: Modèle de mosaïque fluide de la membrane cellulaire selon Singer et Nicolson ²¹

phospholipides situés sur ces deux faces gardent une disposition cristalline.

Le dernier constituant des membranes cellulaires sont les glucides. Les glucides sont présents en petite quantité dans les membranes cellulaires et sont fixés sur les protéines et localisés exclusivement à la face externe ²⁰.

En résumé, la membrane cellulaire est composée de phospholipides, de stérols, de protéines et d'une petite quantité de glucides. Elle joue un rôle important dans l'organisation fonctionnelle de la cellule, dans les interactions entre les cellules qui aboutissent à l'organisation des tissus et aussi dans la reconnaissance de cellules étrangères pénétrant dans l'organisme.

CHAPITRE 3

Viscosité de modèles membranaires et de membranes naturelles

Comme nous l'avons vu précédemment, l'amphotéricine B modifie la perméabilité membranaire. Une des propriétés physico-chimiques qui peut influencer la perméabilité est la viscosité. Dans ce travail, un de nos buts est de déterminer l'effet des stérols et de l'amphotéricine B sur la viscosité de la membrane cellulaire. Donc, nous avons essayé de retracer dans la littérature des valeurs expérimentales de viscosité ainsi que les paramètres pouvant modifier celle-ci, et l'effet du cholestérol et de l'ergostérol sur la viscosité de la membrane.

Il n'y a que très peu de valeurs expérimentales de la viscosité membranaire dans la littérature; quand aux paramètres influençant la viscosité, il y a plus d'informations.

Les facteurs déterminants la viscosité membranaire sont les suivants 22, 23:

- la longueur de la chaîne d'acide gras du phospholipide ainsi que l'existence de doubles liaisons sur cette chaîne.

Par exemple, sous la température de transition, la viscosité des vésicules de DMPC est de 38 cp et celle des vésicules de DPPC 18 cp ²⁴. Dans une autre référence nous retrouvons les valeurs de 4,8 cp pour des vésicules de DPPC et de 48 cp pour des vésicules de DSPC ²⁵.

- **le caractère du phospholipide**

Des valeurs de microviscosité de liposomes étant constitués de différents phospholipides ont été données dans la littérature. Lorsque le liposomes est constitués de phosphatidylcholine la microviscosité est de 0,95 poise, de phosphatidylsérine de 1,53 poise et finalement de sphingomyéline de 18,9 poise ²⁶.

- **la présence de cholestérol**

Shinitzky donne une série de valeurs de microviscosité des liposomes contenant différentes proportions de cholestérol. Pour les rapports cholestérol/phospholipide variant de 0 à 1,4 la microviscosité augmente grandement de 1,8 à 9,1 poise et ce à une température de 25°C ²⁶.

- **la température**

Par exemple, la microviscosité de la bicouche phospholipidique varie de 30 à 3,5 cp et ce avec des variations de température ²⁵.

Dans différents travaux sur les modèles membranaires on trouve que l'effet du cholestérol sur la viscosité membranaire dépend de la température. Au-dessus de la température de transition, il augmenterait la viscosité tandis qu'au-dessous de la température de transition, il diminuerait la viscosité ²⁷.

Par contre, dans la littérature, on retrouve beaucoup de contradiction sur l'effet du cholestérol sur la microviscosité de la membrane cellulaire, ce qui dépend probablement des méthodes et des modèles utilisés ²⁷.

Les stérols sont présents dans la majorité des membranes naturelles en quantité pouvant aller jusqu'à 50% de la totalité des lipides. Le rôle qu'ils jouent n'est pas encore élucidé, mais il est certain qu'ils affectent plusieurs propriétés physico-chimiques et physiologiques de la membrane. La propriété qui nous intéresse ici est la viscosité de la membrane et l'effet des stérols sur celle-ci.

Il y a aussi quelques autres facteurs influençant l'état physique de la bicouche, comme le pourcentage d'eau, la concentration des ions présents ainsi que leur espèce, la composition en lipide, ... Ces facteurs vont par le fait même, affecter le comportement cholestérol-lipide dans la bicouche ²⁵.

Les valeurs de microviscosité ~~membranaire~~ déterminées pour les membranes naturelles à l'aide de sondes optiques sont rares dans la littérature, mais toutefois quelques résultats sont disponibles. Le tableau 1 résume quelques-uns de ces résultats.

Nous avons aussi trouvé dans la littérature des valeurs de microviscosité pour des modèles membranaires. Dans le tableau 2, nous retrouvons des valeurs de microviscosité pour des vésicules de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), des vésicules de distéaroylphosphatidylcholine (DSPC) mesuré à l'aide d'une sonde fluorescente, soit le (p-(dialkylamino)-benzylidène) malononitrile. Nous retrouvons aussi des valeurs pour des vésicules de DPPC et de dimyristoylphosphatidylcholine mesurées par calorimétrie. Enfin des valeurs de modèles de dimyristoyl-lécithine avec et sans cholestérol.

Il faut souligner que les résultats de microviscosité obtenus sur les modèles membranaires varient considérablement d'un modèle à un autre.

Tableau 1.

Microviscosité de membranes naturelles

Cellules	Sondes	Références	Microviscosité (CP)
A-431 en suspension	DPH	28	290 (37°C)
A-431 avec cholestérol	DPH	28	300 (37°C)
Cellules tumorales SEWA	DPP	29	41 - 95
Lymphocytes humains	DPP	29	52
Erythrocytes-ghost	DFME	30	76 (37°C) 500 (5°C)
Erythrocytes-ghost avec cholestérol	DFME	30	133 (37°C)

Légende: DPH - 1,5-diphényl-1,3,5-hexatriène

DPP - dipyrénylpropane

DFME - dipyrénylméthyléther

Tableau 2.

Microviscosité de modèles membranaires

Modèles membranaires	Sondes	Références	Microviscosité(CP)
DPFC	DAAEM	25	4,8 ^a 9,3 ^b
DSFC	DAAEM	25	48 ^a 32,5 ^b
DPFC ^e	—	24	18 ^c 30 ^d
DMFC ^e	—	24	38 ^c 125 ^d
Dimyristoyl- lecithine	Pyrène	31	59,2
Dimyristoyl- lecithine- cholostérol	Pyrène	31	136

Légende: DPFC: dipalmitoylphosphatidilcholine

DSFC: distéaroylphosphatidileholine

DMFC: dimyristoylphosphatidilcholine

DAAEM: (p-(dialkylamino)-benzylidène)malononitrite

a: Comparé avec la courbe standard faite avec des alcools de longueur de chaîne différentes à la température ambiante

b: Comparé avec la courbe standard faite dans l'éthylène glycol à différentes températures

c: température plus grande que la température de transition

d: température plus faible que la température de transition

e: déterminé par calorimétrie

CHAPITRE 4

Sondes membranaires fluorescentes

La spectroscopie de fluorescence est une technique très utilisée pour étudier différentes propriétés des membranes cellulaires ou de modèles membranaires. Les propriétés membranaires les plus souvent étudiées, par cette méthode, sont la microviscosité des différentes régions de la membrane, la mobilité latérale des lipides et des protéines, l'orientation et la mobilité rotationnelle des lipides, l'asymétrie de la membrane, la fusion membranaire ...

Les sondes membranaires utilisées pour étudier les propriétés, ci-haut mentionnées, sont nombreuses. En général, les molécules de ces fluorophores sont composées d'un ou de plusieurs cycles aromatiques ou d'une série de doubles liaisons conjuguées

32.

De part leur origine, les sondes membranaires peuvent être classées de la façon suivante, soit intrinsèque ou extrinsèque. Les fluorophores intrinsèques sont des substances présentes naturellement dans les membranes, tel l'acide aminé tryptophane trouvé dans plusieurs protéines. Ces sondes intrinsèques ne sont

Le deuxième sous-groupe, soit les sondes covalentes, sont pour la plupart utilisées pour marquer les protéines solubles dans l'eau. L'utilisation de ces sondes est restreinte à l'étude de membranes purifiées ³³.

Le pyrène et certains de ces dérivés sont souvent utilisés comme sondes membranaires extrinsèques. Les changements de l'intensité de la fluorescence sont attribués, soit aux changements de la polarité de l'environnement de la sonde, ^{34,35} soit aux changements de la microviscosité ^{36,37}.

Le pyrène étant très peu polaire, il se situe à l'intérieur de la bicouche. Si les régions plus polaires doivent être étudiées, un groupement polaire doit être introduit dans la molécule du pyrène. Ce groupement ne doit pas être fixé directement sur le cycle aromatique pour ne pas modifier les propriétés spectrales de la sonde. En plaçant le groupement polaire plus près ou plus loin du chromophore, on peut programmer la profondeur à laquelle la sonde se retrouvera à l'intérieur de la membrane.

CHAPITRE 5

Partie expérimentale

Du point de vue de l'expérimentation, ce travail se divisait en deux parties différentes. La première partie, était de vérifier comment les sondes membranaires se comportaient vis-à-vis un changement de viscosité. Dans la deuxième partie, nous avons vérifié à l'aide de ces sondes, le changement de viscosité des modèles membranaires lorsqu'on ajoutait à ceux-ci du cholestérol ou de l'ergostérol et l'antibiotique polyénique, l'amphotéricine B.

Produits

De la compagnie "Fischer Chemicals" ont été achetés les produits suivants: le méthanol de grade "certified", le cyclohexane de grade "certified A.C.S.", la paraffine, l'acide chlorhydrique, l'hydroxyde de potassium de grade "reagent", le β -naphthol de grade "certified", le tri(hydroxyméthyl) aminométhane (THAM) et le cholestérol.

L'éthylène glycol et le glycérol de grade "certified" ont été achetés de la compagnie "Anachemia". L'éthanol (94%) provenait de la compagnie "Commercial Alcohol".

De la compagnie "Sigma" ont été achetés, le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), l'amphotéricine B ainsi que l'ergostérol. Ce dernier a été recristallisé deux fois dans l'éthanol avant d'être utilisé.

Sondes membranaires à profondeur programmée

Deux sondes dérivées du pyrène ont été utilisées dans ce travail, l'hydroxyméthyl-1 pyrène et le méthyl-1 pyrène.

Ces sondes membranaires ont été synthétisées de la façon suivante:

- L'hydroxyméthyl-1 pyrène a été synthétisé par une réduction du pyrène-1-carboxaldéhyde avec le tétrahydure de lithium et d'aluminium (LiAlH_4).

- Le méthyl-1 pyrène a été synthétisé par une réduction du pyrène-1-carboxaldéhyde par la méthode de Wolff Kishner.

Détermination de la viscosité: Séries de solvants polaires et apolaires.

Deux séries de solvants ont été préparées. Dans chacune de ces séries, la polarité était constante et la viscosité variable. Pour la première série, celle des solvants polaires, nous avons mélangé en différentes proportions, le méthanol, l'éthylène glycol et le glycérol. Pour la deuxième série, celle des solvants apolaires, nous avons mélangé en différentes proportions le cyclohexane et la paraffine.

Ces mélanges de solvants ont tous été préparés de la même façon soit, par pipetage précis du volume déterminé ou pour les solvants trop visqueux, par pesage précis du poids correspondant à ce volume.

La polarité dans la série de solvants polaires a été déterminée par spectroscopie U.V.-Visible (Varian techtron, modèle 635) à l'aide d'un indicateur de polarité soit le ditertbutyl-2, 6 (triphényl-2',4',6'-pyridinium)-4 phénolate. Ce composé a pour propriété d'absorber à des longueurs d'ondes différentes lorsque la polarité des solvants varie ³⁸.

