

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
ISABELLE FOURNIER, B. Sc. (Biochimie)**

***ÉTUDE DE L'INTERACTION DE L'AMPHOTÉRICINE B
AVEC LE CHOLESTÉROL ET L'ERGOSTÉROL
EN MILIEU LIPIDIQUE ORGANISÉ***

OCTOBRE 2004

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.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le professeur Pierre Tancrède, du département de chimie-biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières. Son enthousiasme, sa grande disponibilité, sa confiance ainsi que l'autonomie qu'il m'a laissée ont permis de développer mon sens critique ainsi que le goût de la recherche fondamentale. Merci de m'avoir donné ma première chance en me permettant de travailler à mi-temps dans votre laboratoire et par la suite, de m'avoir fourni le cadre financier pour poursuivre aux études graduées.

Les recherches effectuées en RMN du deutérium ont été effectuées au laboratoire de la professeure Michèle Auger du département de chimie de l'université Laval. Je tiens aussi à souligner la collaboration de Mme Marie-Josée Paquet, étudiante (à l'époque!!) au doctorat en chimie à l'université Laval. Merci beaucoup à vous deux de votre disponibilité.

Je tiens aussi à remercier sincèrement Mme Joanna Barwicz, qui était ni plus ni moins que le bras droit de M. Tancrède au départ mais qui est devenue par la suite une amie extraordinaire qui a permis tout au long de ces années l'embellissement des journées passées au laboratoire. Elle a participé, elle aussi, au développement de mon sens critique de l'analyse ainsi que de mon autonomie. Joanna, jamais je n'oublierai cette belle amitié et cette confiance, merci pour tout!

Pour l'étude calorimétrique, je voudrais souligner l'aide précieuse apportée par le professeur Claude Gicquaud ainsi que par Mme Agnès LeJeune. Merci à vous deux d'avoir partagé les périlleuses aventures calorimétriques avec moi!!

Je tiens aussi à souligner l'implication apportée par le professeur Bernard Larue lors de l'analyse des données calorimétriques. Son logiciel a été indispensable pour cette analyse. Également, je tiens à remercier le Professeur Camille Chapados pour son expertise en spectroscopie IR ainsi que le professeur Robert Carpentier pour la disponibilité du spectromètre IR.

En terminant, je voudrais remercier mes parents. Ils ont permis que l'accomplissement de ce travail s'effectue avec plus de facilité, en prenant soin de David, notre petit ange! Merci à vous deux.

Je dédie enfin ce travail à Steve. Merci pour ta confiance, tes encouragements et surtout, pour ta présence et ta compréhension. La fin de parcours fut plus longue que prévue mais nous y sommes arrivés!

RÉSUMÉ

L'amphotéricine B est un antifongique très utilisé depuis les 50 dernières années pour le traitement des mycoses profondes et ce, malgré sa grande toxicité envers les patients. L'hypothèse actuellement proposée pour expliquer cette toxicité, tant envers les cellules pathogènes que celles des hôtes, serait son interaction avec les stérols membranaires. En effet, les cellules de champignons pathogènes contiennent de l'ergostérol tandis que les cellules de mammifères contiennent du cholestérol. Cette interaction entre l'amphotéricine B et les stérols aurait pour conséquence la fuite irréversible de certaines composantes cellulaires et, par conséquent, un déséquilibre homéostatique irréversible de la cellule, d'où mort cellulaire. Une des hypothèses les plus généralement admises jusqu'à maintenant pour expliquer cette fuite serait la formation de pores membranaires impliquant l'AmB, avec la participation de chacun des stérols. Afin de vérifier cette hypothèse et d'apporter des éléments concrets au niveau de la sélectivité d'interaction de cet antifongique avec chacun des stérols, nous avons utilisé, comme modèle d'étude, le liposome. Comme lipide de base, nous avons utilisé la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Pour représenter les cellules pathogènes, nous avons incorporé à ces vésicules des quantités variées d'ergostérol et pour représenter les cellules hôtes, nous avons incorporé le cholestérol. À ces différents mélanges lipidiques, différentes quantités d'antifongique ont été ajoutées afin d'étudier l'effet de chacun des stérols sur l'interaction de l'AmB avec son environnement lipidique. Pour y arriver, nous avons utilisé différentes techniques toutes complémentaires les unes des autres : celles servant à l'étude du phospholipide, soit la calorimétrie différentielle à balayage, les spectroscopies FTIR, RMN du deutérium et celle servant à la caractérisation de l'antifongique, soit la spectroscopie UV-visible. Les résultats obtenus montrent premièrement une interaction de l'AmB avec des bicouches lipidiques et ce, même en absence de stérol. Cette interaction induirait la formation de nouvelles phases lipidiques rigidifiées par les molécules d'AmB. La spectroscopie UV-visible a montré que ces molécules d'AmB sont présentes sous forme d'oligomères dans la matrice lipidique de DPPC, fort probablement sous forme de pores membranaires. En présence de cholestérol, les mêmes phases sont observées et l'interaction de l'antifongique avec ces bicouches ne semble pas dépendre de la présence de ce stérol.

Les pores d'AmB formés en présence de cholestérol n'impliqueraient donc pas ce dernier dans leur structure. En présence d'ergostérol par contre, la situation est complètement différente. L'interaction de l'AmB avec ces mélanges impliquerait une association 1 :1 entre les molécules d'AmB et d'ergostérol. Cette interaction de l'AmB avec ce stérol atténue l'effet d'augmentation de l'ordre, qu'a normalement l'ergostérol sur son environnement lipidique. À la lumière de tous nos résultats, l'ergostérol constituerait une cible de choix pour l'AmB, contrairement au cholestérol.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	i
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
CHAPITRE I: Problématique	1
1.1 INTRODUCTION	1
1.2 CARACTÉRISTIQUES DE L'AmB.....	4
1.2.1 Propriétés physicochimiques de l'AmB.....	4
1.2.2 Pharmacocinétique et conséquences cytologiques.....	6
1.3 ASPECT MOLÉCULAIRE DE L'ACTIVITÉ DE L'AmB.....	7
1.3.1 Caractéristiques de l'interaction AmB / stérols	7
1.3.2 Formation de pores membranaires	10
1.3.2.1 Mécanismes stérol-dépendants	10
1.3.2.2 Mécanismes stérol-indépendants	16
1.3.3 Mécanismes alternatifs d'action de l'AmB	16
1.4 OBJECTIFS DE RECHERCHE	17
CHAPITRE II: Matériel et méthodes	20
2.1 MATÉRIEL	21
2.2 TECHNIQUES UTILISÉES	21
2.2.1 Préparation des liposomes.....	21
2.2.2 Techniques servant à l'étude des propriétés du phospholipide.....	22
2.2.2.1 Calorimétrie différentielle à balayage.....	22
2.2.2.2 Spectroscopie FTIR	25
2.2.2.3 Spectroscopie RMN du deutérium.....	27
2.2.3 Technique servant à l'étude des propriétés de l'AmB	30
2.2.3.1 Spectroscopie UV-visible	30

2.3 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.....	32
2.3.1 Calorimétrie différentielle à balayage.....	32
2.3.2 Spectroscopie FTIR.....	32
2.3.3 Spectroscopie RMN- ² H.....	33
2.3.4 Spectroscopie UV-visible.....	33
 CHAPITRE III: Caractérisation des bicouches lipidiques de DPPC	34
3.1 TRANSITIONS DE PHASE DES BICOUCHES DE DPPC.....	34
3.2 ASYMÉTRIE DE LA TRANSITION PRINCIPALE.....	37
 CHAPITRE IV: Bicouches lipidiques mixtes DPPC/stérols	43
4.1 RÉSULTATS CALORIMÉTRIQUES	43
4.1.1 Effet du cholestérol sur les bicouches de DPPC	43
4.1.2 Effet de l'ergostérol sur les bicouches de DPPC.....	54
4.1.3 Effet de chacun des stérols sur l'enthalpie de transition.....	57
4.2 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE FTIR.....	60
4.3 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE RMN-²H.....	67
4.4 CONCLUSIONS PARTIELLES.....	72
 CHAPITRE V: Bicouches lipidiques mixtes DPPC/AmB.....	73
5.1 RÉSULTATS CALORIMÉTRIQUES	73
5.1.1 Effet du DMSO sur les bicouches de DPPC	73
5.1.2 Effet de l'AmB sur les bicouches de DPPC	75
5.2 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE FTIR.....	90
5.3 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE RMN-²H.....	94
5.4 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE	100
5.5 CONCLUSIONS PARTIELLES.....	102

CHAPITRE VI: Bicouches lipidiques mixtes DPPC/cholestérol/AmB.....	105
6.1 RÉSULTATS CALORIMÉTRIQUES	105
6.1.1 Mélanges ternaires contenant 12,5% en mole de cholestérol.	106
6.1.2 Mélanges ternaires contenant 28% en mole de cholestérol.	115
6.1.3 Comportement global des bicouches contenant le cholestérol et l'AmB. ...	117
6.2 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE FTIR.....	120
6.3 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE RMN-²H	125
6.4 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE	131
6.5 CONCLUSIONS PARTIELLES.....	133
 CHAPITRE VII: Bicouches lipidiques mixtes DPPC/ergostérol/AmB.....	 136
7.1 RÉSULTATS CALORIMÉTRIQUES	136
7.1.1 Mélanges ternaires contenant 12,5% en mole d'ergostérol.	137
7.1.2 Mélanges ternaires contenant 28% en mole d'ergostérol.	148
7.1.3 Comportement global des bicouches contenant l'ergostérol et l'AmB	150
7.2 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE FTIR.....	152
7.3 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE RMN-²H	157
7.4 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE	161
7.5 CONCLUSIONS PARTIELLES.....	163
 CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	 165
 BIBLIOGRAPHIE.....	 171

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1: Comparaison des T_m , des $\Delta t_{1/2}$ et des $\Delta \bar{H}$ obtenues pour la DPPC pure...	37
Tableau 4.1: Comparaison des valeurs de la température de transition et de la largeur à mi-hauteur pour les mélanges lipidiques contenant les stérols.....	57
Tableau 4.2: Variation de l'enthalpie molaire totale en fonction de la concentration en stérols.....	58
Tableau 5.1: Comparaison des paramètres thermodynamiques obtenus pour les préparations de DPPC pure et de DPPC contenant 2% (v/v) de DMSO..	74
Tableau 6.1: Comparaison des T_m et des $\Delta t_{1/2}$ pour les mélanges lipidiques contenant seulement l'AmB ou 12,5% cholestérol et l'AmB.....	112

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1: Structure moléculaire de l'Amphotéricine B.....	5
FIGURE 1.2: Structures moléculaires du cholestérol (A) et de l'ergostérol (B).....	7
FIGURE 1.3: Schéma d'un pore membranaire composé de 8 molécules d'AmB et de 8 molécules de cholestérol (Khutorsky 1996).....	11
FIGURE 2.1: Thermogramme typique d'un processus endothermique (McElhaney 1986).....	23
FIGURE 2.2: Courbe de fusion obtenue pour des liposomes MLV de DPPC 4 mg/mL.....	26
FIGURE 2.3: Spectres RMN- ² H original (A) et "dePaké" (B) de liposomes de DPPC- <i>d</i> ₃₁ 20 mg/mL.....	28
FIGURE 2.4: Spectres UV-visible de l'Amphotéricine B, $6,5 \times 10^{-6}$ M, monomère dans un mélange 40% propanol - 60% eau (A) et agrégée dans l'eau (B) (Barwicz <i>et al.</i> 1992).	31
FIGURE 3.1: Thermogramme obtenu pour des bicouches MLV de DPPC 4 mg/mL.	35
FIGURE 3.2: Résultat de la décomposition du thermogramme obtenu pour des bicouches MLV de DPPC 4 mg/mL.	38
FIGURE 3.3: Thermogrammes obtenus pour un même échantillon liposomal de DPPC 4 mg/mL, en utilisant différents taux de chauffe.	40
FIGURE 4.1: Thermogrammes obtenus pour les bicouches mixtes DPPC 4 mg/mL contenant le cholestérol.....	44
FIGURE 4.2: Composantes de décomposition obtenues pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole de cholestérol.	48
FIGURE 4.3: Diagramme de phase du mélange binaire DPPC/cholestérol (McMullen et McElhaney, 1995).....	50
FIGURE 4.4: Représentations d'une section d'une matrice lipidique contenant 36,7% de cholestérol. A: vue générale, B: molécules de cholestérol (Miao <i>et al.</i> 2002).....	53
FIGURE 4.5: Thermogrammes obtenus pour les bicouches mixtes de DPPC 4 mg/mL contenant l'ergostérol.....	55

FIGURE 4.6: Composantes de décomposition obtenues pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol.....	56
FIGURE 4.7: Courbes de fusion obtenues pour la bande de vibration d'élongation symétrique du groupement CH_2 des mélanges DPPC 4 mg/mL contenant du cholestérol ou de l'ergostérol	61
FIGURE 4.8: Courbes de fusion obtenues pour la bande de vibration d'élongation symétrique du groupement CD_2 des mélanges contenant le lipide deutéré.	66
FIGURE 4.9: Écarts quadripolaires obtenus pour le carbone près de la tête polaire (A) et en bout de chaîne (B) en fonction de la température pour les mélanges DPPC- d_{31} /stérol.....	69
FIGURE 5.1: Thermogrammes obtenus pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL pur (noir) et celles contenant 2% (v/v) DMSO (fuchsia).....	74
FIGURE 5.2: Thermogrammes obtenus pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 0%, 6,25%, 12,5% et 25% en mole d'AmB.	76
FIGURE 5.3: Composantes de décomposition du thermogramme obtenu pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'AmB.....	78
FIGURE 5.4: Graphiques de la température de transition (A) et de la largeur à mi-hauteur (B) en fonction de la concentration en AmB pour les trois transitions de phase résultant de la décomposition des thermogrammes des mélanges DPPC 4 mg/mL /AmB	80
FIGURE 5.5: Thermogramme d'une préparation liposomale de DPPC sur support de mica, 30°C/h (tiré de Yang et Appleyard 2000).....	82
FIGURE 5.6: Schéma hypothétique de la distribution des molécules d'AmB dans une bicouche de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'AmB.	84
FIGURE 5.7: Graphique de l'enthalpie de transition en fonction de la concentration en AmB	86
FIGURE 5.8: Courbes de fusion obtenues pour les bandes de vibration d'élongation symétrique du groupement CH_2 des mélanges DPPC 4 mg/mL/AmB	90
FIGURE 5.9: Écarts quadripolaires obtenus pour le carbone près de la tête polaire (A) et en bout de chaîne (B) en fonction de la température pour les mélanges DPPC- d_{31} /AmB.....	95

- FIGURE 5.10: Spectres originaux de la DPPC- d_{31} pure 20 mg/mL (A) et des bicouches de DPPC- d_{31} 20 mg/mL contenant 6,25% AmB (B), 12,5% AmB (C) et 25% AmB (D), enregistrés à 40°C.....96
- FIGURE 5.11: Variation du second moment spectral des spectres originaux des bicouches DPPC- d_{31} /AmB en fonction de la concentration en AmB.98
- FIGURE 5.12: Spectres UV-visible d'une solution aqueuse 5% propanol de DPPC 2 mg/mL et $5,5 \times 10^{-5}$ M d'AmB (A) et d'un échantillon liposomal de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% ($6,8 \times 10^{-4}$ M) en AmB (B)..... 101
- FIGURE 6.1: Thermogrammes des bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole de cholestérol avec et sans AmB..... 106
- FIGURE 6.2: Thermogramme décomposé pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole de cholestérol et 25% en mole d'AmB..... 108
- FIGURE 6.3: Températures de transition (A) et largeur à mi-hauteur (B) en fonction de la concentration en AmB, pour les trois transitions de phase résultant de la décomposition des thermogrammes pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole de cholestérol et d'AmB. 109
- FIGURE 6.4: Enthalpie de transition en fonction de la concentration en AmB pour la première transition de phase, la seconde, la dernière transition et l'enthalpie totale pour les mélanges DPPC/12,5%cholestérol/AmB..... 113
- FIGURE 6.5: Thermogrammes des bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 28% en mole de cholestérol avec et sans AmB..... 116
- FIGURE 6.6: Enthalpies totales pour le mélange DPPC/AmB et les mélanges ternaires DPPC/cholestérol/AmB en fonction de la concentration en AmB. 118
- FIGURE 6.7: Courbes de fusion obtenues, par FTIR, pour les mélanges DPPC/12,5%cholestérol/AmB et DPPC/28%cholestérol/AmB 121
- FIGURE 6.8: Écarts quadripolaires obtenus pour le carbone près de la tête polaire (A) et en bout de chaîne (B) en fonction de la température pour les mélanges DPPC- d_{31} /cholestérol/25%AmB..... 126
- FIGURE 6.9: Variation du second moment spectral en fonction de la température pour les bicouches contenant 12,5% ou 28% en mole de cholestérol et d'AmB..... 129

FIGURE 6.10: Spectres UV-visible d'une dispersion en solution aqueuse 5% propanol du cholestérol et de l'AmB (A, cuvette de 1 cm) et d'un échantillon liposomal de DPPC contenant 12,5% en mole de cholestérol et 12,5% en mole d'AmB (B, cuvette de 0,1 cm).....	132
FIGURE 7.1: Thermogrammes des bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol avec et sans AmB.....	137
FIGURE 7.2: Thermogramme décomposé pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 25% en mole d'AmB.....	139
FIGURE 7.3: Graphiques de la température de transition (A) et de la largeur à mi-hauteur (B) en fonction de la concentration en AmB pour les deux transitions de phase résultant de la décomposition des thermogrammes pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol et d'AmB.....	140
FIGURE 7.4: Schéma hypothétique de la distribution des molécules d'AmB dans une bicouche de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 12,5% en mole d'AmB.	143
FIGURE 7.5: Enthalpie de transition en fonction de la concentration en AmB pour la première transition de phase, la seconde et l'enthalpie totale pour les mélanges DPPC/12,5%ergostérol/AmB.....	146
FIGURE 7.6: Thermogrammes des bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 28% en mole d'ergostérol avec et sans AmB.	149
FIGURE 7.7: Enthalpies totales pour le mélange DPPC/AmB et pour les mélanges ternaires DPPC/ergostérol/AmB en fonction de la concentration en AmB.	150
FIGURE 7.8: Courbes de fusion obtenues, par FTIR, pour les mélanges DPPC/12,5% ergostérol/AmB (A) et DPPC/28% ergostérol/AmB (B) (écart-moyen de $\pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$).	153
FIGURE 7.9: Écarts quadripolaires obtenus pour le carbone près de la tête polaire (A) et en bout de chaîne (B) en fonction de la température pour les mélanges DPPC- d_{31} /ergostérol/25%AmB.	158
FIGURE 7.10: Graphique du second moment spectral en fonction de la température pour les bicouches de DPPC- d_{31} 20 mg/mL contenant 12,5% ou 28% en mole d'ergostérol et l'AmB.	160
FIGURE 7.11: Spectres UV-visible d'une dispersion en solution aqueuse 5% propanol d'ergostérol et de l'AmB (A) et d'un échantillon liposomal de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 12,5% en mole d'AmB (B).....	162

CHAPITRE I

PROBLÉMATIQUE

1.1 INTRODUCTION

Les infections fongiques systémiques prennent de plus en plus d'importance au sein de notre société car elles affectent surtout les personnes dont le système immunitaire est affaibli. Comme la fréquence des maladies autoimmunes est de plus en plus élevée, le nombre de patients admis en milieu hospitalier qui contractent ce genre d'infection augmente sans cesse. En fait, près de 40% de toutes les infections contractées en milieu hospitalier menant à la mort sont dues non pas aux virus ou aux bactéries mais aux champignons pathogènes. Le pourcentage d'infections fongiques a presque doublé entre 1980 et 1990, passant de 6% à 11% (Sternberg 1994). Parmi les patients les plus souvent atteints, on compte les sidéens, les cancéreux et les patients ayant subi une greffe ou une transplantation d'organes. Puisque que la proportion de ces patients augmente de plus en plus au fil des ans, il est grandement justifié de s'attarder au traitement que doivent subir les patients infectés.

Parmi tous les outils pharmaceutiques utilisés pour combattre ces infections fongiques, un seul antibiotique demeure "l'empereur" depuis 40 ans : l'amphotéricine B (AmB). Cet antifongique à large spectre est le plus efficace et le plus utilisé pour le traitement des mycoses systémiques et peut même être utilisé comme traitement préventif avant une intervention chirurgicale comme la transplantation ou la greffe d'organes. En plus de son utilisation comme antifongique, son spectre d'utilisation pourrait même s'étendre jusqu'à certains virus (comme le HIV), certains parasites et même aux infections causées par les prions (Adjou *et al.* 1997, Hartsel et Bolard 1997). Plus précisément, l'AmB a montré un ralentissement au niveau des symptômes des encéphalopathies chez les souris et les hamsters mais ne prévient pas une éventuelle neurodégénérescence (Demaimay *et al.* 1994, McKenzie *et al.* 1994). Aucun mécanisme pouvant expliquer ce ralentissement n'a été découvert mais il a été suggéré que l'AmB pourrait interagir directement avec la protéine normale du cerveau afin de

retarder son interaction avec l'agent infectieux ainsi que sa conversion en protéine étrangère (Demaimay *et al.* 1994).

L'AmB aurait aussi la propriété de stimuler le système immunitaire dans certaines conditions et cet effet dépendrait de la dose utilisée (Utz et Drouhet 1985, Mehta *et al.* 1985, Dei-Cas *et al.* 1987, Jullien *et al.* 1991). Le mécanisme de cette immunostimulation n'est pas encore certain mais jusqu'à maintenant, on observe une augmentation de la production du TNF α (Tumour necrosis factor α) au niveau des macrophages, induite par l'AmB. Par ailleurs, Feigin (1999) a récemment suggéré une nouvelle utilisation de l'AmB : elle pourrait être administrée lors d'une thérapie contre le cancer du foie. En effet, en utilisant une diète riche en cholestérol ainsi que l'administration d'inhibiteurs spécifiques de la biosynthèse du cholestérol, il y aurait accumulation des précurseurs du cholestérol, soit le lanostérol ou le 7-déhydrocholestérol, à l'intérieur des cellules malignes puisque celles-ci auraient perdu la régulation de leur biosynthèse de cholestérol. Les cellules saines pour leur part ne présenteraient donc pas cette accumulation. L'hypothèse émise par Feigin est basée sur une plus grande affinité de l'AmB vis-à-vis ces précurseurs, par rapport au cholestérol lui-même. Dans ce cas, elle pourrait interagir avec les cellules qui contiennent ces stérols, donc avec les cellules malignes, causant ainsi leur destruction. Les bases moléculaires de cette hypothèse furent testées expérimentalement par le groupe de Tancrede (Charbonneau *et al.* 2001) et les résultats se sont avérés encourageants puisque l'hypothèse de Feigin se trouve vérifiée. Cependant, ce groupe a précisé que l'antifongique n'interagit pas avec le lanostérol comme le prétendait Feigin. De plus, ils ont aussi démontré que l'AmB semble interagir avec la plupart des produits d'oxydation du cholestérol retrouvés *in vivo*, situation à ne pas négliger lors d'une éventuelle thérapie anticancéreuse.

L'utilisation de l'AmB est donc de plus en plus importante et son spectre d'action s'élargit au fil des ans. Cependant, malgré ce large spectre d'action, l'administration de l'AmB provoque d'importants effets secondaires chez la plupart des patients. Dans un premier temps, des réactions d'intolérance telles que nausée, fièvre,

diarrhée, douleurs articulaires et musculaires sont pratiquement constamment observées. Des réactions de type allergique sont plutôt rares mais peuvent survenir en début de traitement. Plus tard surviennent les complications viscérales, surtout rénales, ainsi que l'anémie et des lésions au foie. Il a été démontré récemment que l'AmB induirait aussi une toxicité envers les tissus du myocarde (Rao *et al.* 1997). C'est donc dans l'optique d'augmenter son indice thérapeutique que les recherches ont été menées au cours des dernières décennies, tant au niveau des formulations pharmaceutiques d'AmB à administrer que du point de vue fondamental, c'est-à-dire son mécanisme d'action ainsi que les molécules cibles impliquées.

Plusieurs formulations d'AmB ont donc été développées depuis les dernières années afin de réduire sa toxicité. On peut retrouver essentiellement quatre formulations pharmacologiques commerciales: la Fungizone, l'Amphocil ou ABCD, l'Abelcet ou ABLC et l'AmBisome. Depuis sa découverte dans les années 50, aucun agent fongicide ne s'est révélé plus efficace que la Fungizone, une formulation pharmaceutique où l'AmB se retrouve en mélange avec un sel biliaire, le déoxycholate de sodium. La réduction de la toxicité par ce surfactant proviendrait, selon Tancredé *et al.* (1990), de la monomérisation de l'AmB en présence de ce surfactant. L'Amphocil ou l'ABCD est une préparation de l'AmB en suspension colloïdale avec du sulfate de cholestérol tandis que la préparation appelée Abelcet, ou ABLC, est une préparation dans laquelle l'AmB est complexée à des molécules de lipide. Parmi les trois formulations lipidiques, seule l'AmBisome, préparation liposomale d'AmB connue pour réduire efficacement sa toxicité, est utilisée plus régulièrement en clinique. Cette dernière formulation réduit les effets secondaires rencontrés ainsi que la toxicité rénale (Dei-Cas *et al.* 1987). De plus, son administration serait considérablement facilitée. L'enveloppe liposomale assurerait une meilleure diffusion tissulaire ainsi qu'une distribution élective dans les organes riches en cellules réticulo-endothéliales, souvent impliquées dans les mycoses systémiques (Lopez-Berestein *et al.* 1984 et 1985, Brajtburg *et al.* 1990 a et b).

Malgré le fait que plusieurs des nouvelles formulations développées réduisent la toxicité de l'AmB pour les cellules eucaryotes, la dose nécessaire pour un même pouvoir

thérapeutique est supérieure à celle requise lorsque l'on administre l'AmB sous forme de Fungizone. Sous cette formulation, l'AmB se retrouve en quantité très importante dans certains organes comme le foie causant ainsi d'importants dommages, ce qui ne règle pas le problème de la toxicité.

La situation aujourd'hui, environ 50 ans après la découverte de l'AmB, est telle que nous n'expliquons toujours pas de façon approfondie son mécanisme d'action, à savoir comment elle interagit avec les membranes biologiques. Plusieurs groupes de recherche tentent d'éclaircir les bases moléculaires de l'activité de cet antifongique envers les stérols et les membranes modèles lipidiques dans le but d'augmenter son efficacité thérapeutique. C'est dans cette voie que s'orientent les travaux de recherche présentés ci-dessous.

1.2 CARACTÉRISTIQUES DE L'AmB

Afin de bien comprendre le (ou les) mécanisme (s) d'action de l'AmB envers les membranes, la connaissance de sa structure chimique ainsi que ses propriétés physicochimiques est primordiale.

1.2.1 Propriétés physicochimiques de l'AmB

Isolée et découverte pour la première fois en 1956 en sol vénézuélien par Gold *et al.* (1956), l'AmB est un produit de fermentation provenant de l'Actinomycète tellurique *Streptomyces nodosus* (Dei-Cas *et al.* 1987) et sa structure chimique fut déterminée en 1970 par Mechliniski *et al.* (1970). L'AmB, dont la structure est présentée à la figure 1.1, est un polyène heptahédrique dont le poids moléculaire est de 924,1 g/mole et dont la longueur totale de la molécule est d'environ 25 Å, ce qui correspond approximativement à l'épaisseur d'une demi bicouche lipidique de EPC (egg phosphatidylcholine) (Hartsel *et al.* 1993).

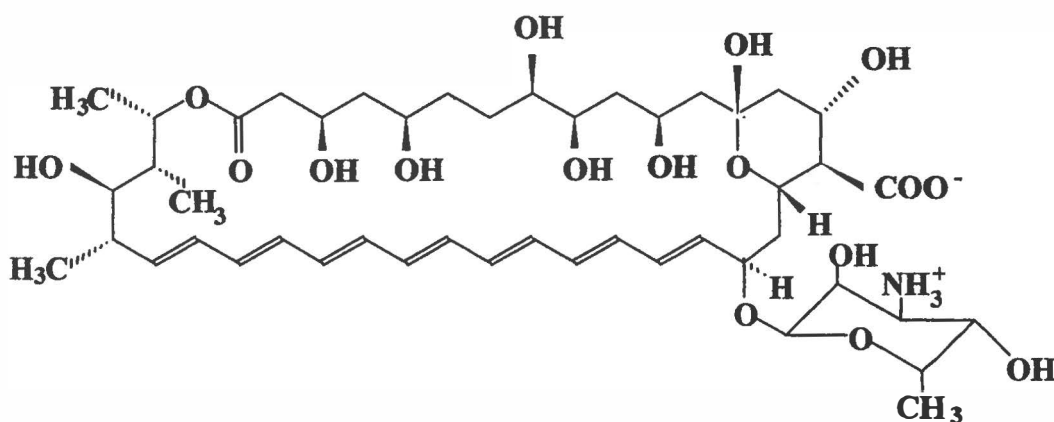


FIGURE 1.1: Structure moléculaire de l'Amphotéricine B.

La molécule est constituée d'un grand cycle lactonique de 37 atomes de carbone, évoquant ainsi la structure des macrolides. L'AmB possède sur un côté de ce cycle un système rigide de 7 doubles liaisons conjuguées en position trans qui lui confère un caractère hydrophobe. La longueur de la région hydrophobe est estimée à environ 20 Å (Van Hoogevest et de Kruijff 1978). Sur l'autre côté du cycle, on retrouve de nombreux groupements hydroxyles, ce qui confère à la molécule un caractère hydrophile. L'AmB est donc une molécule amphipatique, caractère physico-chimique qui est très important au niveau de la compréhension de l'interaction de l'AmB avec les membranes biologiques. Sa structure se complète par la présence d'un sucre aminé, la mycosamine, ainsi qu'un groupement carboxyle. Ces derniers groupements rendent la molécule zwitterionique dans une solution aqueuse à pH neutre. De par sa structure, l'AmB est très peu soluble dans l'eau (Medoff *et al.* 1983, Szoka 1993), sa concentration micellaire critique (CMC) étant de 6×10^{-7} M (Tancrède *et al.* 1990). Elle est cependant hautement soluble dans des solvants comme le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylfluorure (Hartsel *et al.* 1993).

Ses propriétés physicochimiques influencent grandement sa solubilité ainsi que sa distribution à l'intérieur de l'organisme. Le parcours emprunté lors de son administration en milieu médical dépendra de sa concentration, donc de son état d'agrégation, et du véhicule utilisé pour son transport, liposomes ou autres.

1.2.2 Pharmacocinétique et conséquences cytologiques

Tel que mentionné ci-dessus, il existe plusieurs formulations pharmaceutiques commerciales de l'AmB, mais la plus couramment utilisée est la Fungizone. Son administration se fait par voie intraveineuse, en clinique seulement. Après dissociation du sel biliaire, 95% de l'AmB se lie majoritairement aux lipoprotéines ainsi qu'à d'autres protéines plasmatiques. De plus, une proportion importante se lie aussi aux membranes d'érythrocytes (Wolff et Regnier 1984). Lors de l'interaction avec les lipoprotéines, la liaison est plus importante avec les VLDL (very low density lipoprotein) et les LDL (low density lipoprotein) qu'avec les HDL (high density lipoprotein), probablement à cause du contenu plus élevé en cholestérol pour les VLDL et les LDL (Brajtburg *et al.* 1984). Par la suite, l'AmB diffuse assez rapidement aux liquides extra-vasculaires inflammatoires pleuraux, péritonéaux et articulaires. Elle ne diffuse cependant pas au liquide céphalo-rachidien et amniotique (Norris 1985). La dégradation et l'élimination de l'AmB sont des processus inexpliqués jusqu'à maintenant mais l'AmB serait probablement dégradée par autooxydation (Lamy-Freund *et al.* 1985) et éliminée surtout par le foie (Wolff et Regnier 1984). Cette élimination se ferait en deux phases : l'une rapide, avec un temps de demi-vie de 24 à 48 heures, qui est constatée en début de traitement et une autre, plus lente, ayant un temps de demi-vie de 15 jours, qui correspondrait à la libération graduelle de l'AmB liée aux membranes cellulaires dans les tissus (Wolff et Regnier 1984, Norris 1985).

L'interaction de l'AmB au niveau des membranes cellulaires induirait des changements physicochimiques importants: cette interaction engendrerait des perturbations structurales qui auraient comme effet de déséquilibrer la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions comme K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} etc. et aux petites molécules comme l'eau, l'urée et le glucose (de Kruijff et Demel 1974, Van Hoogevest et de Kruijff 1978, Vertut-Croquin *et al.* 1983, Bolard 1986, Cohen 1986, Dei-Cas *et al.* 1987, Brajtburg *et al.* 1990a et b, Warnock 1991 et Fujii *et al.* 1997). La fuite irréversible des constituants cellulaires entraîne alors inévitablement la mort cellulaire (Bolard 1986, Brajtburg *et al.* 1990a et b).

Cette activité cellulaire est exercée sur une large gamme de levures et de moisissures saprophytes et pathogènes. L'AmB agit aussi contre les algues et contre quelques protozoaires pathogènes mais elle n'a cependant aucune activité contre les bactéries. Son spectre d'action est donc très large mais son utilisation principale est basée sur son activité fongicide.

1.3 ASPECT MOLÉCULAIRE DE L'ACTIVITÉ DE L'AmB

L'activité fongicide de l'AmB envers les cellules de champignons, de même que sa toxicité envers les cellules de mammifères, ne sont cependant pas très bien comprises. Au niveau moléculaire, on pense que son activité serait liée à la présence de stérol membranaire.

1.3.1 Caractéristiques de l'interaction AmB / stérols

Jusqu'à maintenant, on présume que l'activité thérapeutique de l'AmB serait principalement liée à son interaction avec l'ergostérol, stérol contenu dans la membrane cellulaire des champignons pathogènes. Sa toxicité, elle, proviendrait de son interaction avec le cholestérol, principal stérol contenu dans la membrane des cellules de mammifères. La structure moléculaire de chacun de ces stérols est illustrée à la figure 1.2.

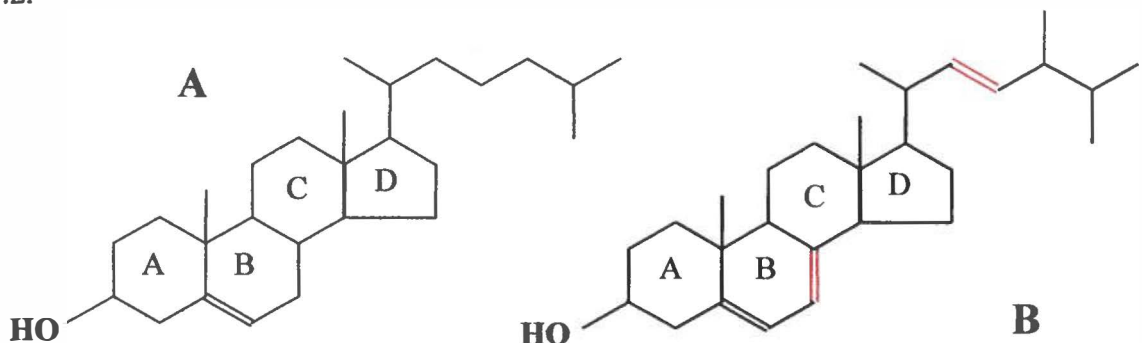


FIGURE 1.2: Structures moléculaires du cholestérol (A) et de l'ergostérol (B).

Sur cette figure, on constate notamment que l'ergostérol et le cholestérol se différencient par la présence de deux doubles liaisons, l'une au niveau du cycle B en position 7, et l'autre au niveau de la chaîne latérale. De plus, un groupement méthyle supplémentaire se retrouve sur la chaîne latérale, pour l'ergostérol.

Il a été proposé, dans les années 1970, que la différence d'interaction entre ces stérols membranaires et l'AmB serait responsable de la sélectivité d'action de cet antifongique. En effet, il a été montré, en milieu aqueux, que l'AmB interagit de façon plus spécifique avec l'ergostérol par rapport au cholestérol et ce, malgré la grande similitude structurale entre ces deux stérols (Medoff *et al.* 1983, Gruda et Dussault 1988, Bolard *et al.* 1991). Les constantes d'affinité de l'AmB envers chacun des stérols sont de $6,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ et $5,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ pour l'ergostérol et le cholestérol, respectivement (Radio et Bitmann 1982). Par ailleurs, Gruda et Dussault (1988) ont été les premiers à établir une relation entre l'état d'agrégation de l'antifongique et son activité thérapeutique. Ils ont démontré, par spectroscopie UV-visible, que l'AmB monomère n'interagissait que très peu ou très lentement avec l'ergostérol en solution. Par contre, lorsque l'AmB est sous forme de petits agrégats, probablement sous forme de dimères, la réaction est plus coopérative. Plusieurs autres études ont démontré une relation entre l'état d'agrégation de l'AmB et son activité (Tancrede *et al.* 1990, Legrand *et al.* 1992, Barwicz *et al.* 1992, Barwicz et Tancrede 1997). Par exemple, en milieu lipidique, Barwicz et Tancrede (1997) ont observé, par des études de pression de surface sur des monocouches de DOPC contenant du cholestérol ou de l'ergostérol, que l'AmB monomère interagissait seulement avec les films lipidiques contenant l'ergostérol.

Au niveau moléculaire, il est généralement admis que l'interaction de l'antifongique avec les stérols se ferait par le biais d'interactions hydrophobes. Du côté de l'antifongique, cette association impliquerait le système de 7 doubles liaisons conjuguées tandis que du côté des stérols, la situation n'est pas aussi claire. Il semblerait que toute la molécule du stérol, c'est-à-dire la chaîne latérale ainsi que les cycles, soit impliquée. Pour l'instant, il a été suggéré par Langlet *et al.* (1994) que la structure plus plane du cycle B de l'ergostérol, qui s'adapterait mieux à la structure de l'AmB, serait

responsable de la plus grande affinité de l'AmB envers l'ergostérol. Cependant, une autre hypothèse, soutenue par Nakamura *et al.* (1980) et par Baginski *et al.* (1989, 1994), voudrait que cette plus grande affinité envers l'ergostérol viendrait de la présence de la double liaison supplémentaire au niveau de la chaîne latérale de l'ergostérol.

De leur côté, le groupe de Tancrède (Charbonneau *et al.*, 2001) a récemment fait une étude concernant la sélectivité d'interaction de l'AmB envers différents stérols, soit le cholestérol, l'ergostérol, le lanostérol, le 7-déhydrocholestérol (7-DHC) ainsi que trois produits d'oxydation du cholestérol retrouvés *in vivo*. Cette étude a démontré que l'AmB interagissait préférentiellement avec le 7-DHC, par rapport au cholestérol et à l'ergostérol. Le 7-DHC contient, tout comme l'ergostérol, une double liaison supplémentaire en position 7 sur le cycle B ce qui indique fortement que la présence de cette double liaison, induisant une plus grande planéité au niveau de leur structure par rapport à celle du cholestérol, augmente leur interaction avec l'antifongique. Pour sa part, le lanostérol, ne possédant pas de double liaison en position 7 sur le cycle B, ne présente aucune interaction avec l'antifongique. Résultats surprenants, les produits d'oxydation du cholestérol présentent une interaction plus forte avec l'AmB que le cholestérol. Entre autre, le 7-kétocholestérol, qui possède un groupement carbonyle en position 7 sur le cycle B, possède une affinité supérieure à celle de l'ergostérol mais inférieure à celle du 7-DHC. Cette étude révèle donc qu'un infime changement au niveau de la structure du stérol influence grandement l'interaction de l'antifongique avec celui-ci et par le fait même, module la sélectivité d'interaction de l'AmB vis-à-vis chacun des stérols.