La courbe standard du paramètre de polarité E_T en fonction de la longueur d'onde maximum d'absorption a été établie à partir

des spectres de l'indicateur qui ont été enregistrés dans quelques solvants de polarité connue (fig. 6). A l'aide de cette courbe standard la polarité des solvants polaires utilisés dans ce travail a été déterminée. Pour cette série de solvant la valeur du paramètre de polarité E_T variait de 55,5 à 56.

Pour la série de solvants apolaires, la polarité ne put être déterminée de la même façon à cause de l'insolubilité de l'indicateur dans les deux solvants utilisés (cyclohexane, paraffine). Pour cette série de solvants, nous avons évalué la polarité à partir des valeurs de la littérature ³⁹ comme étant environ $E_T = 30$.

La viscosité des mélanges de solvants fut déterminée à l'aide d'un viscosimètre à écoulement de marque "CANNON" dans un bain thermostaté de marque "POMP HAAKE E-52" à 25°C. Pour permettre aux solutions d'atteindre cette température, elles devaient séjourner au moins une heure dans le bain thermostaté avant le début de l'expérimentation.

La viscosité fut calculée à l'aide de la formule suivante:

$$\eta = B\rho t$$

- η : Viscosité
- B: constante du viscosimètre à écoulement
- P: densité
- t: temps d'écoulement.

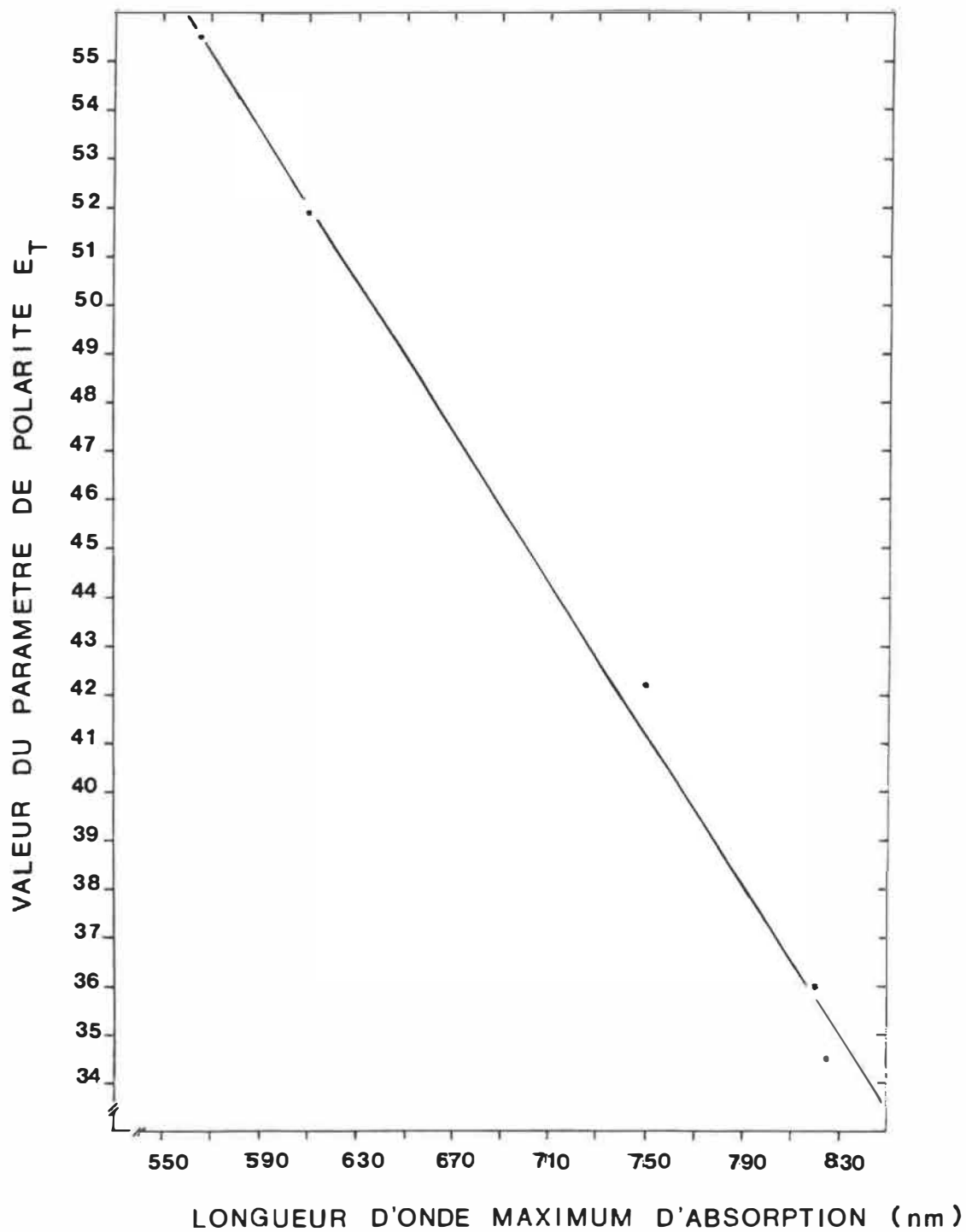


Figure 6: Courbe standard du paramètre de polarité et en fonction de la longueur d'onde maximum d'absorption (nm) du ditertbutyl-2, 6 (triphényl-2',4',6'-pyridinium)-4 phénolate

Pour déterminer la viscosité des mélanges de solvants il était nécessaire de déterminer la valeur de B et de P. La constante B du viscosimètre à écoulement fut déterminée en utilisant l'eau. On a trouvé expérimentalement le temps d'écoulement (t) et calculé la valeur de la constante B. La densité, pour sa part fut déterminée en pesant exactement sur une balance de marque "SARTORIUS 1207 MP-2" un volume exact des mélanges de solvants préalablement thermostatés à 25°C.

Courbes Standard

Une fois les viscosités des deux séries de solvants déterminées, on pouvait alors établir le comportement des sondes membranaires face à un changement de viscosité. Cette étude a été faite en spectrométrie de fluorescence.

Afin d'éviter l'extinction de la fluorescence toutes les solutions étaient dégazées, soit par barbottage avec de l'azote ou encore en appliquant le vide.

Les lectures de fluorescence étaient prises par rapport à un standard externe, soit le β -naphthol. Celui-ci fut utilisé comme standard externe car il émet dans la même région que les deux sondes utilisées.

La solution mère de β -naphthol était préparée toujours de la même façon, soit en pesant précisément à 0,00002 g, sur une balance Mettler H-16, une masse de 0,01150 g qui était dissoute dans une solution de KOH 0,1N et amenée au trait de jauge d'un ballon de 1,00 litre. Cette solution mère avait une concentration molaire de $7,98 \times 10^{-5}$ M. Ensuite on effectuait une dilution d'un rapport de 1/2, amenant ainsi la concentration molaire à $3,99 \times 10^{-5}$ M. Cette dilution était faite juste avant l'expérimentation et était utilisée la journée même de la prépa-

ration. Par contre la solution mère de β -naphthol, conservait ses propriétés intactes durant quelques semaines si elle était gardée à la noirceur. Toutefois, la préparation d'une solution fraîche devenait nécessaire lorsqu'il y avait apparition d'une légère coloration jaunâtre nous indiquant une dégradation. Les conditions du spectrofluorimètre pour le β -naphthol étaient les suivantes:

Perkin-Elmer MPF-2A: -longueur d'onde d'excitation: 348 nm
-longueur d'onde d'émission: 416 nm
-sensibilité: 1

La préparation des solutions de sondes dans les différents solvants était faite toujours selon la même procédure. Dans les deux cas, une solution mère de sonde, de concentration molaire de 2×10^{-4} M était préparée. L'hydroxyméthyl-1 pyrène, était précisément pesé à 0,00002 g, sur une balance Mettler H-16, une masse de 0,00465 g qui était dissoute dans un solvant de la série (voir tableaux 5 et 6) et amenée au trait de jauge d'un ballon de 100,00 ml. Pour le méthyl-1 pyrène, le même cheminement était fait, sauf que la masse précisément pesée était de 0,00430 g. Ensuite, dans les deux cas, on effectuait une dilution d'un rapport de 1/10 amenant la concentration molaire à 2×10^{-5} M.

Dans le cas des deux sondes, la lecture de la fluorescence dans une série de solvants complète soit polaire ou apolaire, se faisait dans une même journée. On vérifiait aussi la reproductibilité et la répétitivité des résultats de la même façon et les résultats sont la moyenne d'au moins trois essais.

Lors de l'expérimentation, le β -naphthol, est utilisé pour vérifier les variations de l'appareil. Ainsi tous les résultats sont exprimés en valeurs relatives au β -naphthol et non en valeurs absolues. Les conditions du spectrofluorimètre pour le méthyl-1 pyrène et l'hydroxyméthyl-1 pyrène étaient les

suivantes:

Perkin-Elmer MPF-2A:

- longueur d'onde d'excitation: 344 nm
- longueurs d'onde d'émission: 376, 386, 394, 416 nm
- sensibilité: 1

Pour les deux sondes l'émission à 376 nm était utilisée pour les courbes standards.

La solution d'amphotéricine B utilisée dans cette expérimentation a été préparée de la façon suivante:

La solution mère d'amphotéricine B, de concentration molaire de 5×10^{-5} M, fut préparée en pesant précisément à 0,00002 g une masse de 0,00495 g, sur une balance Mettler H-16, qui était dissoute dans 1,00 ml de diméthylsulfoxyde. Cette solution était ensuite transférée dans un ballon jaugé de 100,00 ml et le volume de la solution amené au trait de jauge avec de l'eau distillée déminéralisée. La solution mère d'amphotéricine B ainsi complétée était gardée au réfrigérateur jusqu'à l'utilisation. Cette solution était utilisée dans les vingt-quatre heures suivant sa préparation.

Vésicules phospholipidiques sans et avec stérol

Les vésicules ont été préparées par la méthode d'injection rapide d'une solution dans l'éthanol. La procédure suivante a été suivie:^{40, 41}

On pèse précisément à 0,00002 g sur une balance Mettler H-16, une masse de 0,03735 g de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Cette masse est dissoute dans 2,5 ml d'éthanol et on ajoute 2,5 ml de la solution mère de sonde qui a comme solvant l'éthanol

(solution décrite précédemment). Ensuite dans un bain chauffant, un volume de 19 ml de tampon Tris à pH 7 préalablement filtré, est thermostaté à 55°C dans un appareil à ultra-filtration (Amicon 8050). Une fois la température atteinte, la solution tampon est agitée à la vitesse maximale et on injecte rapidement 1,0 ml de la solution sonde-lipide. On filtre alors le tout sur une membrane XM-100 A et ce sous jet d'azote jusqu'à ce qu'il reste environ 5 ml de solution. Cette solution est alors transférée dans un ballon de 5,00 ml et on amène au trait de jauge avec du tampon Tris. Les vésicules ainsi préparées sont alors prêtes pour la lecture en spectrophotométrie de fluorescence.

Le tampon Tris utilisé à une concentration de $2,0 \times 10^{-3}$ M de trihydroxyméthylaminométhane. Ensuite, le pH est ajusté à $7,0 \pm 0,1$ avec de l'acide chlorhydrique.

Les vésicules contenant du cholestérol ou de l'ergostérol sont préparées de la même façon que les vésicules simples. Les solutions mères de stérol sont préparées de la façon suivante. On pèse précisément à 0,00002 g sur une balance Mettler H-16, une masse de 0,05900 g de cholestérol ou de 0,06050 g d'ergostérol. Cette masse est dissoute dans de l'éthanol et transférée dans un ballon de 50 ml et la solution est amenée au trait de jauge avec de l'éthanol. Le volume désiré de cette solution est ajouté à la solution sonde-lipide.

Par la suite 2,5 ml de cette solution de stérol est ajoutée à la solution lipide-sonde (DPPC dissous dans 2,5 ml de solution de la sonde) et jaugé à 5,0 ml pour obtenir 15% molaire de stérol. Pour les solutions de 10% et 5% molaire, on ajoute respectivement 1,70 ml et 0,85 ml à la solution sonde-lipide que l'on jauge à 5,0 ml avec de l'éthanol.

Effet de l'amphotéricine B

La dernière étape, était de vérifier l'effet de l'amphotéricine B sur les sept modèles membranaires différents et ce avec les deux sondes. Pour ce, on ajoutait aux modèles membranaires contenant les sondes dont la fluorescence était mesurée, 10 μ l d'une solution mère d'amphotéricine B. Par la suite, on mesurait la fluorescence, 30 secondes après l'addition ainsi qu'à 30 minutes et 60 minutes. De plus, la fluorescence a aussi été mesurée à 90 minutes et 120 minutes après l'addition mais le changement n'était plus significatif.

CHAPITRE 6

Résultats et discussion

Le pyrène est une sonde membranaire utilisé par les chercheurs pour étudier par exemple la viscosité de certaines membranes humaines, la polarité de membranes, la présence de groupements chimiques spécifiques dans les biomolécules ...

Ce composé étant fortement lipophile, il est probablement localisé à l'intérieur de la bicouche lipidique dans sa partie apolaire. Nous avons voulu étudier aussi la région extérieure, plus polaire de la membrane et dans ce but nous avons utilisé l'hydroxyméthyl-1 pyrène. Le groupement hydroxy devrait se lier à la partie plus polaire de la bicouche lipidique gardant le chromophore plus près de la surface. Comme sonde pour la partie apolaire, nous avons utilisé le méthyl-1 pyrène pour pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus avec l'hydroxyméthyl-1 pyrène.

- Spectres de fluorescence des deux sondes en milieu polaire et apolaire

La structure fine du spectre de fluorescence des deux sondes est la suivante. En milieu polaire, pour l'hydroxyméthyl-1 pyrène, nous avons quatre bandes d'émission, soit une à 376 nm, une à 386 nm, une à 394 nm, et la dernière à 416 nm (fig. 7). Pour le méthyl-1 pyrène, on observe seulement trois bandes soit à 376 nm, une à 394 nm et la dernière à 416 nm (fig. 8).

Si l'on regarde la structure fine du spectre de fluorescence de l'hydroxyméthyl-1 pyrène en milieu apolaire, on peut voir que celle-ci est très différente qu'en milieu polaire. Cette fois-ci, la bande à 376 nm est plus petite que les bandes à 386 nm et

394 nm. De plus la bande à 386 nm est toujours présente, quelle que soit la viscosité (fig. 9). Pour l'hydroxyméthyl-1 pyrène, on observe donc les quatre bandes d'émission dans les deux types de solvants. Par contre, le rapport d'intensité 386 nm / 376 nm change avec la polarité.

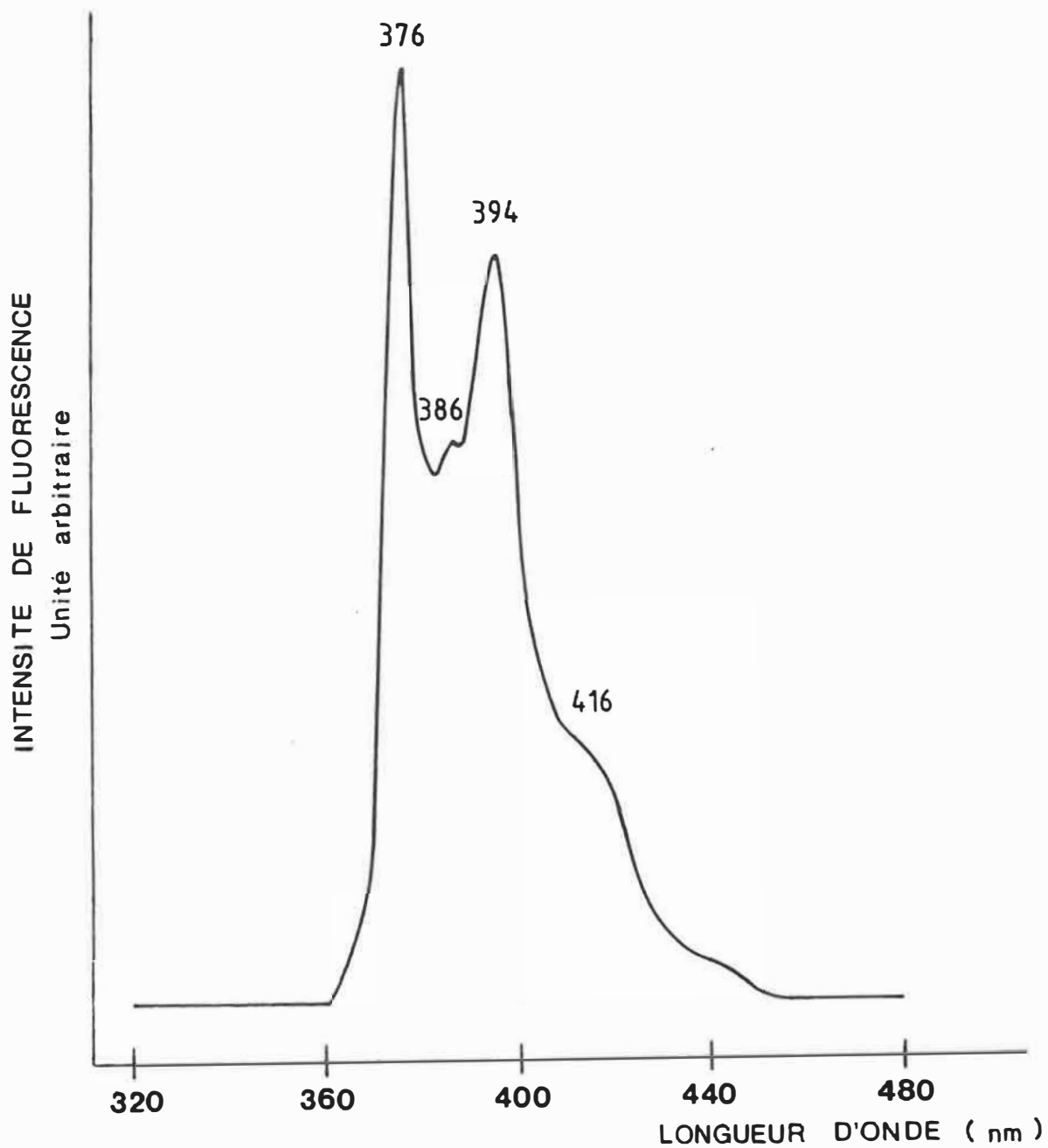


Figure 7: Spectre de fluorescence du hydroxyméthyl-1 pyrène en solution en milieu polaire

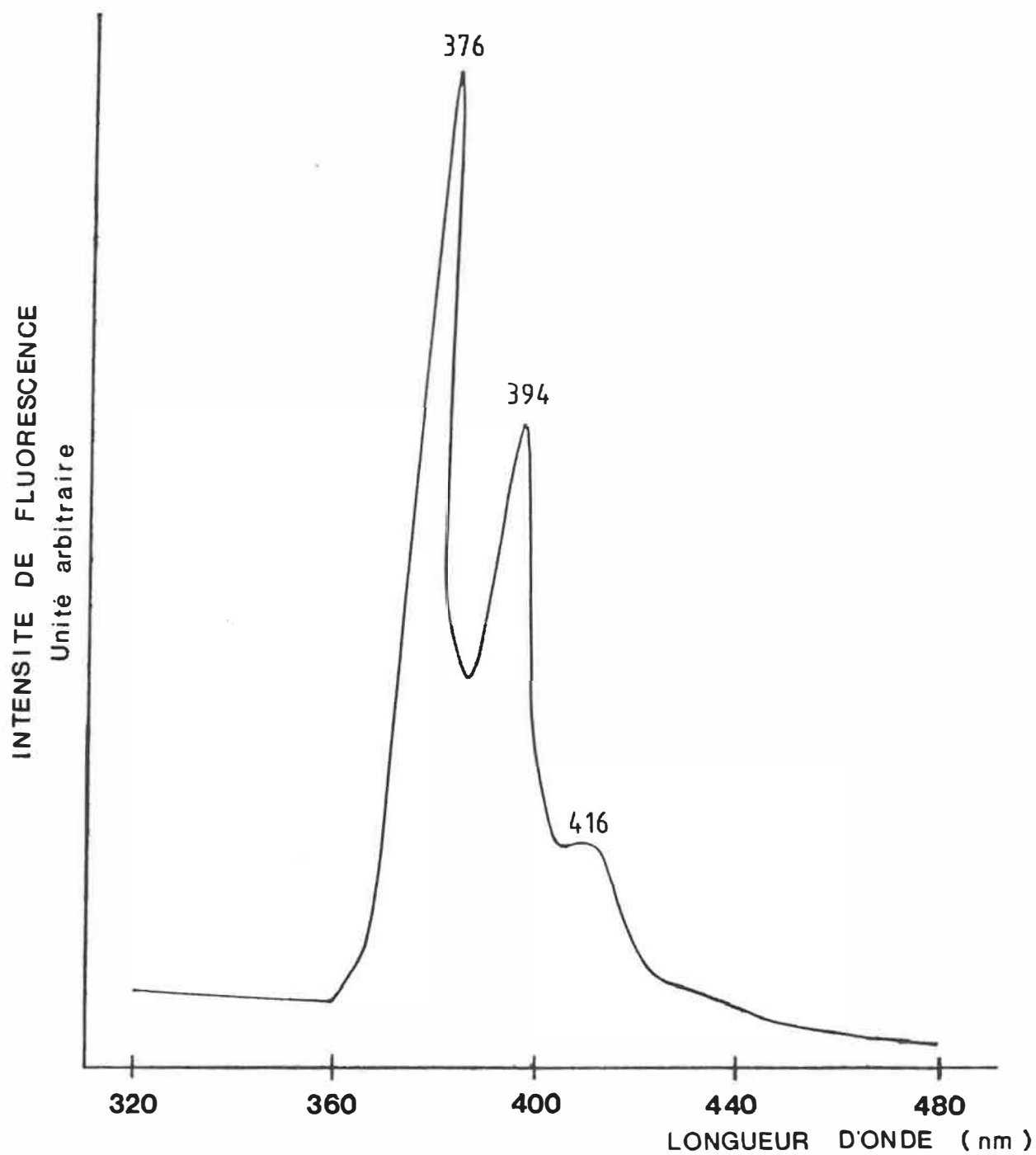


Figure 8: Spectre de fluorescence du méthyl-1 pyrène en solution en milieu polaire