Il est aussi généralement admis que la présence du groupement 3β -OH sur les stérols soit nécessaire à cette interaction. Il y aurait donc aussi la possibilité d'une interaction via la formation d'un lien hydrogène entre ce groupement hydroxyle et certains des groupements polaires de l'AmB, soit la mycosamine et le groupement carboxyle. En effet, l'article publié par Hervé *et al.* (1989) propose un modèle dans lequel une liaison hydrogène serait formée entre le groupement amine de l'AmB, qui

agirait comme donneur de proton et l'atome d'oxygène du groupement 3 β -OH du stérol, qui agirait comme accepteur de proton.

Il y a donc plusieurs hypothèses formulées quant à l'interaction AmB/stérols au niveau moléculaire mais jusqu'à maintenant, aucune confirmation n'a été apportée concernant les groupements impliqués dans cette interaction.

1.3.2 Formation de pores membranaires

Plusieurs modèles théoriques du mécanisme d'action de l'AmB ont été proposés jusqu'à maintenant afin d'essayer d'expliquer les changements de perméabilité membranaire survenant en présence d'AmB mais encore là, aucun consensus n'a été atteint. On peut diviser en deux catégories les mécanismes proposés concernant l'interaction de l'antifongique avec les stérols en milieu lipidique organisé: les mécanismes stérol-dépendants et stérol-indépendants.

1.3.2.1 Mécanismes stérol-dépendants

Parmi tous les mécanismes stérol-dépendants proposés dans la littérature, on retrouve deux types d'interaction possible entre le stérol membranaire et l'antifongique. Le premier type d'interaction impliquerait une participation indirecte des stérols. Dans ce cas, l'interaction de l'antifongique avec la membrane relèverait plutôt d'un état organisationnel particulier au niveau de la membrane et l'introduction des molécules antifongiques serait facilitée par des défauts membranaires. Ces deux conditions seraient induites par la présence des stérols (Hsuchen et Feingold 1973, Presti *et al.* 1982).

Le second type d'interaction, le plus généralement accepté, serait la formation d'un complexe entre l'antifongique et les stérols, organisé en canaux ou pores

membranaires hydrophiles (figure 1.3), à l'intérieur desquels les molécules d'AmB seraient en orientation quasi-parallèle, leur côté polaire pointant vers l'intérieur du pore et leur partie hydrophobe interagissant avec l'environnement lipidique (Andreoli 1974, Ockman 1974, de Kruijff et Demel 1974, Bonilla-Marin *et al.* 1991, Khutorsky 1992, Hartsel *et al.* 1993). Les liens hydrogènes intermoléculaires, c'est-à-dire AmB-AmB et AmB-stérol, viendraient stabiliser le canal (Khutorsky 1992).

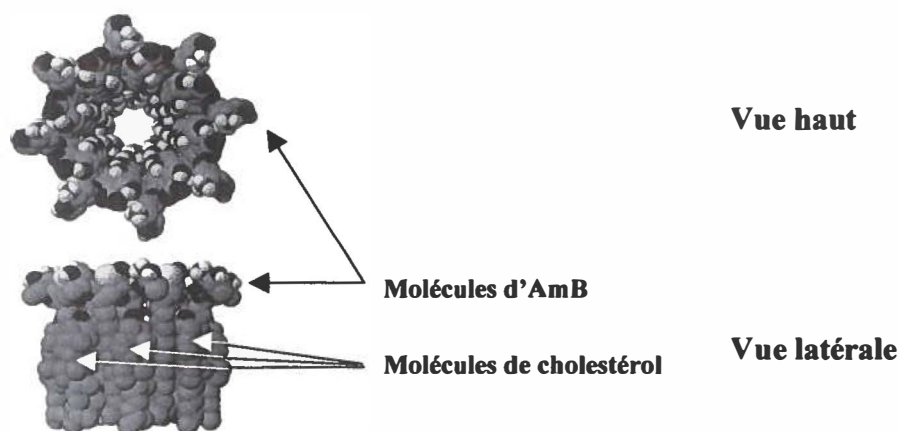


FIGURE 1.3: Schéma d'un pore membranaire composé de 8 molécules d'AmB et de 8 molécules de cholestérol (Khutorsky 1996).

L'implication de chacun des stérols, soit le cholestérol et l'ergostérol, dans l'interaction de l'AmB envers les matrices lipidiques organisées contenant un stérol ne semble pas faire l'unanimité dans la littérature. Par exemple, Brutyan et McPhie (1996) ont suggéré que l'AmB formerait des pores de même structure moléculaire avec l'un ou l'autre des stérols, avec la différence que les pores formés en présence d'ergostérol demeureraient ouverts plus longtemps que ceux formés en présence du cholestérol. De leur côté, les résultats obtenus en simulation moléculaire par le groupe de Baginski *et al.* (1997) suggèrent que les molécules de cholestérol n'interagissent pas avec les molécules d'AmB de façon spécifique, donc il peut être supposé que le cholestérol constituerait une cible non spécifique pour l'AmB.

Ces derniers résultats sont en contradiction avec l'hypothèse proposée par Hervé *et al.* (1989) qui prédit une interaction spécifique entre le groupement hydroxyle du cholestérol et le groupement amino ou carboxyl des molécules d'AmB. Des résultats contradictoires à ceux obtenus par Hervé *et al.* (1989) sont observés par Khutorsky (1992). Ce dernier suppose que les canaux se formeraient principalement par le biais d'interactions électrostatiques entre le groupement aminé chargé positivement d'une molécule d'AmB et le groupement carboxyle des autres molécules d'AmB environnantes. Les interactions de Van der Waals et/ou interactions au niveau du système de doubles liaisons conjuguées entre les molécules d'AmB et de stérol joueraient aussi un rôle dans la formation du pore membranaire. Un modèle tout à fait différent fut proposé par Cohen en 1992. La formation du canal se ferait de façon séquentielle : l'AmB interagirait dans un premier temps avec les molécules de phospholipide pour former un pore intermédiaire non-aqueux (non perméable aux ions). Ces canaux se convertiraient dans un deuxième temps en un pore transmembranaire de diamètre plus grand, aqueux et perméable aux ions, à l'urée et au glucose. Les stérols impliqués dans ce mécanisme viendraient, de par leur interaction avec le pore non-aqueux, faciliter sa conversion en un pore transmembranaire, aqueux et complètement actif. Cette conversion serait plus efficace en présence d'ergostérol que de cholestérol.

Plusieurs hypothèses sont émises quant à la stoechiométrie des molécules impliquées dans la formation de ces pores membranaires. Par exemple, le complexe AmB/stérol serait formé de 8 molécules d'AmB et de 8 molécules de stérol (de Kruijff et Demel 1974, Andreoli 1974). Le diamètre de ce canal serait situé entre 7 et 10 Å selon de Kruijff *et al.* (1974). Plus récemment, le groupe de Gruszecki *et al.* (2002) a précisé ces informations suite à l'analyse d'images obtenues par microscopie à force atomique de monocouches composées d'AmB et de DPPC: le diamètre interne du pore d'AmB approcherait 6 Å tandis que son diamètre externe serait d'environ 17 Å. Le groupe de Baginski (Baginski *et al.* 1997) pour sa part propose, par des études de simulation moléculaire, que le pore d'AmB serait formé de 6 à 8 molécules d'antifongique avec un nombre égale de molécules de stérol. De leur côté, Gagos *et al.* (2001) ont démontré, par analyse spectrométrique en utilisant la théorie des excitons et en assumant un pore

formé de 9 molécules d'AmB, que le diamètre de ce pore devrait être de 2,8 Å à l'état gel et de 3,6 Å en phase fluide d'une bicouche de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). D'un autre côté, Oehlschlager et Laks (1980) ont conclu que le complexe AmB/ergostérol peut aussi bien exister dans une stoechiométrie de 1 : 1 ou de 1 : 2. Bolard *et al.* (1980) ont aussi évoqué, par des études de dichroïsme circulaire, l'existence de plusieurs structures AmB/cholestérol ayant comme ratio molaire 1 : 1 et 1 : 2.

Quant au mécanisme de formation de ces pores, il demeure encore inexpliqué mais leur présence a été prouvée indirectement par des études de conductivité et de perméabilité (Cass *et al.* 1970, Andreoli 1974, Holz 1974, Marty et Finkelstein 1975, Kleinberg et Finkelstein 1984) et directement par microscopie à force atomique (Gruszecki *et al.* 2002). Les études de conductivité et de perméabilité ont démontré que l'induction de la perméabilité de membranes modèles par l'AmB dépendait de plusieurs facteurs dont la structure des stérols présents dans la bicouche lipidique, de l'état physique des phospholipides ainsi que de la nature des modèles utilisés. En effet, une augmentation du nombre de doubles liaisons au niveau du cycle B et de la chaîne latérale de la structure des stérols résulte en la prolongation du temps de vie de ces canaux (Cass *et al.* 1970, Van Zutphen *et al.* 1971, Andreoli 1974, Holz 1974, Marty et Finkelstein 1975, Kleinberg et Finkelstein 1984).

En utilisant comme modèle d'étude le liposome, à l'état liquide-cristallin, des résultats variables sont obtenus. Dans toutes ces études, l'AmB est incorporée après la formation des liposomes donc l'AmB n'est ajoutée que d'un seul côté de la bicouche lipidique. À faible ratio molaire AmB/lipide (environ 10^{-3} pour une concentration en lipide totale de 10^{-3} M), il y a fuite des ions Na^+ et K^+ pour des bicouches contenant le stérol, en présence d'AmB (de Kruijff *et al.* 1974, Singer 1975, Oku *et al.* 1980, Teer Link *et al.* 1980, Cybulska *et al.* 1981, Vertut-Croquin *et al.* 1983). Pour un ratio plus élevé, c'est-à-dire au-dessus de 10^{-2} , la sélectivité cation/anion semble être plus efficace (Gent et Prestegard 1976, Aracava *et al.* 1981, Aggett *et al.* 1982). Pour ce type d'interaction, c'est-à-dire lorsque l'AmB n'est ajoutée que d'un seul côté de la bicouche

liposomale, il a été proposé que la perméabilité induite résulterait de la formation d'un demi-pore, contenu dans la couche externe de la bicouche. Ce demi-pore pourrait alors se déplacer d'un côté ou de l'autre de la bicouche lipidique (Marty et Finkelstein 1975, Van Hoogevest et de Kruijff 1978, 1983). Cette interaction serait sélective aux cations. Cependant, les bicouches constituées de lipides ayant 18 atomes de carbone ou plus se sont montrées insensibles à l'action de l'AmB lorsque cette dernière n'est incorporée que d'un seul côté de la bicouche. Les résultats obtenus par mesures osmotiques montrent que les effets de l'AmB sur la perméabilité des bicouches confirment la formation probable de deux types de canaux actifs, différenciés par leur diamètre interne et dépendants de la concentration totale en antifongique (Cohen 1986).

Pour ce qui est de l'influence des stérols sur la perméabilité induite des membranes, Vertut-Croquin *et al.* (1983) ont montré qu'en présence d'une quantité égale en stérol, soit de cholestérol ou d'ergostérol, et en antifongique, la fuite des ions est plus efficace en présence de stérol. Pour des bicouches contenant l'un ou l'autre de ces stérols, la sensibilité de la perméabilité aux cations dépend non seulement de la quantité de ce stérol mais aussi de sa nature.

Du côté de l'AmB, il semblerait que l'état d'agrégation de l'antifongique modulerait son interaction avec les bicouches. Dépendamment de cet état, la structure de type canal formée ainsi que son activité en seraient affectées. En effet, Gruda et Dussault (1988) ont avancé l'hypothèse que l'état d'agrégation de l'AmB pourrait être responsable de la sélectivité d'interaction de l'antifongique envers chacun des stérols. Cette hypothèse fut confirmée plus tard par plusieurs résultats expérimentaux dont ceux publiés de Tancrede *et al.* (1990), de Bolard *et al.* (1991), de Barwicz *et al.* (1992), de Hartsel *et al.* (1994) et de Barwicz et Tancrede (1997). Ces travaux ont montré que l'AmB devait être sous forme agrégée pour induire la perméabilité aux ions K^+ sur des vésicules contenant le cholestérol tandis que l'AmB pouvait être sous n'importe quelle forme, c'est-à-dire monomère ou agrégée, pour induire cette fuite sur des vésicules contenant de l'ergostérol. D'après ces études, il est maintenant clair que la forme sélective de l'AmB est la forme monomère et que toute formulation pharmaceutique

devrait tenir compte de ce résultat afin de réduire la toxicité du médicament envers les cellules de mammifères. Cependant, même si cette sélectivité est plus grande lorsque l'AmB est monomère, un problème persiste lors de l'administration de l'antifongique: la concentration en AmB monomère nécessaire pour avoir une efficacité thérapeutique est démesurée. En effet, comme la CMC de l'AmB est de l'ordre de 10^{-7} M et que la dose thérapeutique requise est très élevée, la quantité devant être administrée pour atteindre une efficacité thérapeutique valable devrait être d'environ 60 à 180 litres par jour! (Barwicz *et al.* 1992). L'AmB demeure donc toujours sous forme agrégée lors de l'administration des formulations pharmaceutiques commerciales, d'où l'apparition des nombreux effets secondaires.

La formation d'une association AmB/stérol semble donc dépendre de plusieurs facteurs, ce qui rend la compréhension de son mécanisme d'action encore plus difficile lorsqu'il s'agit des membranes biologiques. Malgré les nombreux résultats obtenus par des mesures de conductivité et de perméabilité, aucun modèle de pore membranaire particulier n'a encore été confirmé. Nous savons toutefois que la présence des stérols augmente l'interaction de l'AmB avec ces modèles membranaires et que dépendamment, entre autre, du type de stérol présent dans la bicouche, le type de canal formé serait différent. Ces structures en forme de canal sont dépendantes autant de la nature du stérol, du type de phospholipide utilisé ainsi que de son état physique et finalement, dépendantes aussi de la grosseur des vésicules lipidiques employées (Hartsel *et al.* 1993).

Le fait que tant de discordances concernant le mécanisme de formation des pores membranaires se retrouvent dans la littérature nous révèle que l'interaction de l'AmB avec les membranes, tant synthétiques que biologiques, relève d'une complexité telle que l'implication du cholestérol n'est pas aussi évidente que celle de l'ergostérol. Nous savons cependant que la présence de ces stérols augmente l'affinité de l'AmB envers les bicouches, celles contenant l'ergostérol étant plus sensibles à l'action de l'AmB que celles contenant le cholestérol (Vertut-Croquin *et al.* 1983). La toxicité chronique et

aiguë de l'AmB fournit une évidence que la sélectivité n'est pas absolue (Chen et Bitmann 1977, Vertut-Croquin *et al.* 1983, Brajtburg *et al.* 1990).

1.3.2.2 Mécanismes stérol-indépendants

Malgré le fait que les stérols semblent être impliqués lors de l'interaction de l'AmB avec les membranes, on retrouve au niveau de la littérature plusieurs résultats indiquant fortement que la présence du stérol n'est pas toujours requise pour la formation des pores membranaires. Par exemple, Harstel *et al.* (1991), Perkins *et al.* (1992), Wolf et Hartsel (1995), Fujii *et al.* (1997) et Cotero *et al.* (1998) ont suggéré que les stérols ne sont pas nécessaires à la formation de pores d'AmB dans la membrane lipidique et que l'AmB peut interagir avec le lipide. Le groupe de Rucwardt *et al.* (1998) a mis en évidence, par des études de fluorescence, la présence de canaux uniquement formés par des molécules d'AmB. Plus récemment, Gruszecki *et al.* (2002) ont pour la première fois visualisé, par microscopie à force atomique sur des monocouches de DPPC contenant uniquement l'AmB, la présence de pores membranaires.

1.3.3 Mécanismes alternatifs d'action de l'AmB

Les différentes études portant sur l'action de l'AmB montrent que plus d'un mécanisme serait impliqué au niveau de sa toxicité (Brajtburg *et al.* 1990a et b). L'interaction avec les stérols, la formation de pores membranaires ainsi que l'augmentation de la perméabilité membranaire, tel que présenté précédemment, ne sont probablement pas les seules causes de sa toxicité. L'interaction de l'AmB avec certaines composantes cellulaires telles que les lipides et les protéines, l'induction de la peroxydation des lipides (Sokol-Anderson *et al.* 1986, Brajtburg *et al.* 1990a et b), l'inhibition des pompes membranaires (Capuozzo et Bolard 1985, Surarit et Sheperd 1987, Vertut-Doi *et al.* 1988), le blocage de l'endocytose ainsi que la modification

structurale apportée aux lipoprotéines, principalement les LDL par interaction de l'AmB (Barwicz *et al.* 1991, Barwicz *et al.* 1998), ont été évoqués comme autres causes possibles. L'interaction de l'AmB avec les lipoprotéines a été investiguée par le groupe de Gruda (Barwicz *et al.* 1991, Barwicz et Gruda 1997). Ces auteurs concluent que la toxicité *in vivo* proviendrait d'une interaction entre cet antifongique, les LDL et les VLDL. La diminution de cet effet toxique pourrait survenir si cette interaction est empêchée (Barwicz *et al.* 1991). En fait, Barwicz et Gruda (1997) ont démontré que la formulation pharmacologique commerciale Fungizone induit la modification de la structure des LDL et qu'elle amplifie la formation de produits d'oxydation. Quant à la formulation AmBisome, elle n'altère pas le processus naturel d'oxydation des LDL (Barwicz *et al.* 1998). De l'autre côté, sachant que les produits issus de l'oxydation des LDL sont hautement toxiques (Hodis *et al.* 1994), on peut penser que si l'AmB induit cette oxydation, l'interaction AmB/lipoprotéine peut être directement responsable de certains effets secondaires rencontrés.

L'activité de l'AmB envers les membranes contenant chacun des stérols n'est donc pas aussi sélective puisqu'une toxicité importante est rencontrée lors du traitement et les causes possibles pouvant expliquer sa toxicité sont nombreuses. Malgré tout, cet antifongique demeure le plus efficace lors du traitement des mycoses systémiques et puisqu'il est le plus utilisé encore aujourd'hui, il est primordial de s'attarder à la compréhension de cette toxicité.

1.4 OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'interaction de l'AmB avec les stérols membranaires serait une des principales causes de sa toxicité et jusqu'à maintenant, plusieurs groupes de recherche tentent d'apporter de nouvelles informations quant au mécanisme d'action impliqué lors de l'interaction de l'antifongique avec les membranes biologiques contenant soit l'ergostérol, principal stérol contenu dans la membrane des champignons pathogènes, ou le cholestérol, stérol majoritaire des cellules de mammifères. Comme les effets secondaires rencontrés lors du traitement en milieu hospitalier sont très importants et

rendent très difficile la guérison, il est primordial de comprendre cette interaction et de la caractériser afin de réduire cette toxicité tout en conservant l'efficacité thérapeutique de l'AmB. L'objectif premier de notre recherche est donc d'acquérir de nouvelles connaissances au niveau des bases moléculaires impliquées lors de la sélectivité d'interaction de l'AmB envers le cholestérol et l'ergostérol, avec le but ultime d'apporter de nouvelles informations qui pourraient servir à mieux comprendre le pouvoir thérapeutique de cet antifongique.

Pour y arriver, nous proposons d'utiliser comme modèle membranaire des liposomes LUV de DPPC contenant de l'ergostérol, mimant ainsi les membranes des champignons pathogènes, et des liposomes de DPPC contenant le cholestérol, afin de mimer les cellules de mammifères. Plusieurs techniques seront utilisées afin d'acquérir le plus d'informations possible concernant l'interaction de l'AmB avec chacun des stérols en milieu lipidique organisé. Pour chacun des mélanges étudiés, un suivi sera fait à la fois au niveau :

1° du comportement du phospholipide vis-à-vis chacun des constituants, soit le cholestérol, l'ergostérol et l'AmB. Pour ce faire, la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sera utilisée dans le but d'acquérir des informations quant à l'organisation globale de la bicouche phospholipidique. Dans un deuxième temps, la spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier (FTIR) et la spectroscopie RMN du deutérium seront utilisées afin d'obtenir des informations sur l'ordre moléculaire des chaînes aliphatiques des molécules de DPPC.

2° des modifications survenant au niveau de l'état d'agrégation de l'antifongique à l'intérieur des échantillons. Pour ce faire, la spectroscopie UV-visible sera utilisée afin d'obtenir des informations quant à l'interaction de l'AmB avec les molécules de stérols ou de phospholipides et concernant l'état d'organisation de l'antifongique dans la matrice lipidique.

Les résultats présentés dans ce travail correspondront donc dans un premier temps à l'étude du phospholipide seul (chapitre III), l'étude de l'effet de chacun des stérols sur la DPPC (chapitre IV) et l'étude de l'effet de l'AmB sur la matrice lipidique ne contenant pas de stérol (chapitre V). La première partie correspondra en fait aux contrôles de base servant à une meilleure compréhension des résultats obtenus pour les mélanges ternaires, présentés aux chapitres suivants. La seconde partie sera donc composée des chapitres VI et VII, qui sont l'étude des bicouches lipidiques contenant à la fois chacun des stérols et l'AmB.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans le but de recréer le plus simplement possible une membrane cellulaire, lieu d'action de l'AmB, le liposome MLV (multilamellar vesicle) a été utilisé comme modèle d'étude. De cette façon, plusieurs variables telles que la présence de différents lipides et de protéines contenus dans une cellule originelle, dont la présence compliquerait substantiellement notre étude, ont été éliminées. Ce système d'étude permet donc de choisir la composition des bicouches. Dans le cas présent, le lipide membranaire utilisé est la DPPC. L'utilisation de la DPPC comme phospholipide est basée sur des raisons pratiques puisqu'il est stable à l'oxydation, s'hydrate facilement, et en présence d'un excès de molécules d'eau, il forme uniquement des phases lamellaires aux températures physiologiques, comportement important dans cette étude. Il faut aussi de souligner qu'à l'intérieur de la plupart des membranes cellulaires eucaryotes, les phosphatidylcholines (PC) sont les principaux phospholipides zwiterionniques. Par contre, ils sont peu nombreux chez les eubactéries et entièrement absents chez les archéobactéries (McElhaney 1986). Ce phospholipide est de plus largement caractérisé dans la littérature. Il sera donc aisé de valider les résultats préliminaires obtenus pour les bicouches de DPPC pure.

Afin de représenter les cellules de champignons pathogènes, l'ergostérol a été incorporé dans des bicouches de DPPC. Pour simuler les cellules de mammifères, le cholestérol a été utilisé. Par la suite, l'interaction de l'AmB avec ces trois mélanges lipidiques, soit les bicouches de DPPC seule, celles contenant de l'ergostérol et celles contenant du cholestérol, a été suivie par différentes techniques, toutes complémentaires les unes des autres.

2.1 MATÉRIEL

Le lipide utilisé, la DPPC, provient de la compagnie Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al) et est utilisé sous forme de poudre. Le cholestérol, l'ergostérol, l'AmB ainsi que le DMSO ont été achetés chez Sigma (St. Louis, MO). Le chloroforme pour sa part provient de chez Anachemia (grade spectroscopique, Montréal, Qc). Un tampon phosphate de sodium (PBS), 0,02 M, pH 7,0 a été utilisé pour préparer les échantillons et l'eau ayant servi à la préparation de ce tampon a été distillée et déminéralisée sur un système Sybron-Barnstead (Fisher Scientific, Montréal, Qc). Pour les échantillons de RMN, le lipide utilisé est toujours la DPPC mais deutérée sur la chaîne acyle *sn-2* (DPPC- d_{31}) et il provient lui aussi de chez Avanti Polar Lipids. Dans ce cas, l'eau utilisée pour la préparation du tampon PBS est de l'eau légère ($^1\text{H}_2\text{O}$) afin d'éliminer le plus possible les perturbations causées par le deutérium présent dans l'eau, dont l'abondance naturelle est de 0,016 %. Cette eau provient de la compagnie Aldrich (Milwaukee, WI).

2.2 TECHNIQUES UTILISÉES

2.2.1 Préparation des liposomes

La technique de préparation des liposomes utilisée pour obtenir majoritairement des MLV est la technique classique du gel-dégel (Avanti Polar Lipids). Dans un premier temps, une solution-mère d'AmB est préparée par la dissolution de l'antifongique dans une quantité minimale et déterminée de DMSO. Dans un deuxième temps, à partir d'une solution-mère de DPPC et de stérol préalablement dissous dans du CHCl_3 , une quantité est prélevée et incorporée à l'intérieur d'un ballon afin d'obtenir la concentration désirée. Une quantité déterminée d'AmB y est ensuite ajoutée (selon la concentration de la solution-mère). Tous les constituants se retrouvent donc dans le CHCl_3 afin de maximiser leur incorporation dans la matrice lipidique lors de la formation des liposomes. Le CHCl_3 est évaporé sous vide pendant 20 minutes avec un

évaporateur rotatif (Rotovapor R 110, Buechi–Brinkman, Germany). Le film lipidique obtenu est ensuite resuspendu dans le tampon PBS, à 50°C. Cette suspension liposomale subit 4 cycles de gel-dégel, dans l'azote liquide et dans l'eau à 50°C, afin d'obtenir majoritairement des liposomes MLV de différentes tailles. La température de 50°C a été utilisée puisque l'échantillon doit être au-dessus de la température de transition de la DPPC lors du dégel, cette valeur étant de 41,4°C.

Dans la solution liposomale, la concentration finale en DPPC est de 4 mg/mL ($5,45 \times 10^{-3}$ M) sauf pour les expériences en RMN- ^2H où la concentration en DPPC- d_{31} est de 20 mg/mL afin d'augmenter le rapport signal sur bruit. Les concentrations de stérols utilisées pour cette étude sont de 12,5% et 28% en mole par rapport au nombre de mole de DPPC. Ces concentrations ont été utilisées afin d'obtenir deux états membranaires différents puisque dépendamment de la concentration en cholestérol, différentes phases lipidiques sont formées, phases discutées en détail au chapitre IV. De plus, la concentration de 28% en mole de cholestérol se rapproche de façon réaliste des conditions physiologiques qui sont d'environ 30% en mole (Yeagle 1985, Parasassi *et al.* 1995). Les concentrations en AmB utilisées sont 6,25%, 12,5% et 25% en mole par rapport au phospholipide. Elles ont été choisies au départ à partir de la concentration de 12,5% en mole de stérol dans le but d'obtenir des ratios molaires stérol/AmB de 2 : 1, 1 : 1 et 1 : 2. L'utilisation de ces ratios molaires vise à vérifier les différentes hypothèses retrouvées dans la littérature concernant la stoechiométrie des pores membranaires. Enfin, toutes les expériences ont été effectuées au minimum trois fois afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

2.2.2 Techniques servant à l'étude des propriétés du phospholipide

2.2.2.1 Calorimétrie différentielle à balayage

La calorimétrie différentielle à balayage est une technique de pointe pour l'étude des membranes modèles. Elle permet d'enregistrer les changements calorifiques qui

accompagnent les transitions de phases survenant dans une membrane lorsque l'on augmente ou abaisse la température. Par cette technique, le flux de chaleur différentiel nécessaire pour maintenir un échantillon et une référence inerte à la même température est mesuré. Ces deux cellules sont chauffées indépendamment et en absence d'une transition de phase dans l'échantillon, la différence de flux de chaleur est nulle ou constante entre l'échantillon et la référence. Lorsqu'une transition de phase survient, l'appareil doit modifier la quantité de chaleur à fournir pour que les deux cellules demeurent à la même température. Dans ce cas, une différence de flux de chaleur est enregistrée et une transition apparaît lorsqu'est portée en graphique la capacité calorifique (C_p en $\mu J/^{\circ}C$) en fonction de la température (figure 2.1).

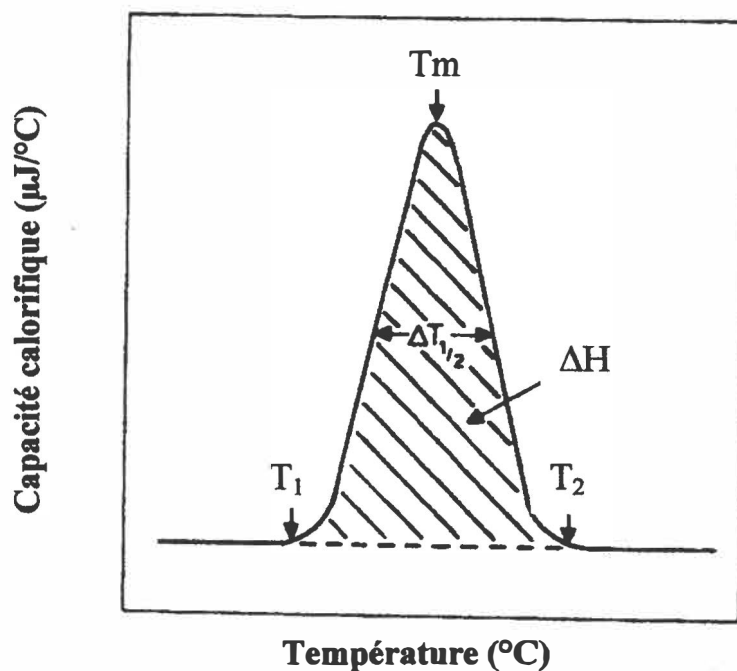


FIGURE 2.1: Thermogramme typique d'un processus endothermique (McElhaney 1986).

Ce graphique est appelé thermogramme et de ce signal, on soustrait celui obtenu pour le tampon-phosphate. La figure 2.1 représente un thermogramme typique, sur lequel on peut entre autre déterminer la valeur des paramètres thermodynamiques suivants pour une transition donnée :

- a) *l'enthalpie molaire expérimentale* ($\Delta \bar{H}$): elle représente la quantité de chaleur nécessaire pour passer d'une phase lipidique à une autre, calculée en intégrant l'aire sous la courbe, divisée par le nombre (#) de mole de phospholipide contenu dans l'échantillon:

$$\Delta \bar{H} = \Delta H / \text{\#mole DPPC} = \left(\int_{T_1}^{T_2} \Delta C_p dT \right) / \text{\#mole DPPC}$$

Elle mesure directement l'enthalpie associée au processus de transition. Dans nos conditions expérimentales, nous avons choisi un taux de chauffe de 10°C/h. Cette valeur de taux de chauffe permet d'avoir des conditions d'équilibre thermodynamique appropriées pour les bicouches lipidiques tout en imposant un temps d'acquisition de données acceptable (8 heures par balayage thermique) (Voir chapitre III, section 3.2).

- b) *la température de transition* (T_m): elle est déterminée en enregistrant la température au sommet de la transition.
- c) *la coopérativité*: elle est inversement proportionnelle à la largeur à mi-hauteur de la transition ($\Delta t_{1/2}$). Dans la présente étude, la coopérativité est utilisée pour une analyse qualitative des résultats c'est-à-dire que les $\Delta t_{1/2}$ obtenues pour chacun des échantillons étudiés sont comparées à celle de la DPPC seule.

Pour les phospholipides, la transition de phase la plus souvent étudiée et caractérisée en calorimétrie est la transition principale puisque le rapport signal sur bruit est très important et que cette transition de phase est associée principalement à l'état d'organisation globale des chaînes aliphatiques du phospholipide utilisé. Les paramètres thermodynamiques mentionnés ci-dessus servent donc à la caractérisation de cette transition de phase. Par la suite, la valeur de ces paramètres est portée en graphique en fonction de la concentration soit de chacun des stérols ou de l'AmB.

Par ailleurs, si plusieurs transitions de phase surviennent à l'intérieur d'un même échantillon, le thermogramme obtenu peut être décomposé afin d'obtenir les paramètres thermodynamiques de chaque transition. Cette décomposition peut être effectuée seulement si les valeurs de température et d'enthalpie des transitions sont indépendantes du taux de chauffe utilisé de même que si le thermogramme est réversible et reproductible (Hinz et Schwarz 2001). Cette décomposition est faite à l'aide du logiciel Quickfit élaboré par le professeur Bernard Larue du Département de chimie-biologie de l'UQTR. Ce logiciel utilise les équations de Van't Hoff afin de simuler le plus parfaitement possible le pourtour du signal calorimétrique enregistré et estime que chacune des transitions peut être simulée en supposant un modèle de transition entre deux états (two-state transition). Les composantes obtenues par décomposition sont alors automatiquement caractérisées par tous les paramètres thermodynamiques mentionnés ci-dessus et puisque nos thermogrammes sont reproductibles et indépendants du taux de chauffe employé, il est justifié selon le rapport technique IUPAC (Hinz et Schwarz 2001) de caractériser chacune des transitions de cette façon.

2.2.2.2 Spectroscopie FTIR

La spectroscopie infrarouge est une technique très utilisée entre autre pour l'étude des protéines et des lipides car ces derniers ont des bandes d'absorption très caractéristiques. Elle mesure l'énergie des transitions entre les différents niveaux vibrationnels situés à l'intérieur d'un même niveau électronique. Cette transition énergétique résulte de l'absorption de radiation dans la région infrarouge du spectre électromagnétique. Ces niveaux vibrationnels sont générés par des mouvements caractéristiques tels que les mouvements d'élongation et de déformation, qui ont lieu à l'intérieur des différents liens chimiques d'une molécule donnée. Ces vibrations moléculaires ont lieu à une échelle de fréquence de l'ordre de 10^{-13} s, ce qui implique que l'infrarouge fournit un aperçu instantané des mouvements au niveau moléculaire. Lorsque le dipôle électrique du groupement est modifié durant la vibration, ces mouvements ont une bande d'absorption dont la fréquence est très caractéristique et dont la valeur est déterminée par la nature des atomes participant au lien chimique, par leur conformation ainsi que par leur environnement immédiat.

Comme mentionné précédemment, les molécules de phospholipide peuvent facilement être caractérisées en IR en utilisant entre autre le nombre d'onde de la bande d'absorption des vibrations d'élongation des liaisons CH_2 des chaînes aliphatiques, située à 2850 cm^{-1} pour les vibrations symétriques et à 2920 cm^{-1} pour celles antisymétriques (Casal et Mantsch 1984). On peut de plus caractériser un phospholipide deutéré en suivant les bandes CD_2 symétriques et antisymétriques situées respectivement à 2090 cm^{-1} et 2195 cm^{-1} . Ces bandes caractérisent donc la région hydrophobe du phospholipide et leur position (nombre d'onde de la bande de vibration) est très sensible au changement dans le ratio de conformères *trans/gauche* le long des chaînes aliphatiques, informations d'intérêt lorsque l'on étudie les bicouches lipidiques en fonction de la température. Cependant, il est important de mentionner que la position de la bande de vibration des élongations symétriques et antisymétriques peut aussi être influencée par le couplage interchaîne et par le mouvement de librotation des chaînes aliphatiques, comme l'ont souligné Kodati *et al.* (1994). Les valeurs des fréquences d'absorption sont ensuite portées en graphique en fonction de la température pour donner ce que l'on appelle une courbe de fusion. La figure 2.2 représente une courbe de fusion obtenue pour la DPPC pure.

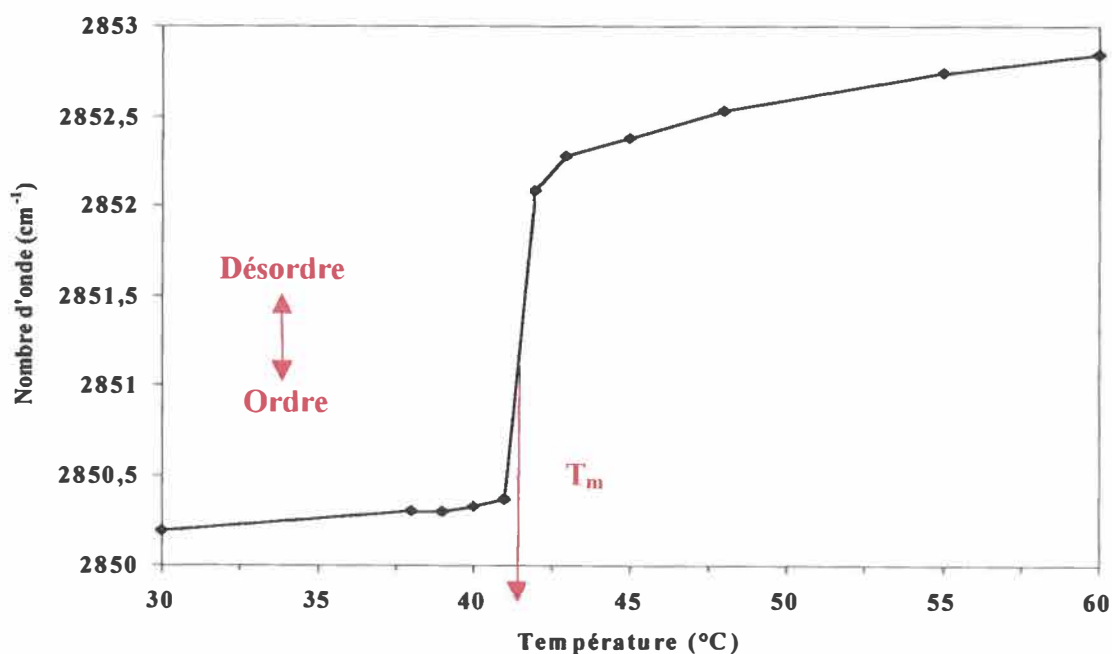


FIGURE 2.2: Courbe de fusion obtenue pour des liposomes MLV de DPPC 4 mg/mL.

Cette courbe de fusion représente en fait la transition de phase survenant à l'intérieur de l'échantillon étudié puisque le passage de l'état gel à l'état liquide-cristalin (L_α) se traduit par une élévation de la valeur du nombre de la bande de vibration, caractérisant l'augmentation du nombre de conformères gauches à l'intérieur de la chaîne aliphatique du phospholipide. Il sera alors possible, de façon qualitative, de comparer l'élargissement de la transition de phase observé en FTIR avec l'augmentation de la largeur à mi-hauteur obtenue par calorimétrie.

2.2.2.3 Spectroscopie RMN du deutérium

La résonance magnétique nucléaire est une technique utilisant les basses fréquences dans le spectre électromagnétique, environ 10^8 Hz, radiations de faible énergie par rapport à la spectroscopie UV-visible ou infrarouge. Le principe de la RMN est le suivant : tout noyau actif de l'atome en RMN résonnera, dans un champ magnétique donné, à une fréquence caractéristique qui dépendra du rapport gyromagnétique. L'atome utilisé pour cette étude est le deutérium et la fréquence nécessaire pour qu'il entre en résonance est de 46,1 MHz dans un champ magnétique de 7,05 T. Ce noyau possède un spin de 1 ce qui implique qu'il possède trois orientations de spin possibles; -1, 0 et +1 puisque le nombre d'orientations possibles est $2I+1$, où I est le spin du noyau. Ce noyau possède de plus un moment quadripolaire, qui représente une distribution non sphérique de charges dans le noyau. Ce moment quadripolaire interagit avec le gradient de champ électrique retrouvé au niveau des liens C-D le long de la chaîne aliphatique; dans ce cas, il y a une interaction quadripolaire, caractéristique de chacun des liens C-D dans un environnement donné. Cette interaction quadripolaire est représentée par le paramètre appelé écart quadripolaire (Seelig 1977).

Pour la présente étude, la RMN à transformée de Fourier a été utilisée. Le principe est le suivant : les noyaux de deutérium sont irradiés avec une brève impulsion de radiofréquence. Cette impulsion est ensuite interrompue et les noyaux de deutérium retournent à la distribution de Boltzmann. Ces noyaux induisent alors un courant sinusoïdal dans la bobine d'un récepteur qui se traduit par l'obtention d'un signal de

précession libre (FID). Nous avons alors un graphique du moment magnétique en fonction du temps. Par la suite, ce signal est transformé (Fourier) pour obtenir un spectre de l'absorption en fonction de la fréquence (figure 2.3A).