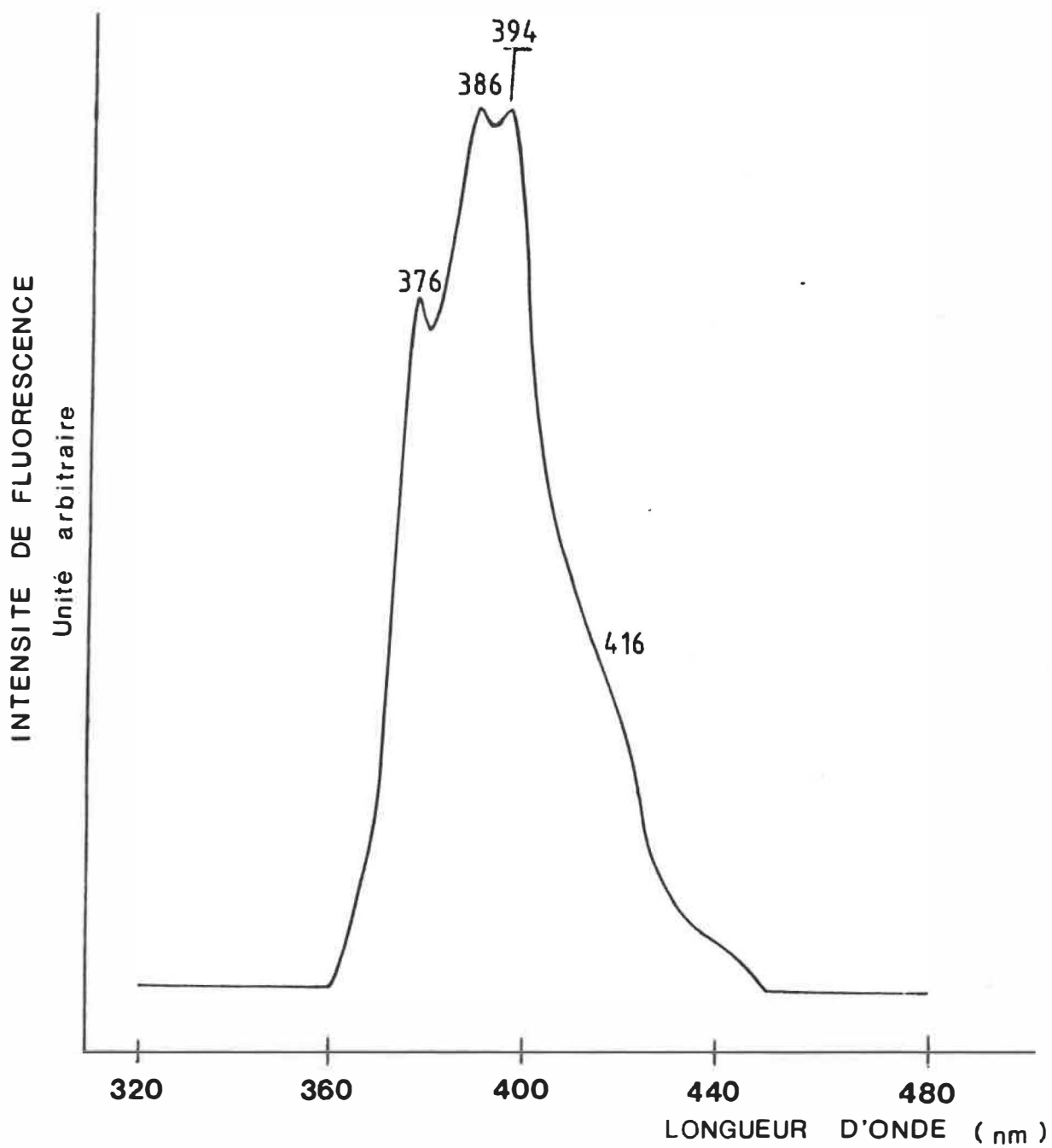


Figure 9: Spectre de fluorescence du hydroxyméthyl-1 pyrène en solution en milieu apolaire

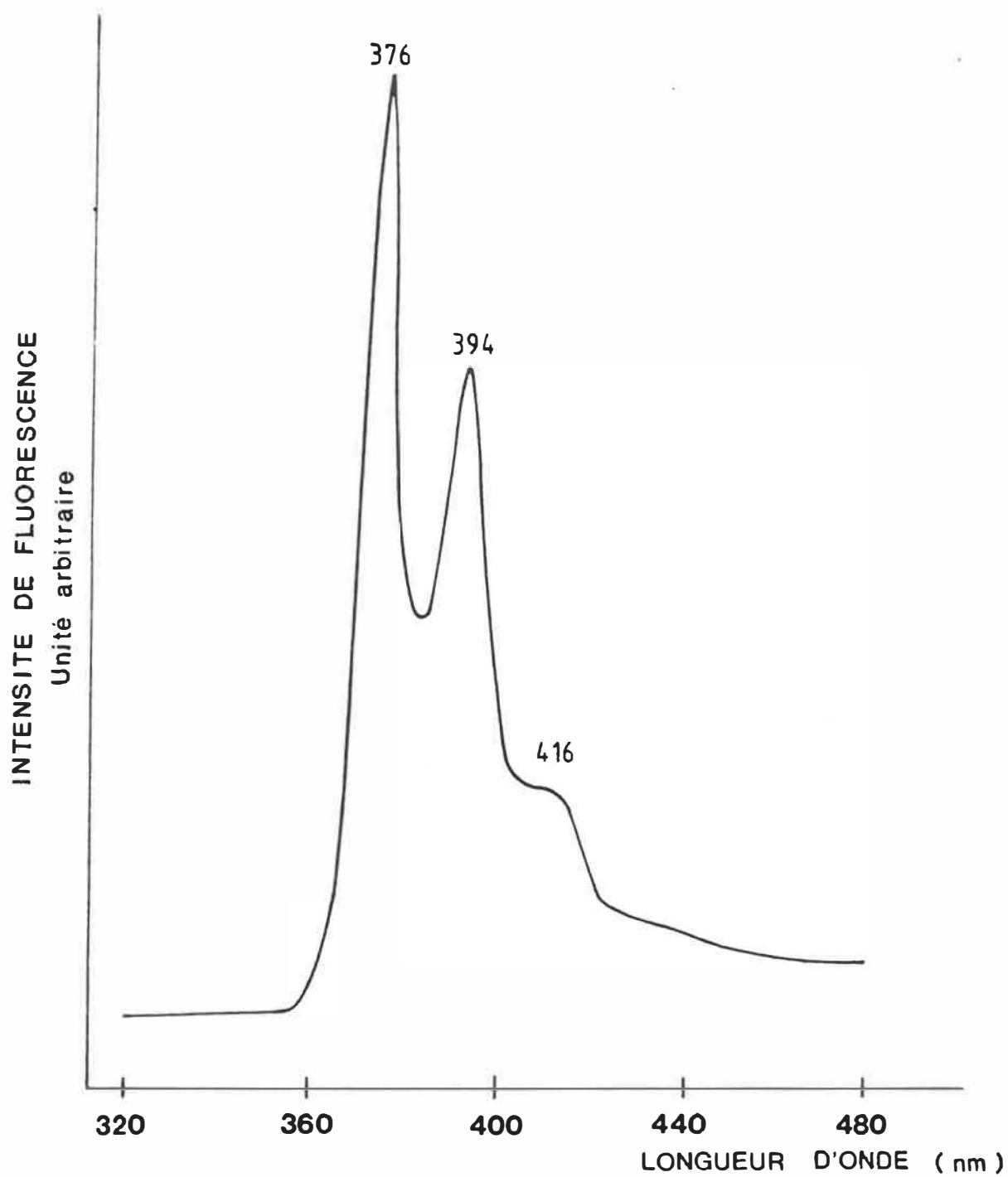


Figure 10: Spectre de fluorescence du méthyl-1 pyrène en solution en milieu apolaire

Pour la structure fine du spectre de fluorescence du méthyl-1 pyrène en milieu apolaire, elle ne diffère pas de celle en milieu polaire. On observe toujours seulement les trois bandes d'émission, soit à 376 nm, 394 nm et 416 nm (fig. 10).

A partir de ces informations, nous pouvons dire pour l'hydroxyméthyl-1 pyrène quelle est la polarité de son milieu environnant. C'est-à-dire que si le rapport des bandes 386 nm/376 nm est près de un ou plus petit, le milieu environnant sera polaire. Par contre, si ce rapport est plus grand que un, le milieu environnant la sonde sera apolaire.

Pour le méthyl-1 pyrène, étant donné que la structure fine du spectre de la fluorescence est similaire en milieu polaire et apolaire, on ne pourra tirer de conclusion sur la polarité du milieu environnant.

- Effet de la viscosité sur les spectres de fluorescence des sondes membranaires.

Les deux sondes, soit le méthyl-1 pyrène et l'hydroxyméthyl-1 pyrène réagissent toutes deux de la même façon à une augmentation de la viscosité de leur environnement, par une augmentation de l'intensité de leur fluorescence. L'intensité de fluorescence augmente dans les deux cas jusqu'à une viscosité de 15 cp, où, à ce point, on atteint un faux plateau, car l'intensité de fluorescence continue à augmenter mais plus faiblement. La figure 11 montre les changements de l'intensité de la fluorescence des deux sondes en fonction de la viscosité dans un milieu polaire.

Avec une augmentation de la viscosité, l'intensité de fluorescence augmente, mais le rapport des bandes 376 nm/394 nm ne varie pas d'une façon significative. Ce rapport, 376 nm/394 nm, est toutefois différent pour les deux sondes.