Puisque le modèle d'étude utilisé pour le présent travail est le liposome et que ses mouvements sont considérés comme étant lents par rapport au temps de la RMN, le signal obtenu est appelé spectre de poudre, caractéristique de la RMN des solides. Le spectre de poudre ainsi obtenu est une superposition de chacune des paires de deutériums similaires le long de la chaîne aliphatique. Il est possible de convertir ce spectre de poudre en un spectre ayant les caractéristiques d'un échantillon orienté, en utilisant un traitement mathématique appelé le "dePaking" (Bloom *et al.* 1981). Au lieu d'un spectre de poudre (figure 2.3, spectre A), nous obtenons alors un doublet pour chacun des deutériums le long de la chaîne aliphatique du phospholipide, comme si l'échantillon était orienté à 90°, ce qui résulte en un spectre de meilleure résolution (figure 2.3, spectre B).

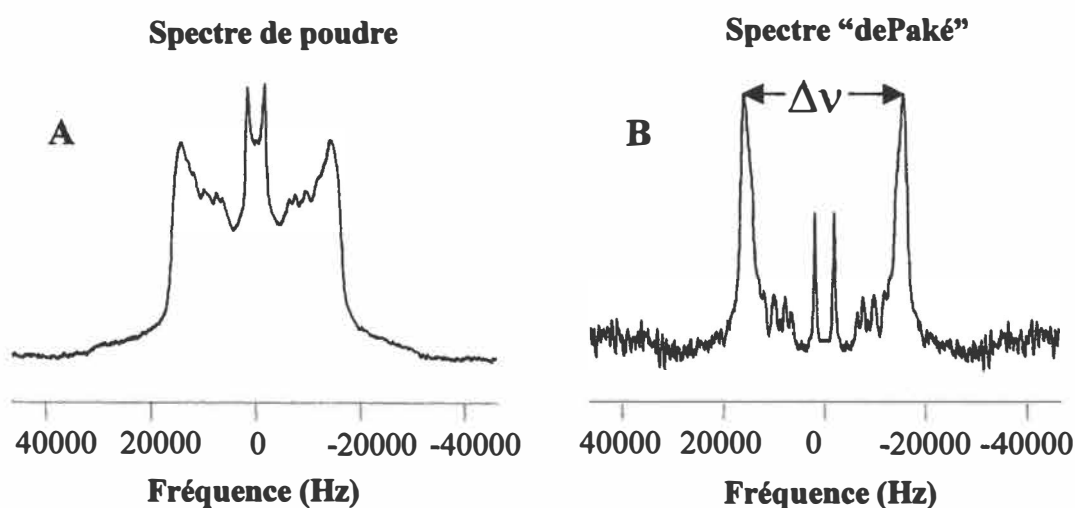


FIGURE 2.3: Spectres RMN- ^2H original (A) et "dePaké" (B) de liposomes de DPPC- d_{31} 20 mg/mL.

Sur le spectre dePaké (figure 2.3B), la différence de fréquence entre deux bandes d'absorption est déterminée ($\Delta\nu$) et cette valeur correspond à l'écart quadripolaire pour un lien C-D de la chaîne aliphatique. Pour cette étude, la valeur de ce paramètre est

déterminée uniquement pour le lien C-D près de la tête polaire (carbone #2 de la chaîne aliphatique ou C2) et pour celui en bout de chaîne (carbone #16 de la chaîne aliphatique ou C16) puisque les autres liens C-D le long de la chaîne aliphatique ne donnent pas un signal assez différent pour les isoler. Sur le spectre de Paké (spectre B), ces deux bandes correspondent respectivement aux bandes externe et interne.

Pour sa part, l'écart quadripolaire ($\Delta\nu$) est directement proportionnel au paramètre d'ordre (S_{cd}) pour le lien C-D:

$$\Delta\nu = (3/4)(e^2qQ/h)S_{cd}$$

où e^2qQ/h est égal à 167 kHz et représente la constante de couplage quadripolaire pour le deutérium dans un lien C-D. La variable "e" étant égale à la charge électrique du noyau de deutérium, les multiples "eq" et "eQ" correspondent respectivement au gradient de champ électrique du deutérium et au moment quadripolaire du deutérium. La constante "h" correspond à la constante de Planck.

La valeur de cet écart quadripolaire est ensuite portée en graphique en fonction de la température et la comparaison de chacune des courbes obtenues pour chacun des mélanges lipidiques utilisés permettra de visualiser l'effet de chacun des stérols et/ou de l'AmB sur l'ordre orientationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC- d_{31} . Il est cependant important de mentionner que dès que la bicouche phospholipidique pure est à l'état liquide-cristallin, la rotation du phospholipide le long de son axe est rapide au temps de la RMN (10^{-5} sec) et l'échantillon montre alors une symétrie axiale. À l'état gel par contre, il n'est pas possible de mesurer ce paramètre puisque le mouvement de rotation (à symétrie axiale) est trop lent par rapport à l'échelle de temps de la RMN. Cependant, si pour une raison quelconque, la présence d'une molécule engendre la formation de nouvelles phases lipidiques, plus fluides que celle du phospholipide seul, il sera alors possible de mesurer ce paramètre pour des températures inférieures à celle de la transition du phospholipide pur.

Un autre paramètre peut être obtenu et suivi par cette technique : le moment second M_2 du spectre (Davis 1983). Ce paramètre donne des informations quant à la distribution des écarts quadripolaires sur le spectre. Le moment second d'un spectre est défini comme suit:

$$M_2 = \frac{4\pi^2}{5} \langle (\Delta\nu)^2 \rangle \quad \text{où } \Delta\nu = \text{valeur d'écart quadripolaire}$$

La valeur du moment second est donc obtenue en multipliant la fréquence par l'intensité pour chacune des fréquences balayées lors de l'enregistrement. Cette intégration se fait par l'utilisation du logiciel appelé "Moment" créé par le groupe de recherche de la professeure Michèle Auger et exécuté dans le logiciel Grams. Cette valeur est ensuite portée en graphique en fonction de la concentration en stérol ou en AmB, selon le cas.

À l'aide de cette technique, nous serons donc en mesure de visualiser si l'AmB augmente ou diminue l'ordre orientationnel des chaînes aliphatiques du phospholipide dans les différents mélanges lipidiques. Cette technique nous permettra en plus de visualiser si l'AmB interagit davantage au niveau de la tête polaire ou en bout de la chaîne hydrophobe du phospholipide.

2.2.3 Technique servant à l'étude des propriétés de l'AmB

2.2.3.1 Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible est une technique de choix pour l'étude de l'AmB puisque comme cette dernière possède un système de doubles liaisons conjuguées, son spectre d'absorption est très caractéristique de son état d'agrégation et de son interaction avec une molécule donnée. Ce spectre d'absorption est situé dans la région spectrale comprise entre 300 et 450 nm. Lorsque l'AmB est sous forme monomère en solution

aqueuse, son spectre (figure 2.4A) est caractérisé par la présence de 4 bandes dont le maximum d'absorption est situé à 348 nm, 365 nm, 385 nm et 409 nm (Barwicz *et al.* 1992, Mazerski *et al.* 1995). Cette dernière bande d'absorption correspond à la bande d'absorption principale de l'AmB (figure 2.4A). Par contre, avec l'augmentation de l'état d'agrégation de l'AmB en solution aqueuse, la bande principale du spectre se situe à 348 nm et à partir de 10^{-5} M en AmB, une nouvelle bande apparaît à 421 nm (figure 2.4B), qui elle, caractérise l'AmB très agrégée en solution (Barwicz *et al.* 1992).

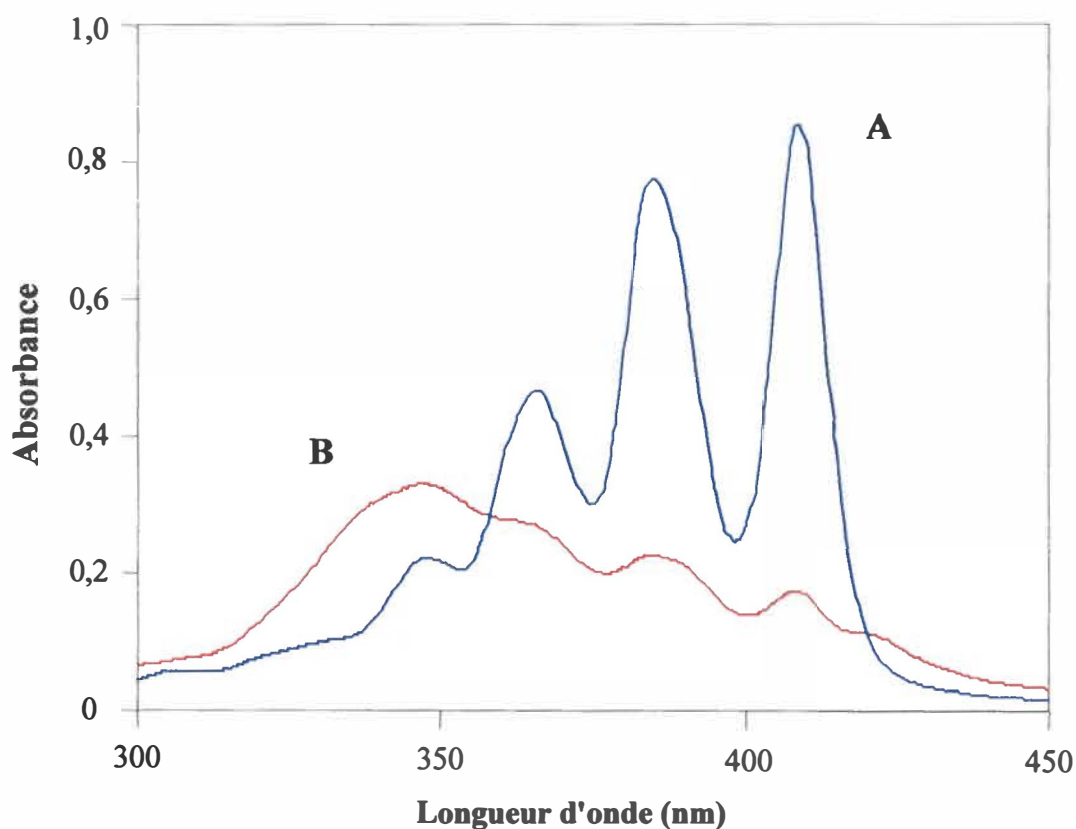


FIGURE 2.4: Spectres UV-visible de l'Amphotéricine B, $6,5 \times 10^{-6}$ M, monomère dans un mélange 40% propanol - 60% eau (A) et agrégée dans l'eau (B) (Barwicz *et al.* 1992).

En présence de lipides, de protéines, de lipoprotéines ou de stérols, la bande d'absorption située à 409 nm disparaît et une autre bande se forme dans la région comprise entre 414 et 416 nm (Barwicz *et al.* 1991). La position de cette nouvelle bande ainsi que l'allure du spectre caractérisent l'interaction de l'AmB avec une molécule

donnée. Ce sera donc en suivant la position de cette bande que l'interaction de l'AmB, envers chacun des mélanges lipidiques utilisés, sera caractérisée. Cette étude permettra donc de confirmer si l'AmB interagit ou non avec chacun des stérols contenus dans la matrice lipidique et de déterminer l'état d'organisation de cet antifongique en milieu lipidique organisé.

2.3 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

2.3.1 Calorimétrie différentielle à balayage

L'appareil utilisé est un calorimètre Hart Scientific Differential Calorimeter (Calorimetry Sciences Corporation, Provo, Utah) et la précision de ce calorimètre atteint 0,025°C. Le taux de chauffe utilisé est de 10°C/h et un balayage de température entre 20°C et 60°C a été effectué (ce qui correspond à l'intervalle de température utilisé pour une préparation liposomale de DPPC).

2.3.2 Spectroscopie FTIR

Le spectromètre IR utilisé est un Spectrum 2000 de marque Perkin-Elmer, CDRH class II. Les fenêtres sont constituées de CaF₂ et l'espaceur choisi est de 50 µm. Le montage est chauffé à l'aide d'une sonde thermique reliée à un contrôleur de température électronique Omega CN3201 de Spectra-Tech. Les spectres sont enregistrés contre le tampon PBS avec une résolution de 2 cm⁻¹ et 100 balayages ont été effectués afin d'augmenter le rapport signal sur bruit. Une correction de la ligne de base est ensuite effectuée à l'aide du logiciel Grams/32, version 5.22 (Galactic Industries Corporation). La position des bandes d'absorption est elle aussi déterminée à l'aide du logiciel Grams mais en utilisant un programme (CEGRA) spécialement créé à cet effet par le groupe du professeur Michel Pézolet du Département de chimie de l'Université Laval. Ce logiciel détermine la position des bandes en utilisant le centre de masse de la bande d'absorption.

2.3.3 Spectroscopie RMN-²H

Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre Bruker ASX-300 (Bruker Canada Ltd., Milton, ON) à une fréquence de 46,05 MHz. Les températures utilisées sont comprises entre 40°C et 65°C avec un intervalle de 5°C. Les spectres ont été enregistrés à l'aide de la séquence d'écho quadripolaire (90x - τ - 90y - τ - acquisition (Davis *et al.* 1976)) pour laquelle un délai entre les impulsions a été fixé à 60 μ s (τ) et le temps de répétition, à 500 ms. La longueur typique d'une impulsion de 90° était de 6 μ s alors que la largeur spectrale était de 250 kHz. Pour chacun des spectres, 24 000 balayages ont été effectués.

2.3.4 Spectroscopie UV-visible

Pour cette étude, le spectromètre utilisé est de marque Spectronic 3000 Array (Milton Roy, NY). La précision de cet appareil est de 0,35 nm. La cuvette utilisée est en quartz et son parcours optique est de 0,1 cm. Les spectres ont été enregistrés à température ambiante.

CHAPITRE III

CARACTÉRISATION DES BICOUCHES LIPIDIQUES PURES DE DPPC

La calorimétrie différentielle à balayage est une technique de pointe pour l'étude des bicouches lipidiques, entre autre dû à sa grande sensibilité. Avant d'étudier l'effet de chacun des stérols sur l'état d'organisation du phospholipide à l'intérieur de la matrice lipidique, en présence ou non de l'AmB, il est important de caractériser le modèle membranaire choisi, en l'occurrence le liposome de DPPC.

3.1 TRANSITIONS DE PHASE DES BICOUCHES DE DPPC

Les transitions de phase lipidiques sont étudiées depuis de nombreuses années par calorimétrie différentielle à balayage. Le signal calorimétrique enregistré dépendra du lipide utilisé, de sa concentration ainsi que du type de vésicule formée. Ces molécules de phospholipides traverseront plusieurs états d'organisation moléculaire (état) en fonction de la température.

La figure 3.1 présente un des thermogrammes obtenus pour les bicouches MLV de DPPC pure à 4 mg/mL où sont illustrées les différents états lipidiques rencontrés. Ce thermogramme correspond à l'enregistrement de transitions endothermiques de premier ordre entre deux états physiques différents de cette membrane.

Sur cette figure, nous pouvons clairement identifier deux transitions de phase pour cette gamme de température, soit la prétransition et la transition principale. La première transition de phase observée, la prétransition, est située aux alentours de 34°C, ce qui est comparable à la valeur trouvée par Meyer *et al.* (1994), 36,3°C. Elle correspond au passage de l'état gel ($L_{\beta'}$) à l'état gel-ondulée ($P_{\beta'}$) et est associée plus particulièrement à une transformation structurale à l'intérieur du groupe choline des têtes polaires. L'état gel-ondulée ($P_{\beta'}$) est identifiée comme étant un état solide-ordonné c'est-à-dire ordonnée autant du point de vue translationnel que conformationnel. Les

molécules de phospholipide dans état se trouvent configurées pratiquement de façon tout-*trans* et décalées les unes des autres afin de maximiser la stabilité de la bicouche, formant ainsi l'ondulation de la bicouche (Rolland *et al.* 1991).

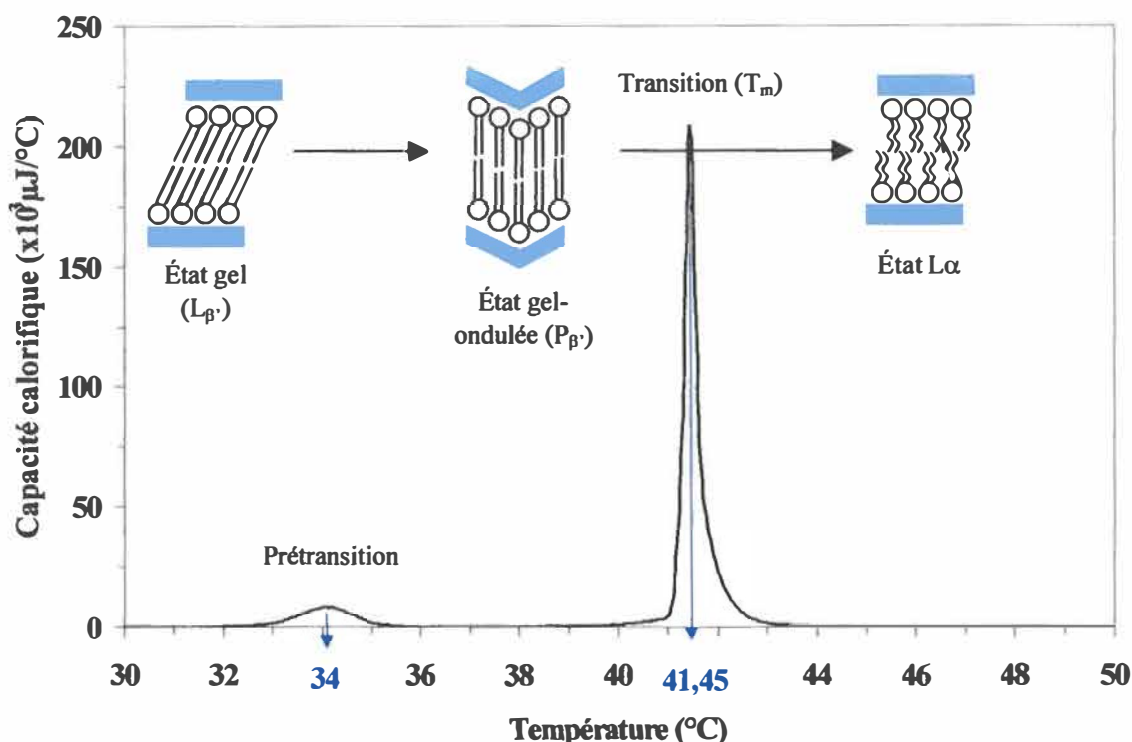


FIGURE 3.1: Thermogramme obtenu pour des bicouches MLV de DPPC 4 mg/mL.

Cependant, il est important ici de mentionner que des études en RMN ont montré qu'à l'intérieur de ces deux états "gel", où tout semble très bien organisé et structuré, il existe une hétérogénéité dans l'organisation latérale des molécules de phospholipide, c'est-à-dire une organisation où les chaînes aliphatiques ne se retrouvent pas entièrement tout-*trans*, dû à la présence de conformères gauches le long de ces chaînes (Davis 1979). Cette observation est compatible avec des résultats observés par spectroscopie Raman qui suggèrent la présence de 1 à 2 conformères gauches par chaîne aliphatique à une température se situant juste en-dessous de la température de transition principale (Yellin et Levin 1977, Gaber *et al.* 1978, Levin et Bush 1981).

En calorimétrie, la transition la plus étudiée et la plus utilisée pour caractériser une bicouche lipidique est la seconde transition de phase, soit la transition principale, puisque qu'elle reflète mieux l'organisation globale des chaînes aliphatiques du phospholipide que la prétransition. Cette transition sera donc celle utilisée pour analyser de façon quantitative tous les résultats de ce présent travail.

Le thermogramme présenté à la figure 3.1 montre une transition principale située à 41,5°C. Cette transition est associée aux changements survenant au niveau des chaînes aliphatiques du phospholipide lors du chauffage et correspond au passage de la bicouche de l'état gel-ondulée ($P_{\beta'}$) à l'état liquide-cristalline (L_{α}). L'état L_{α} est caractérisée par la présence de nombreux conformères gauches le long des chaînes aliphatiques du phospholipide, par un désordre moléculaire plus grand que dans les deux états gel précédents, ainsi que par une augmentation de la diffusion latérale (voir illustrations, figure 3.1). On qualifie donc cet état de liquide-désordonnée, c'est-à-dire désordonnée autant du point de vue de la diffusion latérale que du degré de désordre au niveau des chaînes aliphatiques (conformères gauches). Cette augmentation de la fluidité membranaire, suite à la transition principale, est accompagnée d'un amincissement de l'épaisseur hydrophobe afin de maintenir la plus grande stabilité possible (Sheetz et Chan 1972, Melchior et Morowitz 1972, Blazyk *et al.* 1975). Par exemple, l'épaisseur hydrophobe pour une bicouche de DPPC passe de 39,4 Å à l'état gel à 26,3 Å à l'état liquide cristallin (Zhang *et al.* 1992).

Afin d'analyser de façon plus détaillée la transition de phase principale, trois paramètres thermodynamiques sont utilisés pour caractériser cette transition, soit la température, la largeur à mi-hauteur ainsi que l'enthalpie molaire de la transition ($\Delta\bar{H}$). Les valeurs obtenues pour ces paramètres, moyennes obtenues sur 7 thermogrammes d'échantillons liposomaux différents de DPPC, sont les suivantes : la température de la transition se situe à $41,45 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$, la largeur à mi-hauteur ($\Delta t_{1/2}$) est de $0,34 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$ et l'enthalpie molaire de transition est de $34,2 \pm 2,7 \text{ kJ/mole}$.

Dans le but de comparer les données obtenues pour les bicouches MLV de DPPC, le tableau 3.1 présente une compilation des données tirées de la littérature pour cette matrice lipidique.

TABLEAU 3.1

Température de transition (T_m), largeur à mi-hauteur ($\Delta t_{1/2}$) et enthalpie molaire ($\Delta \bar{H}$) totale obtenues pour la DPPC pure

Source	T_m (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)	($\Delta \bar{H}$) (kJ/mole)
Marbrey <i>et al.</i> 1978	41,4	0,3	
Estep <i>et al.</i> 1978	41,3	0,5	
Finegold <i>et al.</i> 1984	41,4		36,4 +/-0,1
Genz <i>et al.</i> 1986			39,8
Rolland <i>et al.</i> 1991	41,4		
Meyer <i>et al.</i> 1994	41,3		38,5
Harris <i>et al.</i> 1995	42,1	0,4	
McMullen et McElhaney 1995			32,4
Tahir <i>et al.</i> 1999	41,5	0,25	32,6

Par ce tableau, il est possible de constater que les données que nous avons obtenues sont parfaitement comparables à celles retrouvées dans la littérature, autant du point de vue de la température de transition, de la largeur à mi-hauteur que de l'enthalpie molaire de la transition principale.

3.2 ASYMÉTRIE DE LA TRANSITION PRINCIPALE

La figure 3.1 précédemment analysée montrait une asymétrie au niveau de la base de la transition principale, vers les températures supérieures. Cette composante d'asymétrie est causée par le temps de réponse de l'appareil et est généralement soustraite du thermogramme original (McMullen *et al.* 1994, McMullen et McElhaney 1997). Dans d'autres cas, le thermogramme original est présenté sans soustraction de cette composante (Genz *et al.* 1986, Stillwell *et al.* 1996).

Il est donc important, avant d'analyser les résultats concernant les autres mélanges lipidiques utilisés, d'isoler cette composante causant l'asymétrie afin d'interpréter le plus justement possible les données calorimétriques. Pour ce faire, une décomposition a été effectuée sur le thermogramme de la DPPC pure, préalablement présenté à la figure 3.1. Tel que mentionné au chapitre II, cette décomposition a été effectuée à l'aide d'un programme conçu par le professeur Bernard Larue de l'UQTR. La figure 3.2 présente le résultat de cette décomposition .

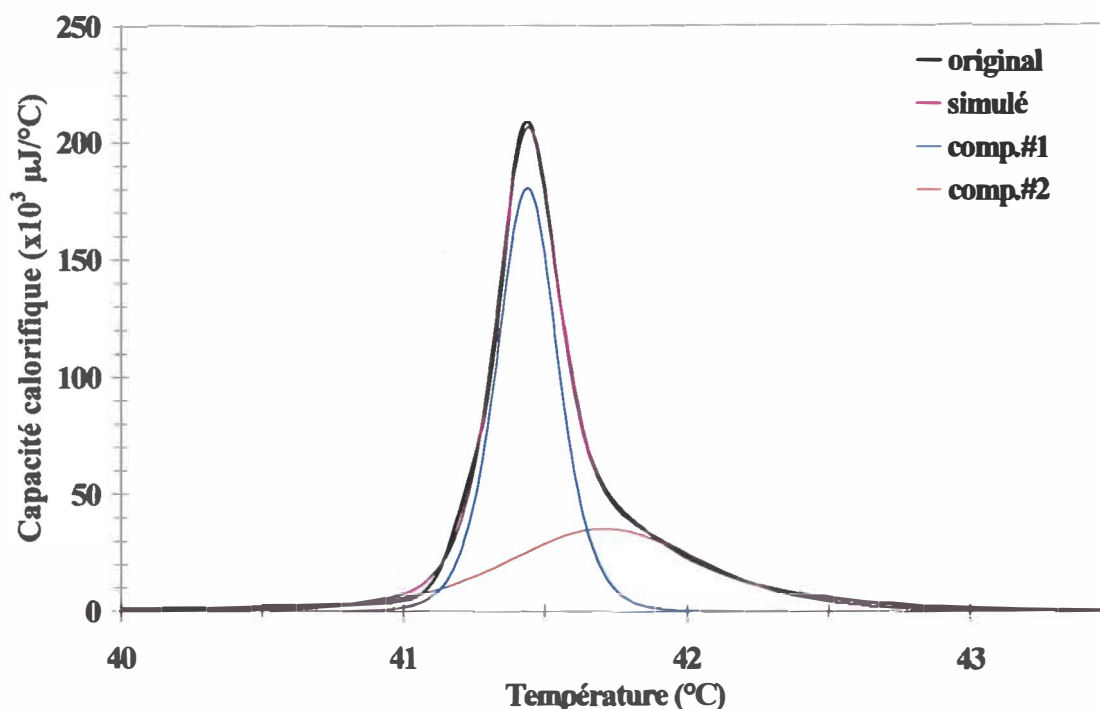


FIGURE 3.2: Résultat de la décomposition du thermogramme obtenu pour des bicouches MLV de DPPC 4 mg/mL.

Cette figure présente dans un premier temps le thermogramme original en noir. Dans un deuxième temps, le résultat de la décomposition montre que deux composantes sont nécessaires pour une simulation optimale du tracé original. Une première composante (tracé bleu), correspond à la transition principale décrite plus tôt dans ce chapitre et la seconde composante (tracé rouge), beaucoup plus large, est située à une température supérieure à celle de la transition principale, lorsque que le balayage est effectué de 20°C à 60°C. Cette dernière composante est la cause de l'asymétrie et correspond donc au signal thermique associé au temps de réponse de l'appareillage. La

somme de ces deux composantes de décomposition donne le signal illustré en fuchsia sur cette figure et montre l'efficacité de la décomposition puisque ce signal se superpose à l'original (noir).

Lorsque le balayage thermique est effectué dans le sens d'un refroidissement, cette composante large de décomposition apparaît à une température inférieure à celle obtenue pour la transition principale. Il est donc évident dans ce cas-ci que la position de cette asymétrie dépend du sens du balayage thermique (chauffant ou refroidissant). Dans ces conditions de balayage, Stillwell *et al.* (1996) ont publié un article dans lequel cette asymétrie au niveau de la transition principale de bicouches de DPPC se présente du côté des températures inférieures à celle de la transition principale démontrant ainsi la dépendance de cette composante sur le sens du balayage thermique. Il est important de mentionner que l'amplitude et la surface de cette composante d'asymétrie sont les mêmes peu importe le sens du balayage thermique (données non-présentées).

Afin de vérifier si le choix du taux de chauffe pouvait aussi influencer le comportement de cette asymétrie, la valeur du taux de chauffe a été variée. Pour l'échantillon liposomal de DPPC pure, les valeurs de taux de chauffe suivantes ont été utilisées : 5°C/h, 10°C/h, 30°C/h et 60°C/h. Tous les balayages ont été effectués un à la suite de l'autre sur le même échantillon afin de vérifier si les autres paramètres thermodynamiques, comme l'enthalpie molaire et la T_m étaient influencés par la variation de la valeur du taux de chauffe. Avant de comparer les différents thermogrammes obtenus, il est important de mentionner que les transitions thermotropiques de la DPPC sont réversibles c'est-à-dire que lorsque l'on refroidit ces bicouches lipidiques, on observe les mêmes transitions thermotropiques, sauf bien sûr exothermiques, aux mêmes températures et caractérisées par un même $\Delta t_{1/2}$ et par une même enthalpie molaire. Il était donc possible d'effectuer une série de balayages (chauffage/refroidissement) sur un même échantillon sans pour autant altérer les propriétés thermotropiques du phospholipide. Les thermogrammes obtenus suite à ces balayages sont présentés à la figure 3.3.

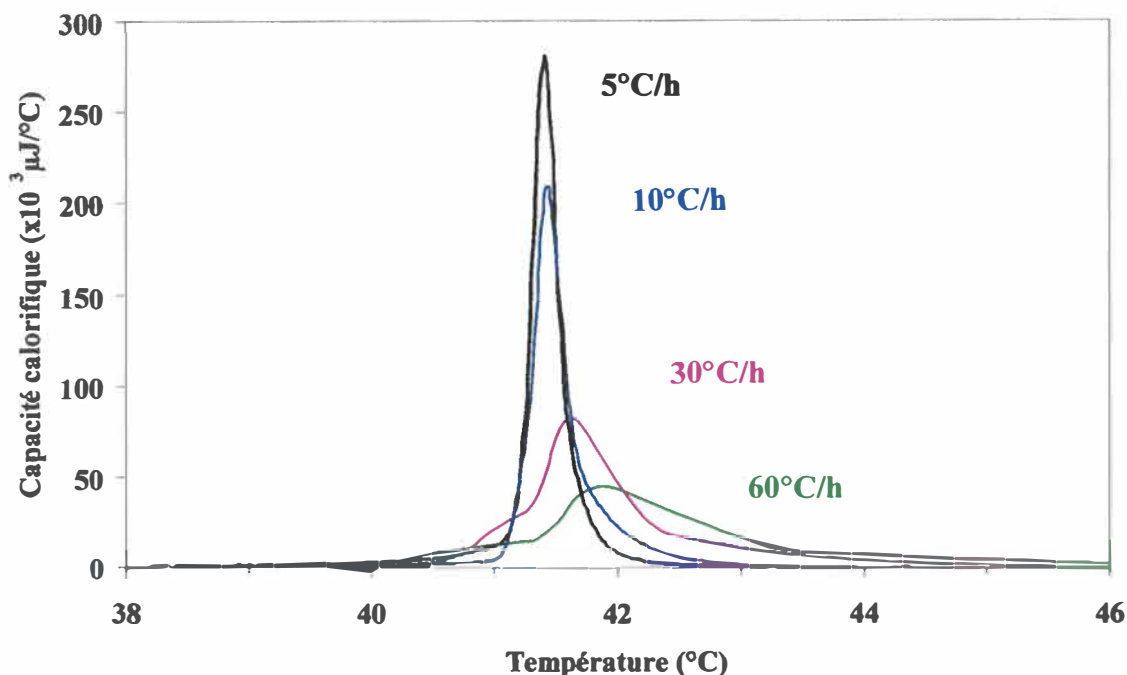


FIGURE 3.3: Thermogrammes obtenus pour un même échantillon liposomal de DPPC 4 mg/mL, en utilisant différents taux de chauffe.

Sur cette figure, il est possible de constater que même pour un taux de chauffe aussi bas que 5°C/h, il y a une asymétrie, du côté des températures supérieures. En effet, avec l'augmentation de la valeur du taux de chauffe, la transition diminue en intensité et se déplace globalement vers des températures supérieures. Cette figure montre en fait que si le taux de chauffe est trop élevé pour l'échantillon analysé, une inhomogénéité thermique survient à l'intérieur de l'échantillon ce que se traduit par la présence d'aberrations thermiques sur le thermogramme enregistré. Cette figure démontre donc que le choix de la valeur du taux de chauffe est très important puisque pour un même échantillon liposomal, il va modifier le thermogramme enregistré, du moins la forme de la transition, sa T_m ainsi que sa $\Delta t_{1/2}$.

Pour sa part, l'aire sous la courbe (ΔH) divisée par le nombre de mole de DPPC, donc l'enthalpie molaire totale de la transition ($\Delta \bar{H}$), demeurera pratiquement inchangée selon le taux de chauffe utilisé. En effet, si un taux de chauffe de 5°C/h est utilisé, la valeur d'enthalpie molaire est de 34,81 kJ/mole, pour 10°C/h cette valeur est de 34,20 kJ/mole, pour 30°C/h on obtient une valeur de 33,79 kJ/mole et finalement, pour un taux

de chauffe de 60°C/h, l'enthalpie molaire est de 32,44 kJ/mole. Ceci indique que toutes les molécules de phospholipides passent à l'état liquide cristallin mais de façon beaucoup moins coopérative puisque la largeur à mi-hauteur augmente avec l'augmentation du taux de chauffe, comme le montre la figure 3.3. L'élargissement du signal calorimétrique observé à la droite de la transition de phase principale, composante isolée à la figure 3.2, est donc, comme nous l'avions pressenti, causé par le temps de réponse de l'appareil lors de l'enregistrement des données brutes et non par la présence d'une nouvelle transition thermotropique.

Il est important de souligner ici que lors de la présente étude, cette asymétrie est observée uniquement pour les échantillons liposomaux purs ou ceux contenant peu de stérol ou d'antifongique, échantillons donc, présentant des transitions étroites. Ces transitions étroites sont hautement coopératives et caractérisent habituellement les transitions principales de bicouches phospholipidiques pures. Si le choix du taux de chauffe ne prend pas en considération ce facteur de temps de réponse de l'appareil, le profil de la transition en sera affecté. En effet, un relevé des articles traitant de la calorimétrie montre que la valeur utilisée pour le taux de chauffe dépendait de l'échantillon analysé. Par exemple, la plupart des lipides purs étudiés (transition étroite donc hautement coopérative) sont enregistrés avec des taux de chauffe de 5°C/h ou 10°C/h (McMullen *et al.* 1993, McMullen et McElhaney 1995). Si par ailleurs une protéine est étudiée par calorimétrie, caractérisée par une transition très large et peu coopérative, les taux de chauffe habituels sont alors de 30°C/h et de 60°C/h (Le Bihan et Gicquaud 1993, Gicquaud 1993, Zhang *et al.* 1992, McElhaney 1986).

Dans un autre ordre d'idée, le groupe de Halstenberg (Halstenberg *et al.* 1998) a étudié l'effet du cholestérol sur la variation du volume et de l'enthalpie des bicouches lipidiques de DMPC. Pour des fractions molaires allant de 0 à 11% en cholestérol, ils ont utilisé un taux de chauffe de 5°C/h alors que pour des fractions molaires de 25% et 43%, ils ont utilisé un taux de chauffe de 60°C/h. Par ailleurs, les articles publiés de McMullen *et al.* (1993, 1994, 1995), de McMullen et McElhaney (1997) et de Vist et Davis (1990) montrent aussi l'utilisation de différentes valeurs de taux de chauffe,

croissantes avec une concentration croissante en cholestérol. Toutes ces observations traduisent encore une fois le fait que plus une transition devient large, soit par la présence d'une quantité accrue de stérol ou par la présence d'une protéine ou encore par un mélange lipidique, la transition observée est moins affectée par le temps de réponse de l'appareil qu'une transition hautement coopérative.

Dans notre cas, il est évident que l'asymétrie observée au niveau de la base de la transition principale est importante et qu'elle vient augmenter le degré de difficulté rencontré au niveau de l'interprétation de la décomposition des thermogrammes. Cependant, comme la composante a été isolée, tous les thermogrammes ont été traités de la même façon c'est-à-dire que la composante d'asymétrie, nécessaire pour une bonne décomposition, est attribuée au temps de réponse de l'appareil affectant la transition hautement coopérative. Lors de la détermination de l'aire pour chacune des transitions de phase lors de la décomposition, l'aire de cette composante parasite est additionnée à celle de la transition coopérative. Le T_m et le $\Delta t_{1/2}$ sont déterminés uniquement sur la transition hautement coopérative puisque la composante parasite n'influence pas la valeur de ces deux derniers paramètres.

Pour ce qui est du taux de chauffe utilisé, nous aurions pu utiliser 5°C/h au lieu de 10°C/h mais l'effet du temps de réponse de l'appareil sur le thermogramme ne s'en trouve qu'amoindri dans le premier cas. Il est à noter que certains auteurs considèrent que le temps de réponse de l'appareil est négligeable avec 5°C/h (McMullen *et al.* 1995). Cependant, d'autres facteurs peuvent influencer le temps de réponse de l'appareillage notamment le volume de l'échantillon (plus le volume est petit, plus l'inhomogénéité de température sera réduite), la géométrie de l'appareil ainsi que la sensibilité de l'appareil lui-même. Dans notre cas, l'utilisation d'un taux de chauffe de 10°C/h est donc un bon compromis entre le temps nécessaire pour chacun des balayages thermiques, soit environ 8 heures par échantillon, et la définition des transitions enregistrées.

CHAPITRE IV

BICOUCHES LIPIDIQUES MIXTES DPPC/STÉROLS

Les bicouches lipidiques contenant du cholestérol sont depuis longtemps étudiées et par conséquent, les résultats retrouvés dans la littérature sont très abondants. L'intérêt scientifique porté aux bicouches contenant l'ergostérol est cependant moindre que celui porté aux bicouches contenant du cholestérol puisque l'ergostérol ne se retrouve pas dans les membranes des cellules de mammifères. Comme l'ergostérol constituerait une des composantes majeures impliquées dans le mécanisme d'action de l'antifongique, nous avons tenu à caractériser les bicouches mixtes DPPC/ergostérol avant d'y incorporer l'antifongique. Les résultats présentés dans ce chapitre, tout comme ceux présentés aux chapitres III et V, serviront donc de contrôles pour les mélanges ternaires, soit ceux contenant à la fois la DPPC, le stérol et l'amphotéricine B, dont les résultats seront présentés aux chapitres VI et VII.

4.1 RÉSULTATS CALORIMÉTRIQUES

La calorimétrie différentielle à balayage est une des techniques amplement utilisées pour caractériser l'effet du cholestérol sur un phospholipide en milieu lipidique organisé. Dans un premier temps, nous analyserons les résultats obtenus pour les bicouches de DPPC contenant du cholestérol et par la suite, nous examinerons l'effet de l'ergostérol sur son environnement lipidique.

4.1.1 Effet du cholestérol sur les bicouches de DPPC

L'incorporation de molécules de cholestérol dans la matrice de DPPC modifie de façon significative le signal calorimétrique, par rapport à celui enregistré pour les bicouches de DPPC seule. Les résultats obtenus pour les bicouches contenant différentes concentrations de cholestérol sont présentés à la figure 4.1. Sur cette figure,

le signal endothermique est illustré en fonction de la température pour la DPPC seule (thermogramme noir), pour celles contenant 12,5% ou 28% en mole de cholestérol (thermogrammes fuchsia et bourgogne respectivement). Pour une meilleure visualisation du signal enregistré pour les bicouches contenant 28% en mole de cholestérol, le thermogramme est présenté à l'aide d'une échelle mieux adaptée, dans l'encart supérieur gauche.