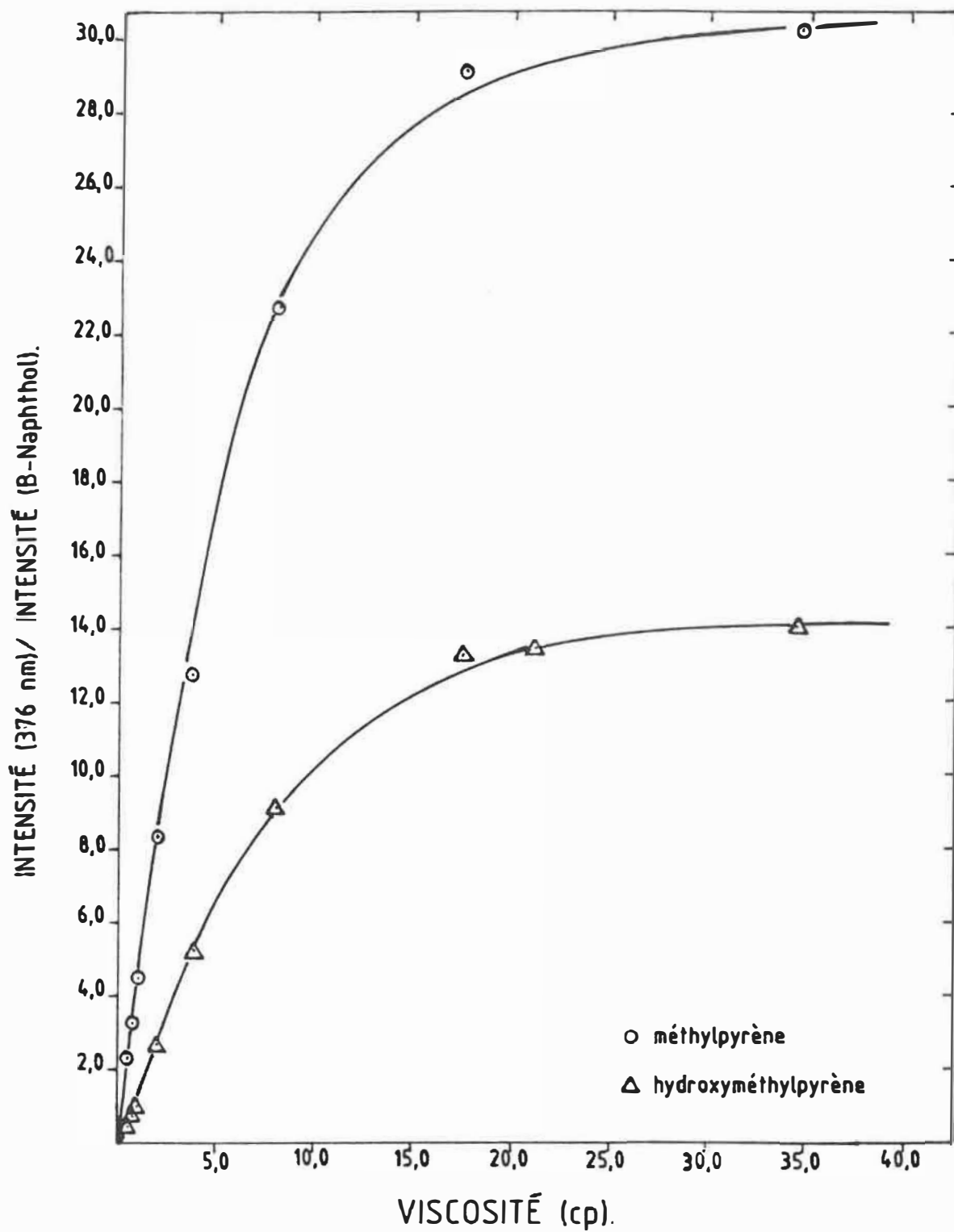


Figure 11: Courbe standard, dans des solvants polaires, de l'effet de la viscosité sur l'intensité de fluorescence

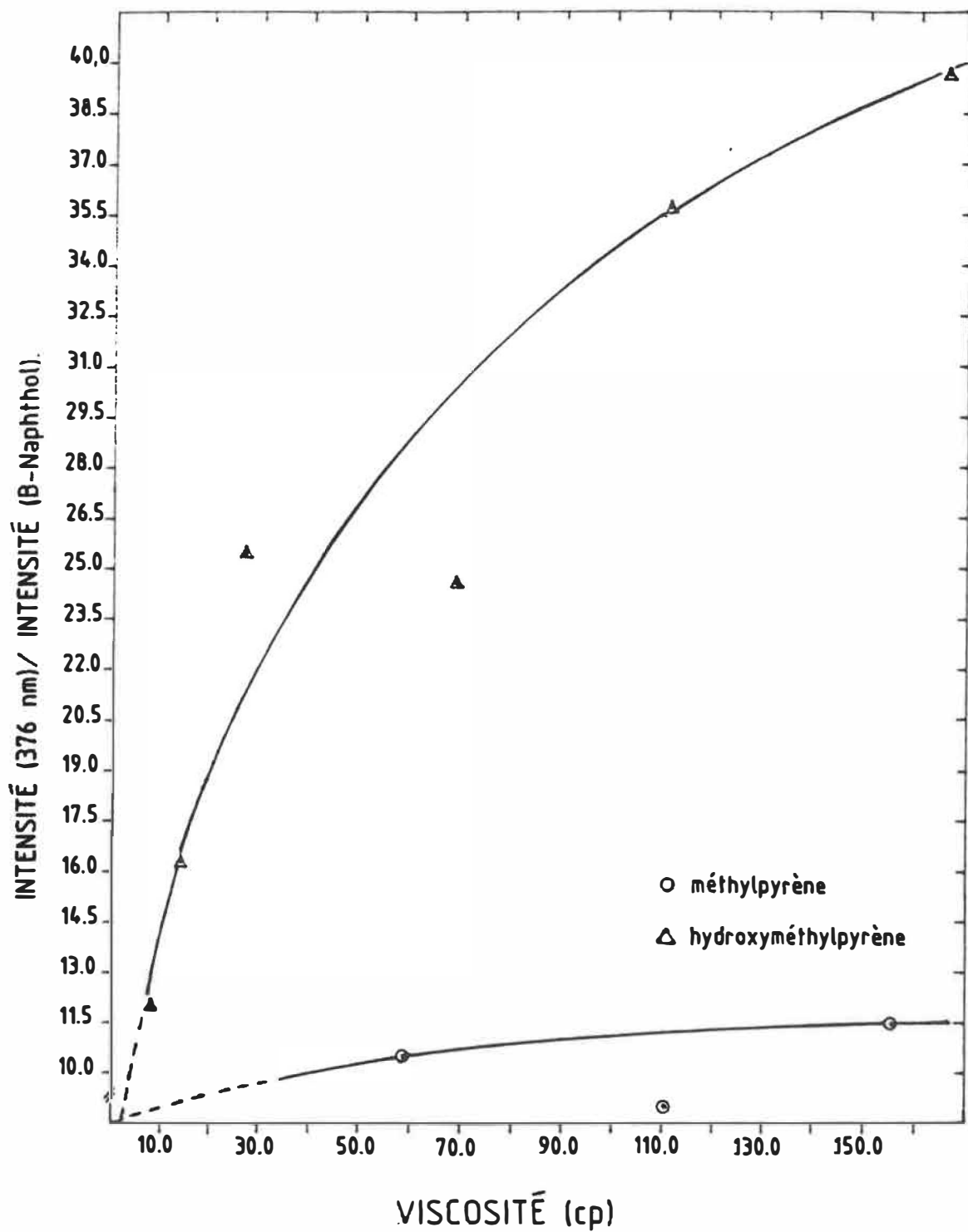


Figure 12: Courbe standard, dans des solvants apolaires, de l'effet de la viscosité sur l'intensité de fluorescence

La bande d'émission médiane, soit à 386 nm, n'apparaît que très peu et souvent, n'apparaît pas (fig. 7 et fig. 8). Aussi, un autre point important est, qu'il n'y a pas de déplacement de bandes d'émission remarqué entre les deux sondes.

L'hydroxyméthyl-1 pyrène en milieu apolaire, réagit de la même façon qu'en milieu polaire, soit lorsque la viscosité augmente, l'intensité de la fluorescence augmente aussi. Par contre en milieu apolaire, l'hydroxyméthyl-1 pyrène fluoresce beaucoup plus qu'en milieu polaire. Par exemple, en milieu apolaire, pour une viscosité de 40cp, nous avons un rapport de fluorescence, 376 nm/ β -naphthol, d'environ 25 et pour une même viscosité en milieu polaire le rapport de fluorescence, 376 nm/ β -naphthol, est d'environ 13, soit un peu plus de la moitié de celui observé en milieu apolaire (fig. 11 et 12).

Pour le méthyl-1 pyrène, par contre nous avons une diminution de la fluorescence dans le milieu apolaire. Par exemple, en milieu polaire, le rapport de fluorescence, 376 nm/ β -naphthol, pour le méthyl-1 pyrène pour une viscosité de 40 cp est d'environ 30, pour une même viscosité nous avons un rapport de fluorescence, 376 nm/ β -naphthol, d'environ huit, soit une réponse d'environ quatre (4) fois plus petite dans le milieu apolaire (fig. 11 et 12).

- Courbes standards

Nous avons fait deux courbes standards pour des milieux ayant des polarités différentes. L'une dans un milieu polaire et l'autre apolaire.

Nous avons gardé la polarité constante pour s'assurer que les résultats enregistrés soient dus uniquement à la viscosité.

La série de solvants polaires était constituée de méthanol, d'éthylène glycol et de glycérol, en différentes proportions. La série de solvants apolaires était constituée de paraffine et de cyclohexane. Les tableaux 3 et 4 représentent le pourcentage (%) de chacun des solvants du mélange ainsi que la viscosité déterminée à 25°C.

Puisque nous pensons que nos sondes vont se situer, l'une en milieu polaire, soit à l'interface de la membrane et l'autre en milieu apolaire, soit à l'intérieur de la membrane, il était important de vérifier s'il y avait des différences entre les résultats pour ces deux milieux de polarité différente.

Tableau 3.

Composition (v/v) de la série de solvants polaires
($E_T = 55.5 - 56$)

Méthanol (%)	Ethylène Glycol (%)	Glycérol (%)	Viscosité (cp) (25°C)
100	—	—	0,547
90	10	—	0,820
80	20	—	1,045
60	40	—	2,000
40	60	—	3,814
20	80	—	8,072
—	100	—	17,5
—	95	5	21,2
—	80	20	34,5

Tableau 4.

Composition (v/v) de la série de solvants apolaires
($E_T = 30$)

Cyclohexane (%)	Paraffine (%)	Viscosité (cp) (25°C)
100	—	0,96
95	5	1,12
80	20	1,71
40	60	8,22
30	70	14,29
20	80	27,33
10	90	59,09
4	96	110,42
—	100	155,46

- Vésicules phospholipidiques

Les deux sondes ont été incorporées dans des vésicules de DPPC. La fig. 13 montre le spectre de fluorescence de l'hydroxyméthyl-1 pyrène dans ce milieu et la fig. 14 celui du méthyl-1 pyrène incorporé dans des vésicules de DPPC. Toutes les mesures ont été faites à température ambiante, donc en bas de la température de transition du DPPC.

Si l'on compare les spectres de fluorescence des sondes incorporées dans des vésicules purement phospholipidiques avec ceux faits dans les deux séries de solvants, il apparaît que l'hydroxyméthyl-1 pyrène se retrouve dans un milieu polaire,

puisque la bande à 386 nm est absente du spectre. Ce résultat est conforme à notre hypothèse de base, puisque nous pensions que l'hydroxyméthyl-1 pyrène par son groupe OH resterait à l'interface de la bicouche. Comme nous l'avons dit plus haut les résultats obtenus par le méthyl-1 pyrène ne peuvent nous donner d'information sur sa localisation, mais il reste raisonnable de penser qu'il s'insère au niveau des chaînes d'acide gras de la bicouche lipidique, soit en milieu apolaire (fig. 12 et fig. 13).

A partir de l'intensité de fluorescence de nos deux sondes et à l'aide des courbes standards (fig. 11 et 12), on peut évaluer la viscosité des vésicules purement phospholipidiques comme étant 3,4 cp dans la couche extérieure et 41,5 cp à l'intérieure (tableau 5).

Ce tableau contient également une valeur de la littérature obtenue à l'aide d'une sonde différente. On constate que dans les vésicules purement phospholipidiques et aussi dans celles contenant le cholestérol ou l'ergostérol la viscosité est beaucoup plus élevée à l'intérieur de la bicouche (mesurée avec le méthyl-1 pyrène) qu'à l'interface (mesurée avec l'hydroxyméthyl-1 pyrène).

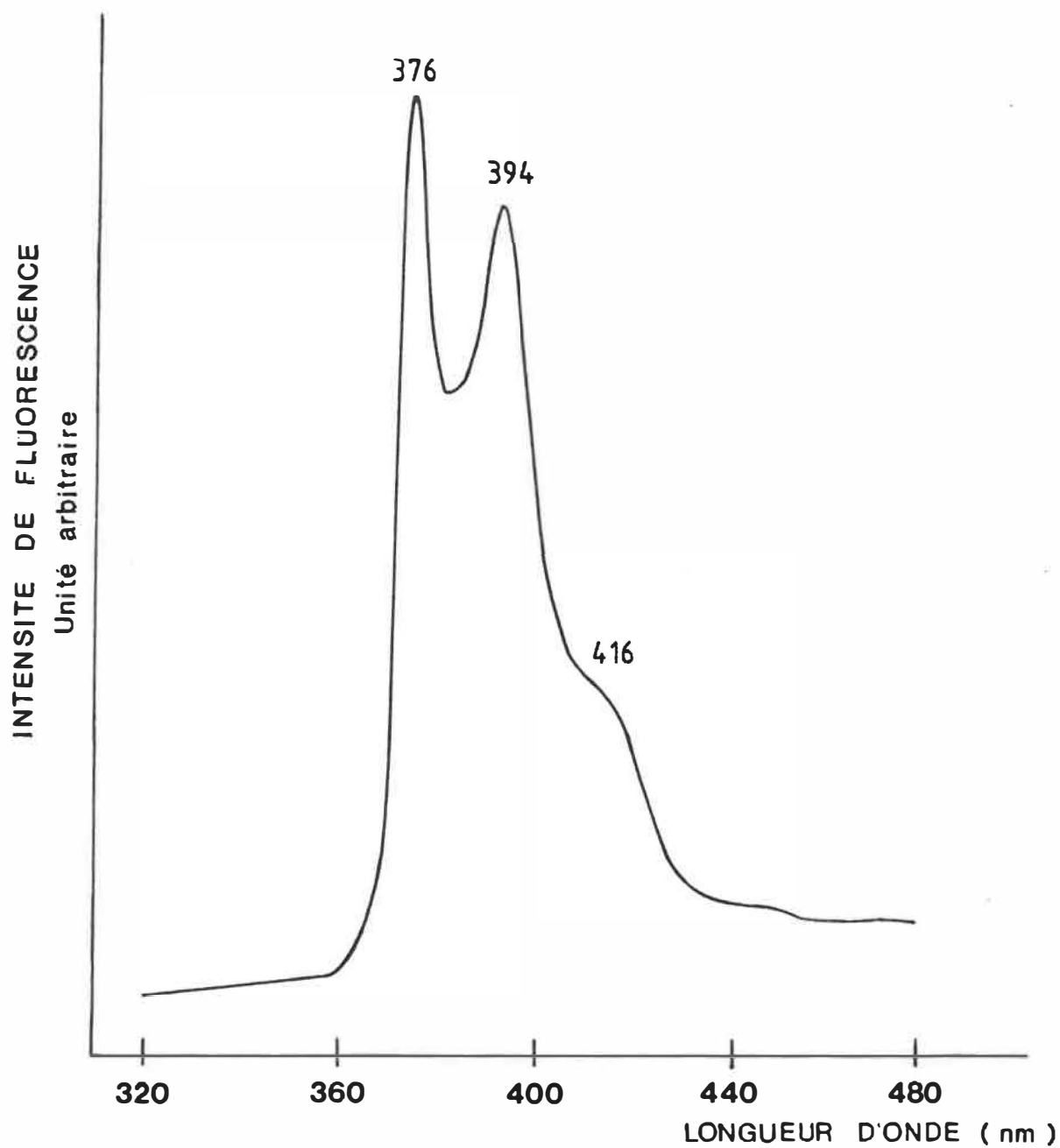


Figure 13: Spectre de fluorescence de 1'hydroxyméthyl-1-pyrène en milieu membranaire

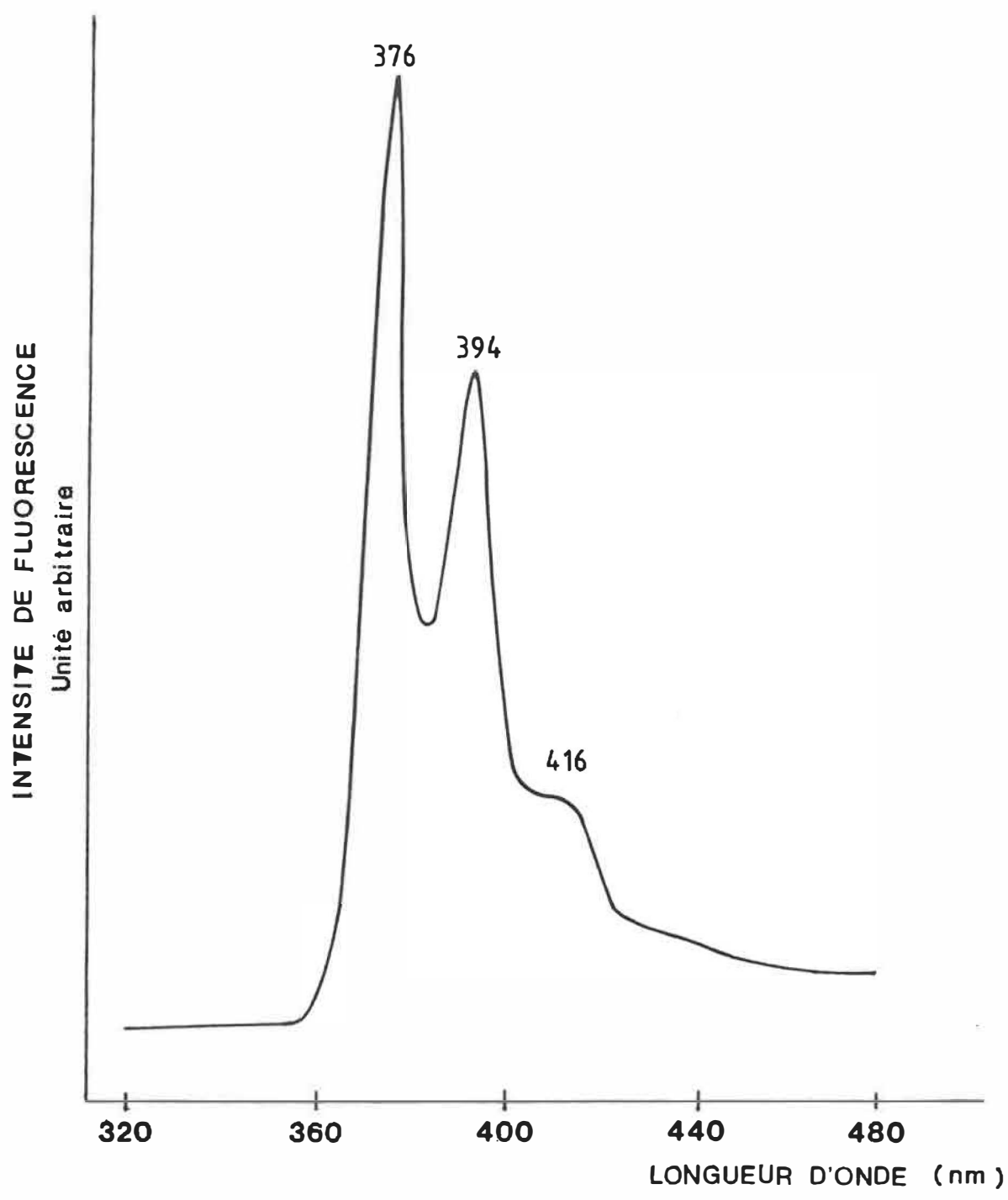


Figure 14: Spectre de fluorescence du méthyl-1-pyrène en milieu membranaire

Tableau 5.

Valeurs de microviscosité de vésicules de DPPC
trouvées expérimentalement et en littérature

SONDE	VISCOSITÉ (cp)	% STÉROL
Hydroxyméthyl-1 pyrène	3,4	0%
	2,6	5% ergostérol
	2,5	10% ergostérol
	2,3	15% ergostérol
	5,0	5% cholestérol
	5,0	10% cholestérol
	4,9	15% cholestérol
Méthyl-1 pyrène	41,5	0%
	20,0	5% ergostérol
	25,0	10% ergostérol
	36,5	15% ergostérol
	112	5% cholestérol
	149	10% cholestérol
	173 *	15% cholestérol
DAAEM ²⁵	4,8 - 9,3	0%

* valeur extrapolée

Légende:

DAAEM: (p-(dialkylamino)benzylidène malononitrile

- Effet des stérols

Nous avons aussi étudié, les vésicules contenant de l'ergostérol ou du cholestérol. Nous avons choisi ces deux stérols car dans la littérature, il est mentionné que l'amphotéricine B se complexe avec ces deux stérols mais que son affinité est plus grande pour l'ergostérol.

L'effet de l'ergostérol sur la microviscosité est différent lorsque mesuré par les deux sondes (fig. 15). Par exemple, lorsque l'on mesure l'effet de l'ergostérol avec l'hydroxyméthyl-1 pyrène, la microviscosité diminue et ce, d'une façon presque linéaire en fonction de l'augmentation du pourcentage d'ergostérol dans la vésicule. Une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène est que l'ergostérol, à ces pourcentages dans les bicouches phospholipidiques, servirait d'espaceur, c'est-à-dire, qu'il briserait certaines liaisons de la bicouche phospholipidique pour ainsi diminuer la viscosité.

L'effet mesuré par le méthyl-1 pyrène est différent. L'ergostérol altère la viscosité de la façon suivante: à faible pourcentage, la viscosité est diminuée, pour augmenter peu à peu et presque atteindre la viscosité initiale, lorsque le pourcentage augmente. Donc on peut penser que l'ergostérol à faible pourcentage à l'intérieur de la membrane servirait aussi d'espaceur. Toutefois le phénomène peut être différent qu'à l'interface, puisque par la suite lorsque l'on augmente le pourcentage d'ergostérol la viscosité augmente (fig. 15).

L'effet du cholestérol sur la microviscosité des vésicules est différent de celui de l'ergostérol (tableau 5). A l'interface le cholestérol augmente la microviscosité de la bicouche lipidique d'un facteur d'environ 1,5. La microviscosité passe de 3,4 cp à 5,0 cp pour 5 et 10% de cholestérol dans la bicouche et à 4,9 cp pour 15% de cholestérol. L'ergostérol pour sa part

diminue la viscosité d'un facteur d'environ 1,4. A 5% d'ergostérol dans la bicouche, la microviscosité diminue à 2,6 cp. Lorsque l'on augmente le pourcentage d'ergostérol à 10% la viscosité diminue encore légèrement à 2,5 cp et à 15% d'ergostérol la viscosité diminue jusqu'à 2,3 cp.