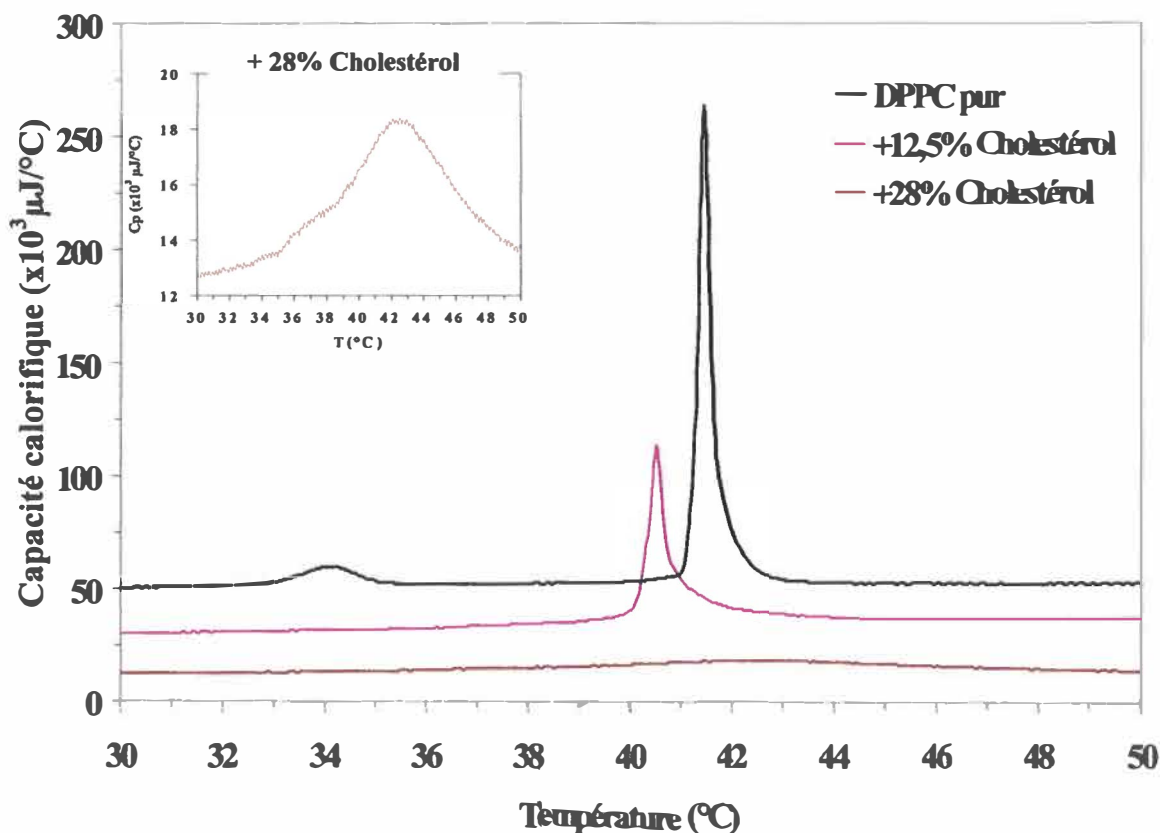


FIGURE 4.1: Thermogrammes obtenus pour les bicouches mixtes DPPC 4 mg/mL contenant du cholestérol. L'encart représente le thermogramme des bicouches de DPPC contenant 28% en mole de cholestérol.

Afin de faciliter l'analyse de la figure 4.1, les thermogrammes seront étudiés en deux sections: la région de température comprenant la prétransition et celle de la transition principale.

a) Prétransition

Sur cette figure, il est possible de constater que la présence de 12,5% en mole de cholestérol fait disparaître la prétransition. Ce comportement est prévisible puisque cette transition est associée principalement à une transformation structurale à l'intérieur du groupe choline des têtes polaires de la DPPC. Les molécules de cholestérol dispersées dans la matrice lipidique agissent comme des "espaceurs" entre les molécules de phospholipides, séparant ainsi les têtes polaires et réduisant leurs interactions spécifiques. La disparition de la prétransition donne des indices quant à la distribution des molécules à l'intérieur de la matrice lipidique : les molécules de stérol ne s'agrègent pas dans la bicouche puisque dans ce cas, il y aurait une séparation de phase et par conséquent, persistance de cette prétransition. Les molécules de stérol sont plutôt distribuées de façon homogène dans la bicouche, nous y reviendrons aux figures 4.3 et 4.4 de la présente section.

Les résultats obtenus pour la prétransition sont cohérents avec ceux retrouvés dans la littérature, où il est rapporté que la prétransition disparaît aux alentours de 5% en mole de cholestérol (Ladbroke 1968, McMullen et McElhaney, 1995). L'article publié de McMullen et McElhaney en 1995 montre aussi que l'enthalpie de cette prétransition diminue avec une augmentation de la concentration en cholestérol jusqu'à 5% et qu'une concentration plus élevée fait disparaître complètement cette prétransition. McMullen *et al.* (1993) ont montré que ce comportement ne dépendait pas de la longueur des chaînes aliphatiques du phospholipide utilisé.

b) Transition principale

La région de température comprenant la transition principale, sur la figure 4.1, montre que le cholestérol a plusieurs effets sur les bicouches de DPPC :

- 1) diminution de la température de transition globale (La température de la DPPC seule est de $41,45 \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ et celle de la DPPC contenant 12,5% en mole de cholestérol est située à $40,52 \pm 0,02^{\circ}\text{C}$);
- 2) élargissement, vers la droite, de la base de la transition de phase principale;
- 3) diminution de l'aire sous la courbe (diminution du ΔH).

Ces effets sur la transition principale sont bien connus dans la littérature. En effet, Ladbroke *et al.* (1968) ont trouvé que l'incorporation de molécules de cholestérol à l'intérieur des bicouches de DPPC causait un élargissement de la transition principale jusqu'à abolition complète de celle-ci à 50% en mole de cholestérol. Ces résultats sont confirmés plus tard par ceux publiés par Marbre *et al.* (1978), par Estep *et al.* (1984) et par Vist et Davis (1990). Par ailleurs, Huang *et al.* (1993) ainsi que McMullen et McElhaney (1995) ont obtenu les mêmes résultats : l'incorporation du cholestérol diminue l'enthalpie totale de la transition ainsi que la température. Pour ce qui est de la coopérativité apparente de cette transition, elle diminue avec l'augmentation de la concentration en cholestérol. Ces auteurs obtiennent donc eux aussi un élargissement de la transition principale. McMullen et McElhaney (1995) expliquent ce comportement par la notion de "mismatch" qui implique que les molécules ayant une longueur hydrophobe plus grande que celle de la bicouche utilisée tendront à stabiliser l'état gel, donc à augmenter la température de transition principale. Par contre, les molécules ayant une longueur hydrophobe plus petite que celle de la bicouche déstabiliseront celle-ci. Puisque la longueur hydrophobe d'une molécule de DPPC à l'état gel est de $19,7\text{\AA}$ (Zhang *et al.* 1992) et que celle du cholestérol est de $17,5\text{\AA}$ (McMullen *et al.* 1993), il y a "mismatch" et la température diminue. McMullen *et al.* (1993) ont de plus démontré qu'une différence aussi petite que $1,25\text{\AA}$ entre la longueur hydrophobe du phospholipide et le cholestérol pouvait induire un "mismatch".

L'élargissement antisymétrique des transitions de phases enregistrées, présentées à la figure 4.1, indique qu'il y a probablement plus d'une transition sous le tracé original. Une analyse plus détaillée des résultats calorimétriques obtenus pour les bicouches contenant du cholestérol nécessite donc l'utilisation d'un logiciel de décomposition. Cette manipulation mathématique a été appliquée sur tous les thermogrammes obtenus

pour les bicouches de DPPC contenant les deux concentrations de cholestérol, soit 12,5% et 28% en mole par rapport au phospholipide. Cependant, afin d'alléger la lecture, seul le résultat de décomposition des thermogrammes des bicouches de DPPC contenant 12,5% en mole de cholestérol sera présenté puisqu'à cette concentration, le tracé calorimétrique est beaucoup mieux défini que celui observé à 28% en mole de cholestérol. En effet, à 28% en mole de cholestérol, le signal enregistré ainsi que le rapport signal sur bruit sont faibles, ce qui rend inefficace la décomposition.

La figure 4.2 présente donc les résultats de la décomposition d'un thermogramme enregistré pour les bicouches de DPPC contenant 12,5% en mole de cholestérol. Sur cette figure, le tracé en noir correspond au thermogramme original ayant subi une correction de la ligne de base, les tracés en bleu, rouge et vert correspondent aux composantes de décomposition simulant de façon optimale le contour du tracé original et le tracé en fuchsia, correspond au tracé résultant de la simulation.

Cette figure montre que trois composantes de décomposition sont nécessaires afin d'effectuer une simulation optimale. Il est important de préciser que le signal illustré en rouge provient du temps de réponse de l'appareil, phénomène discuté au chapitre précédent. Nous obtenons donc deux transitions de phase (composantes en bleue et en vert) et un signal relié au temps de réponse de l'appareil (composante rouge). L'identification de la composante reliée au temps de réponse de l'appareil a été facilitée dans ce cas-ci par les résultats de décomposition publiés par McMullen et McElhaney (1995). Les paramètres qu'ils ont obtenus pour la dernière transition de phase, la plus large, sont les suivants : la transition débute aux alentours de 38°C et se termine aux alentours de 43,5°C. La température de cette transition est de 40,9°C. Les paramètres obtenus pour notre transition de phase la plus large sont respectivement de 37,5°C, 45°C et 41,5°C pour la température initiale, la température de complétion et la température de la transition de phase. Nous pouvons donc facilement attribuer la composante illustrée en rouge au temps de réponse de l'appareillage puisque la 3^{ème} composante correspond tout à fait à la transition de phase observée par McMullen et McElhaney (1995).

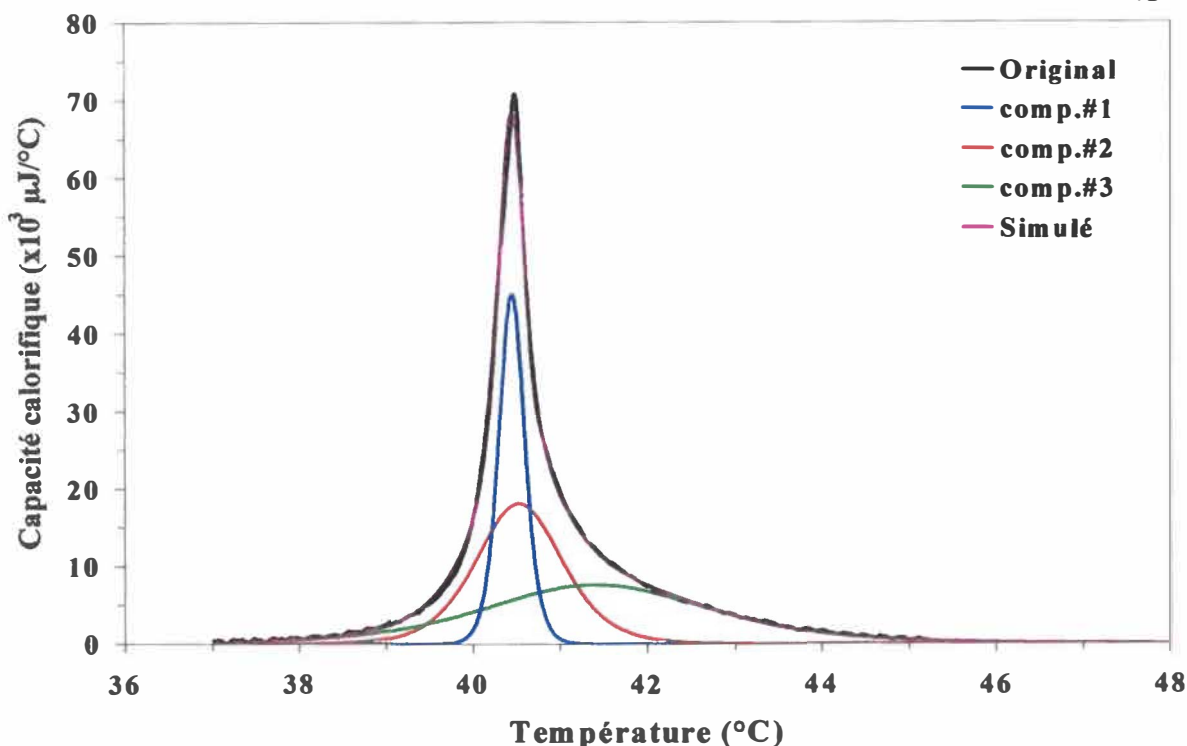


FIGURE 4.2: Composantes de décomposition obtenues pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole de cholestérol.

Puisque le signal relié au temps de réponse de l'appareil est isolé, la décomposition révèle essentiellement deux transitions différentes observées pour les mélanges DPPC/12,5%cholestérol. La première composante, la plus étroite, est illustrée en bleu sur la figure 4.2 et est centrée à 40,5°C. La seconde composante est plus large que la première et est représentée en vert sur la figure 4.2. Elle est centrée à 41,5°C.

Ces deux transitions de phase, mises en valeur par la décomposition, correspondent à deux organisations différentes des molécules de DPPC. L'interprétation majoritairement acceptée jusqu'à maintenant dans la littérature est la suivante: la première transition de phase rencontrée en fonction de la température (tracé bleu) correspond à la transition des molécules de DPPC contenues dans des régions pauvres en cholestérol (régions pratiquement pures en DPPC). Pour sa part, la seconde transition (tracé vert) correspond à la transition des régions phospholipidiques riches en cholestérol (Vist et Davis 1990, McMullen *et al.* 1993, Huang *et al.* 1993).

Afin de mieux comprendre ce qui se passe lors des transitions de phases enregistrées pour une concentration en cholestérol donnée, le diagramme de phase publié par McMullen et McElhaney (1995), présenté à la figure 4.3, sera utilisé. Ce diagramme est à notre avis le plus complet dans la littérature, jusqu'à maintenant, puisque c'est le seul qui est aussi précis quant à la nature des phases participant aux transitions, informations importantes pour l'analyse des résultats. Il est important de mentionner que plusieurs diagrammes de phase sont proposés dans la littérature (Ipsen *et al.* 1989, Vist et Davis 1990, Sankaram et Thompson 1991, Huang *et al.* 1993) et parmi ceux-ci, celui proposé par Vist et Davis (1990) est celui le plus utilisé comme référence dans la littérature. Malgré toutes les contradictions qui existent entre ces différents diagrammes de phase, comme le mentionne récemment McMullen *et al.* (2004), aux concentrations en cholestérol utilisées dans le présent travail, le diagramme de Vist et Davis (1990) est comparable à celui présenté par McMullen et McElhaney (1995) et les quelques différences se situent principalement aux limites de chacune des phases rencontrées, mis à part le point eutectique à 7,5% proposé par Vist et Davis.

Pour les bicouches de DPPC pures, sans cholestérol, le diagramme ci-dessous montre sur l'ordonnée trois transitions de phase, phases identifiées en rouge sur cette figure. La première transition rencontrée est la subtransition (\odot), qui représente le passage de la phase lipidique pure de l'état $L_{C'}$ à l'état $L_{\beta'}$. Il est important de noter que cette transition n'est pas visible sur nos thermogrammes puisque le balayage thermique effectué débute à 20°C et que les thermogrammes présentés dans ce travail montrent le signal enregistré pour les températures allant de 30°C à 50°C. Les deux autres transitions rencontrées, soit la prétransition (\square) ainsi que la transition principale (\diamond), ont été préalablement décrites au chapitre III, ainsi que l'organisation lipidique correspondante.

En présence de cholestérol, d'autres phases sont présentes, dépendamment des concentrations utilisées et sont illustrées en vert et bleu sur la figure 4.3. Afin de faciliter l'interprétation de nos résultats avec ce diagramme de phase, les deux concentrations en cholestérol utilisées par la présente étude, 12,5% et 28% en mole par

cholestérol qui, selon McMullen et McElhaney (1995), correspond au passage des molécules de DPPC de la phase riche en cholestérol de l'état $L_{o\beta}$ (liquide ordonné type-gel) à l'état $L_{o\alpha}$ (liquide ordonné type-liquide-cristallin). La différence existant entre ces deux états lipidiques de la phase riche en cholestérol concerne l'ordre orientationnel des molécules de DPPC. Cette phase, dite L_o (liquide-ordonnée), est constituée de molécules de DPPC qui sont en interaction directe avec les molécules de cholestérol et possèdent à la fois des caractéristiques de l'état gel et de l'état liquide-cristallin du phospholipide pur. En effet, les chaînes aliphatiques des molécules de DPPC dans cette phase ont une liberté de mouvement translationnel, semblable à celle rencontrée en état L_{α} , mais ont un degré de liberté conformationnel moins élevé que dans cet état.

Une seconde transition de phase, plus étroite, apparaît avant même que la transition large soit terminée. Elle est illustrée à l'aide des marqueurs " \diamond " sur le diagramme de phase et est associée à la transition de phase de régions pauvres en cholestérol, régions pratiquement pures en DPPC. Cependant, à la différence de la transition principale de la DPPC pure, ce ne sont pas les phases lipidiques pures en DPPC dans l'état $L_{\beta'}$ et $P_{\beta'}$ qui passent à l'état plus liquide mais une nouvelle phase (L_{β}), phase lipidique qui a perdu son aspect ondulatoire par la présence de molécules de cholestérol dans la bicouche.

Les données recueillies sur ce diagramme de phase, pour 11% en mole de cholestérol, sont compatibles avec les résultats de la décomposition présentés plus tôt à la figure 4.2. En effet, la température de transition de la phase pauvre en cholestérol est, selon McMullen et McElhaney (1995), située aux alentours de 40,2°C ce qui est fort comparable avec la température de la composante étroite que nous avons obtenue, qui est de 40,5°C (figure 4.2). Pour ce qui est de la seconde transition de phase, la plus large, le diagramme montre qu'elle débute aux alentours de 38°C et se termine vers 45°C. Ces données correspondent tout à fait à la composante large de décomposition présentée à la figure 4.2.

En augmentant la concentration en cholestérol à 28% en mole par rapport au DPPC (22% sur le diagramme de phase à la figure 4.3), le diagramme de McMullen et McElhaney (1995) montre une seule transition, débutant aux alentours de 34°C et se terminant aux environs de 54°C. Cette transition de phase est reliée aux régions lipidiques riches en cholestérol ou phase $L_{\alpha\beta}$. Elle correspond tout à fait au thermogramme présenté à la figure 4.1 dans l'encart supérieur gauche sur lequel la transition enregistrée débute aux alentours de 32°C et se termine à une température supérieure à 50°C avec un sommet situé aux alentours de 42,3°C. Il est intéressant de noter que cette dernière valeur est située à une température supérieure à celle de la DPPC pure reflétant probablement l'effet ordonnant du cholestérol sur son environnement lipidique, effet induit par la diminution du nombre de conformères gauches normalement présents le long des chaînes aliphatiques de la DPPC (Davies *et al.* 1990, Senak *et al.* 1992, McMullen *et al.* 1994).

Pour 28% en mole de cholestérol, une seule transition de phase est enregistrée. McMullen et McElhaney proposent donc, par ce diagramme de phase, qu'au-delà de 20% en mole de cholestérol, il n'existe plus de régions lipidiques pauvres en cholestérol. Genz *et al.* (1986) ont proposé qu'aux environs de 20% en mole de cholestérol, les régions dites 'riches' en cholestérol devenaient soudainement connectées formant ainsi un réseau de cholestérol à travers toute la matrice lipidique. Ce serait donc pour cette raison qu'à partir de 20% en mole de cholestérol, il n'existerait pratiquement plus de phases "pures" en DPPC, donc pratiquement plus de molécules de DPPC non-touchées directement par le cholestérol.

Afin de mieux comprendre et visualiser la répartition physique de ces deux phases lipidiques, c'est-à-dire les phases pauvre et riche en cholestérol, Miao *et al.* (2002) ont publié récemment une représentation modélisée d'une matrice lipidique théorique obtenue par simulation Monte Carlo. La figure 4.4 montre, en A, une section de la matrice pour un mélange lipide-cholestérol dont la fraction molaire du cholestérol est de 0,367. En B, cette même figure montre les molécules de DPPC en contact avec les molécules de cholestérol, présentes en A.

Sur la figure 4.4B, un agrandissement est effectué afin de visualiser chacune des molécules impliquées dans un arrangement moléculaire précis du cholestérol. Seul cet encart sera utilisé pour l'analyse suivante puisque les deux autres parties de la figure, soit les sections A et B, ne servent qu'à situer dans la matrice ces molécules de cholestérol. Sur cet agrandissement, il est possible de visualiser ce que les auteurs appellent une "boîte" de cholestérol ou ce qui est normalement appelé "domaine" de cholestérol. Sur cet encart, les molécules de cholestérol sont représentées par des croix et les molécules de phospholipides, par des cercles. Les cercles ouverts correspondent aux rares molécules de phospholipides retrouvées dans un état désordonné (L_α) et les cercles pleins, aux molécules de phospholipides dans un état ordonné par les molécules de cholestérol adjacentes ($L_{o\alpha}$) selon McMullen et McElhaney (1995).

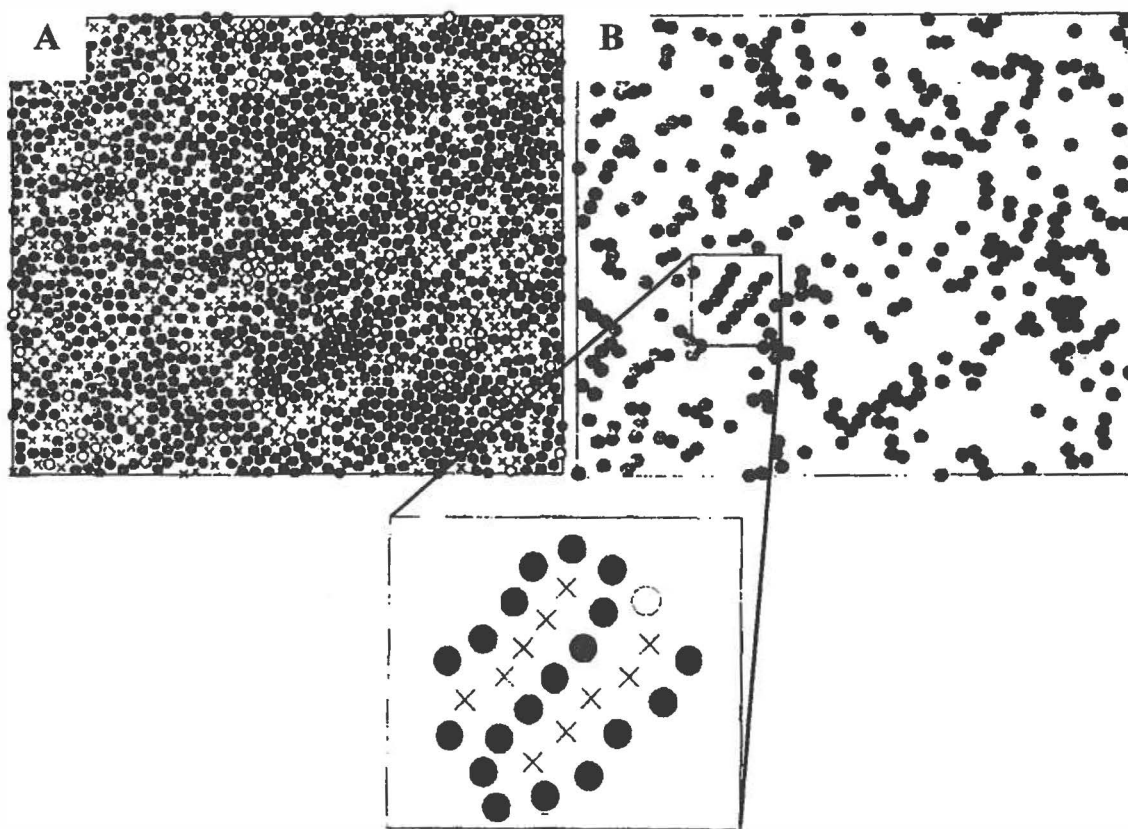


FIGURE 4.4: Représentations d'une section d'une matrice lipidique contenant 36,7% de cholestérol. A: vue générale, B: molécules de DPPC en contact avec le cholestérol. Agrandissement: \times = cholestérol, \circ = lipide en L_α et \bullet = lipides en $L_{o\alpha}$ (Miao *et al.* 2002).

Grâce à cette figure, il est plus facile de comprendre ce que représente, du point de vue moléculaire, la phase pauvre et la phase riche en cholestérol. La phase pauvre correspond donc à toutes les molécules de DPPC n'interagissant pas directement avec les molécules de cholestérol et la phase riche, à celles qui sont impliquées directement dans une interaction avec ce stérol.

En résumé, les résultats présentés dans cette section montrent que le cholestérol fait disparaître la prétransition et diminuer la température, la coopérativité de même que l'enthalpie de la transition principale de la DPPC. Les molécules de cholestérol influencent donc globalement la matrice lipidique en s'insérant entre les molécules de DPPC de sorte que les interactions prévalant entre les molécules de DPPC s'en trouvent affectées. De plus, deux phases, d'ordre différent, sont présentes pour la concentration de 12,5% en mole de cholestérol utilisée: une phase pauvre et une phase riche en cholestérol. Par contre, à 28% en mole de cholestérol, une seule phase est présente, soit la phase riche en cholestérol.

4.1.2 Effet de l'ergostérol sur les bicouches de DPPC

Comme il a été mentionné auparavant, l'effet de l'ergostérol sur les bicouches lipidiques n'est pas documenté dans la littérature scientifique. Nous avons donc analysé et publié pour la première fois les résultats calorimétriques présentés dans cette section en 1998 (Fournier *et al.* 1998). La figure 4.5 présente les thermogrammes obtenus pour les bicouches de DPPC seule (tracé noir) et ceux obtenus pour les bicouches de DPPC contenant 12,5% et 28% en mole d'ergostérol par rapport au DPPC (tracés bleu royal et bleu marin).

Cette figure montre dans un premier temps que l'augmentation de la concentration en ergostérol fait disparaître la prétransition. Au niveau de la transition principale, la présence d'ergostérol diminue la température de transition, augmente légèrement la largeur à mi-hauteur, donc diminue la coopérativité, et de plus, diminue

l'enthalpie totale de la transition. En comparant ces résultats à la figure 4.1, nous pouvons voir que les thermogrammes obtenus pour les mélanges contenant l'ergostérol sont pratiquement identiques à ceux obtenus pour les mélanges DPPC/cholestérol.

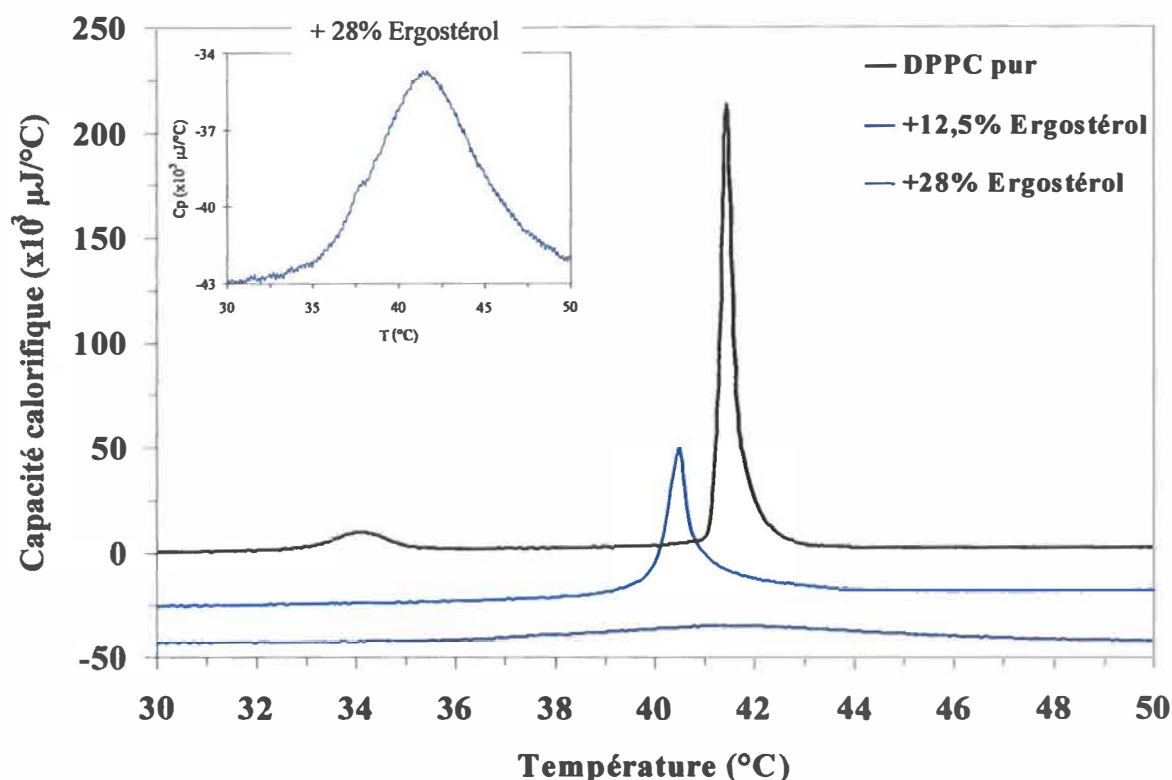


FIGURE 4.5: Thermogrammes obtenus pour les bicouches mixtes de DPPC 4 mg/mL contenant de l'ergostérol. L'encart représente le thermogramme des bicouches de DPPC contenant 28% en mole d'ergostérol.

Puisqu'il y a une asymétrie apparente dans le tracé original du thermogramme pour la concentration en ergostérol de 12,5% en mole, nous avons effectué une décomposition de tous les thermogrammes obtenus pour chacune des concentrations en ergostérol et ce, dans le but de bien définir la région de la transition de phase principale. De plus, afin de faciliter la lecture du texte, seul le résultat de décomposition obtenu pour le mélange DPPC/12.5% en mole d'ergostérol sera présenté sur la figure 4.6. Sur cette figure, le thermogramme en noir correspond au signal original ayant été corrigé pour la ligne de base, les tracés en bleu, rouge et vert correspondent aux composantes de

décomposition obtenues et celui en fuchsia, au tracé résultant simulant de façon optimale le tracé original.

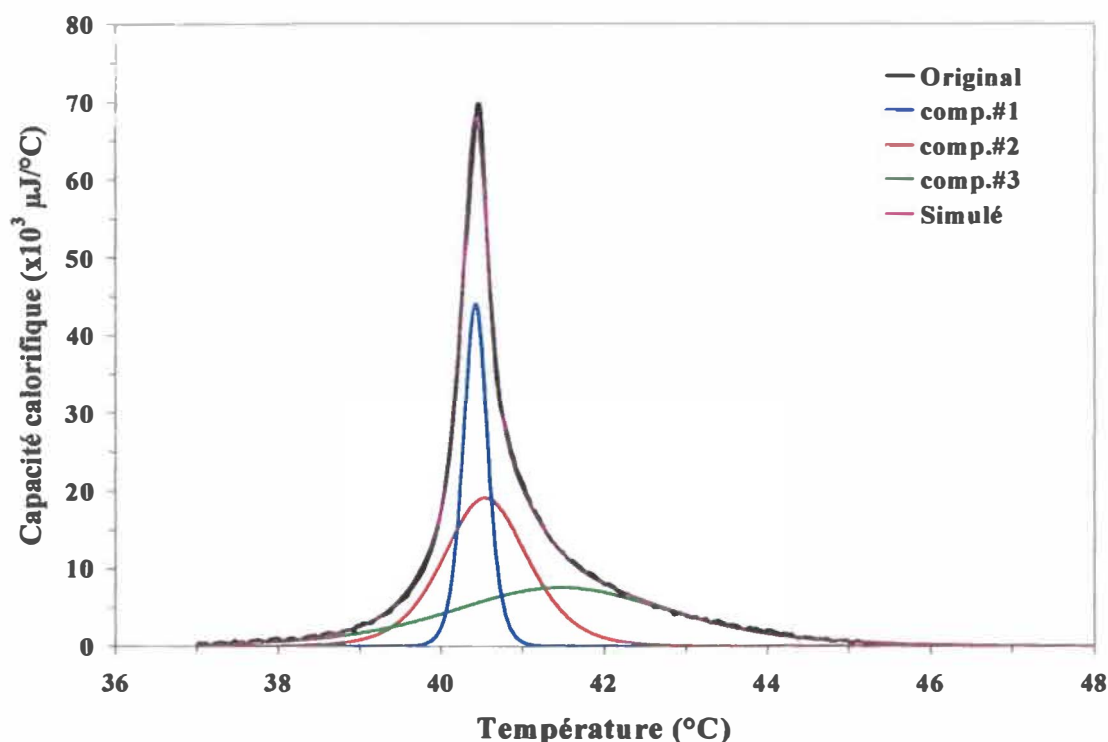


FIGURE 4.6 : Composantes de décomposition obtenues pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol.

Cette figure montre que, pour obtenir une simulation optimale du thermogramme original, trois composantes sont nécessaires: une première, tracée en rouge, qui est associé au temps de réponse de l'appareil et deux autres, une étroite (bleu) et une plus large (vert), qui correspondent à deux transitions thermotropiques.

Puisque ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour les bicouches contenant le cholestérol (figure 4.2), nous avons comparé la valeur des paramètres thermodynamiques de ces deux transitions avec celles obtenues pour les bicouches contenant le cholestérol. Cette comparaison est présentée au tableau 4.1 suivant.

TABLEAU 4.1

Comparaison des valeurs de la température de transition et de la largeur à mi-hauteur pour les mélanges lipidiques contenant les stérols.

Paramètres thermodynamiques		DPPC/12,5%Cholestérol	DPPC/12,5%Ergostérol
Température (°C)	Signal étroit	40,5 ± 0,1	40,5 ± 0,1
	Signal large	41,5 ± 0,1	41,5 ± 0,3
Largeur à mi-hauteur (°C)	Signal étroit	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
	Signal large	3,0 ± 0,7	3,3 ± 0,2

Ce tableau montre une grande similitude existant entre la valeur des différents paramètres obtenus pour la DPPC en présence de 12,5% en mole de cholestérol ou d'ergostérol et par conséquent, entre le thermogramme obtenu pour les bicouches de DPPC contenant ces stérols. Pour une concentration de 12,5% en mole d'ergostérol, les deux composantes de décomposition obtenues peuvent donc être associées respectivement à des régions lipidiques pauvres et riches en ergostérol, comme ce qui était le cas pour les bicouches de DPPC contenant le cholestérol. Il est important de mentionner que cette grande similitude entre les thermogrammes est aussi présente pour l'autre concentration utilisée en stérol, soit 28% en mole.

À la suite de cette comparaison des données calorimétriques, il est possible de conclure que les phases présentes dans ces deux mélanges lipidiques sont très similaires et par conséquent, le diagramme de phase éventuel du mélange DPPC/ergostérol devrait aussi être très similaire à celui des bicouches de DPPC contenant le cholestérol.

4.1.3 Effet de chacun des stérols sur l'enthalpie de transition

En plus des valeurs de température et de largeur à mi-hauteur, un troisième paramètre peut être utilisé pour caractériser la transition principale de chacun des deux

mélanges DPPC/stérol utilisés: l'enthalpie molaire totale de transition. La section précédente a montré qu'à la fois les valeurs de température de transition et de largeur à mi-hauteur étaient pratiquement identiques pour les deux bicouches phospholipidiques, contenant chacun des stérols. Les valeurs d'enthalpie molaire totale ($\Delta \bar{H}$) du thermogramme, c'est-à-dire l'aire totale sous la courbe avant décomposition divisée par le nombre de moles de DPPC, semblent toutefois varier. Le tableau 4.2 présente les valeurs obtenues pour ce paramètre en fonction de la concentration en stérol :

TABLEAU 4.2

Variation de l'enthalpie molaire totale en fonction de la concentration en stérol.

Concentration stérol	$\Delta \bar{H}_{\text{Cholestérol}} \text{ (kJ/mole)}$	$\Delta \bar{H}_{\text{Ergostérol}} \text{ (kJ/mole)}$
12,5%	$20,9 \pm 1,2$	$25,5 \pm 0,5$
28%	$10,3 \pm 0,2$	$15,8 \pm 1,6$

($\Delta \bar{H}_{\text{DPPC}}$: $34,1 \pm 1,5 \text{ kJ/mole}$)

Ce tableau montre que l'augmentation de la concentration en stérol différencie l'effet de chacun des stérols sur son environnement lipidique. En effet, la présence de chacun des deux stérols diminue la valeur d'enthalpie molaire totale mais cette diminution est moindre lorsque l'ergostérol est utilisé. En premier lieu, la diminution de l'enthalpie molaire totale en fonction de la concentration en stérols reflète directement la réduction de l'enthalpie totale de la transition (aire sous la courbe) puisque le nombre de moles de DPPC est le même dans chacun des échantillons. Cette variation de l'enthalpie totale engendrée par les molécules de stérol signifie que l'énergie nécessaire à l'accomplissement de la transition de phase est moindre que celle requise pour effectuer la transition du phospholipide pur (Marichal *et al.* 1990). Cette diminution de l'enthalpie molaire totale peut être expliquée de deux façons: elle peut soit provenir de la diminution des interactions de Van der Waals existant entre les molécules de phospholipides, engendrée par la présence de molécules de stérol, et/ou par la diminution du nombre de molécules de phospholipides participant à la transition de la

phase pauvre en stérol. Dans ce dernier cas, plus la concentration en stérol est augmentée, plus il y a enrichissement de la phase riche en stérol. Par conséquent, les molécules de DPPC qui passent d'une phase à l'autre, qui sont caractérisées par des valeurs d'enthalpie molaire bien particulières, feront varier l'enthalpie molaire totale du processus thermodynamique et ce, fort probablement de façon différente selon le stérol utilisé.

En second lieu, la différence enregistrée entre les valeurs d'enthalpie molaire totale pour les mélanges contenant le cholestérol et ceux contenant l'ergostérol peut être expliquée par la structure plus plane de la molécule d'ergostérol, provenant de sa double liaison supplémentaire sur le cycle B (chapitre I). Le cholestérol engendrerait donc une plus grande déstabilisation de la bicouche phospholipidique ou une plus grande fluidité que l'ergostérol. L'article publié de Marichal *et al.* (1990) fournit des valeurs d'énergies d'interaction intermoléculaires calculées par simulation moléculaire qui appuient tout à fait l'interprétation ci-haut mentionnée. En effet, l'énergie d'interaction trouvée entre les molécules de DPPC est de $-54,3$ kJ/mole, celle correspondant aux liaisons DPPC/cholestérol de $-58,9$ kJ/mole et celle entre les molécules de DPPC/ergostérol de $-66,9$ kJ/mole. De par ces données, l'interaction DPPC/ergostérol serait plus forte que celle existant entre la DPPC et le cholestérol et que celle entre les molécules de DPPC elles-mêmes.

Cette différence d'enthalpie totale de transition observée entre les thermogrammes des mélanges contenant le cholestérol et ceux contenant l'ergostérol est compatible avec les résultats publiés de Endress *et al.* (2002). Des données obtenues par RMN- ^2H montrent, pour des bicouches de DPPC- d_{62} contenant 40% en mole d'ergostérol, un spectre montrant un caractère liquide (phase lipidique avec symétrie axiale, possiblement reliée à la phase $L_{\alpha\beta}$) induit par la présence des molécules d'ergostérol ainsi qu'un caractère solide (type gel, sans symétrie axiale, possiblement reliée à des phases "pures" en DPPC), pour une température de 20°C . Les bicouches contenant 40% en mole de cholestérol au contraire montrent uniquement un signal spectroscopique typique de la phase $L_{\alpha\beta}$. Ces expériences montrent donc qu'à 20°C ,

l'ergostérol affecte une quantité moindre de molécules de DPPC que le cholestérol, puisqu'il existe toujours à cette température une phase lipidique "pure" en DPPC. Ces résultats pourraient aussi contribuer à expliquer le fait que l'ergostérol diminue moins l'enthalpie totale du processus thermodynamique que le cholestérol (tableau 4.2), puisqu'une quantité moindre de molécules de DPPC sont touchées par l'ergostérol, à 20°C (Endress *et al.* 2002).