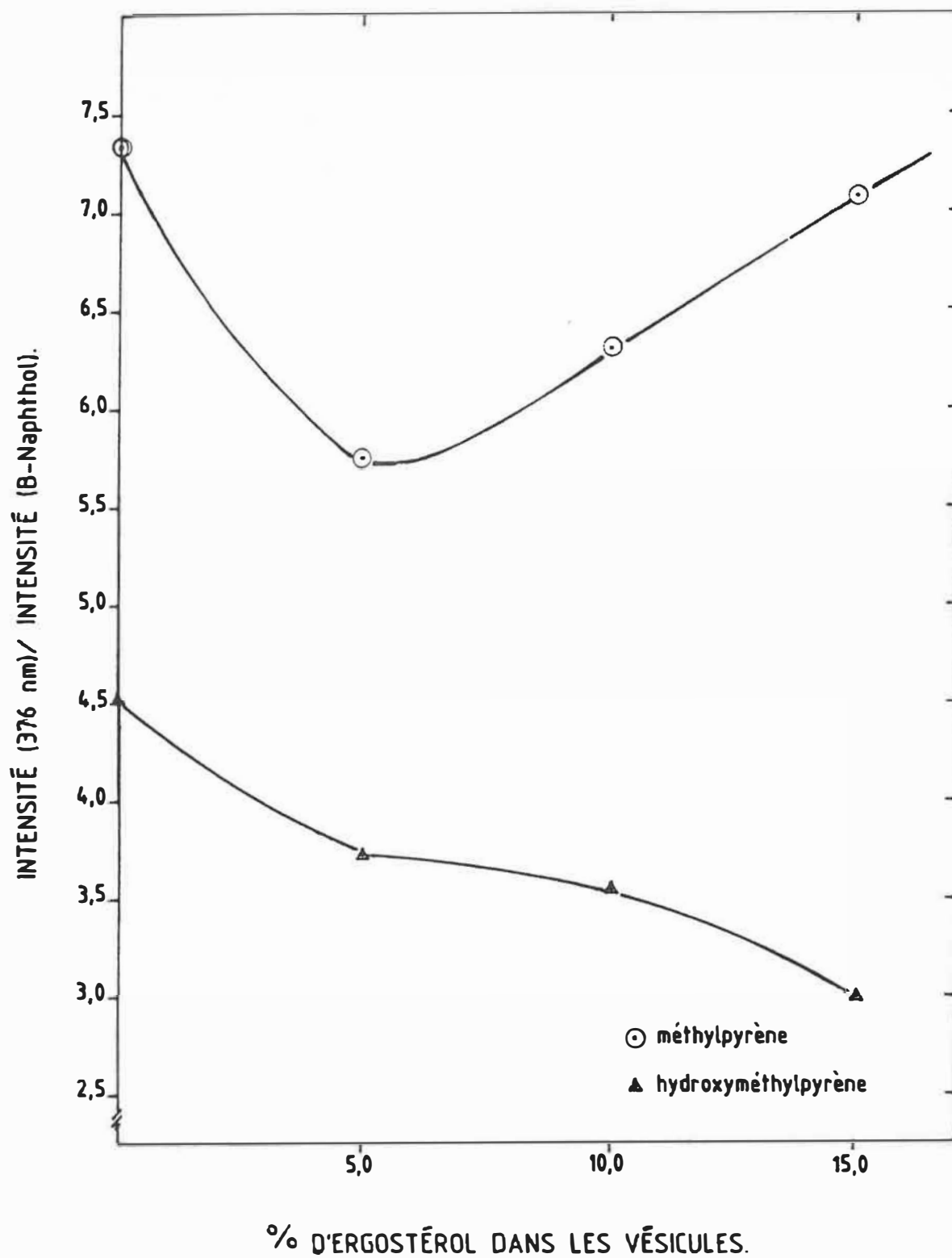


Figure 15: Effet de l'ergostérol sur la microviscosité des vésicules phospholipidiques. Etudes en fluorescence

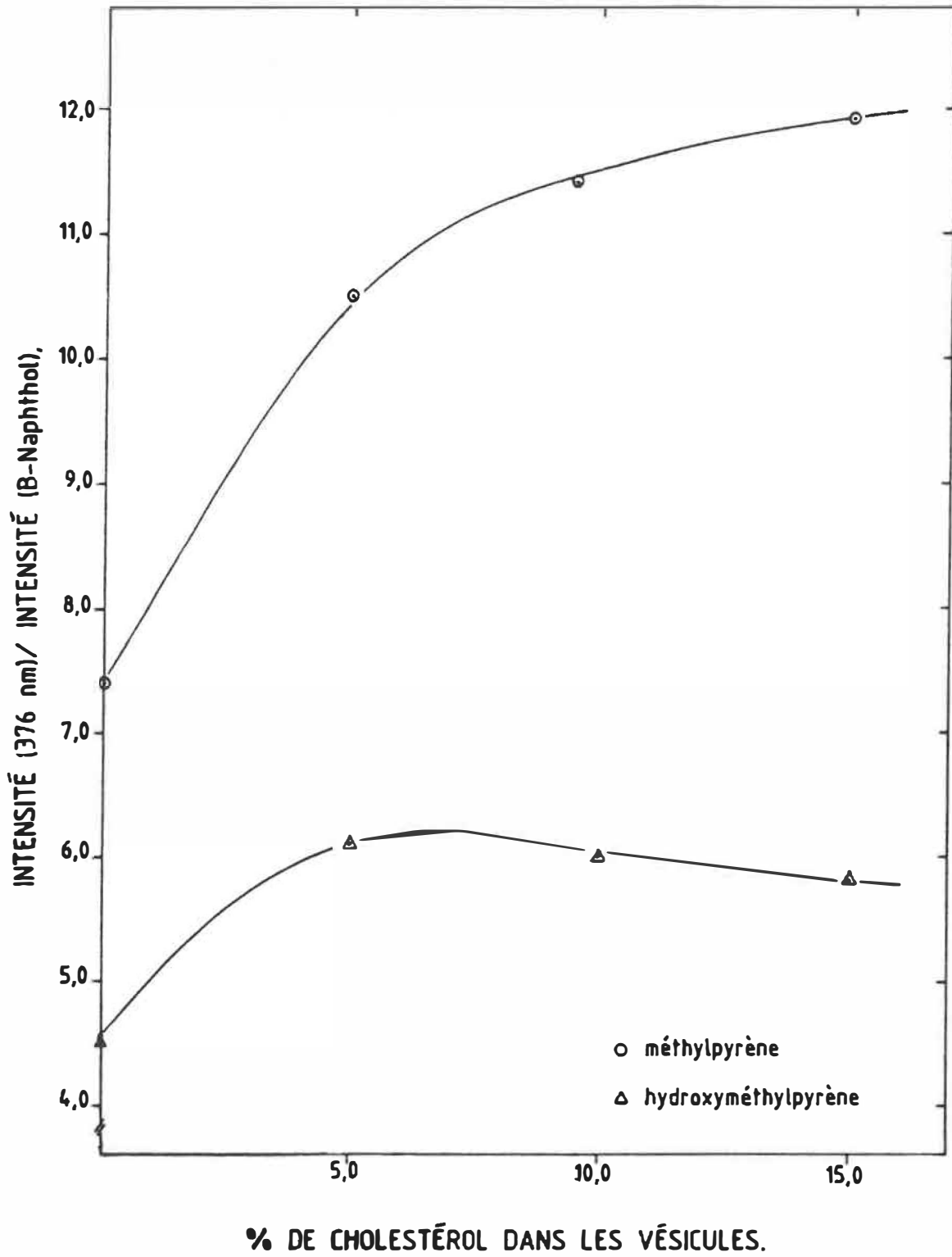


Figure 16: Effet du cholestérol sur la microviscosité des vésicules phospholipidiques. Etude en fluorescence

Au niveau où se situe le méthyl-1 pyrène le cholestérol augmente aussi la microviscosité. Cette fois la viscosité passe de 41,5 cp à 112 cp pour 5% de cholestérol dans la bicouche lipidique. A 10% de cholestérol la viscosité augmente jusqu'à 149 cp et à 15% la viscosité augmente à 173 cp. L'ergostérol comme mentionnée ci-haut diminue la viscosité du modèle membranaire. A 5% d'ergostérol dans le modèle membranaire la viscosité diminue à 20 cp. Ensuite, à 10% et 15%, nous assistons à une augmentation de la viscosité soit 25 et 36,5 cp respectivement, qui est toutefois plus faible que celle de la bicouche purement phospholipidique soit 41,5 cp.

Ceci semble indiquer que le cholestérol rigidifie la membrane à l'interface et d'une façon beaucoup plus prononcée au niveau où se situe le méthyl-1 pyrène.

Nos résultats pour le cholestérol sont en accord avec ceux de Shinizky, puisqu'en augmentant le rapport cholestérol/phospholipide la microviscosité de la bicouche lipidique augmente ²⁶. En variant le rapport cholestérol/phospholipide de 0 à 0,17, nous trouvons que la microviscosité varie de 41,5 à 173 cp et selon Shinitzky pour un rapport cholestérol/phospholipide variant de 0 à 1,4 la microviscosité augmente de 1,8 à 9,1 cp. Dans les deux cas les expérimentations ont été faits à 25°C.

Par contre à notre connaissance, l'effet de l'ergostérol n'a pas été décrit et nos résultats montrent qu'il est différent de l'effet du cholestérol. Au contraire du cholestérol, l'ergostérol diminue la viscosité des vésicules purement phospholipidiques et ce au deux niveaux étudiés de la bicouche phospholipidique.

- Effet de l'amphotéricine B

La dernière étape du travail était de voir l'effet de l'amphotéricine B sur la microviscosité des bicouches lipidiques.

Voici les résultats que nous avons obtenus.

A l'interface: l'amphotéricine B diminue, immédiatement après son addition au milieu, la viscosité des vésicules phospholipidiques d'environ 13%, la même chose est vraie pour les vésicules contenant de l'ergostérol. L'effet est légèrement moins prononcé pour les vésicules contenant le cholestérol. Dans ce cas l'effet diminue avec le temps et après 1 heure, la microviscosité devient presque égale à la valeur initiale.

Donc à l'interface, l'amphotéricine B change la microviscosité de toutes les vésicules, mais moins quand elles contiennent le cholestérol et surtout avec 15% de cholestérol après 1 heure.

Nous constatons le même phénomène avec le méthyl-1 pyrène, mais cette fois l'effet est encore plus prononcé à 15% de cholestérol dans les vésicules (tableaux 6, 7).

Tableau 6.

Effet de l'amphotéricine B, en fonction du temps, sur la microviscosité des vésicules simples et celles contenant de l'ergostérol ou du cholestérol. Étude en fluorescence.

Diminution de l'intensité de fluorescence			
Vésicules phospholipidiques (DPPC)	30 sec.	30 min.	60 min.
Sans stérol	-13,2%	-13,0%	-15,5%
5% ergostérol	-13,2%	-14,3%	-11,6%
10% ergostérol	-10,9%	-13,6%	-10,8%
15% ergostérol	-12,0%	-12,2%	-11,5%
5% cholestérol	-10,0%	-12,3%	- 7,5%
10% cholestérol	-11,8%	- 8,5%	- 8,1%
15% cholestérol	-13,4%	- 6,4%	- 2,2%
Sonde: Hydroxyméthyl-1 pyrène.			

Tableau 7.

Effet de l'amphotéricine B, en fonction du temps, sur la microviscosité des vésicules simples et celle contenant de l'ergostérol ou du cholestérol. Étude en fluorescence.