En conclusion de ce sous-chapitre, il semble qu'aux concentrations de stérol utilisées, soit 12,5% et 28% en mole, les thermogrammes enregistrés pour les mélanges contenant le cholestérol ou l'ergostérol montrent une grande similitude. Cependant, les données d'enthalpie molaire totale ont montré quelques différences entre les bicouches contenant chacun de ces deux stérols ce qui laisse croire qu'il y aurait une différence entre l'effet du cholestérol et celui de l'ergostérol sur l'environnement lipidique global, probablement relié à la structure plus plane de l'ergostérol par rapport à celle du cholestérol.

4.2 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE FTIR

Les mélanges lipidiques utilisés pour l'étude calorimétrique, présentée dans la section précédente, ont aussi été analysés par spectroscopie FTIR. Rappelons que cette technique donne des informations complémentaires à celles fournies par calorimétrie concernant les chaînes aliphatiques de la DPPC. La figure 4.7 montre les différentes courbes de fusion, obtenues en mettant en graphique le nombre d'onde de la bande de vibration d'élongation symétrique des groupements CH₂ en fonction de la température, pour les bicouches de DPPC seule (noir), pour les bicouches contenant les différentes concentrations de cholestérol (rose) et pour celles contenant l'ergostérol (bleu).

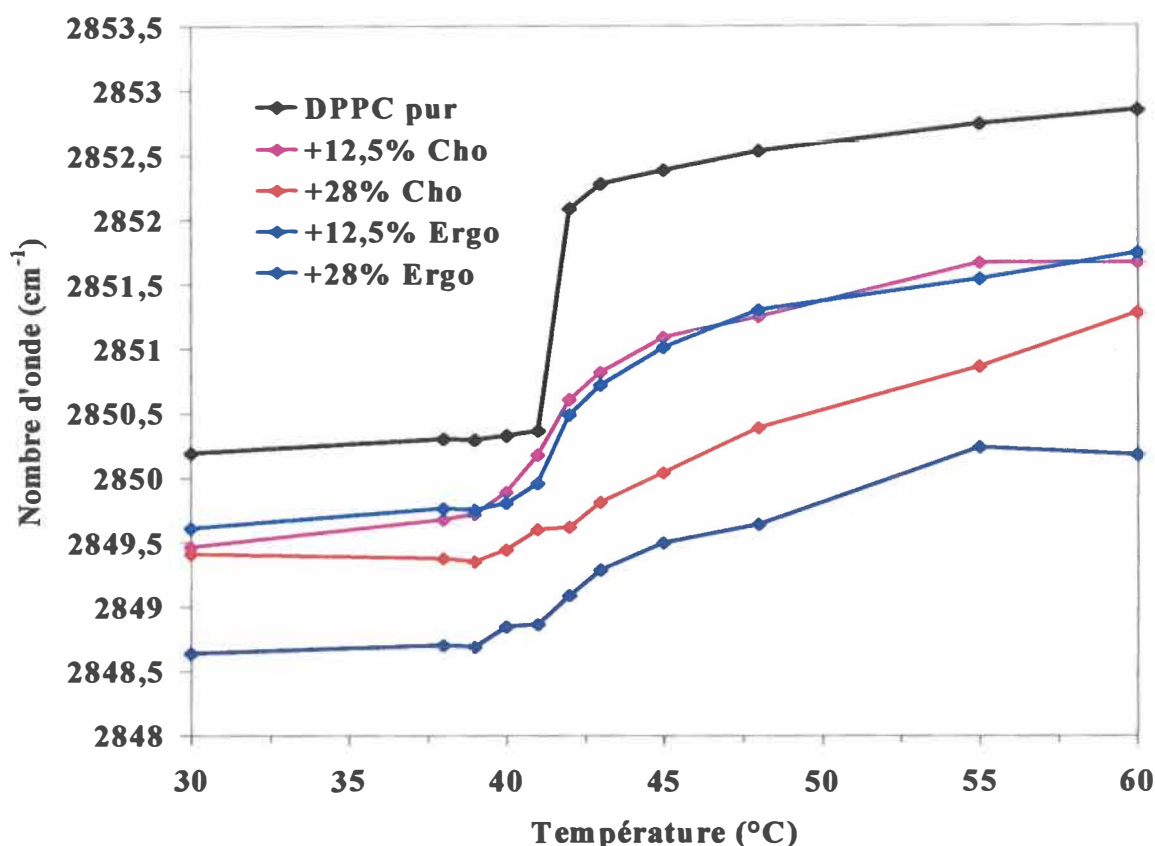


FIGURE 4.7: Courbes de fusion obtenues pour la bande de vibration d'élongation symétrique du groupement CH_2 des mélanges DPPC 4 mg/mL contenant soit du cholestérol ou de l'ergostérol (écart-type moyen de $\pm 0,12 \text{ cm}^{-1}$).

Cette figure présente tout d'abord la courbe de fusion obtenue pour le phospholipide pur (courbe noire). Elle représente une courbe de fusion typique pour une bicouche phospholipidique c'est-à-dire que l'on y retrouve à la fois la fréquence de vibration de l'état gel, celle de l'état liquide-cristallin ainsi que la transition de phase. À l'état gel, la bande de vibration d'élongation symétrique des groupements CH_2 obtenue est située à $2850,2 \text{ cm}^{-1}$. Lorsque cette bicouche est chauffée, la courbe de fusion présente, à $41,5^\circ\text{C}$, une brusque augmentation du nombre d'onde de cette bande de vibration, augmentation qui est associée à une transition de phase. L'atteinte d'un plateau aux environs de $2852,7 \text{ cm}^{-1}$ reflète l'atteinte de l'état L_α . Cette brusque augmentation de la fréquence correspond principalement à une augmentation du nombre de conformères gauches dans les chaînes aliphatiques du phospholipide avec le

chauffage, mais il est possible aussi que la diminution du couplage interchaîne ainsi que l'augmentation de la mobilité librotorsionnelle interviennent dans ce changement de fréquence (Kodati *et al.* 1994).

La température de transition observée par spectroscopie FTIR est donc comparable à celle enregistrée par DSC, qui est de $41,45 \pm 0,05^\circ\text{C}$ (chapitre III). À ce sujet, les informations contenues dans la littérature montrent des résultats tout à fait comparables pour la DPPC (Asher et Levin 1977, Inoue *et al.* 2001, Toyran et Severcan 2003). De plus, l'augmentation du nombre d'onde entre l'état gel et liquide-cristallin est de l'ordre de $3,5\text{ cm}^{-1}$ (Cameron *et al.* 1980), de $2,5\text{ cm}^{-1}$ (Casal *et al.* 1984) et d'environ 3 cm^{-1} (Senak *et al.* 1992) alors que l'augmentation enregistrée par la présente étude est de l'ordre de $2,5\text{ cm}^{-1}$, ce qui est fort comparable.

La figure 4.7 montre par la suite que lorsque l'un ou l'autre des stérols est présent dans la bicouche phospholipidique, les courbes de fusion pour ces mélanges montrent des transitions de phase élargies par rapport à celle observée pour la DPPC seule et ce, d'autant plus que la concentration en stérol augmente. Cet élargissement de la transition de phase coïncide parfaitement avec l'augmentation de la largeur à mi-hauteur observée par calorimétrie, reflétant ainsi la diminution de la coopérativité de cette transition.

Aux concentrations de 12,5% et de 28% en mole de stérol, la figure 4.7 montre que chacun des stérols diminue le nombre d'onde de la bande de vibration d'élongation du groupement CH_2 , aussi bien en-dessous qu'au-dessus de la transition de phase principale. Cette augmentation est de plus fonction de la concentration en stérol. Pour une concentration de 12,5% en mole de stérol, il n'existe pas de différence entre les deux stérols, tout comme en DSC. Par contre, à 28% en mole, l'ergostérol diminue de façon plus importante le nombre d'onde enregistré, d'environ 1 cm^{-1} , par rapport au cholestérol. Ce résultat peut être relié aux données calorimétriques précédemment présentées où l'enthalpie totale de la transition pour les bicouches contenant l'ergostérol est plus élevée que l'enthalpie totale des bicouches contenant le cholestérol (tableau 4.2).

Le fait que l'ergostérol diminue davantage le nombre d'onde enregistrée que le cholestérol a aussi été relevé par le groupe de Urbina *et al.* (1995), par des mesures de RMN- ^2H sur les bicouches de DMPC ou de DPPC. Ils obtiennent que l'ergostérol ordonne plus le phospholipide que le cholestérol. Ils ont aussi montré qu'à 30% en mole de stérol, à 25°C, l'ergostérol ordonne davantage que le cholestérol dans des bicouches de DMPC mais l'inverse est obtenu pour des bicouches de POPC. Ce résultat montre que l'interaction entre les stérols et les phospholipides est complexe et qu'elle dépend de la structure du stérol ainsi que du type de lipide utilisé.

Le fait que l'ergostérol (à 28% en mole) diminue de façon plus importante la valeur du nombre d'onde de la DPPC que le cholestérol peut s'expliquer entre autre par la structure davantage plane de l'ergostérol par rapport à la molécule de cholestérol. Dans ce cas, l'ergostérol réduirait davantage le nombre de conformères gauches des chaînes aliphatiques que ne le fait le cholestérol. De plus, puisque la longueur hydrophobe effective de l'ergostérol est plus élevée que celle du cholestérol, en raison de la double liaison sur la chaîne latérale, l'effet engendré sur les chaînes aliphatiques du phospholipide pourrait être différent. Par ailleurs, Urbina *et al.* (1995), ont démontré par spectroscopie RMN (^2H , ^{13}C et ^{31}P) que l'ergostérol est plus efficace que le cholestérol ou le lanostérol pour structurer la DPPC. En utilisant les résultats publiés de Kodati *et al.* (1994) concernant l'hexadécane, l'ergostérol pourrait aussi diminuer davantage la mobilité librotorsionnelle des molécules de DPPC que le cholestérol, ce qui aurait comme conséquence une diminution du nombre d'onde.

L'accroissement de l'ordre conformationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC engendré par les molécules de cholestérol, illustré à la figure 4.7 dans la région subséquente à la transition de phase, correspond tout à fait au comportement relaté dans la littérature (Smondyrev et Berkowitz 1999, Mantsch et McElhaney 1991, McMullen *et al.* 1994). Davies *et al.* (1990) ont démontré que le cholestérol empêchait la formation de conformères gauches au-dessus de la température de transition du phospholipide pur, par un facteur d'environ 5 fois. De plus, l'augmentation de l'ordre conformationnel au-dessus de la transition de phase en fonction de la concentration en cholestérol est

prévisible puisque plus la concentration en cholestérol est augmentée, plus il y a un enrichissement de la phase L_o , caractérisée par une grande mobilité translationnelle mais aussi par un ordre accru au niveau conformationnel, par rapport aux molécules de DPPC retrouvées dans une matrice phospholipidique pur en phase L_α .

Pour les bicouches contenant l'ergostérol, aucune donnée dans la littérature nous permet d'effectuer une comparaison; cependant, compte tenu de la grande similarité des résultats calorimétriques présentés dans la section précédente, il est fort probable que l'interprétation donnée ci-dessus pour les bicouches contenant le cholestérol s'applique aussi à celle contenant l'ergostérol.

Quant à la région située en-dessous de la transition de phase globale, le fait que la présence de l'un ou l'autre des stérols dans la matrice lipidique semble engendrer aussi une augmentation de l'ordre conformationnel sur les chaînes aliphatiques de la DPPC est surprenant. En effet, la plupart des données retrouvées dans la littérature jusqu'à maintenant, obtenues par RMN et FTIR, montrent que l'incorporation du cholestérol à l'intérieur des bicouches phospholipidiques diminue l'ordre conformationnel des chaînes aliphatiques, sous la température de transition (Demel et de Kruijff 1976, Finean 1990, Vist et Davis 1990, McMullen et McElhaney 1996, Davies *et al.* 1990, Chia *et al.* 1993). Toutefois, quelques groupes de chercheurs (Senak *et al.* 1992, Huang *et al.* 1993, McMullen *et al.* 1994) ont récemment obtenu le même comportement que nous. L'article publié de Senak *et al.* (1992) montre un grande ressemblance avec nos résultats. Par exemple, nous avons observé que la présence de 28% en mole de cholestérol dans une bicouche de DPPC faisait diminuer le nombre d'onde de la bande de vibration d'élongation du groupement CH_2 d'environ $0,8 \text{ cm}^{-1}$, par rapport à celle enregistrée pour la DPPC. Le groupe de Senak a observé qu'elle diminuait d'environ 1 cm^{-1} en présence de 25% en mole de cholestérol, ce qui est fort comparable avec nos résultats.

Ce même groupe a de plus avancé l'idée que dans l'état gel de la DPPC pure, malgré le fait que les chaînes aliphatiques sont supposées être en arrangement tout-*trans*, il y aurait présence de conformères gauches le long de ces chaînes aliphatiques. Le

cholestérol, par son insertion entre les chaînes phospholipidiques, pourrait empêcher la formation de ces conformères gauches, ce qui expliquerait cet effet d'ordonnement. En fait, ce stérol aurait le même effet en-dessous qu'au-dessus de la transition de phase, en réduisant le nombre de conformères gauches formés. En effet, ils ont observé qu'à l'état liquide-cristalline (L_α), pour des bicouches de DPPC pures, il existe environ 3,6 à 4,2 rotamères-gauches par chaîne aliphatique alors qu'à l'état L_o , il n'en existe qu'un. Puisque la phase riche en cholestérol, L_o , est présente à la fois lorsque la bicouche est en-dessous et au-dessus de la température de transition et puisqu'il y a existence de conformères gauches à l'état gel des bicouches phospholipidiques pures, il est normal que le cholestérol, ou l'ergostérol, augmente l'ordre conformationnel des chaînes aliphatiques. De leur côté, le groupe de McMullen (McMullen *et al.* 1994) a obtenu un comportement semblable pour le DMPC en présence de cholestérol. Dans leur cas, le nombre d'onde de la bande de vibration diminue aussi d'environ 1 cm^{-1} lorsqu'ils incorporent 25% en mole de cholestérol.

De plus, les conclusions retrouvées dans les articles de Kodati *et al.* (1993 et 1994) démontrent que le couplage interchaîne ainsi que le mouvement de librotorsion des chaînes aliphatiques peuvent aussi influencer la position de la bande de vibration des elongations C-H ou C-D. Dans ce cas, il est aussi probable que ces influences peuvent modifier de façon importante les valeurs enregistrées pour les températures inférieures à la transition de phase globale, par rapport aux données obtenues au-dessus de la T_m , et ainsi engendrer les déplacements observés.

Afin de s'assurer que la variation des fréquences observée en présence de chacun des stérols provient de la mesure des bandes de vibration d'elongation symétrique des groupements CH_2 des chaînes aliphatiques de la DPPC, et non de la superposition de bandes parasites provenant des groupements CH_2 correspondants du système cyclique et de la chaîne latérale sur chacun des stérols, nous avons utilisé la DPPC deutérée sur la chaîne acyle *sn*-2 et suivi la bande de vibration d'elongation du groupement CD_2 comme l'a fait McMullen *et al.* (1994) lors d'une étude semblable.

Ces bandes de vibration sont situées respectivement à 2195 cm^{-1} et 2090 cm^{-1} pour les vibrations d'élongation antisymétrique et symétrique. Il est donc possible d'éliminer ainsi toute interférence spectrale pouvant fausser les mesures de fréquences de vibration pour le groupement CH_2 . Les courbes de fusion obtenues, présentées à la figure 4.8, sont illustrées en noir pour les bicouches de DPPC- d_{31} pur, en rouge et en bleu marin pour les bicouches de DPPC- d_{31} contenant respectivement 28% en mole de cholestérol et d'ergostérol. Cette concentration en stérol fut utilisée pour ce contrôle puisque c'est à 28% en mole que le plus grand effet des stérols sur le nombre d'onde fut observé par FTIR (figure 4.7).

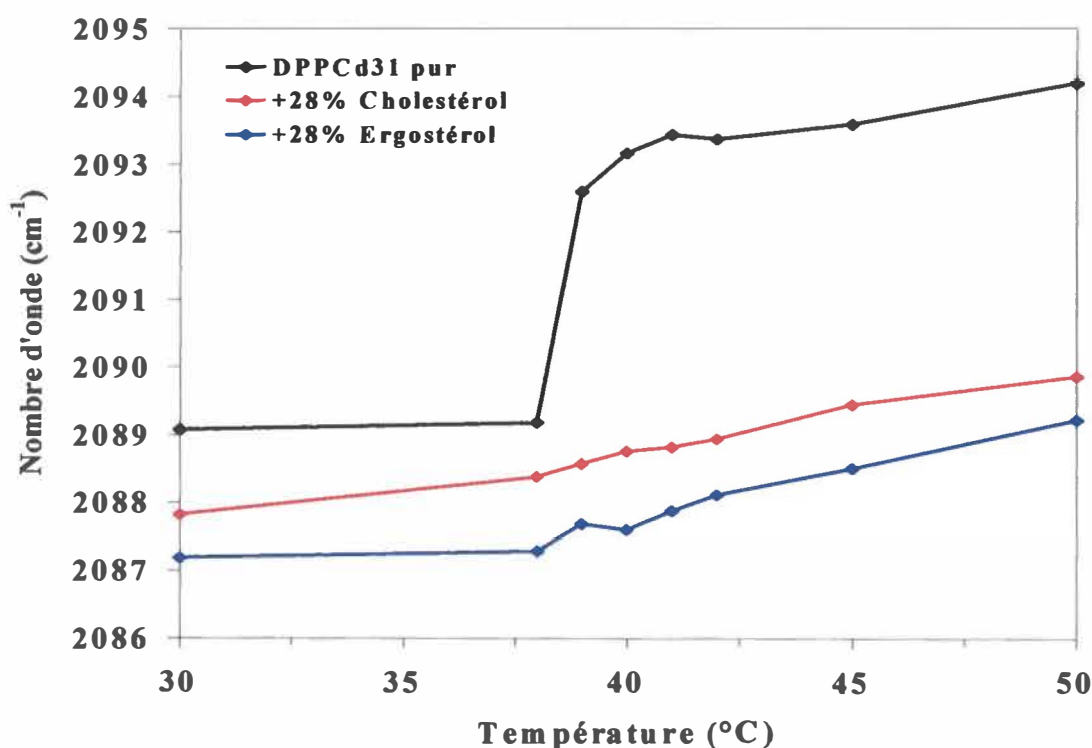


FIGURE 4.8 : Courbes de fusion obtenues pour la bande de vibration d'élongation symétrique du groupement CD_2 des mélanges contenant le lipide deutéré (écart-type moyen de $\pm 0,18\text{ cm}^{-1}$).

Premièrement, la figure 4.8 montre que pour les bicouches phospholipidiques pures (noir), le nombre d'onde de la bande de vibration d'élongation symétrique enregistré est d'environ 2089 cm^{-1} à l'état gel alors qu'à l'état liquide-cristalline, cette valeur est de 2094 cm^{-1} . Ces résultats sont comparables à ceux publiés du groupe de

Silvius *et al.* (1996) qui ont obtenu des valeurs correspondantes de 2088 cm^{-1} et 2095 cm^{-1} pour la DPPC- d_{62} .

Cette figure montre deuxièmement que l'incorporation de chacun des stérols à l'intérieur de la matrice lipidique cause une diminution du nombre d'onde de la bande de vibration du groupement CD_2 , que ce soit sous ou au-dessus de la transition de phase principale. De plus, l'incorporation de 28% en mole d'ergostérol diminue d'avantage cette valeur que ne le fait le cholestérol. Ce résultat est identique à celui retrouvé pour la bande de vibration d'élongation du groupement CH_2 , présenté à la figure 4.7.

La comparaison des résultats obtenus pour les bandes de vibration des groupements CH_2 et CD_2 montre donc que le résultat obtenu pour les mélanges binaires DPPC/stérol correspond effectivement à une variation engendrée par les molécules de stérols sur les chaînes aliphatiques de la DPPC et non par la superposition de bandes parasites provenant des groupements correspondants (CH_2 du système cyclique et de la chaîne latérale) sur chacun des stérols.

4.3 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE RMN- ^2H

L'effet des stérols sur les chaînes aliphatiques de la DPPC a été aussi étudié par RMN- ^2H . Cependant, dans le but de s'assurer que les liposomes formés ont le même comportement thermotropique que ceux formés par la DPPC non-deutérée, liposomes utilisés jusqu'à maintenant, un contrôle fut effectué par calorimétrie. En effet, le fait qu'une des deux chaînes aliphatiques soit deutérée et que la concentration en DPPC soit 5 fois plus élevée pour cette étude spectroscopique, en comparaison avec les autres techniques, peut influencer les résultats. Nous avons donc étudié certains de ces échantillons par calorimétrie (données non-présentées).

Tout d'abord, le signal thermotropique enregistré pour les bicouches pures deutérées montre une transition coopérative située à $39,6^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ alors que celui

obtenu pour les bicouches non-deutérées donne une transition principale située à $41,45 \pm 0,05^\circ\text{C}$. Cette différence au niveau de la température de transition est compatible avec les données de la littérature où l'on retrouve deux résultats calorimétriques disponibles concernant la DPPC deutérée sur la chaîne acyle *sn*-2: le premier provient du groupe de Klump *et al.* (1981) qui a obtenu une température de transition principale de $39,1^\circ\text{C}$ et le second, celui du groupe de Casal *et al.* (1983), qui a obtenu une valeur de $39,5^\circ\text{C}$. Ces deux données confirment donc le résultat que nous avons obtenu pour les bicouches utilisées aux concentrations de 20 mg/mL.

Ce contrôle a été complété en étudiant, par calorimétrie, les mélanges lipidiques deutérés contenant 28% en mole de stérol (données non-présentées). Les thermogrammes ont montré une grande ressemblance avec ceux présentés aux figures 4.1 et 4.5 puisqu'une seule transition est visible. Avec ce contrôle, nous confirmons que les deux matrices lipidiques contenant chacun des stérols, qu'elles soient deutérées ou non, ont un comportement identique en calorimétrie.

Puisque les résultats calorimétriques sont cohérents avec ceux obtenus pour les bicouches correspondantes non-deutérées, nous pouvons étudier l'influence de chacun des stérols sur l'ordre orientationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC deutérée. À cet effet, les valeurs d'écart quadripolaire mesurées sont mises en graphique en fonction de la température à la figure 4.9 A, pour le carbone du groupement CD_2 situé près de la tête polaire (C2) et en B, celles obtenues pour le carbone du groupement CD_3 en bout de chaîne (C16). La courbe obtenue pour les bicouches de DPPC- d_{31} pures est illustrée en noir et les courbes en rose correspondent aux mélanges contenant le cholestérol tandis que celles représentées en bleu, correspondent aux bicouches contenant l'ergostérol.

La figure 4.9 montre dans un premier temps que les valeurs d'écart quadripolaire associées au carbone près de la tête polaire (A) sont plus élevées que celles associées au carbone en bout de chaîne (B). Cette observation est attendue puisque le carbone près de la tête polaire est beaucoup moins mobile que celui situé au bout de la chaîne aliphatique et par conséquent, la valeur d'écart quadripolaire sera plus élevée pour le

carbone près de la tête polaire puisque ce paramètre reflète l'ordre du lien C-D, il dépend donc de sa mobilité. Plus le lien C-D est mobile, plus la valeur de l'écart quadripolaire sera faible.

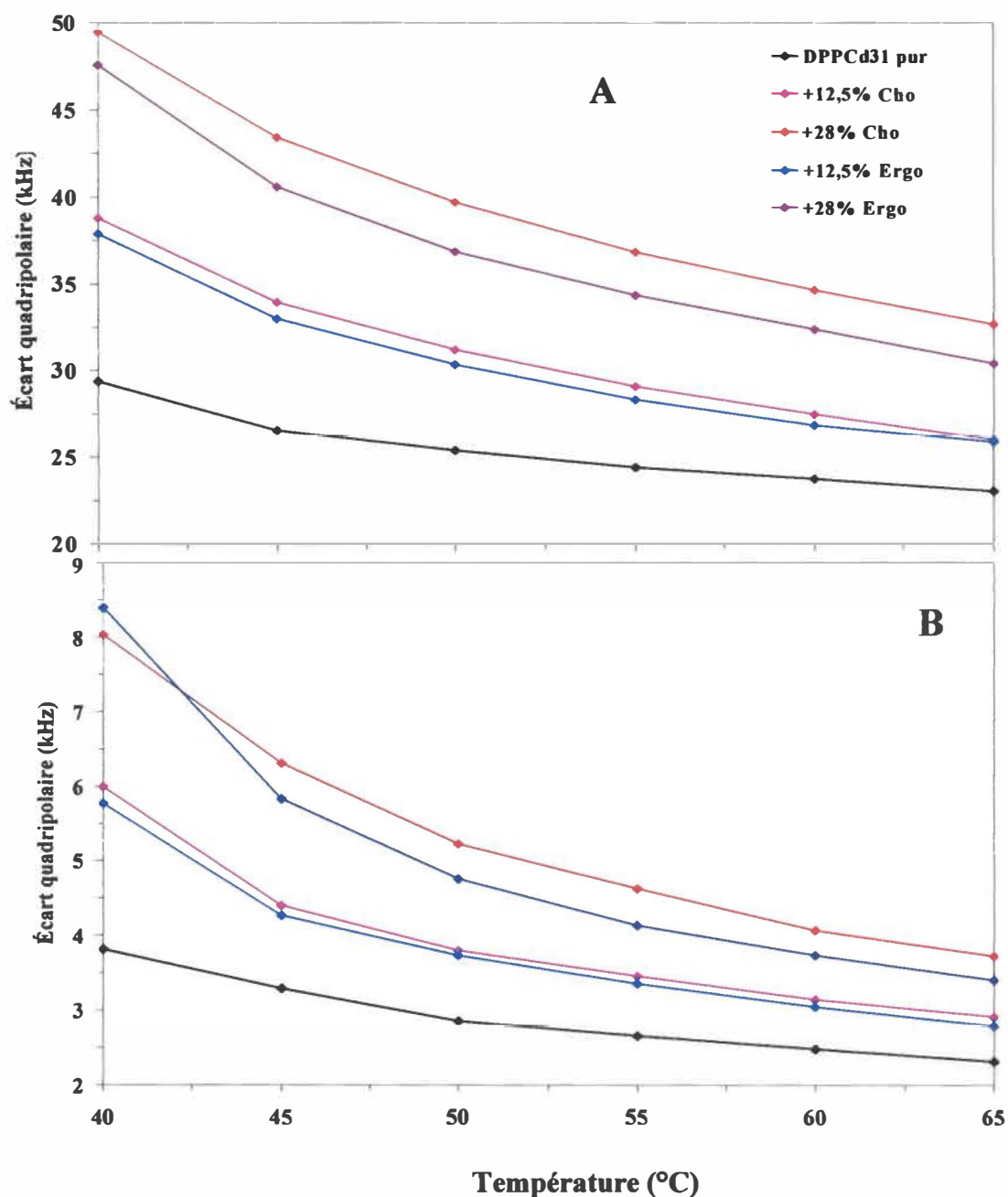


FIGURE 4.9 : Écarts quadripolaires obtenus pour le carbone près de la tête polaire (A) et en bout de chaîne (B) en fonction de la température pour les mélanges DPPC- d_{31} /stérol. L'écart-type moyen est de l'ordre de $\pm 0,2$ kHz pour les données recueillies pour la région près de la tête polaire (A) et de $\pm 0,1$ kHz pour celles correspondant au lien C-D en bout de chaîne (B).

Dans un deuxième temps, cette figure montre qu'en présence de chacun des stérols, aussi bien près de la tête polaire (A) qu'en bout de chaîne (B), la valeur de l'écart quadripolaire mesurée se trouve augmentée par rapport à celle obtenue pour la DPPC- d_{31} pur. Cette augmentation de la valeur de l'écart quadripolaire est proportionnelle à l'augmentation de la concentration en stérol et est plus marquée en présence de cholestérol qu'en présence d'ergostérol. Le fait que l'ordre orientationnel soit influencé de la même façon autant en bout de chaîne aliphatique que près de la tête polaire implique probablement que toute la chaîne aliphatique de la DPPC est affectée par les molécules de stérols.

Enfin, les résultats présentés en A et B de la figure 4.9 montrent clairement que l'incorporation de chacun des stérols augmente les valeurs d'écart quadripolaire, donc l'ordre orientationnel de la chaîne aliphatique, à l'état liquide-cristallin. Cet effet est proportionnel à la concentration en stérol et ce, de façon plus marquée pour le cholestérol par rapport à l'ergostérol. Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux obtenus par Huang *et al.* (1993), par FTIR, et par Vist et Davis (1990), par RMN. Par contre, les résultats obtenus par la présente étude sont différents de ceux publiés par Urbina *et al.* (1995) sur des bicouches de DMPC- d_{27} . Ces auteurs ont démontré par RMN- ^2H , RMN- ^{13}C et RMN- ^{31}P que l'ergostérol ordonne plus que le cholestérol la chaîne aliphatique dans un mélange lipidique contenant 30% en mole de stérol. Cependant, dans ce même travail, ce groupe a obtenu les mêmes résultats que nous mais pour une bicouche de POPC, révélant ainsi encore une fois le rôle important joué par la longueur de la chaîne hydrophobe dans l'interaction du stérol avec celle-ci.

La comparaison des résultats obtenus par FTIR et par RMN- ^2H fait ressortir à la fois des correspondances et des discordances. Dans un premier temps, nous constatons à l'aide de ces deux techniques, que chacun des stérols augmente l'ordre des chaînes aliphatiques du phospholipide, au-dessus de la T_m . Cependant, par FTIR, cette augmentation est plus importante lorsque la bicouche de DPPC contient de l'ergostérol par rapport au cholestérol, comportement inverse à celui observé par RMN- ^2H . Cette contradiction peut s'expliquer de la façon suivante: les paramètres d'ordre mesurés par

ces deux techniques ne sont pas tout à fait les mêmes. En effet, par infrarouge, le paramètre d'ordre obtenu est un paramètre d'ordre conformationnel et de plus, la valeur enregistrée est une moyenne du nombre d'onde de la bande de vibration de tous les groupements CH_2 le long de la chaîne aliphatique ainsi qu'une moyenne de toutes les chaînes aliphatiques de l'échantillon. C'est donc une mesure représentant une moyenne de l'ordre de toutes les phases présentes, que se soit sous la T_m ($L_\beta + L_{o\beta}$) ou au-dessus de la T_m (L_α ou $L_{o\alpha}$). Par contre, par RMN- ^2H , l'information acquise concerne l'ordre orientationnel du lien C-D et par conséquent, il est possible d'obtenir des renseignements plus localisés le long de la chaîne lipidique (Kodati *et al.* 1993).

Ces différences existant entre ces deux techniques peuvent aussi être expliquées par des influences du type librotorsion des chaînes aliphatiques et couplage interchaîne, mises en évidence par Kodati et al. (1994). De même, dans un article récemment publié de Paré *et al.* (2001), les auteurs démontrent que la fréquence de vibration d'élongation des groupements CH_2 et CD_2 contenus sur la chaîne aliphatique d'un phospholipide ne constituerait pas une donnée pouvant être reliée à l'ordre conformationnel de cette chaîne aliphatique pour des bicouches contenant entre autre des inclusions lipophiliques. Cependant, selon eux, la technique de RMN- ^2H constituerait une technique fournissant des données pouvant refléter cet état d'ordre à l'intérieur des chaînes aliphatiques. Ils mentionnent que malgré le fait que ces deux techniques sont sensibles au phénomène d'isomérisation *trans-gauche*, la position de la bande de vibration d'élongation du groupement CH_2 serait sensible entre autre à l'interférence des fréquences de vibration des groupements analogues des molécules de stérol. Cette interférence possible a été éliminée lors de la présente étude en suivant la position de la bande de vibration d'élongation des groupements CD_2 .

4.4 CONCLUSIONS PARTIELLES

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent clairement que l'incorporation de molécules de stérol à l'intérieur de la matrice lipidique de DPPC, que ce soit le cholestérol ou l'ergostérol, influence son environnement lipidique, ce qui appuie les données de la littérature concernant le mélange DPPC/cholestérol. Cette interaction résulte en la diminution des interactions qui prévalent entre chacune des chaînes aliphatiques de la DPPC puisque la température, la coopérativité ainsi que l'enthalpie molaire de la transition principale diminuent. De plus, par DSC, il est clair que les stérols ne sont pas distribués sous forme d'agrégats dans la bicouche puisque la prétransition disparaît et ce, à de très faibles concentrations en stérol. Les résultats calorimétriques nous permettent de plus d'avancer l'hypothèse que le diagramme de phase de l'ergostérol, dans une matrice lipidique de DPPC, devrait être similaire à celui proposé par McMullen et McElhaney (1995) pour le cholestérol.

Les deux techniques spectroscopiques pour leur part montrent que chacun des stérols ont un effet d'ordonnement sur les chaînes aliphatiques du DPPC et ce, malgré les différences que nous avons soulignées entre ces deux techniques.

CHAPITRE V

BICOUCHES LIPIDIQUES MIXTES DPPC/AmB

Le présent chapitre cible l'effet de l'incorporation de l'AmB sur des bicouches de DPPC en l'absence de stérol, en utilisant à la fois des techniques permettant de caractériser le phospholipide (DSC, FTIR et RMN-²H) et une technique permettant de caractériser les propriétés de l'antifongique, soit la spectroscopie UV-visible. Comme cette étude n'a jamais été réalisée auparavant, les résultats présentés dans ce chapitre correspondent à la fois à de nouvelles données ainsi qu'à des contrôles pour les chapitres subséquents, c'est-à-dire ceux associés aux mélanges ternaires DPPC/stérol/AmB.

5.1 RÉSULTATS CALORIMÉTRIQUES

5.1.1 Effet du DMSO sur les bicouches de DPPC

Comme il a été mentionné au chapitre II, l'antifongique requiert un solvant polaire pour sa dissolution, comme le DMSO. Afin de s'assurer que ce solvant n'interfère pas au niveau de l'organisation des phospholipides en milieu aqueux, nous avons vérifié si les transitions thermotropiques du phospholipide demeurent intactes en présence de la quantité de DMSO utilisée pour la solubilisation de l'antifongique. Nous avons donc utilisé comme contrôle des préparations liposomales de DPPC auxquelles 2 % (v/v) de DMSO a été ajouté, quantité correspondant à celle utilisée lors de la préparation des échantillons contenant l'antifongique. La figure 5.1 présente en noir le thermogramme obtenu pour les bicouches de DPPC pure et celui illustré en rose, correspond au thermogramme des liposomes en présence de solvant.

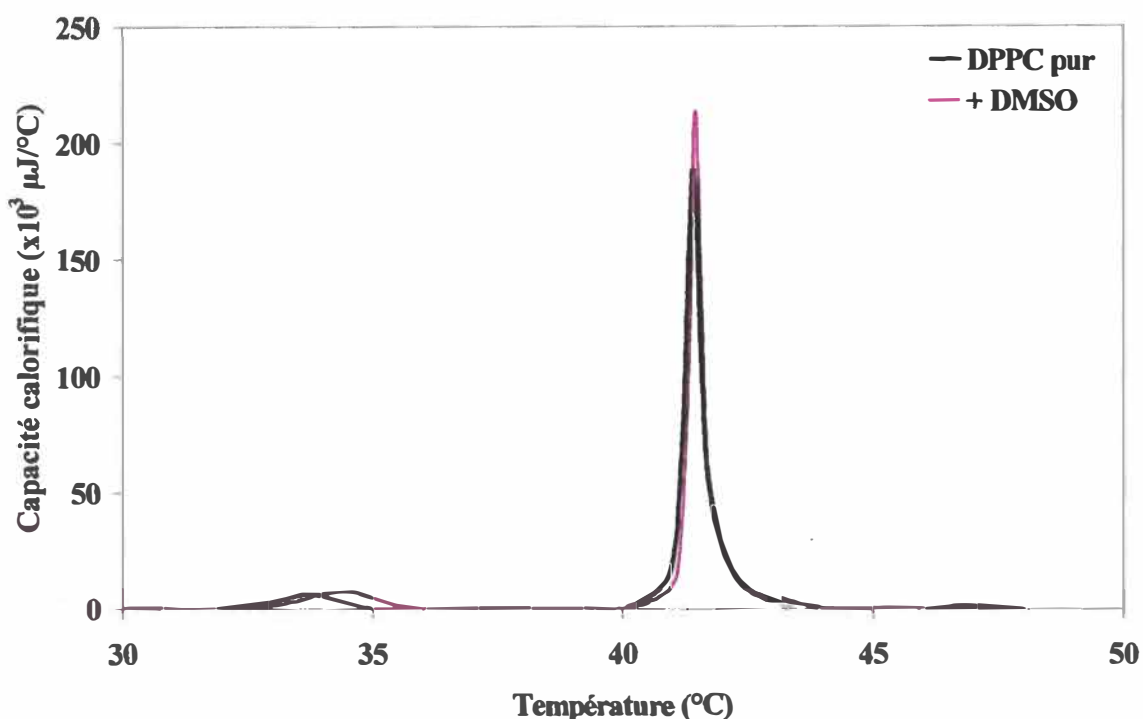


FIGURE 5.1: Thermogrammes obtenus pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL pur (noir) et celles contenant 2% (v/v) DMSO (fuchsia).

Cette figure montre tout d'abord, sur le thermogramme de la DPPC contenant le solvant, une prétransition située aux alentours de 34,5 $^\circ\text{C}$ ainsi qu'une transition principale située à 41,5 $^\circ\text{C}$. La valeur de ces données s'approche à première vue de celle obtenue pour les bicouches de DPPC pures (chapitre III). Afin de bien comparer ces deux thermogrammes, le tableau 5.1 présente les valeurs des paramètres thermodynamiques correspondant à la transition principale pour les deux préparations lipidiques.

TABLEAU 5.1

Comparaison des paramètres thermodynamiques obtenus pour les préparations de DPPC pure et de DPPC contenant 2% (v/v) de DMSO.

Préparation	T_m ($^\circ\text{C}$)	$\Delta T_{1/2}$ ($^\circ\text{C}$)	$\Delta \bar{H}$ (kJ/mole)
DPPC pure	$41,45 \pm 0,05$	$0,34 \pm 0,03$	$34,2 \pm 2,7$
DPPC+DMSO	$41,46 \pm 0,06$	$0,32 \pm 0,05$	$35,6 \pm 1,9$

Ce tableau permet de constater qu'à la fois la température, la largeur à mi-hauteur ainsi que l'enthalpie molaire du processus thermodynamique pour les bicouches de DPPC pures ne se trouvent pas affectées par la présence du DMSO puisque la moyenne des deux séries de données est identique, compte tenu des faibles valeurs d'écart. À la lumière de ces résultats, il est clair que le DMSO n'entrave aucunement la formation des liposomes MLV de DPPC, du moins pour cette concentration, et que son utilisation lors de l'incorporation de l'AmB n'altèrera pas les données calorimétriques. De plus, comme il sera constaté à la section suivante, ce contrôle nous assure que les effets induits par la présence de l'AmB sur les bicouches lipidiques proviennent uniquement de cet antifongique, et non du DMSO.

5.1.2 Effet de l'AmB sur les bicouches de DPPC

L'incorporation de l'AmB à l'intérieur de la matrice lipidique aura sans doute des répercussions sur son environnement lipidique. Cependant, comme la structure moléculaire de l'antifongique et de chacun des stérols est différente, l'interaction de chacune de ces molécules sera probablement différente avec les molécules de DPPC. Cette section est donc consacrée à l'effet de l'AmB sur les molécules de DPPC.

Les résultats calorimétriques obtenus pour les trois concentrations d'AmB utilisées, soit 6,25%, 12,5% et 25% en mole, sont présentés à la figure 5.2. Le thermogramme de la DPPC pure y figure aussi pour fins de comparaison et est représenté en noir. Les trois signaux calorimétriques correspondant aux mélanges DPPC/AmB sont illustrés par les thermogrammes en jaune (6,25% AmB), en orangé (12,5% AmB) et en rouge (25% AmB). Sur cette même figure, la région de la prétransition est présentée, dans l'encart supérieur gauche, à l'aide d'une échelle appropriée, afin de mieux visualiser le comportement de la prétransition en présence d'antifongique.

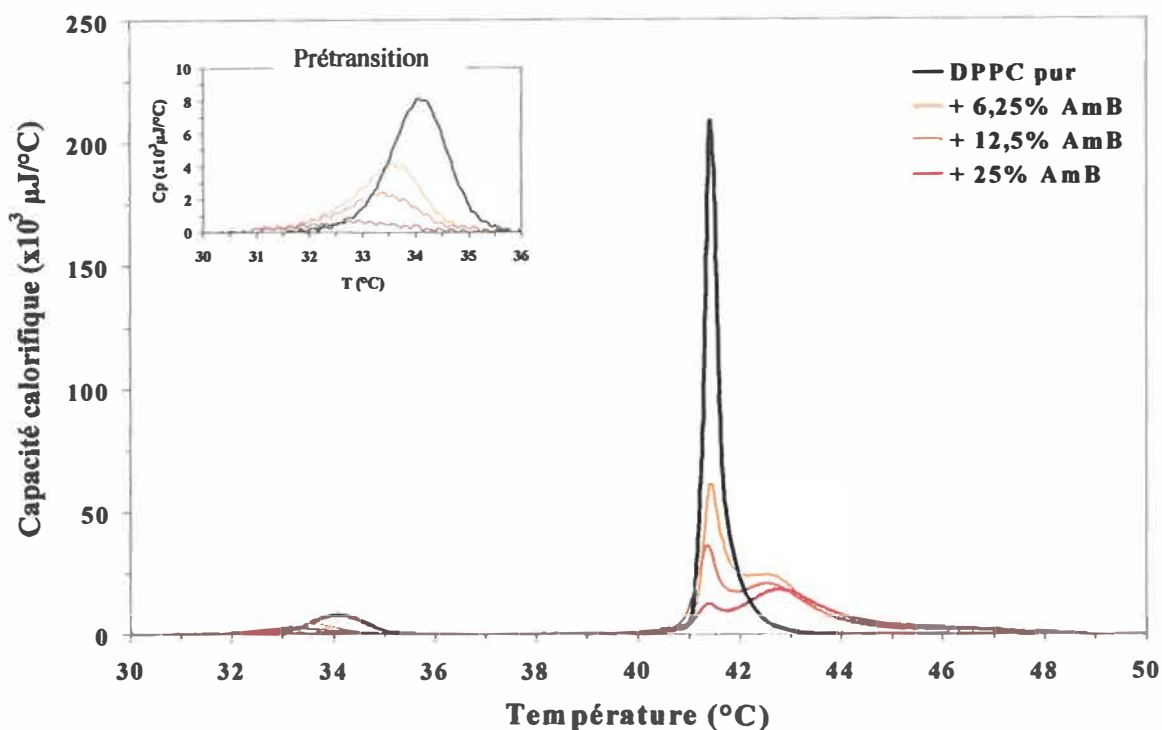


FIGURE 5.2: Thermogrammes obtenus pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 0%, 6,25%, 12,5% et 25% en mole d'AmB.

Afin de faciliter l'analyse de cette figure, nous séparerons en deux sections les thermogrammes qui y sont présentés: la région de la prétransition et celle de la transition principale.

a) prétransition

Pour cette gamme de température, soit 30°C à 36°C, il est possible de constater dans l'encart supérieur gauche de la figure 5.2 que l'incorporation de l'AmB à l'intérieur de la matrice lipidique modifie le signal de la prétransition du lipide pur (thermogramme noir). En effet, la présence de cet antifongique diminue ce signal thermodynamique et le déplace vers des températures inférieures. La diminution du signal calorimétrique ainsi que de la température de cette prétransition en fonction de la concentration en AmB est prévisible puisque la concentration en AmB dans la bicouche augmente, ce qui modifie les interactions prévalant normalement entre les têtes polaires de la DPPC. Cette

modification résulte en une déstabilisation des interactions existantes entre les têtes polaires de la DPPC puisqu'il faut de moins en moins de chaleur pour faire passer les molécules de DPPC à l'état gel-ondulé ($P_{\beta''}$).

Ce comportement de la prétransition en fonction de la concentration en antifongique est complètement différent de celui observé lorsque la bicouche contient l'un ou l'autre des stérols. Dans ce dernier cas, nos résultats ont montré qu'il y a disparition complète de la prétransition avec 12,5% en mole de cholestérol. Cependant, le diagramme de phase de McMullen et McElhaney (1995) montre qu'aussi peu que 5% en mole de ce stérol fait disparaître cette prétransition, quantité de stérol que nous n'avons pas étudiée. Cette différence au niveau du comportement de la prétransition entre les mélanges contenant l'antifongique ou un des stérols suggère que la répartition de ces molécules est différente à l'intérieur de ces matrices lipidiques. Au chapitre IV, il avait été mentionné que la distribution des molécules de stérols est homogène à l'intérieur de la matrice lipidique, influençant ainsi beaucoup de molécules de DPPC (disparition de la prétransition). Puisqu'il y a persistance de la prétransition en présence d'AmB, le nombre de molécules de DPPC affectées par cet antifongique semble donc être beaucoup moins important que le nombre de celles touchées par les molécules de stérol. La présence des molécules d'AmB dans la bicouche modifie donc les interactions prévalant entre les molécules de DPPC, mais de façon moindre que ne le font les molécules de stérols.

b) transition principale

Dans la région de la transition principale, la figure 5.2 montre clairement que le signal obtenu pour la DPPC pure (thermogramme noir) est aussi modifié par la présence d'AmB (thermogrammes orangés). Cette modification se traduit par une diminution de l'intensité du signal enregistré, en fonction de la concentration en AmB, ainsi que par la présence d'épaulements du côté des températures plus élevées. Ces épaulements correspondent à de nouvelles transitions de phases et afin de bien les visualiser, une

décomposition a été effectuée sur tous les thermogrammes. La figure 5.3 présente un thermogramme original obtenu pour les bicouches de DPPC contenant 12,5% en mole d'AmB (noir) ainsi que les tracés nécessaires, obtenus par décomposition (tracés bleu, orange et rouge), pour simuler le plus fidèlement le tracé original. De plus, le tracé représentant la résultante de la simulation est illustré en fuchsia afin de montrer l'efficacité de la décomposition.

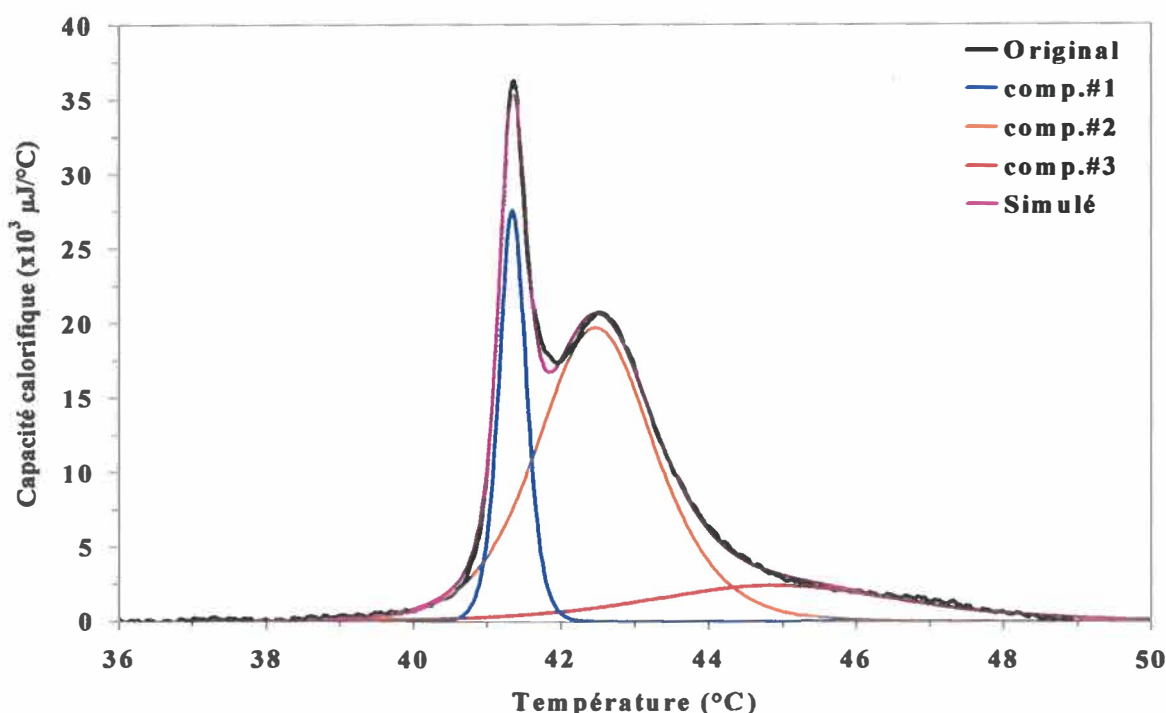


FIGURE 5.3: Composantes de décomposition du thermogramme obtenu pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'AmB.

Sur cette figure, les composantes mises en évidence suite à la décomposition suggèrent fortement qu'il existe trois transitions de phase pour les bicouches de DPPC contenant l'AmB. La première transition de phase enregistrée est située exactement à la même température que celle de la DPPC pure, soit 41,5°C. Les deux autres transitions sont observées à 42,6°C et à 44,9°C. Il est intéressant de noter que généralement, les données retrouvées dans la littérature en calorimétrie concernant l'ajout d'une molécule étrangère dans une matrice phospholipidique montrent une diminution de la température de transition principale (voir entre autre l'effet des stérols sur la DPPC) et non une

augmentation de celle-ci. Les résultats obtenus par la présente étude montrent en effet une influence hors du commun de la part de cet antifongique sur les bicouches de DPPC. Nous avons été les premiers à publier ces résultats en 1998 (Fournier *et al.*).

Les trois transitions de phase observées peuvent être caractérisées à l'aide des paramètres thermodynamiques obtenus suite à la décomposition, soit la température de transition, la largeur à mi-hauteur ainsi que l'enthalpie. La valeur de ces paramètres a été relevée pour les thermogrammes obtenus aux différentes concentrations étudiées et portée en graphique en fonction de la concentration en AmB à la figure 5.4 A et B respectivement pour la variation des T_m (A) et celle des largeurs à mi-hauteur (B). Sur ces graphiques, les données correspondant aux valeurs obtenues pour les bicouches de DPPC pures y sont représentées par un point fuchsia à 0% en mole d'AmB. Les données obtenues suite à la décomposition sont illustrées en bleu, pour la première transition de phase observée (située à la température la plus faible), en orangé pour la seconde et en rouge, pour la dernière transition.

Sur le graphique 5.4A, il est possible de constater que la température de chacune des transitions obtenues demeure constante avec l'augmentation de la concentration en AmB. La première transition de phase obtenue est située aux alentours de 41,4°C (courbe bleue). Rappelons que la température de transition de la DPPC pure est de 41,5°C (point rose). La deuxième transition rencontrée (courbe orangée) est située aux alentours de 42,6°C et la troisième (courbe rouge), près de 44,9°C.

Le graphique 5.4B montre pour sa part que la largeur à mi-hauteur des transitions demeure elle aussi constante en fonction de la concentration en AmB. La première transition de phase est caractérisée par une valeur de largeur à mi-hauteur d'environ 0,4°C, et les deux autres transitions par des valeurs de 1,8°C et de 3,8°C, respectivement. Rappelons que la transition principale de la DPPC pure a une valeur de largeur à mi-hauteur de 0,34 °C.

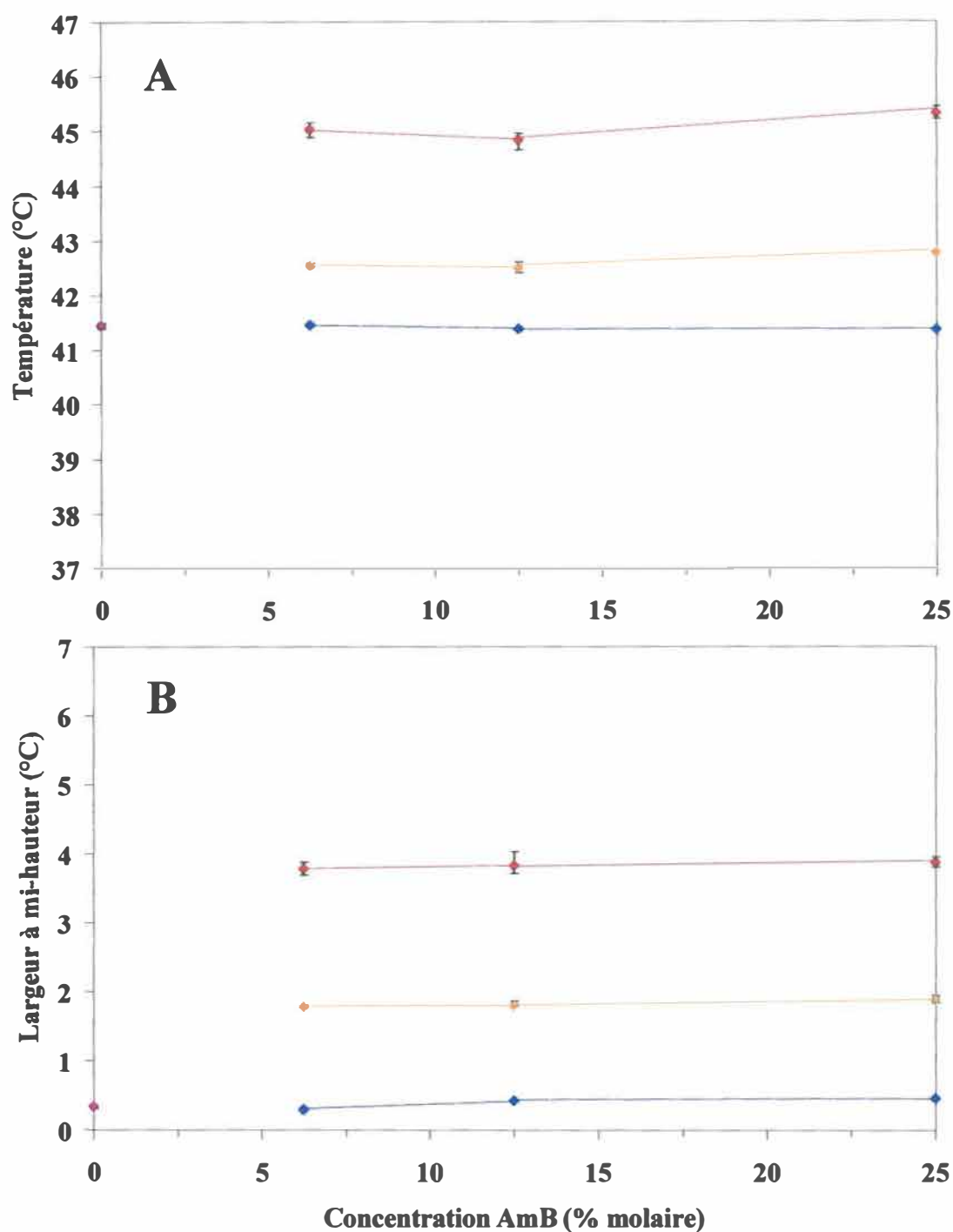


FIGURE 5.4: Graphiques de la température de transition (A) et de la largeur à mi-hauteur (B) en fonction de la concentration en AmB pour les trois transitions de phase résultant de la décomposition des thermogrammes des mélanges DPPC 4 mg/mL /AmB (1^{ère} transition en bleu, 2^{ème} transition en orangé, 3^{ème} transition en rouge et point fuschia : DPPC pure).

Le fait qu'à la fois les valeurs de température et de largeur à mi-hauteur demeurent constantes en fonction de la concentration en AmB indique clairement que les trois transitions de phases rencontrées lors du balayage thermique sont les mêmes, peu importe la quantité d'AmB présente dans les bicouches lipidiques.

Chacune de ces transitions est associée à une organisation particulière des molécules de DPPC. Puisqu'à la fois la valeur de la température de la première transition et celle de sa largeur à mi-hauteur sont identiques à celles du phospholipide pur, la première transition de phase, située à la température la plus faible, est ici associée aux molécules de phospholipides pures, c'est-à-dire celles n'interagissant pas avec les molécules d'AmB. Il est important de mentionner ici que cette transition demeure parfaitement perceptible même à 50% en mole d'AmB (données non-présentées).

Les deux autres transitions de phase observées, situées aux températures supérieures, seraient associées aux molécules de DPPC influencées par l'AmB puisqu'elles sont visibles seulement en présence d'AmB. Afin de s'assurer que ces deux nouvelles transitions ne proviennent pas d'un arrangement en agrégats de l'AmB en solution à l'extérieur des liposomes, un contrôle a été effectué. Ce phénomène d'agrégation en solution aqueuse pourrait survenir lors d'une incorporation incomplète de l'antifongique à l'intérieur des liposomes. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé la quantité correspondante d'AmB utilisée pour les échantillons liposomaux mais en solution dans le tampon-PBS, en absence du lipide. La concentration en AmB utilisée pour ce contrôle est de 25% en mole ($1,36 \times 10^{-3}$ M) puisque c'est à cette concentration que la proportion d'AmB non-incorporée dans les liposomes risquerait d'être la plus importante. Suite à plusieurs balayages thermiques, aucun signal n'a été enregistré sur ces échantillons, que ce soit de façon endothermique ou exothermique (données non-présentées). Les deux transitions de phase obtenues aux températures les plus élevées en présence d'AmB (figure 5.3) proviennent donc de l'interaction de l'AmB avec des molécules de DPPC en milieu lipidique organisé et non de la présence d'agrégats d'AmB en solution.

Puisqu'il est clair que l'AmB s'insère dans la matrice lipidique et que cet insertion se traduit par l'apparition de deux signaux calorimétriques additionnels, situés à des températures supérieures à celle observée pour la DPPC pure, est-il possible d'associer ces deux transitions thermodynamiques à un arrangement moléculaire particulier impliquant l'AmB et les molécules de DPPC? C'est ce que nous tenterons de démontrer dans la suite du présent chapitre.

Afin de faciliter l'interprétation des résultats calorimétriques, nous utiliserons les résultats récemment publiés de Yang et Appleyard en 2000. Ces auteurs ont étudié, par calorimétrie, des préparations lipidiques de DPPC sur support solide de mica. La figure 5.5 qui suit montre un thermogramme qu'ils ont enregistré pour une préparation liposomale de DPPC en contact avec un support de mica. À droite de ce thermogramme, une schématisation des différentes populations lipidiques présentes dans cet échantillon liposomal est illustrée afin de faciliter l'analyse de ce thermogramme.

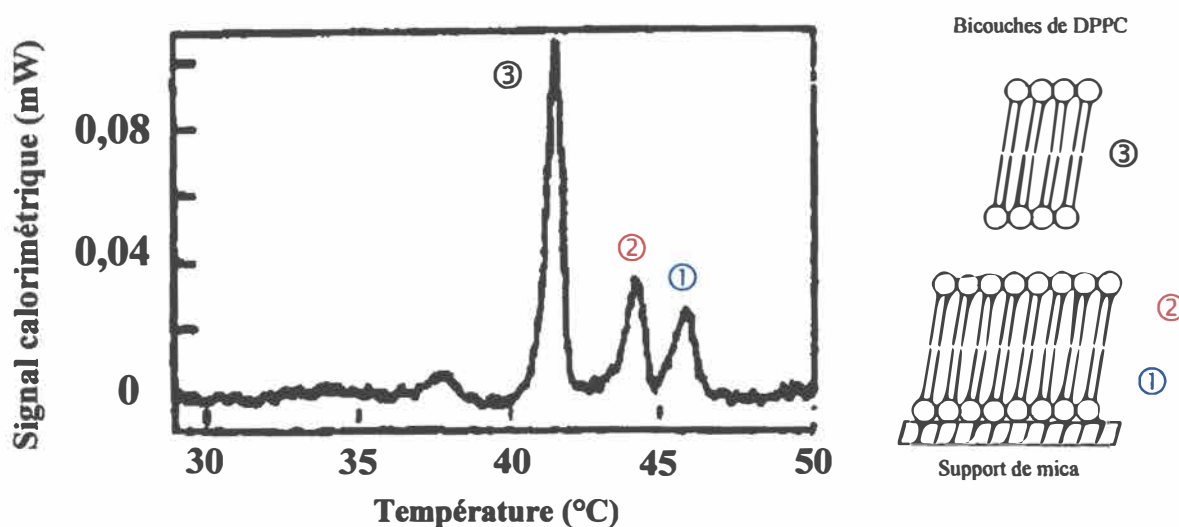


FIGURE 5.5: Thermogramme d'une préparation liposomale de DPPC sur support de mica, 30°C/h (tiré de Yang et Appleyard 2000).

Ce thermogramme montre essentiellement trois transitions de phase situées autour de 41°C, 44°C et 46°C. La première transition est associée aux bicouches de DPPC sans contact avec le support de mica. Les deux dernières transitions, situées à des températures supérieures à celle des bicouches de DPPC en suspension dans le tampon,

sont attribuées à celles de molécules de DPPC ayant deux états d'organisation différents. Sur le thermogramme, chacune des transitions est identifiée par un chiffre, celui-ci faisant référence à une population de molécules de DPPC illustrée à droite de ce thermogramme. Ils obtiennent donc que la couche de DPPC qui est en contact direct avec le support de mica (1) est la plus structurée, la plus stable et par conséquent, sa température de transition est la plus élevée. La seconde couche de phospholipides (2) est influencée par celle qui est en contact direct avec le mica (1) de façon à ce que ces molécules de DPPC (2) soient plus structurées encore que ne le sont celles des bicouches de DPPC en suspension dans le tampon (3).

Ces résultats sont étrangement similaires à ceux obtenus par notre étude, du moins du point de vue des températures de chacune des transitions observées. C'est donc dire que l'AmB, avec la rigidité de sa structure, semble influencer son environnement de façon à ce que les molécules de DPPC environnantes soient beaucoup plus structurées que celles contenues dans la matrice lipidique pure. Les interactions DPPC-AmB sont donc probablement plus fortes que celles prévalant entre les molécules de DPPC elles-mêmes. Cette structuration de l'environnement lipidique par les molécules d'AmB se fait donc de deux façons différentes puisque deux nouvelles transitions apparaissent en présence de cet antifongique et ce, à des températures supérieures à celle du phospholipide pur (figure 5.4 A). De plus, le fait que ces deux nouvelles transitions soient plus larges que celle de la DPPC pure indique que ces deux nouveaux processus thermodynamiques sont moins coopératifs que celui de la transition de la DPPC pure (figure 5.4 B).

Les résultats calorimétriques obtenus par la présente étude, ainsi que les renseignements fournis par l'article de Yang et Appleyard, nous amènent à présenter de façon très schématique, à la figure 5.6, la distribution ou l'organisation des molécules d'AmB dans la matrice lipidique de DPPC. Cette représentation schématique tient compte du ratio molaire de chacun des constituants membranaires, pour une bicouche de DPPC contenant 12,5% en mole d'AmB. Les différentes phases qui y sont représentées,

par lesquelles passe l'AmB quand, très lentement, on augmente la température, n'existent probablement pas toutes à une température donnée.

Sur cette figure, les molécules d'AmB sont organisées en pores formés de 6 ou 8 molécules d'AmB et ce, pour plusieurs raisons. Premièrement, il est généralement admis que l'AmB forme des pores, comptant entre 6 et 9 molécules d'AmB, 6 et 8 étant les plus répandus (de Kruijff et Demel 1974, Andreoli 1974, Baginski *et al.* 1997, Gagos *et al.* 2001). Deuxièmement, Gruszecki *et al.* (2003) ont montré pour la première fois des images prises par microscopie à force atomique de bicouches de DPPC, supportées sur des films de mica, contenant de l'AmB. Sur ces images, des structures ressemblant à des pores membranaires sont clairement identifiables. Troisièmement, l'article récemment publié de Huang *et al.* (2002) montre aussi, par UV-visible, par voltamétrie cyclique et par spectroscopie impédance AC, que l'AmB peut former des canaux ioniques dans une matrice lipidique de DMPC sur support GCE (glassy carbone electrode) mais seulement pour une concentration à laquelle l'AmB est hautement agrégée.

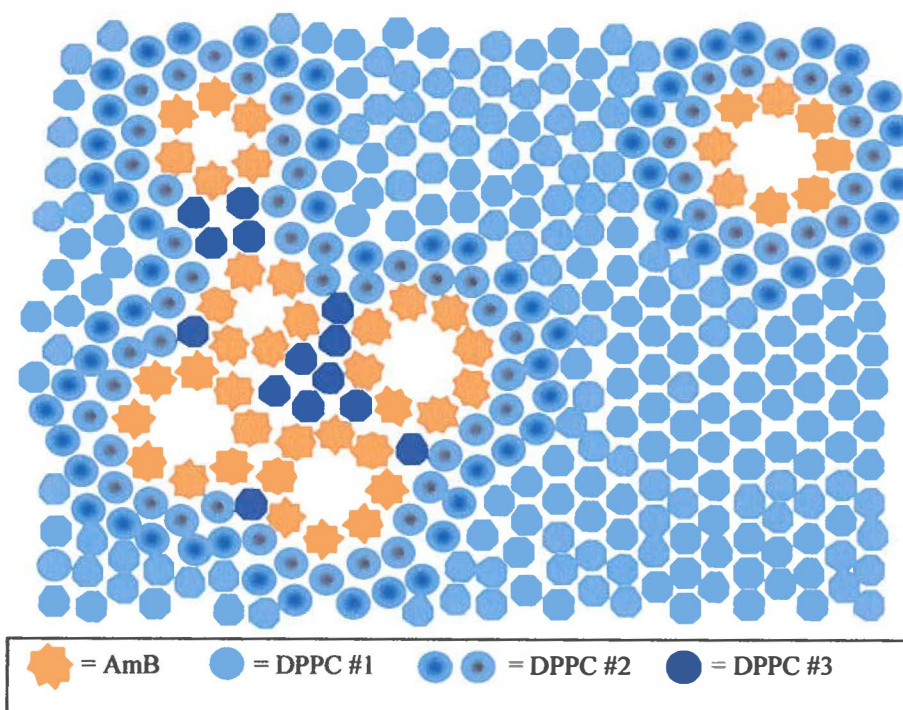


FIGURE 5.6: Schéma hypothétique de la distribution des molécules d'AmB dans une bicouche de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'AmB.

Le schéma hypothétique proposé à la figure 5.6 illustre bien les différentes phases de DPPC possiblement présentes dans la bicouche lorsque celle-ci contient l'antifongique. La première transition de phase enregistrée (figure 5.3) correspondrait donc aux molécules de DPPC "pures" c'est-à-dire celles qui ne sont pas à proximité des molécules d'AmB (identifiées DPPC #1 sur la figure 5.6). La seconde transition de phase obtenue pourrait être reliée aux molécules de DPPC entourant les oligomères ou pores d'antifongique (DPPC #2). L'effet de structuration de l'AmB sur les molécules de DPPC environnantes peut être ressenti sur plusieurs couches de molécules de DPPC entourant ces arrangements en pores, vue la faible coopérativité de cette transition (figure 5.4B, courbe orangée). La dernière transition de phase enregistrée pourrait être, pour sa part, associée aux molécules de DPPC piégées entre les pores membranaires (DPPC #3) puisqu'il n'est pas exclu que ces pores d'AmB s'agrègent dans le plan de la bicouche, emprisonnant ainsi des molécules de DPPC. À ce propos, Gagos *et al.* (2001) et Gruszecki *et al.* (2003) ont obtenu qu'en fonction de la température, le niveau d'agrégation de l'AmB dans la bicouche augmentait. Nous supposons donc que les deux premières transitions observées, à une concentration donnée d'AmB, soient indépendantes l'une de l'autre c'est-à-dire qu'elles soient associées à des phases lipidiques existant dès le début de la chauffe. Cependant, la troisième transition obtenue devrait logiquement être dépendante de la seconde, puisqu'elle dépend du processus d'agrégation des pores d'AmB, phénomène accentué par le chauffage.

En augmentant la concentration en AmB, la proportion des molécules de DPPC dans chacune de ces phases lipidiques devrait varier. Si tel est le cas, nous devrions nous attendre à ce que le nombre de molécules de DPPC dans la phase "pure" diminue au profit de la formation des deux autres phases. Le nombre de DPPC compris dans chacune des deux autres phases devrait donc varier de façon contraire c'est-à-dire que si le nombre de molécules de DPPC d'une des deux phases diminue, celui de l'autre phase devrait augmenter, et vice-versa. Comme il a été vu à la figure 5.4, la température ainsi que la coopérativité de chacune des trois transitions ne varient pas en fonction de la concentration en AmB. Il est donc clair qu'il s'agit des mêmes phases que l'on retrouve en fonction de la concentration en AmB. En conséquence, l'enthalpie molaire de

chacune d'elles demeurant la même, la variation de l'aire sous la courbe de ces transitions reflète la variation du nombre de molécules participant à la transition de phase. En étudiant la variation des valeurs d'enthalpie de chacune de ces transitions en fonction de la concentration en AmB, il sera possible de vérifier si effectivement le nombre de molécules de DPPC varie dans chacune de ces phases en fonction de la concentration en AmB, comme nous le supposons au début de ce paragraphe.

La figure 5.7 présente les valeurs d'enthalpie obtenues pour les trois transitions de phase en fonction de la concentration en AmB. Sur cette figure, les données associées à la première transition de phase sont représentées en bleu, celles de la seconde en orangé et celles de la troisième, en rouge. Sur l'axe des ordonnées, la donnée obtenue pour les bicouches de DPPC pures est illustrée en fuchsia afin de faciliter l'analyse. De plus, un tracé additionnel y est rajouté, par rapport à la figure 5.4, et est illustré en vert. Il correspond à l'enthalpie totale du processus thermodynamique c'est-à-dire la quantité de chaleur requise pour que les trois transitions de phase, précédemment identifiées, soient complétées.

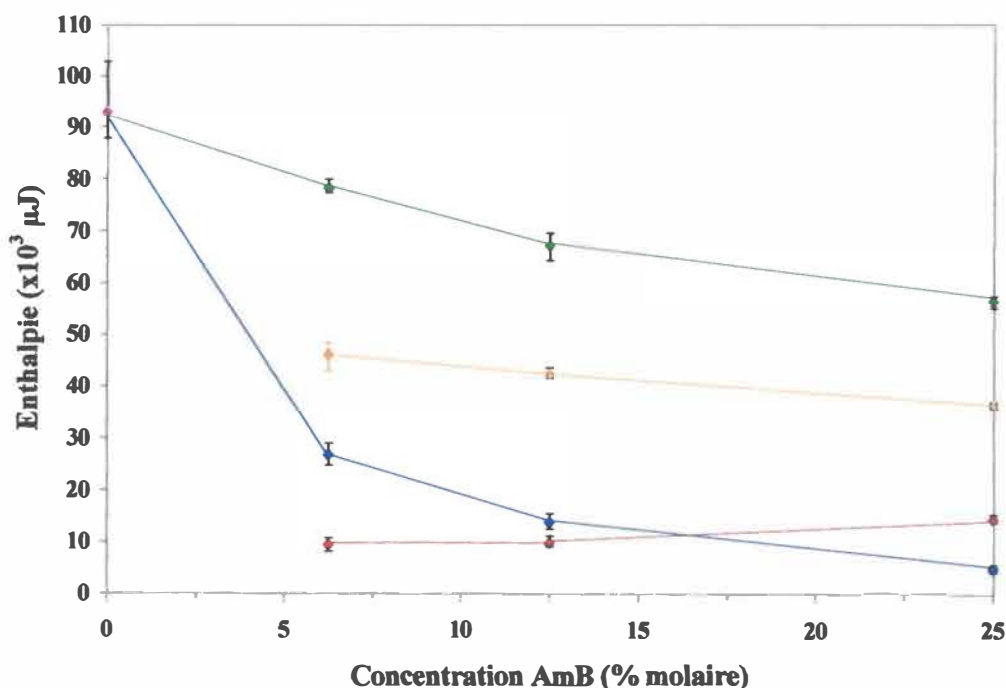


FIGURE 5.7: Graphique de l'enthalpie de transition en fonction de la concentration en AmB (1^{ère} transition en bleu, 2^{ème} transition en orangé, 3^{ème} transition en rouge et enthalpie totale en vert).

Puisqu'il a été établi plus tôt dans cette section que la première transition de phase observée par décomposition correspondait aux molécules de DPPC "pures", nous pouvons relier la valeur d'enthalpie obtenue pour le mélange lipidique pur (point fuchsia) à celle de la première transition de phase observée lorsqu'il y a 6,25% en mole d'AmB dans la matrice lipidique (tracé bleu sur la figure 5.7). Cette courbe montre alors une brusque diminution de l'enthalpie de cette transition entre 0% et 6,25% en mole d'AmB. Cette diminution se poursuit lentement jusqu'à 25% en mole d'AmB et les valeurs demeurent constantes par la suite. Cette diminution plafonne cependant à 25% en mole d'AmB, indiquant possiblement une saturation de la bicouche en antifongique à cette concentration. Le comportement de l'enthalpie de cette transition coïncide donc parfaitement avec ce que nous avons prévu auparavant puisque le nombre de molécules de DPPC de cette phase diminue en fonction de concentration en AmB et ce, au profit de la formation des deux autres phases lipidiques impliquant l'AmB.

La figure 5.7 montre de plus que l'enthalpie associée à la seconde transition de phase diminue légèrement (tracé orange) entre 6,25% et 25% en mole d'AmB tandis que celle de la troisième augmente légèrement (tracé rouge). Cette figure montre en fait que le nombre de molécules de DPPC comprises dans la seconde phase diminue tandis que celui de la dernière transition augmente. Cette dernière observation révèle donc que plus la concentration en AmB augmente, plus le nombre de molécules de DPPC dans la seconde phase diminue (DPPC #2 sur la figure 5.6) tandis que celui des molécules de DPPC emprisonnées entre ces agrégats augmente (DPPC #3 sur la figure 5.6).

Le fait que l'enthalpie de la première transition diminue lentement au-delà de 6,25% en mole d'AmB et que celles de la seconde diminue tandis que celle de la dernière augmente confirme notre hypothèse suggérant l'agrégation des pores membranaires, mise en évidence sur le schéma proposé à la figure 5.6 (DPPC #3). En effet, en fonction de la concentration en AmB, il y aurait moins de lipides purs affectés par l'AmB puisque les pores formés s'agrégeraient entre eux (DPPC #2), au-delà de 6,25% en mole d'AmB. L'organisation des molécules d'AmB sous formes de pores membranaires et sous forme d'agrégation de ces pores est aussi appuyée par les résultats obtenus pour la région de la

prétransition. En effet, cette transition se détecte toujours même à 25% en mole d'AmB signifiant ainsi la persistance de régions lipidiques pures, sans AmB. Rappelons que ce n'est pas ce qui fut observé pour les bicouches contenant chacun des stérols, qui influençaient toute la matrice lipidique.

De façon plus générale, cette figure révèle que l'AmB diminue l'enthalpie totale du processus jusqu'à 25% en mole (tracé vert). Au-delà de cette concentration, aucune diminution n'est observée (données non-présentées). Il est important ici de remarquer que la transition qui affecte le plus l'enthalpie totale est la première transition, donc celle associée aux molécules de DPPC "pures" (DPPC #1 sur la figure 5.6). La diminution de l'enthalpie totale est donc expliquée de la même façon que celle observée pour la première transition : l'incorporation de 6,25% en mole d'AmB diminue brusquement l'enthalpie totale. Au-delà de cette concentration en AmB, la variation enregistrée en fonction de la concentration en AmB montre que l'apparition de grands agrégats d'AmB dans la bicouche semble débiter, puisque l'enthalpie totale ne varie pratiquement plus.

Les résultats calorimétriques présentés jusqu'à maintenant dans ce chapitre montrent que l'effet de l'AmB sur le signal calorimétrique est très différent de celui induit par chacun des stérols. Dans le but de mettre en parallèle l'effet de la présence de l'AmB avec celui induit par chacun des stérols sur l'enthalpie totale en fonction de la concentration, une comparaison des données obtenues est faite. Pour des concentrations semblables, soit 25% en mole pour l'AmB et 28% en mole pour chacun des stérols, la diminution d'enthalpie molaire totale est moins importante lorsqu'il y a incorporation d'AmB que lorsqu'il y a incorporation de l'un ou l'autre des stérols. En effet, pour 25% en mole d'AmB, la valeur d'enthalpie molaire totale obtenue est de $20,8 \pm 1,5$ kJ/mole tandis que celles obtenues pour le cholestérol et l'ergostérol sont respectivement de $10,8 \pm 0,2$ kJ/mole et de $15,8 \pm 1,6$ kJ/mole. Rappelons que l'enthalpie molaire de la DPPC pure est de $34,2 \pm 2,7$ kJ/mole. Ceci indique donc que l'AmB perturbe beaucoup moins son environnement lipidique que ne le font chacun des stérols et/ou que le nombre de molécules de DPPC perturbées est moindre, reflétant ainsi l'agrégation de l'AmB dans la matrice lipidique.

D'autre part, l'article de Gagos *et al.* (2001) récemment paru montre l'effet de l'AmB sur des bicouches de DPPC par calorimétrie et par spectroscopie UV-visible. Dans cet article, pour de très faibles concentrations en AmB, plus précisément sous 1% en mole, la transition de phase survient à une température inférieure à celle de la DPPC pure. Ce comportement n'a pas été observé lors de nos expériences puisque nous n'avons pas été en-dessous de 6,25% en mole d'AmB. Par contre, plus ils augmentent la concentration en AmB, plus la température se déplace vers de plus hautes valeurs et l'AmB induit alors un effet ordonnant sur les chaînes aliphatiques de la DPPC. Ils expliquent ce comportement par la différence au niveau de l'organisation de l'antifongique à l'intérieur de la bicouche. Sous 1% en mole, l'AmB est comme une impureté, distribuée de façon homogène entre les molécules de phospholipide et agit comme les stérols en diminuant l'interaction de Van der Waals entre les molécules de DPPC. Par contre, en augmentant la concentration en AmB, les chances de collision entre plusieurs molécules d'AmB augmentent et le risque de former des agrégats à l'intérieur de la matrice lipidique augmente. Ces agrégats auraient de plus un effet structurant sur les chaînes aliphatiques. Les résultats publiés dans cet article coïncident donc avec ceux présentés par la présente étude.

En résumé, en présence d'AmB, tous les résultats calorimétriques présentés dans ce chapitre indiquent une importante séparation de phase entre des molécules de DPPC pure et celles impliquées dans une interaction avec l'AmB. La DSC montre aussi que l'interaction de l'AmB avec son environnement lipidique est hautement stabilisatrice puisque deux nouvelles phases sont formées et leur température de transition est plus élevée que celle de la DPPC pure. De plus, le fait qu'il y a persistance de la prétransition malgré l'incorporation de 25% en mole d'AmB indique aussi que l'AmB n'est pas distribuée dans la matrice lipidique de façon aussi homogène que les molécules de stérol. Cet antifongique semble donc être sous forme agrégée dans la matrice lipidique. Cette agrégation des molécules d'AmB appuie fortement l'organisation de l'AmB sous forme de pore membranaire, hypothèse émise par plusieurs auteurs de la littérature. Toutefois, même si la calorimétrie n'apporte qu'une preuve indirecte de l'existence d'un tel arrangement, elle montre cependant clairement qu'il existe deux

arrangements différents des molécules d'AmB dans la matrice lipidique, le premier étant fort probablement sous forme de pores membranaires et le second, sous forme d'agrégats de ces pores membranaires. Ces deux arrangements ont été proposés suite à l'analyse détaillée de la région de la transition principale des thermogrammes obtenus pour les mélanges binaires DPPC/AmB.