Diminution de l'intensité de fluorescence			
Vésicules phospholipidiques (DPPC)	30 sec.	30 min.	60 min.
Sans stérol	-12,5%	-17,7%	-17,0%
5% ergostérol	- 9,7%	-11,1%	-11,7%
10% ergostérol	-11,0%	-12,2%	-10,9%
15% ergostérol	-13,0%	-12,9%	-11,5%
5% cholestérol	-10,5%	-13,1%	-16,3%
10% cholestérol	- 6,9%	-13,9%	-15,3%
15% cholestérol	- 7,4%	- 5,6%	- 1,2%
Sonde: Méthyl-1 pyrène			

En résumé, l'amphotéricine B diminue la viscosité des membranes. Cet effet dépend de la composition de la membrane. L'ergostérol ne semble pas influencer l'effet de l'amphotéricine B. D'après nos résultats, l'amphotéricine B diminue d'environ 15% la microviscosité de modèles membranaires purement phospholipidiques et lorsque l'ergostérol est présent dans la bicouche, la diminution de microviscosité est au minimum de 11%. Donc l'influence de l'ergostérol est très légère. L'effet de l'amphotéricine B est moins prononcé quand la membrane contient un certain pourcentage de cholestérol et après une heure celui-ci annule presque complètement l'effet de l'antibiotique.

Il n'est pas facile de relier ces résultats avec la synergie d'action que l'amphotéricine B démontre avec certains agents antitumoraux. On peut croire que le modèle utilisé peut être trop simplifié pour bien représenter la membrane cellulaire. L'effet peut être relié avec d'autres composants de la membrane.

CHAPITRE 7

Conclusion

Les résultats de ce travail montrent que le système que nous avons élaboré permet d'étudier systématiquement les effets que les substances physiologiquement actives exercent sur l'état physique de la membrane cellulaire. Notre modèle semble adéquat et relativement simple.

L'effet du cholestérol, sur la microviscosité de la bicouche lipidique, observé dans ce travail est du même ordre que celui observé par les autres auteurs (Shinitzky ²⁶) qui ont utilisé des méthodes différentes. Notre méthode permet, en plus, de différencier les effets aux différents niveaux de la bicouche lipidique. Selon nos résultats, l'addition du cholestérol affecte beaucoup plus la viscosité à l'intérieur de la membrane qu'à l'interface.

Nous avons aussi étudié l'effet de l'ergostérol sur la microviscosité des modèles membranaires. Nous avons trouvé qu'il se comporte différemment du cholestérol. A notre connaissance, l'ergostérol n'a pas été étudié de ce point de vue jusqu'à présent.

Dans ce travail, il a été démontré que l'amphotéricine B à des concentrations de l'ordre de 10^{-7} M, donc beaucoup plus faibles que celles utilisées pour tuer les champignons, affecte les propriétés physiques des modèles de membranes cellulaires en diminuant leur microviscosité. Cet effet est en accord avec les résultats du chercheur Kazuo Ohki⁴² qui trouve une augmentation de la fluidité de la membrane cellulaire par l'amphotéricine B. Cette diminution de la microviscosité par l'amphotéricine B peut être responsable de sa synergie d'action avec certains agents antitumoraux.

Les résultats obtenus avec les stérols et l'amphotéricine B sont assez étonnants. Les deux stérols, mais surtout le cholestérol, protègent la bicouche lipidique contre l'effet de l'amphotéricine B. Il n'est pas facile d'interpréter ces résultats et surtout très difficile de les relier avec la synergie d'action de l'amphotéricine B avec des agents antitumoraux. D'autres études seraient nécessaires pour tirer de meilleures conclusions sur cette propriété de synergie d'action.

Comme on sait, les modèles membranaires sont très loin de la réalité. Plusieurs autres substances sont présentes dans les membranes naturelles qui peuvent changer les interactions entre l'amphotéricine B, les lipides et les stérols. L'étude pourrait donc être continuée sur des modèles membranaires plus perfectionnés.

REFERENCES

1. Bolard, J. *Biochim. Biophys. Acta*, 864, 257-304, (1986).
2. Brajtburg, J., Medoff, G., Kobayashi, G.S., ch. 5, dans "Antitumor Compounds of natural Origin: Chemistry and Biochemistry", vol. II, Ed. Adorjan Azalos, CRC press inc., 129-143, (1981).
3. Strauss, G. *Can. J., Spectr.*, 26, 3, 95-102, (1981).
4. Hammond, S.M., ch. 3, dans "Progress in Medicinal chemistry", vol. 14, Ed. Ellis, G.P., West, G.B, North-Holland Biomedical Press, 105-179, (1977).
5. Hidaka, K., Endo, H., Akiyama, S., Kuwano, M., *Cell*, 14, 415, (1978).
6. Coulon, J., Lematre, J., Bonaly, R., Pierfitte, M. *Mycopathology*, 71, 17-22, (1980).
7. Nozawa, Y., Yaginuma, H., Ozeki, K., dans "Filamentous microorganisms, Biomedical Aspects", Ed. Arai, T. Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo, 345-354, (1985).

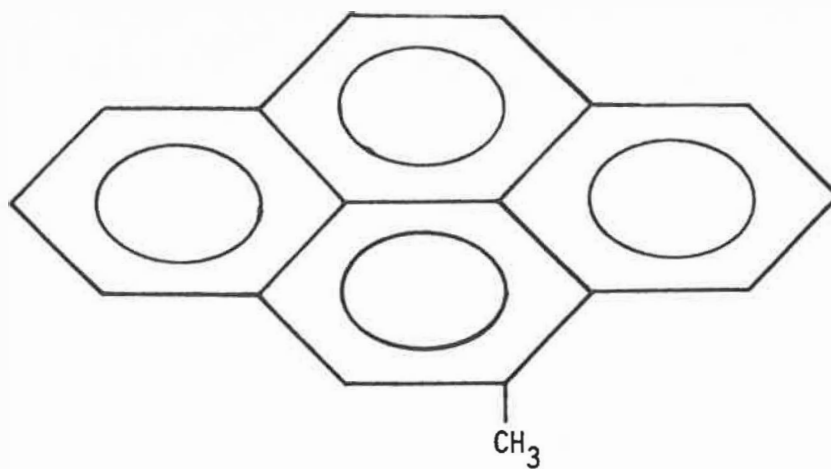
8. De Kruijff, B., Demel, R.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 57-70, (1974).
9. Kinsky, S.C., *Ann. Rev. Pharma.*, 10, 119-142, (1970).
10. Norman, A.W., Spielvogel, A.M., Wong, R.G., *Ad. Lip. Res.*, 14, 127-171, (1976).
11. De Kruijff, B., Geritsem, W.J., Oerlemans, A., Demel, R.A., Van Deneen, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta*, 339, 30-43, (1974).
12. Lampen, J.O., *Am. J. Clin. Path.*, 52, 138-140, (1969).
13. Archer, D.B., Gale, E.F., *J. Gen. Microbiol.*, 90, 187-190 (1975).
14. Kotler-Brajtburg, J., Price, H.D., Medoff, G., Schlessinger, D., Kobayashi, G.S., *Antimicrob. Agents chemother.*, 5, 377-382, (1974).
15. Van Hoogevest, P., De Kruijff, B., *Biochim. Biophys. Acta*, 511, 397-407, (1978).
16. Marty, A., Finkelstein, A., *J. Gen. Physiol.*, 65, 515-526, (1975).

17. Andreoli, T.E., Ann. N.Y., Acad. Sci., 235, 448-468, (1974).
18. Valeriote, F., Medoff, G., Dieckman, J., Cancer Research, 39, 2041-2045, (1979).
19. Medoff, G., Valeriote, F., Dieckman, J., JNCI, 67.1, 131-135, (1981).
20. Vander, A.J., Sherman, J.H., Luciano, D.S., dans "Physiologie humaine", McGraw-Hill, Editeurs-Montréal, 43-47, (1977).
21. Singer, S.J., Nicolson, G.L., Science, 175, 720, (1972).
22. Van Blitterswijk, W.J., Van der Meer, B.W, Hilkmann, H. Biochemistry, 26, 1746-1756, (1987).
23. Molitoris, B.A., Hoilien, C., J. Memb. Biol., 99, 165-172, (1987).
24. Zachariasse, K.A., Kühnle, W., Weller, A., Chem. Phys. letters, 73, 1, 6-11, (1980).
25. Lukac, S., J. Am. chem. soc., 106, 4386-4392, (1984).
26. Shinitzky, M. Inbar, M., Biochim. Biophys. Acta, 433, 133-149, (1976).

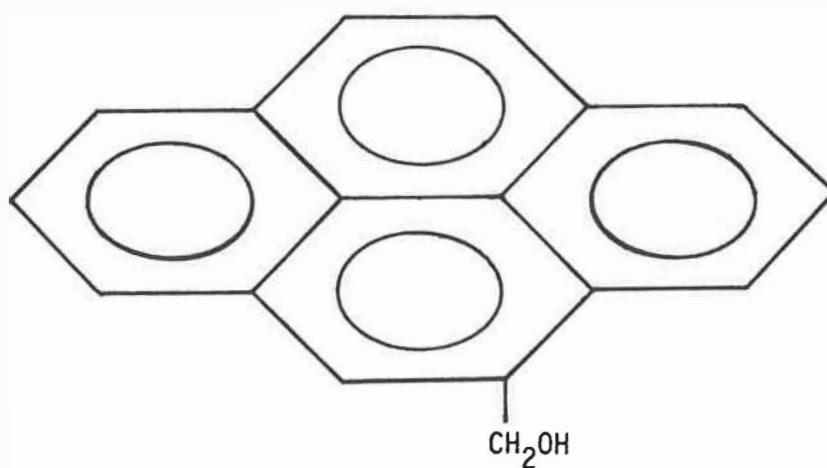
27. Trentacosti Presti, F., ch. 3, dans "Membrane Fluidity in biology", vol. 4, Ed. Aloia, R.C., Academic Press inc., 97-143, (1985).
28. Sauk, J.J., Krumwiede, M., Cocking-Johnson, White, J.G., J. Oral, Phatol, 16, 69-74, (1987).
29. Donner, M., Bouchy, M., Viriot, M.L., André, J.C., Biochimie, 63, 961-965, (1981).
30. Zachariasse, K.A., Vaz, W.L.C., Sotomayor, C., Biochim. Biophys. Acta, 688, 323-332.
31. Vanderkooi, J.M., Callis, J-B., Biochemistry, 13, 19, 4000-4006, (1974).
32. Andersen, H.C., Ann. Rev. Biochem., 47, 359-389, (1978).
33. Yguerabide, J., Foster, M.C., Mol. Biol. Biochem. Biophys. (membr. spectr.), 31, 199-269, (1981).
34. Glushko, V., Thaler, M.S.R., KARP, C.D., Arch. Biochem., Biophys., 210, 1, 33-42, (1981).
35. Georghiou, S., Mukhophadhyay, A.K., Biochim., Biophys., Acta, 645, 365-368, (1981).

36. Vekshin, N.L., J., *Biochem., Biophys. meth.*, 15, 97-104, (1987).
37. Cheng, S., Thomas, J.K., Kulpa, C.F., *Biochemistry*, 13, 6, 1135-1141, (1974).
38. Gruda, I., Lavallée, C., travaux non-publiés.
39. Reichardt, C., *Solvent effects in organic chemistry*, Verlag Chemie, Weinheim, New York, (1979).
40. Batzri, S., Korn, E.D., *Biochim. Biophys. Acta*, 298, 1015 (1973).
41. Kremer, J.M.H., Esker, M.W.J., ~~Patmananoharan~~, C., *Biochemistry*, 16, 3932, (1977).
42. Ohki, K., *Toyoda Kendyu Hokoku*, 40, 9-14, (1987).

APPENDICE



MÉTHYL-1-PYRÈNE



HYDROXYMÉTHYL-1-PYRÈNE

Figure 17: Structure chimique du méthyl-1 pyrène et de l'hydroxyméthyl-1 pyrène