5.2 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE FTIR

Les courbes de fusion obtenues pour les matrices lipidiques contenant l'AmB (6,25%, 12,5% et 25%) sont présentées à la figure 5.8 sur laquelle le nombre d'onde de la bande de vibration d'élongation symétrique du groupement CH_2 est représenté en fonction de la température. La courbe de fusion de l'échantillon liposomal pur est illustrée en noir alors que celles des mélanges contenant l'AmB sont présentées à l'aide des différentes teintes d'orangé.

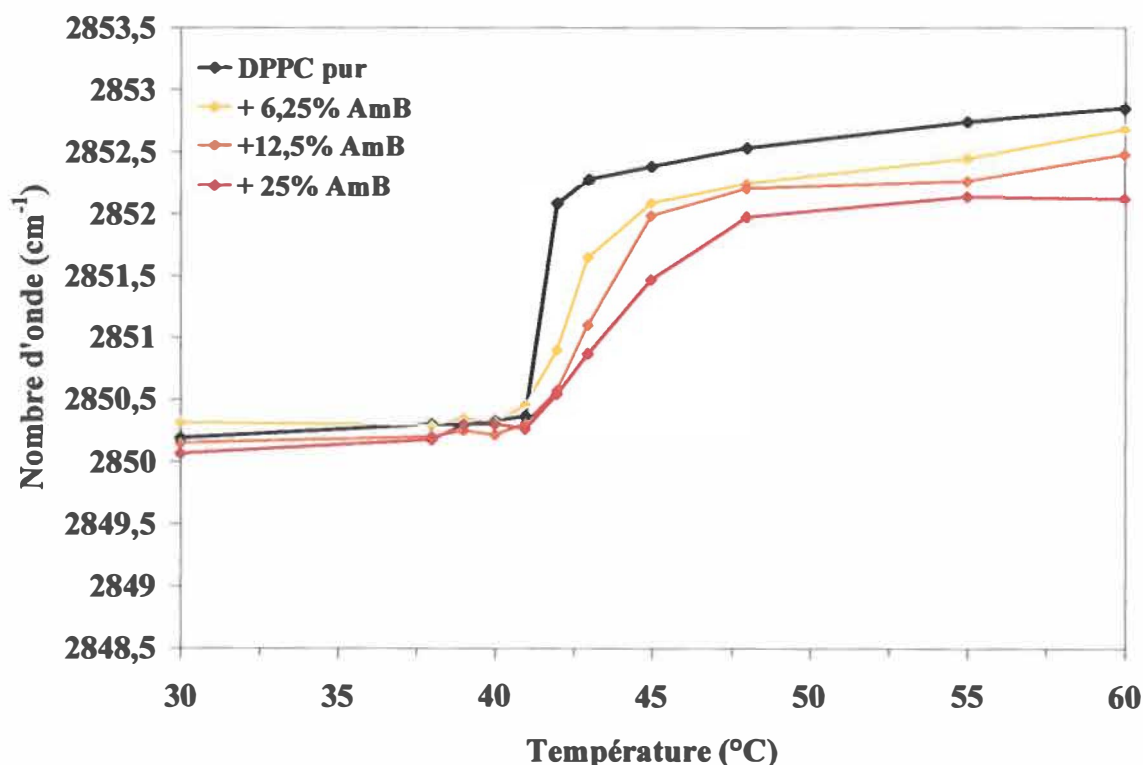


FIGURE 5.8 : Courbes de fusion obtenues pour les bandes de vibration d'élongation symétrique du groupement CH_2 des mélanges DPPC 4 mg/mL/AmB (écart-type moyen de $\pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$).

Dans un premier temps, les résultats présentés à la figure 5.8 indiquent qu'en-dessous de la transition de phase, aucun effet de la part de l'AmB n'est observé sur le nombre d'onde de vibration d'élongation du groupement CH_2 . Ce résultat est très différent de celui obtenu pour le cholestérol ou l'ergostérol (figure 4.7). En effet, il a été observé au chapitre IV que la présence de l'un ou l'autre des stérols engendrait une diminution du nombre d'onde, par rapport aux bicouches de DPPC pur. Dans le cas présent, l'absence d'effet de l'AmB sur ce paramètre, lorsque la bicouche est à l'état gel, peut s'expliquer de deux façons. Premièrement, il suggère que l'AmB soit répartie sous forme agrégée à l'intérieur de la matrice lipidique, contrairement aux stérols, affectant ainsi très peu de molécules de DPPC par rapport aux stérols et mettant en évidence l'importante séparation de phase induite par cet antifongique, comme l'ont fait les résultats calorimétriques. De cette manière, l'ordre conformationnel, le couplage interchaîne ainsi que la librotorsion des molécules de DPPC en interaction avec l'AmB ne devraient donc pas influencer la moyenne des valeurs obtenues et par conséquent, aucun effet sur le nombre d'onde de vibration ne devrait être induit, pour des températures situées sous celle de la transition de phase globale. Deuxièmement, ce résultat pourrait aussi s'expliquer par le phénomène de "mismatch", notion apportée par McMullen *et al.* (1993). Toutefois, ce n'est pas le cas puisque la longueur hydrophobe d'une molécule de DPPC à l'état gel est de 19,7 Å (Zhang *et al.* 1992) et que celle de l'AmB est de 20 Å (Van Hoogevest et de Kruijff 1978); il n'existerait pratiquement aucun "mismatch" entre les molécules d'antifongique et celles du phospholipide.

Dans un deuxième temps, les courbes de fusion illustrées à la figure 5.8 montrent un déplacement de la température de transition globale, passant de $41,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ pour la DPPC pure à environ 44°C pour les bicouches contenant 25% en mole d'AmB. Cette observation est tout à fait concordante avec les données calorimétriques précédemment présentées puisque dans ce cas nous avons vu que plus la concentration en AmB augmente, plus la quantité de DPPC dans la phase pure diminue et celle de la troisième transition augmente. Ceci influencerait donc la température de transition globale vers la valeur associée aux molécules de DPPC interagissant avec l'AmB, c'est-à-dire vers de plus hautes températures.

La comparaison des courbes de fusion présentées à la figure 5.8 montre dans un troisième temps que la présence d'antifongique déplace la température d'atteinte du plateau de fréquence de vibration ($1/\text{nombre d'onde}$) à l'état liquide-cristallin vers des températures supérieures à celle enregistrée pour les bicouches de DPPC pures, soit 41°C . La présence de molécules d'AmB a donc comme conséquence un élargissement de la transition de phase globale du processus thermotropique. Cet élargissement reflète, comme dans le cas des stérols, une diminution de la coopérativité globale de la transition thermotropique. Dans le cas présent, cet élargissement peut aussi faire référence à la présence des deux nouvelles transitions de phase observées en calorimétrie, ce qui élargirait globalement la transition de phase en FTIR.

De plus, en comparant la région de transition observée en présence de 25% en mole d'AmB avec celle observée pour 28% en mole de l'un ou l'autre des stérols (chapitre IV, figure 4.7), on peut s'apercevoir que cette région est beaucoup mieux définie lorsque la bicouche contient l'antifongique que lorsqu'elle contient chacun des stérols. En effet, pour une même concentration, les bicouches contenant le stérol atteignent l'équilibre de la phase fluide (plateau) entre 55°C et 60°C tandis que celles contenant l'AmB atteignent ce plateau vers 48°C . Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus par calorimétrie puisqu'en présence d'AmB, la température de complétion de la transition (température à laquelle se termine la dernière transition) se situe à 49°C (figure 5.2) tandis que celle obtenue en présence de 28% en mole de cholestérol ou d'ergostérol n'est pas encore atteinte à 50°C (chapitre IV, figures 4.1 et 4.5).

La figure 5.8 montre quatrièmement, pour la région de température située au-dessus de la transition de phase globale, qu'il y a une diminution du nombre d'onde de vibration d'élongation des groupements CH_2 en fonction de la concentration d'AmB, ce qui correspond entre autre à un ordonnement induit par la présence d'AmB. Cette variation du nombre d'onde, par rapport à celui enregistré pour la DPPC pur, est cependant moins important que ne l'est celui induit par chacun des stérols sur les chaînes aliphatiques de la DPPC pour des concentrations comparables (chapitre IV, figure 4.7). Ceci indique donc encore une fois la forte probabilité que le nombre de

molécules de DPPC perturbées par l'antifongique soit moindre que le nombre de celles perturbées par les molécules de stérol. De plus, il a été mentionné plus tôt dans cette section, lors de l'analyse des résultats obtenus par FTIR, qu'à l'état gel, pratiquement aucun effet de "mismatch" n'est présent entre les molécules de DPPC et d'AmB. Au-dessus de la transition de phase globale, un scénario différent peut survenir puisque l'épaisseur hydrophobe de la bicouche de DPPC devient alors égale à 26,3 Å en phase L_α (Zhang *et al.* 1992). Par contre, puisque la longueur hydrophobe effective de l'AmB est de 20 Å et que sa structure est très rigide, il en résulte que l'AmB ne s'adapte probablement pas à l'amincissement de la bicouche lipidique. Les molécules de DPPC environnantes influencées par cette molécule rigide demeureraient probablement ordonnées, présentant ainsi moins de conformères gauches que les molécules normalement comprises dans la phase L_α des bicouches lipidiques pures. Ce comportement rappelle celui décrit par le phénomène de "mismatch" amené par McMullen *et al.* (1993).

Les résultats obtenus par FTIR sont donc compatibles avec les résultats calorimétriques en ce sens où les résultats de ces deux techniques suggèrent qu'une séparation de phase a lieu à l'intérieur de la matrice lipidique en présence de molécules d'AmB. Cette séparation de phase est apparente en FTIR par le fait qu'en-dessous de la transition de phase globale, la valeur du nombre d'onde de vibration du groupement CH_2 demeure la même, peu importe qu'il y ait de l'AmB ou non dans la bicouche lipidique. Une autre compatibilité entre les résultats calorimétriques et ceux obtenus par spectroscopie infrarouge est l'effet d'ordonnement induit par l'AmB sur les molécules de DPPC. En calorimétrie, il y avait apparition de deux nouvelles transitions de phases à des températures supérieures à celles de la DPPC pure tandis qu'en spectroscopie FTIR, il y a augmentation globale de l'ordre conformationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC en présence d'AmB. L'AmB induit donc une stabilisation de son environnement lipidique.

5.3 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE RMN- ^2H

Les résultats obtenus concernant l'effet de l'AmB sur l'ordre orientationnel des liens C-D de la DPPC- d_{31} sont illustrés à la figure 5.9, pour les mêmes mélanges de DPPC et d'AmB que nous avons considérés jusqu'à maintenant. Sur cette figure, les valeurs d'écart quadripolaire pour les carbones près de la tête polaire (C2) sont représentées en A, et celles des carbones en bout de chaînes (C16), en B, en fonction de la température. Les courbes obtenues pour la DPPC- d_{31} pure y sont illustrées en noir et celles obtenues pour les trois concentrations en AmB, en orangé.

La figure 5.9 montre en premier lieu que l'augmentation de la température diminue légèrement la valeur de l'écart quadripolaire mesurée, que ce soit près de la tête polaire ou en bout de chaîne. Ce résultat reflète l'augmentation de la fluidité membranaire avec la température donc une augmentation de la liberté de mouvement des chaînes aliphatiques du phospholipide.

En second lieu, cette figure montre aussi que l'incorporation de molécules d'AmB dans la matrice lipidique n'influence pas la valeur de l'écart quadripolaire, que ce soit près de la tête polaire ou en bout de chaîne. Ces résultats sont opposés à ceux obtenus par le groupe Dufourc *et al.* (1984a) qui ont observé une augmentation de la valeur de l'écart quadripolaire, induit par la présence d'AmB, pour des bicouches faites de DMPC. Toutefois, puisque nous utilisons la DPPC et non le DMPC, cette différence de comportement résulte probablement ici de la différence de la longueur des chaînes aliphatiques de la DMPC et de la DPPC, la DPPC engendrant un moins grand "mismatch" avec l'AmB que le DMPC.

Ces résultats RMN indiquent donc à première vue que la présence de molécules d'AmB dans la matrice lipidique n'affecte en rien l'ordre orientationnel des liens C-D aux extrémités des chaînes aliphatiques des molécules de DPPC- d_{31} . Or en FTIR, il a été observé, pour des températures supérieures à 41°C, que l'AmB induisait un effet

d'ordonnement sur les chaînes aliphatiques, résultat qui prouve encore une fois que les deux techniques ne mesurent pas le même paramètre d'ordre (voir chapitre IV).

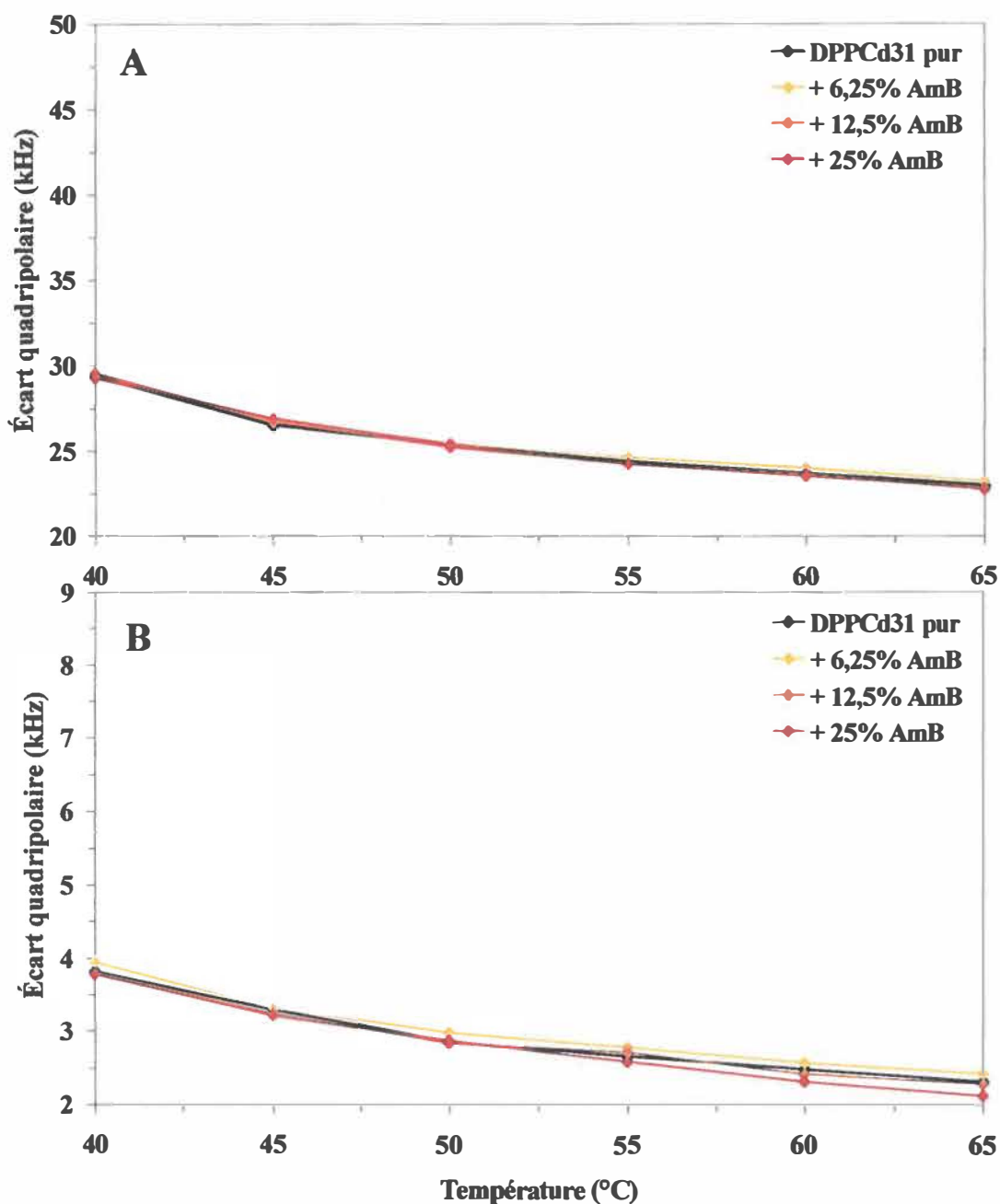


FIGURE 5.9: Écarts quadripolaires obtenus pour le carbone près de la tête polaire (A) et en bout de chaîne (B) en fonction de la température pour les mélanges DPPC-*d*₃₁/AmB (écart-type moyen de $\pm 0,15$ kHz).

Puisqu'aucun effet sur les spectres de Pakés n'est observé et que par DSC et par FTIR nous avons observé des effets de la part de l'AmB sur les paramètres détectés respectivement par ces deux techniques, nous avons été amenés à examiner les spectres originaux. La figure 5.10 montre des spectres originaux, pris à 40°C, pour les bicouches de DPPC- d_{31} pures (A) et pour celles contenant 6,25% (B), 12,5% (C) et 25% (D) en mole d'AmB.

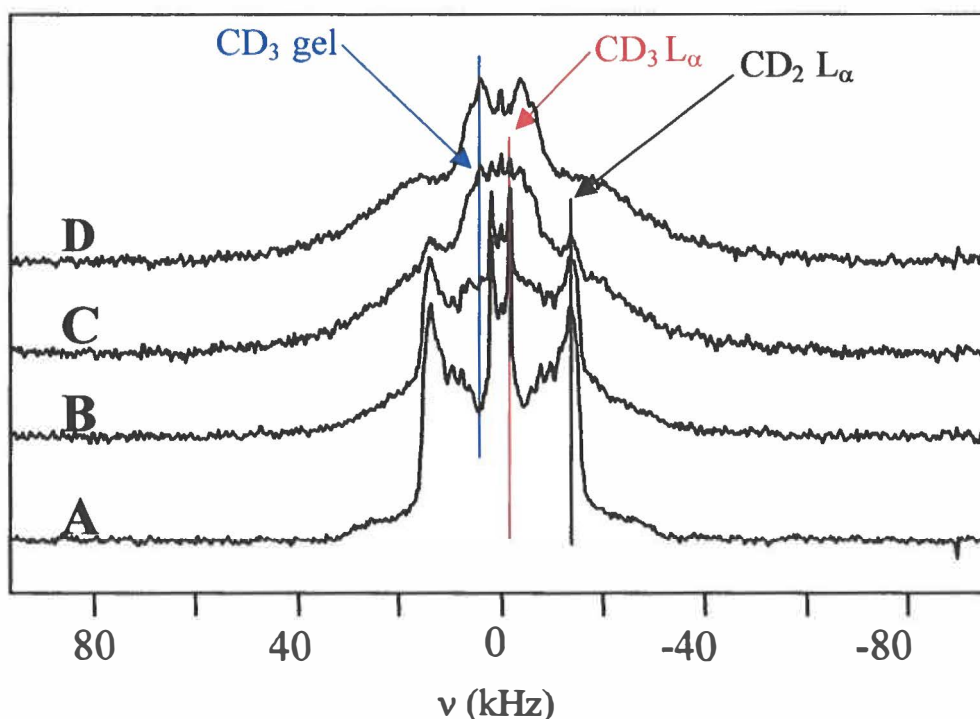


FIGURE 5.10: Spectres originaux de la DPPC- d_{31} pure 20 mg/mL (A) et des bicouches de DPPC- d_{31} 20 mg/mL contenant 6,25% AmB (B), 12,5% AmB (C) et 25% AmB (D), enregistrés à 40°C.

Sur cette figure, il est possible de constater que le spectre obtenu pour les bicouches lipidiques pures (A) correspond tout à fait à l'allure d'un spectre d'une bicouche lipidique à l'état liquide-cristallin donc d'un échantillon ayant une symétrie axiale complète sur lequel un signal d'écart quadripolaire peut être enregistré (chapitre II, section 2.2.2.3). Rappelons qu'à 40°C, l'échantillon phospholipidique pur est à l'état liquide-cristallin puisque comme il a été vu au chapitre IV, section 4.3, la DPPC- d_{31} est complètement en phase L_α à 40°C puisque sa température de transition est de 39,6°C.

Sur ce spectre (A), deux bandes principales sont visibles à partir desquelles les valeurs d'écart quadripolaire présentées à la figure 5.9 précédente ont été calculées. Les bandes extérieures (identifiée $CD_2 L_\alpha$), correspondant au carbone situé près de la tête polaire (C2), donnent un écart quadripolaire de 29 kHz et les bandes intérieures (identifiée $CD_3 L_\alpha$), associée au carbone situé en bout de chaîne (C16), donnent un valeur de 3,8 kHz. Ces deux valeurs d'écart quadripolaire sont donc obtenues lorsque les molécules de DPPC- d_{31} pures sont à l'état liquide-cristallin.

En présence d'AmB, ces deux bandes sont toujours présentes (figure 5.10 B, C et D). Ce résultat coïncide parfaitement avec ceux obtenus par calorimétrie où l'on observe une persistance de la transition de phase associée aux molécules de DPPC dans la phase "pure". Cependant, lorsque la concentration en AmB augmente, ces deux bandes diminuent en intensité, ce qui coïncide avec la diminution de l'enthalpie de la première transition observée par DSC (figure 5.7). L'augmentation de la concentration en AmB résulte en une diminution de l'intensité du signal associé aux molécules de DPPC à l'état liquide-cristallin et fait apparaître une contribution spectrale, à symétrie non-axiale, caractéristique d'une bicouche à l'état gel. Cette symétrie non-axiale se reflète par l'élargissement de la base du spectre et par la perte de définition des bandes associées à chacun des liens C-D, par rapport au spectre des bicouches lipidiques pures à 40°C. La contribution spectrale associée au carbone en bout de chaîne (C16) à l'état gel est identifiée sur la figure 5.10C par la notation " CD_3 -gel".

Cette importante différence entre le spectre des bicouches lipidiques pures (A) et ceux des bicouches contenant l'AmB (B à D) indique que la présence de molécules d'AmB, à 40°C, induit un changement au niveau des molécules de DPPC- d_{31} , changement qui ne se perçoit pas au niveau de la mesure de l'écart quadripolaire. Puisque les bandes utilisées pour le calcul des valeurs d'écart quadripolaire, présentes sur le spectre de la DPPC pure, sont aussi présentes sur le spectre des mélanges DPPC/AmB et demeurent à la même position avec l'augmentation de la concentration en AmB (figure 5.10), aucun effet de l'AmB sur l'écart quadripolaire ne peut être perçu (figure 5.9). Les molécules d'AmB dans la matrice lipidique influencent donc un certain

nombre de molécules de DPPC en les conservant en une phase où il y a moins de liberté de mouvement que celle de la phase lipidique à l'état liquide-cristallin (L_α). Cette nouvelle contribution spectrale serait donc attribuée aux molécules de DPPC en interaction avec les molécules d'antifongique. Plus la concentration en AmB augmente, plus il y a de molécules de DPPC influencées par l'antifongique, ce qui coïncide parfaitement avec les données calorimétriques.

La coexistence des phases gel et liquide-cristalline à 40°C résulte en une distribution des écarts quadripolaires au niveau du spectre original RMN. Cette distribution peut être quantifiée en calculant le moment second (M_2) de chacun des spectres comme décrit au chapitre II, section 2.2.2.3. La figure 5.11 présente les données obtenues pour le second moment (M_2) en fonction de la concentration en AmB.

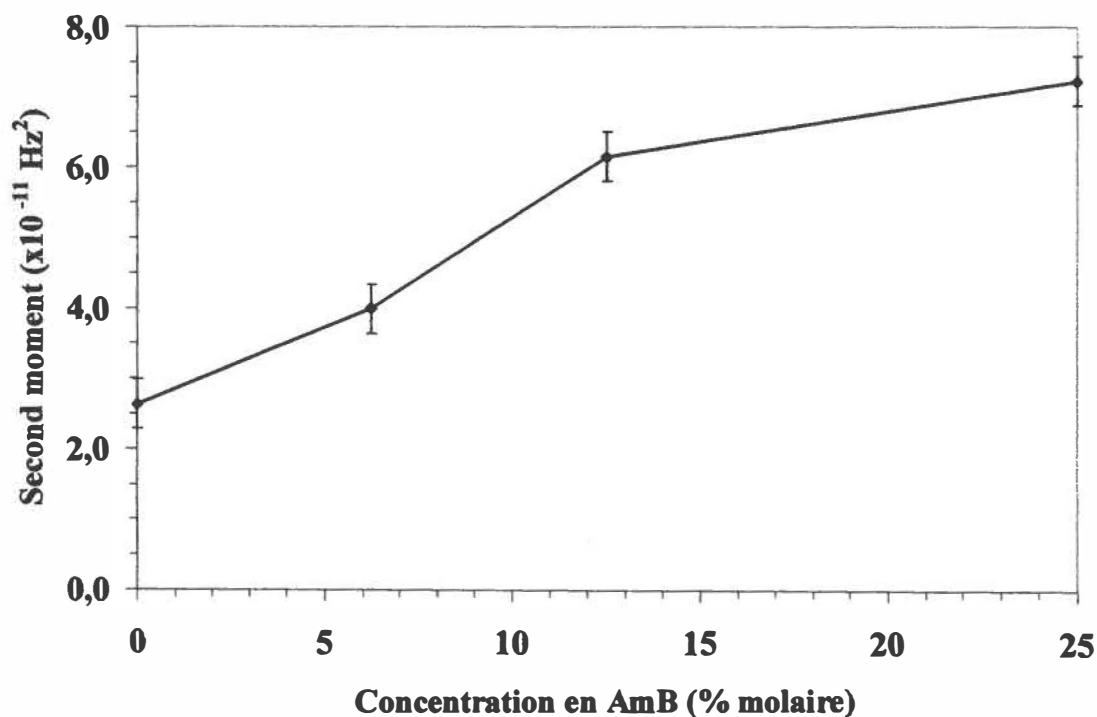


FIGURE 5.11: Variation du second moment spectral des spectres originaux des bicouches DPPC- d_{31} /AmB en fonction de la concentration en AmB ($T=40^\circ\text{C}$).

Sur cette figure, il est possible de voir que les valeurs du second moment augmentent avec la concentration en AmB ce qui reflète l'augmentation de la proportion de spectre "type-gel", donc la quantité de molécules de DPPC interagissant avec l'AmB.

L'interaction entre les molécules de DPPC et les molécules d'AmB, mise en valeur par cette technique, engendre un ordonnement des molécules de phospholipides puisqu'il y a perte de symétrie axiale au niveau du spectre. Cette interaction peut modifier la transition de phase du phospholipide dans une voie où l'environnement lipidique immédiat de l'AmB demeurerait en une phase "gel", même à 40°C. Pour des températures supérieures à 40°C, cette composante large ne se détecte plus dans les spectres originaux. Au-dessus de cette température, les molécules de DPPC deutérées influencées par l'AmB ont donc déjà passé la transition de phase puisque celle-ci se situe aux alentours de 39,6°C. Ces molécules de DPPC se retrouvent alors en une phase fluide par rapport à celle enregistrée à 40°C.

Les données retrouvées dans la littérature concernant les mélanges lipide/impureté montrent aussi des résultats semblables à ceux présentés dans ce chapitre. Par exemple, Davis *et al.* (1983) ont obtenu, pour des bicouches de DPPC- d_{62} contenant un polypeptide synthétique, des spectres correspondant à une superposition de deux composantes, une caractéristique de l'état gel et l'autre, de l'état liquide-cristallin. De leur côté, le groupe de Dufourc *et al.* (1984a) a obtenu lui aussi une superposition de deux composantes au niveau du spectre obtenu pour des bicouches de DMPC contenant l'AmB.

En résumé, les résultats obtenus par cette technique montrent encore une fois l'importante séparation de phase induite par l'AmB sur son environnement lipidique. Deux populations lipidiques sont mises en valeur par RMN- ^2H soit une phase lipidique "pure" ayant la même valeur d'écart quadripolaire que la DPPC pure et une autre, ayant un signal spectroscopique semblable à celui de l'état gel des molécules de DPPC. Cette portion de spectre "type gel" est cependant induite par la présence de molécules d'AmB et non par une faible température de l'échantillon. Les molécules de DPPC interagissant

avec l'AmB se trouvent donc plus ordonnées que celles normalement présentes à l'état liquide-cristallin, ce qui correspond tout à fait aux données obtenues par les deux autres techniques utilisées précédemment.

5.4 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

Comme nous l'avons mentionné au chapitre II, section 2.2.3.1, le spectre d'absorption de l'AmB, observé dans la région spectrale située entre 300 et 450 nm, est très sensible à son environnement moléculaire. Le spectre de l'AmB permettra donc de déterminer l'état d'organisation de l'AmB. Rappelons que lorsque l'AmB est sous forme monomère en solution aqueuse, son spectre est caractérisé par la présence de 4 bandes dont les maxima d'absorption sont situés à 348 nm, 365 nm, 385 nm et 409 nm, cette dernière étant la bande d'absorption principale de l'AmB monomère (chapitre II, figure 2.4). Par contre, avec l'augmentation de l'état d'agrégation de l'AmB en solution aqueuse, la bande principale du spectre se situe à 348 nm et correspond à l'AmB sous forme d'oligomères (micelles) (Barwicz *et al.* 1993). À partir de 10^{-5} M en AmB, une nouvelle bande apparaît à 421 nm et correspond à l'AmB très agrégée (très grands agrégats) (Barwicz *et al.* 1993).

Pour cette technique, un contrôle a été effectué dans un premier temps afin de déterminer la longueur d'onde correspondant à la bande d'absorption caractérisant l'interaction AmB/DPPC. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus pour ce contrôle sont comparés aux spectres enregistrés pour les échantillons liposomaux afin de confirmer si l'AmB interagit avec la DPPC dans la bicouche lipidique. La figure 5.12 présente les spectres obtenus où l'absorption est illustrée en fonction de la longueur d'onde. Le premier spectre (A) correspond au spectre contrôle enregistré pour une solution aqueuse 5% propanol de DPPC 2 mg/mL et d'AmB $5,5 \times 10^{-5}$ M. Le propanol est ici utilisé pour solubiliser le lipide et cette concentration en propanol n'affecte pas l'état d'agrégation de l'AmB. Ce protocole expérimentale est largement utilisé en spectroscopie UV-visible lorsque l'AmB est étudiée (Gruda et Dussault 1988).

Le second spectre (B) correspond à celui enregistré pour l'échantillon liposomal de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en AmB ($6,8 \times 10^{-4} \text{M}$). Cette concentration en AmB a été choisie afin de bien visualiser l'effet de l'AmB sur les bicouches de DPPC tout en conservant une quantité moyenne de molécules phospholipidiques dans les trois phases lipidiques mises en évidence par DSC.

La figure 5.12 montre tout d'abord une bande d'absorption située à 415,6 nm pour le spectre contrôle (A). Cette bande caractérise l'interaction de l'AmB avec la DPPC (Barwicz *et al.* 1991). En milieu lipidique organisé (B), cette bande d'absorption est située à 415,2 nm, correspondant donc à la même bande caractérisant l'interaction de l'AmB avec la DPPC mise en évidence par le contrôle. Ces résultats montrent qu'il y a une interaction entre les molécules de DPPC et celles d'AmB en milieu lipidique organisé, s'ajoutant ainsi aux résultats obtenus précédemment par les autres techniques où des phases lipidiques impliquant l'AmB sont formées.

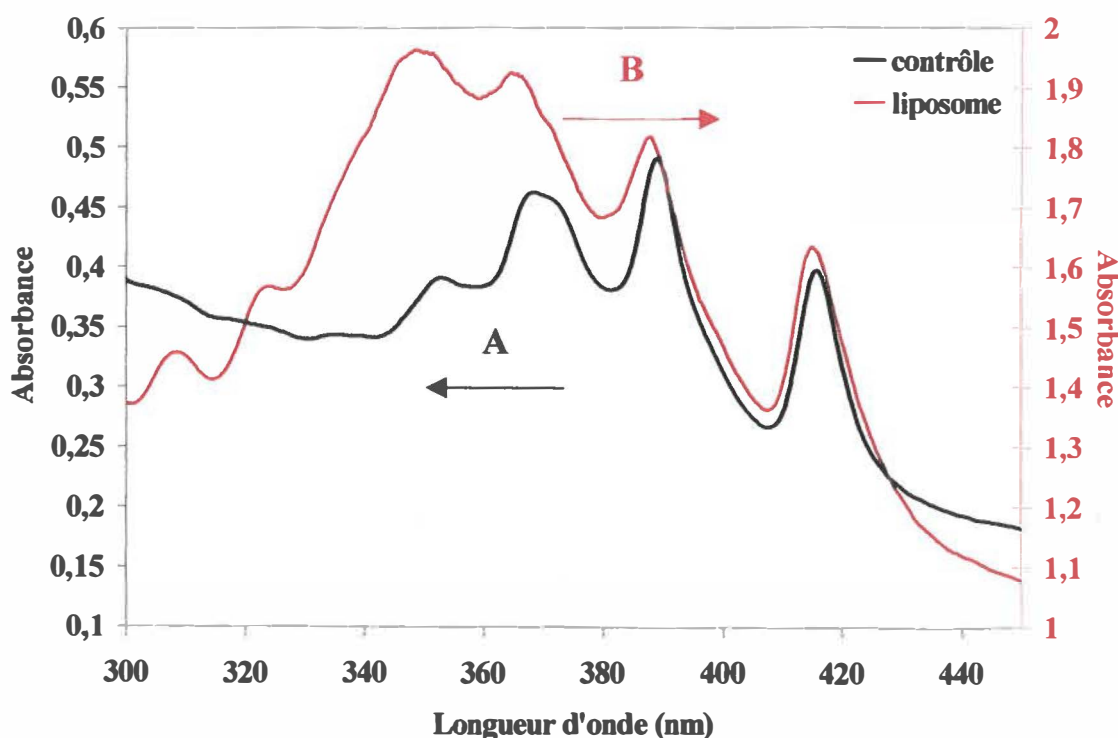


FIGURE 5.12: Spectres UV-visible d'une solution aqueuse 5% propanol de DPPC 2 mg/mL et $5,5 \times 10^{-5} \text{M}$ d'AmB (A, cuvette de 1 cm) et d'un échantillon liposomal de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% ($6,8 \times 10^{-4} \text{M}$) en AmB (B, cuvette de 0,1 cm).

La figure 5.12 indique aussi que l'AmB se retrouve sous forme d'oligomères dans la matrice lipidique puisque la bande située à 348 nm, associée à l'AmB sous forme d'oligomère (Barwicz *et al.*, 1992), est présente sur le spectre. Le fait que ces résultats spectroscopiques montrent que l'AmB se retrouve sous forme d'oligomères en milieu lipidique organisé est cohérent avec le schéma de la matrice lipidique contenant l'AmB proposé à la section 5.1.2 (figure 5.6) qui montre une organisation de l'AmB sous forme de pores membranaires. Par ailleurs, Barwicz *et al.* (1993) ont démontré que l'oligomère de l'AmB représenté par la bande à 348 nm correspond à la l'AmB sous forme de pore. De plus, un article récemment publié par Gruszecki *et al.* (2002) montre de façon directe, par microscopie à force atomique, la présence de pores membranaires dans une monocouche de DPPC, ce qui peut appuyer l'interprétation donnée ci-dessus.

En résumé, cette technique a permis de s'assurer de l'état d'organisation de l'AmB dans les bicouches lipidiques. Il en ressort que les molécules d'AmB interagissent directement avec les molécules de DPPC et sont présentes dans la matrice lipidique sous forme d'oligomères, correspondant probablement aux pores membranaires d'AmB. Les résultats fournis par la spectroscopie UV-visible confirment donc ceux obtenus par les autres techniques utilisées.

5.5 CONCLUSIONS PARTIELLES

À la lumière des résultats présentés dans ce chapitre, nous apportons la preuve qu'en l'absence de stérol, l'AmB interagit avec des bicouches phospholipidiques en induisant une importante séparation de phase à l'intérieur de la matrice lipidique. L'interaction de l'antifongique avec les molécules de DPPC se veut structurante puisque comme il a été démontré en calorimétrie, deux nouvelles transitions de phases apparaissent en présence d'AmB. Ces nouvelles transitions sont aussi reflétées en infrarouge puisqu'il y a un élargissement de la transition de phase globale, signifiant une diminution de la coopérativité du processus thermodynamique associé aux phases mises en évidence par DSC.

L'effet rigidifiant de l'AmB sur son environnement lipidique a aussi été observé par les spectroscopies FTIR et RMN. En effet, la première spectroscopie montre une augmentation globale de l'ordre conformationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC au-dessus de la transition de phase globale, reflétant ainsi une diminution du nombre de conformères gauches, si on compare ces données à celles de la DPPC pure. Par RMN- ^2H , aucune variation de l'écart quadripolaire par l'AmB n'a été observée, ne mettant ainsi en évidence, à première vue, aucun effet sur l'ordre orientationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC. Par contre, l'existence d'une composante associée à des molécules de phospholipides qui seraient organisées de telle sorte que leurs caractéristiques dynamiques se rapprocheraient de celles d'une bicouche phospholipidique pure à l'état gel a été observée. Cette technique supporte donc elle aussi l'évidence que l'AmB rigidifie son environnement lipidique et que l'AmB induit une séparation de phase dans la bicouche.

Toutes ces techniques apportent de plus des informations quant à la distribution des molécules d'AmB à l'intérieur de la matrice lipidique. La calorimétrie amène cette évidence par la persistance de la prétransition, même pour une concentration en AmB de 25%. L'existence d'une séparation de phase importante entre des molécules de DPPC de la phase "pure" et celles influencées par l'antifongique indique aussi fortement que l'AmB n'est pas distribuée de façon homogène à l'intérieur de la bicouche lipidique, comme l'est chacun des stérols. La spectroscopie FTIR apporte aussi des indices à ce sujet puisque qu'aucun effet à l'état gel sur l'ordre conformationnel n'est observé. L'AmB serait plutôt distribuée sous forme d'agrégats (oligomères), possiblement sous forme de pores membranaires, ce qui pourrait être compatible avec l'hypothèse de formation de pores à l'intérieur des membranes biologiques même en l'absence de stérol membranaire, hypothèse discutée plus tôt au chapitre I.

De son côté, la spectroscopie UV-visible prouve effectivement que l'AmB est présente sous forme d'oligomères dans la bicouche lipidique, en interaction avec la DPPC. Puisque ces résultats sont compatibles avec l'existence de pores membranaires sous l'influence de l'environnement lipidique, cette technique apporte donc des éléments

qui vont dans le sens de l'interprétation proposée pour les résultats obtenus par calorimétrie, par FTIR et par RMN- ^2H .

À la lumière de l'analyse des résultats présentés dans ce chapitre, nous proposons un modèle, qui n'est pas statique, de répartition des molécules d'AmB dans la bicouche lipidique (figure 5.6) dans lequel les molécules d'antifongique se retrouvent sous forme de pores membranaires et sous formes d'agrégats de ces pores membranaires.

CHAPITRE VI

BICOUCHES LIPIDIQUES MIXTES DPPC/Cholestérol/AmB

L'interaction possible entre l'AmB et le cholestérol à l'intérieur des membranes biologiques est la base même d'une des hypothèses expliquant la toxicité de cet antifongique. Nous avons donc voulu, à la lumière des méthodes expérimentales que nous avons utilisées jusqu'ici, caractériser cette interaction au sein de bicouches de DPPC et ce, dans le but de la comparer à celle prévalant possiblement entre l'AmB et l'ergostérol à l'intérieur de la matrice lipidique, étude qui fera l'objet du chapitre suivant.

6.1 RÉSULTATS CALORIMÉTRIQUES

La présence simultanée du cholestérol et de l'antifongique dans la matrice lipidique peut changer le signal thermodynamique enregistré, dépendamment de la façon dont ces constituants interagissent l'un avec l'autre, ou encore avec le phospholipide, dans la matrice lipidique. Les mélanges ternaires contenant la DPPC, le cholestérol ainsi que l'AmB ont donc été étudiés par calorimétrie et les résultats sont présentés dans cette section. Pour cette étude, trois concentrations en cholestérol ont été utilisées afin de mettre en évidence l'effet de la variation de la concentration en cholestérol sur l'interaction de l'antifongique avec le phospholipide. Les concentrations en cholestérol sont de 12,5% et 28% en mole par rapport au DPPC et celles de l'AmB sont les mêmes que celles utilisées au chapitre précédent, soit 6,25%, 12,5% et 25% en mole par rapport au DPPC. Les résultats obtenus seront présentés en trois sous-sections, selon la concentration en cholestérol utilisée, afin de faciliter la lecture et la compréhension des résultats calorimétriques.

6.1.1 Mélanges ternaires contenant 12,5% en mole de cholestérol.

Il a été vu au chapitre IV que l'augmentation de la concentration en cholestérol modifiait le signal calorimétrique de la DPPC. Il est donc prévisible que cela modifiera l'effet de l'AmB sur le signal enregistré, mais est-ce que les phases rencontrées pour les mélanges DPPC/AmB seront les mêmes avec 12,5% en mole de cholestérol dans la bicouche? Sur la figure 6.1, le thermogramme en fuchsia correspond au mélange binaire DPPC/12,5% cholestérol et ceux en orangés, aux mélanges ternaires contenant l'AmB.

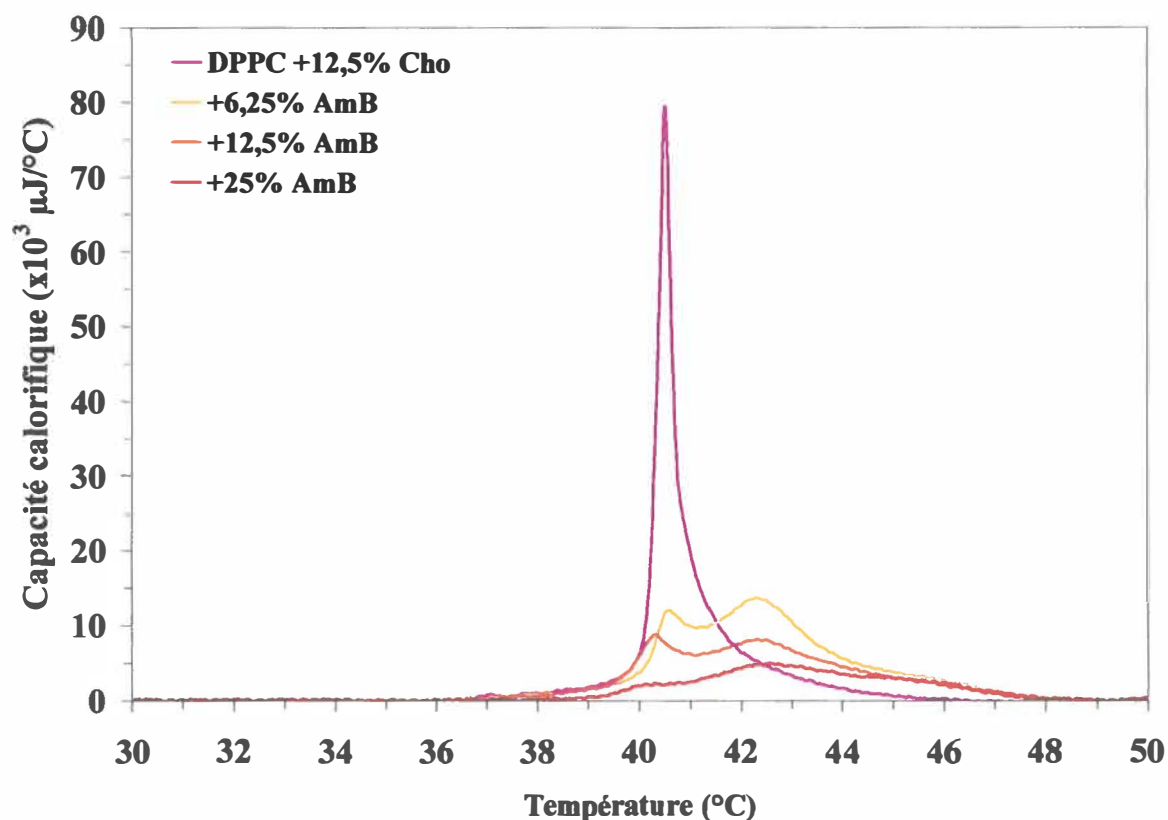


FIGURE 6.1 : Thermogrammes des bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole de cholestérol avec et sans AmB.

Afin de faciliter la lecture de cette section, l'analyse de ces thermogrammes se fera en deux parties: celle de la région de températures comprenant la prétransition et celle de la transition principale.

a) prétransition

L'analyse de la région de température comprise entre 30°C et 36°C, pour le mélange binaire DPPC/12,5% cholestérol (thermogramme fuchsia), montre la disparition de la prétransition normalement enregistrée pour les bicouches de DPPC pure. Il a été mentionné au chapitre IV que la disparition de la prétransition provenait de la présence du cholestérol à l'intérieur de la matrice lipidique, avec aussi peu que 5% en mole de cholestérol (McMullen et McElhaney 1995). De plus, au chapitre V (figure 5.2), il avait été observé que l'AmB seule ne provoquait pas cette disparition, même pour une concentration en AmB de 25% en mole. Le fait que la prétransition soit absente pour les bicouches contenant à la fois le cholestérol et l'AmB indique donc fortement que l'effet du cholestérol sur les têtes polaires (chapitre IV) persiste même en présence de l'antifongique.

b) transition principale

Dans la région de la transition principale, il est possible de voir sur la figure 6.1 qu'il y a une importante diminution du signal enregistré avec l'incorporation de 6,25% en mole d'AmB. De plus, il y a élargissement de la base du signal vers les températures supérieures, par rapport au signal obtenu pour le mélange binaire (figure 6.1, thermogramme fuchsia). Avec l'augmentation de la concentration en AmB, ce signal diminue et s'élargit globalement. Il semble donc y avoir plus d'une transition sous le tracé original.

Afin de mieux définir cette région lipidique, une décomposition a été effectuée sur tous ces thermogrammes. La figure 6.2 montre le résultat de décomposition pour un thermogramme-type obtenu pour un mélange lipidique contenant 12,5%cholestérol et 25%AmB, qui représente les composantes de décomposition obtenues pour les deux autres concentrations en AmB utilisées. Cette figure montre que trois composantes sont nécessaires afin de simuler de façon optimale le tracé original.

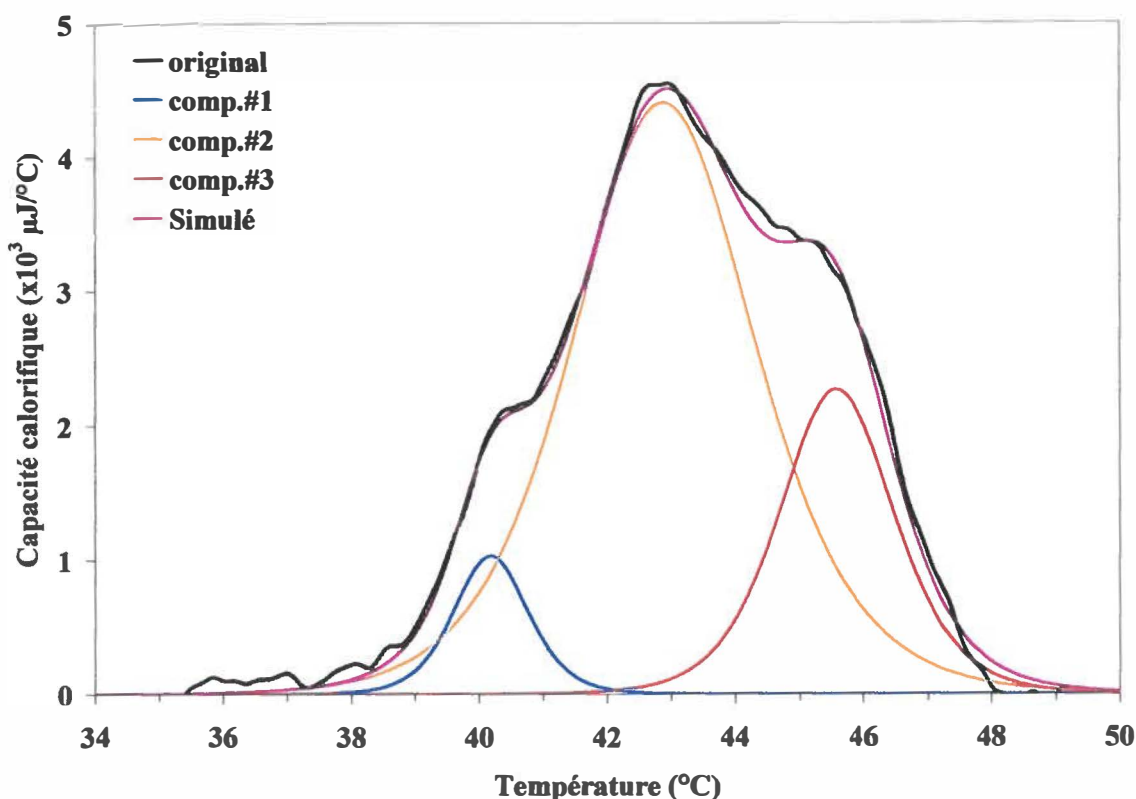


FIGURE 6.2: Thermogramme décomposé pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole de cholestérol et 25% en mole d'AmB.

Afin de suivre le comportement de ces transitions de phases en fonction de la concentration en AmB, la valeur des paramètres thermodynamiques obtenus pour ces transitions de phase est illustrée à la figure 6.3. Sur cette figure, les données obtenues pour les deux transitions de phases observées pour le mélange binaire DPPC/12,5% cholestérol ont été identifiées sur l'axe des ordonnées: la région lipidique pauvre en cholestérol est représentée par un point noir et la région riche, par un point fuchsia. La variation des valeurs de température de transition en fonction de la concentration en AmB est présentée en A et en B, celle des valeurs de largeur à mi-hauteur ($\Delta T_{1/2}$). La courbe en bleu est associée à la première composante observée, celle en orange à la seconde et celle en rouge, à la troisième composante donc à la transition dont la température est la plus élevée.

Le graphique 6.3A montre tout d'abord que la température de la première transition obtenue à 6,25% en mole d'AmB (courbe bleue) est située à 40,6°C, celle de

la seconde à 42,2°C et celle de la dernière transition, à 45,5°C. La température de ces trois transitions de phase tend à demeurer constante avec l'augmentation de la concentration en AmB.

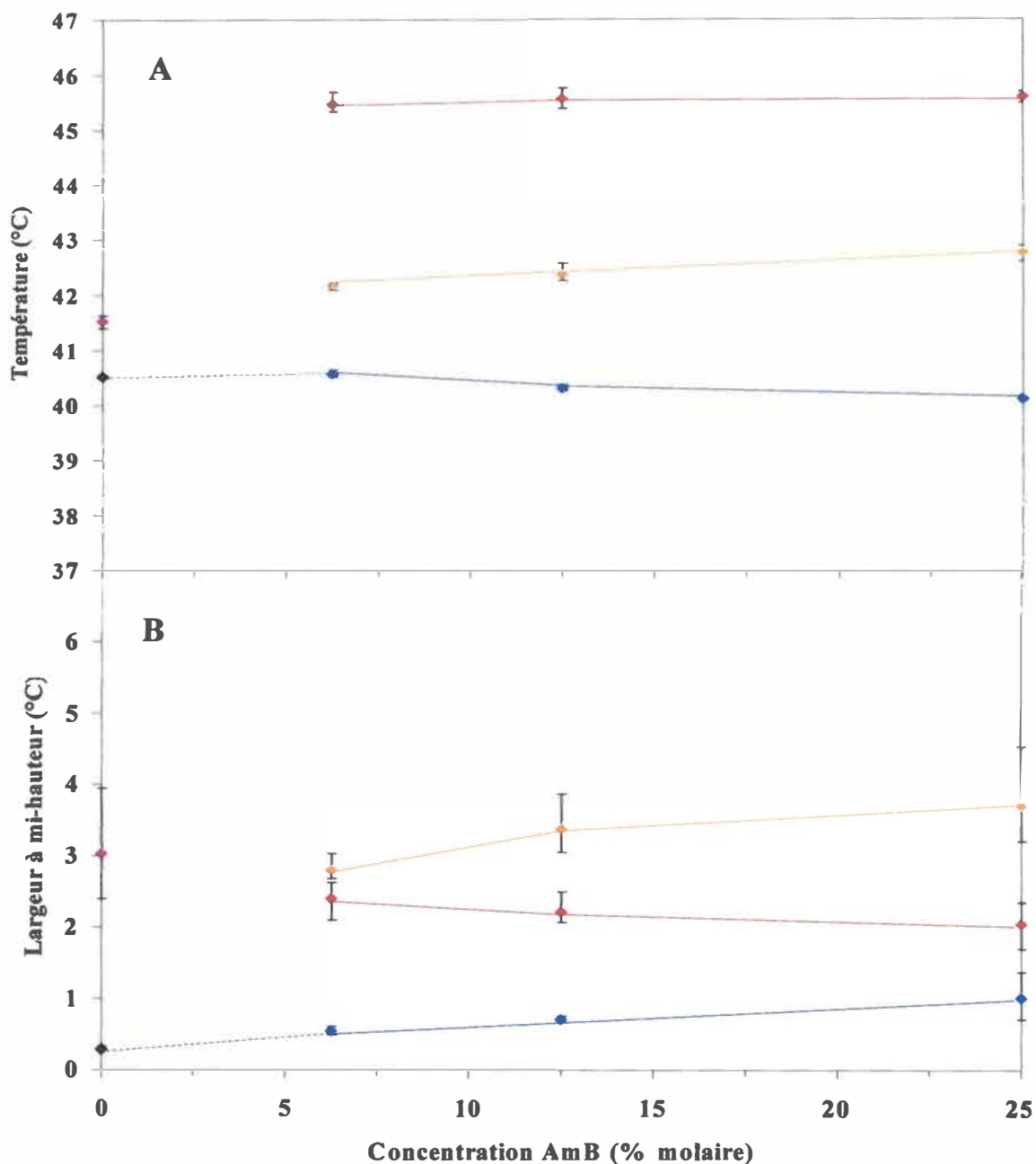


FIGURE 6.3: Températures de transition (A) et largeur à mi-hauteur (B) en fonction de la concentration en AmB, pour les trois transitions de phase résultant de la décomposition des thermogrammes pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole de cholestérol et d'AmB.

Par la suite, il est possible de constater, en B, que la valeur de la largeur à mi-hauteur de la première transition, pour une concentration en AmB de 6,25% en mole, est de 0,5°C (courbe bleue), celle de la seconde est de 2,8°C (courbe orange) et celle de la dernière transition, de 2,4°C (courbe rouge). Avec l'augmentation de la concentration en AmB, ces valeurs ne varient pratiquement pas compte tenu de la valeur des écarts-type moyens.

Le fait que la valeur de la température de transition et de la largeur à mi-hauteur des trois transitions de phase enregistrées pour les bicouches DPPC/12,5% cholestérol contenant l'AmB demeurent constantes en fonction de la concentration en AmB indique que les phases formées sont de même nature, peu importe la concentration en AmB.

Les graphiques 6.3A et B montrent aussi que la température de transition ainsi que la largeur à mi-hauteur de la première transition de phase rencontrée (courbe bleue), pour une concentration de 6,25% en mole d'AmB, correspondent aux valeurs trouvées pour le mélange binaire DPPC/12,5%cholestérol, caractérisant la transition de phase de la région pauvre en cholestérol (figure 6.3, point noir à 0% AmB). Par conséquent, cette transition, observée pour les mélanges contenant à la fois 12,5% cholestérol et l'AmB, peut être associée à celle des régions lipidiques pauvres en cholestérol. Ce résultat est très surprenant compte tenu du mode de préparation des liposomes où toutes les composantes sont forcées de se retrouver dans la bicouche lipidique. Or, il appert que cette phase, pauvre en cholestérol, est toujours présente même pour une concentration en cholestérol de 12,5% en mole et pour 25% en mole d'AmB. Cette observation est compatible avec le fait que la prétransition ne soit pas visible lorsque la bicouche contient à la fois le cholestérol et l'AmB puisque le cholestérol semble toujours exercer son effet sur la DPPC. Nous pouvons donc conclure, à première vue, que le cholestérol n'interagit pas directement avec les molécules d'AmB présentes dans la bicouche lipidique.

Les deux autres transitions de phase observées, situées à des températures supérieures à la première transition rencontrée sont associées aux molécules de DPPC en

interaction avec l'antifongique puisqu'elles apparaissent seulement en présence d'AmB. Les molécules de DPPC participant à ces deux transitions de phase se retrouvent plus stabilisées ou plus structurées que les molécules de DPPC qui participent à la première transition de phase, puisque leur température est supérieure à celle-ci.

Afin de déterminer si la présence du cholestérol influence l'interaction existant entre les molécules de DPPC et celles d'AmB de ces deux phases lipidiques, le tableau 6.1 présente les données recueillies pour la température et la largeur à mi-hauteur de chacune des trois transitions obtenues par décomposition pour le mélange binaire DPPC/AmB et celui contenant à la fois 12,5% en mole de cholestérol et l'AmB. La notation "T_n", où n = 1 à 3, fait référence à la transition obtenue suite à la décomposition. À l'aide de ce tableau, il est possible de comparer les données obtenues pour ces deux mélanges lipidiques et de déterminer si le cholestérol influence les deux transitions de phase situées aux températures les plus élevées, illustrant deux interactions différentes DPPC/AmB (voir chapitre V, figure 5.6).

Ce tableau révèle premièrement une différence entre ces deux mélanges lipidiques pour la valeur de température de transition et celle de la largeur à mi-hauteur de la première transition de phase rencontrée. Ceci met en évidence tout simplement la différence existant entre la phase pure en DPPC des bicouches DPPC/AmB et la phase pauvre en cholestérol des bicouches DPPC/12,5%cholestérol/AmB analysée précédemment au chapitre IV.

Deuxièmement, le tableau 6.1 montre que la valeur de température de transition obtenue pour les deux transitions de phase situées aux températures les plus élevées est la même pour ces deux mélanges lipidiques, peu importe la concentration en AmB, ce qui indique que les phases formées impliquant l'AmB et la DPPC, en absence ou en présence de cholestérol, sont les mêmes. Ce résultat est en accord avec ceux publiés de Matsumori *et al.* (2002) qui ont montré, par spectroscopie RMN-³¹P, que le même type de canal est présent pour les bicouches de PC d'oeuf contenant l'AmB avec ou sans cholestérol.

TABLEAU 6.1

Comparaison des valeurs de la température de transition et de la largeur à mi-hauteur pour les mélanges lipidiques contenant seulement l'AmB ou 12,5%cholestérol/AmB.

[AmB] —→		DPPC/AmB				DPPC/12,5%Cho/AmB			
		0%	6,25%	12,5%	25%	0%	6,25%	12,5%	25%
T_m	T_1 ($\pm 0,1^\circ\text{C}$)	41,5	41,5	41,4	41,4	40,5	40,6	40,3	40,1
	T_2 ($\pm 0,1^\circ\text{C}$)	-	42,6	42,5	42,7	41,5	42,2	42,4	42,8
	T_3 ($\pm 0,2^\circ\text{C}$)	-	44,9	44,8	45,3	-	45,5	45,6	45,6
$\Delta T_{1/2}$	T_1 ($\pm 0,1^\circ\text{C}$)	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,7	1,0
	T_2 ($\pm 0,3^\circ\text{C}$)	-	1,8	1,8	1,9	3,0	2,8	3,4	3,7
	T_3 ($\pm 0,2^\circ\text{C}$)	-	3,8	3,8	3,9	-	2,4	2,2	2,0

Cependant, ce tableau montre aussi que la valeur des largeurs à mi-hauteur est différente entre ces deux mélanges lipidiques et ce, pour les trois transitions de phase observées. En effet, par rapport au mélange binaire DPPC/AmB, la présence du cholestérol fait augmenter la valeur du $\Delta T_{1/2}$ de la seconde transition (diminue la coopérativité) et diminuer celle de la dernière transition (augmenter la coopérativité). Il semble donc que la présence simultanée du cholestérol et de l'AmB influence les trois phases lipidiques enregistrées puisque leur coopérativité est modifiée par rapport aux bicouches ne contenant pas de cholestérol, sans pour autant que la température associée à chacune de ces transitions ne soit affectée.

Dans le but d'obtenir d'autres informations complémentaires aux courbes de températures et de la largeur à mi-hauteur de ces transitions présentées précédemment, la variation des valeurs d'enthalpie de ces transitions en fonction de la concentration en AmB est mise en évidence sur la figure 6.4. Sur cette figure, la courbe d'enthalpie

illustrée en bleu correspond à celle de la première transition de phase, celle en orange est attribuée à la deuxième transition et celle en rouge, à la dernière. Le tracé en vert pour sa part correspond à l'enthalpie totale du processus thermodynamique.

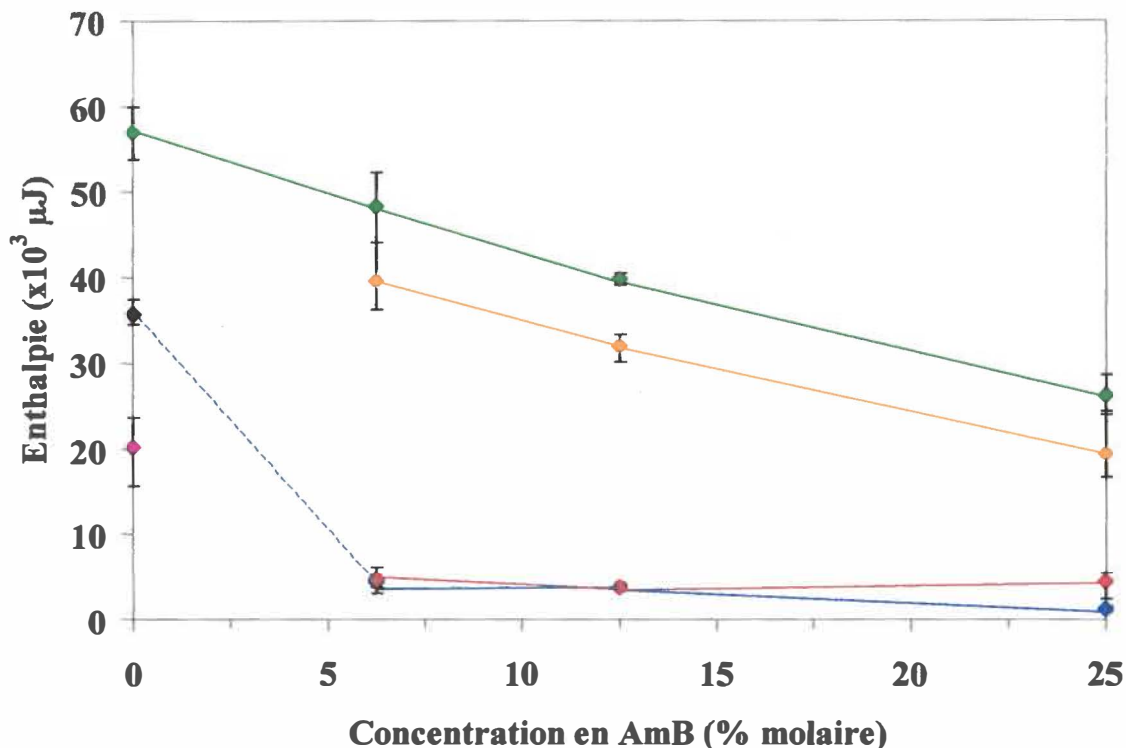


FIGURE 6.4: Enthalpie de transition en fonction de la concentration en AmB pour la première transition de phase (courbe bleue), la seconde (courbe orange), la dernière transition (courbe rouge) et l'enthalpie totale (courbe verte) pour les mélanges DPPC/12,5%cholestérol/AmB.

Puisqu'il a été établi, à l'aide des graphiques 6.3A et B, que la première transition de phase observée par décomposition correspond aux molécules de DPPC des régions pauvres en cholestérol, ne contenant pas d'AmB, la valeur d'enthalpie obtenue pour le mélange binaire DPPC/12,5% cholestérol peut être reliée à celle de la première transition de phase observée lorsqu'il y a aussi 6,25% en mole d'AmB dans la matrice lipidique (courbe bleue). Cette figure montre alors une brusque diminution de l'enthalpie entre 0% et 6,25% en mole d'AmB. Par la suite, les valeurs demeurent pratiquement constantes. Nous voyons donc, par la courbe d'enthalpie de cette transition, qu'une quantité moindre d'AmB est requise pour l'atteinte du plateau, par

rapport aux mélanges contenant uniquement l'AmB, puisque dans ce dernier cas, le plateau était atteint à 25% en mole d'AmB (chapitre V, figure 5.7). La présence du cholestérol semble donc forcer l'AmB à interagir avec les molécules de DPPC, autrement dit, l'organisation de l'AmB sous forme de pores membranaires est facilitée lorsque la bicouche contient 12,5% en mole de cholestérol, sans nécessairement que ce dernier soit impliqué dans une interaction directe avec ces pores membranaires. Cette interprétation peut être appuyée par un article de revue récemment publié de Barenholz (2002) qui montre que le cholestérol joue un rôle important dans l'organisation latérale des composantes membranaires, dont les protéines. Il n'est donc pas exclu que le cholestérol joue un rôle semblable vis-à-vis les molécules d'AmB. De plus, Vertut-Croquin *et al.* (1983) ont démontré par des études de dichroïsme circulaire et de perméabilité sur des liposomes de PC d'œuf, que la présence de stérol membranaire augmentait l'interaction de l'AmB vis-à-vis ces bicouches, par rapport aux bicouches sans stérol.

De leur côté, les deux autres transitions de phase observées sont caractérisées par un comportement des valeurs d'enthalpie sensiblement différent. L'enthalpie de la seconde transition tend à diminuer entre 6,25% et 25% en mole d'AmB (courbe orange) et c'est elle qui influence majoritairement l'enthalpie totale au-delà de 6,25% en mole d'AmB. Quant à l'enthalpie de la troisième transition, elle demeure stable avec l'augmentation de la concentration en AmB (courbe rouge).

Cette figure montre donc que l'AmB interagit avec les molécules de DPPC, ce qui engendre une diminution du nombre de molécules de DPPC dans la phase pauvre en cholestérol, pour une concentration en AmB de 6,25% en mole. Au-delà de cette concentration, c'est plutôt la seconde phase lipidique qui est influencée par la présence de l'AmB, contrairement au comportement observé pour les bicouches binaires DPPC/AmB (chapitre V, figure 5.7). Puisque la seconde phase enregistrée correspondrait aux molécules de DPPC en interaction avec les pores membranaires d'AmB et que l'enthalpie de cette phase diminue en fonction de la concentration en AmB, nous pouvons suggérer que la présence du cholestérol semble favoriser

l'agrégation des pores membranaires, en comparaison des bicouches ne contenant que l'AmB.

À la lumière de tous ces résultats calorimétriques, le schéma proposé au chapitre V (figure 5.6) concernant l'organisation de l'AmB en pores membranaires et en agrégats de ces pores membranaires dans la matrice lipidique peut être appliqué aussi aux bicouches contenant à la fois 12,5% en mole de cholestérol et l'AmB puisque les transitions de phase se présentent aux mêmes températures. Toutefois, en présence de cholestérol, l'interaction DPPC/AmB semble être modifiée puisque premièrement, la quantité d'antifongique nécessaire à l'obtention du plateau sur le graphique d'enthalpie est moindre lorsque la bicouche contient 12,5% en mole de cholestérol que lorsqu'elle n'en contient pas. Ce résultat est compatible avec les données publiées de Cotero *et al.* (1998) qui montrent, par des mesures de conductance sur des bicouches de DMPC, que plus la concentration en cholestérol augmente, plus la quantité d'AmB nécessaire pour induire une différence de potentiel (conductance) est moindre. Leurs résultats montrent donc que la présence du cholestérol dans la bicouche sensibilise celle-ci vis-à-vis l'antifongique, comme le laissent supposer nos résultats. Deuxièmement, nous avons vu que la coopérativité des deux transitions de phase, associées aux molécules de DPPC en interaction avec l'AmB, est affectée par la présence du cholestérol dans la matrice lipidique, sans pour autant que leur température varie en fonction de la concentration en AmB. Ceci indique donc que le cholestérol, contenu dans l'environnement lipidique des pores membranaires d'AmB, influencerait les lipides impliqués dans la structure de ces pores, et non l'AmB directement.

6.1.2 Mélanges ternaires contenant 28% en mole de cholestérol.

Comme il a été vu au chapitre IV, pour une concentration de 28% en mole de cholestérol, il ne reste pratiquement plus de régions phospholipidiques non-influencées par le cholestérol et par conséquent, le signal calorimétrique enregistré devient alors très faible. En fait, pour cette concentration, la bicouche se retrouve pratiquement

uniquement en phase L_o . En présence d'AmB, les thermogrammes obtenus sont illustrés à la figure 6.5. Sur cette figure, le thermogramme en fuchsia correspond au mélange binaire DPPC/28% cholestérol et ceux en orangés, aux mélanges contenant l'AmB.

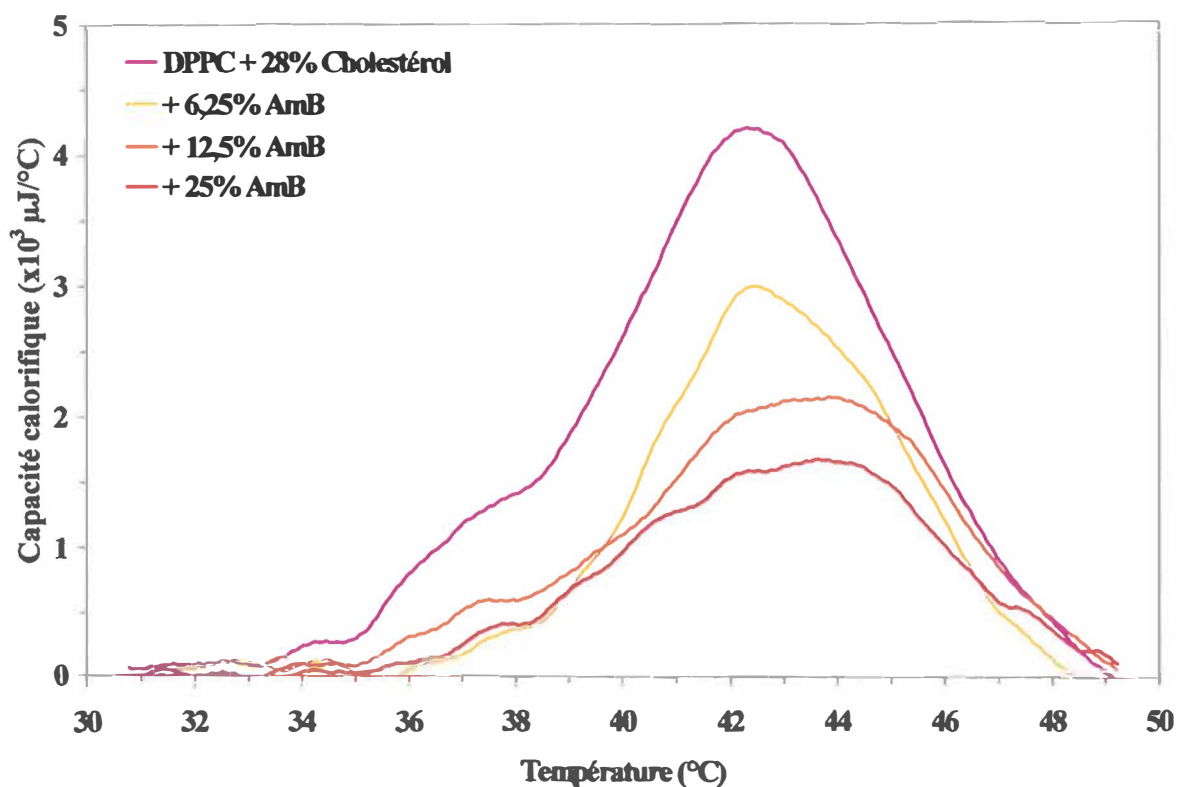


FIGURE 6.5: Thermogrammes des bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 28% en mole de cholestérol avec et sans AmB.

Cette figure montre que pour les bicouches sans AmB (thermogramme fuchsia), une large transition est observée, centrée aux alentours de 42,5°C. L'incorporation de l'AmB diminue ce signal enregistré sans toutefois le déplacer significativement. Puisque le rapport signal sur bruit est trop faible pour exécuter une décomposition adéquate, les résultats obtenus pour les bicouches contenant à la fois 28% en mole de cholestérol et l'AmB ne peuvent pas être analysés aussi en profondeur que ne l'ont été ceux à 12,5% en mole de cholestérol. Cependant, la diminution du signal enregistré en fonction de la concentration en AmB indique qu'il y a encore un effet de l'AmB sur la transition de phase et le signal persiste, même avec 28% en mole de cholestérol et 25% en mole d'AmB! Rappelons qu'aucun signal calorimétrique n'est enregistré pour des bicouches contenant plus de 50% en mole de cholestérol (McMullen *et al.* 1993, Huang

et al. 1993). Le fait que la transition de phase soit toujours perceptible même avec 53% "d'impureté" dans la bicouche met ici aussi en évidence la structuration de l'environnement lipidique par l'antifongique.

6.1.3 Comportement global des bicouches contenant le cholestérol et l'AmB.

D'une façon plus générale, il est possible de suivre l'influence de la présence de l'antifongique sur les bicouches de DPPC contenant les trois concentrations en cholestérol en portant en graphique l'enthalpie totale pour chacun des mélanges lipidiques étudiés en fonction de la concentration en AmB. Le graphique, présenté à la figure 6.6, est alors obtenu, sur lequel les données enregistrées pour le mélange binaire DPPC/AmB sont représentées en noir et celles des mélanges ternaires, sous différentes teintes de rose.

Cette figure montre dans un premier temps qu'à 0% en mole d'AmB, l'incorporation du cholestérol diminue la valeur de l'enthalpie totale du processus thermodynamique, résultat largement discuté au chapitre IV.

Dans un deuxième temps, il est possible de constater sur cette figure que l'enthalpie totale des bicouches sans stérol (courbe noire) diminue progressivement en fonction de la concentration en AmB. Cette diminution a été discutée pour sa part au chapitre V. Les valeurs enregistrées pour les mélanges contenant à la fois le cholestérol et l'AmB, pour l'une ou l'autre des trois concentrations en cholestérol utilisées (courbes roses), montrent qu'il y a également une diminution de l'enthalpie totale de transition en fonction de la concentration en AmB.

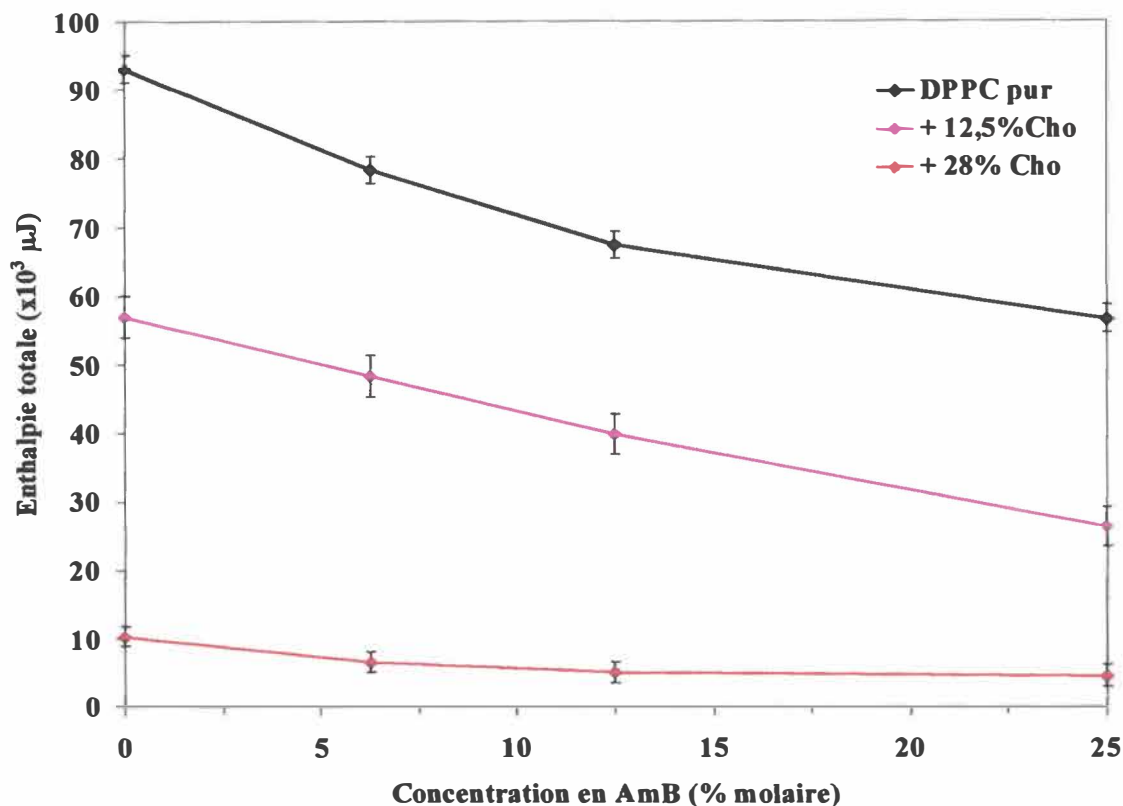


FIGURE 6.6: Enthalpies totales pour le mélange DPPC/AmB et les mélanges ternaires DPPC/cholestérol/AmB en fonction de la concentration en AmB.

Cette diminution de l'enthalpie en fonction de la concentration en AmB pour chaque concentration de stérol est similaire à celle observée pour le mélange DPPC/AmB (courbe noire). Ceci signifie donc que la variation d'enthalpie engendrée par les molécules de cholestérol sur la bicouche de DPPC (diminution par rapport à la courbe noire) est la même malgré la présence de molécules d'AmB. De plus, la diminution d'enthalpie engendrée par les molécules d'antifongique sur les bicouches de DPPC (diminution entre deux concentrations d'AmB) ne se trouve pas affectée par la présence de molécule de cholestérol.

Ces résultats, de même que le comportement de chacune des transitions de phase en fonction de la concentration en AmB que nous avons discuté précédemment, indiquent donc fortement que le cholestérol et l'AmB ne semblent pas interagir directement entre eux. Il semble que les variations observées proviendraient plutôt de la somme de l'effet des molécules de cholestérol sur la DPPC et de celui des molécules de l'AmB sur la DPPC.

Les données présentées ci-dessus sont appuyées par celles parues dans l'article de Coterio *et al.* (1998) qui montre, par des mesures de conductance sur des membranes biologiques (asolectine) et sur des membranes synthétiques de DMPC, que des canaux ayant les mêmes propriétés moléculaires sont formés par l'AmB en présence ou en absence de cholestérol. Ils avancent aussi l'idée que la présence des stérols n'est pas nécessaire à la formation des pores membranaires d'AmB. De leur côté, les résultats de simulation moléculaire publiés en 1997 de Baginski *et al.* montrent effectivement, tout comme nos résultats concernant la présence simultanée du cholestérol et de l'AmB dans une bicouche lipidique, que les stérols n'interagiraient pas directement avec les canaux membranaires. De plus, les groupes de Hartsel *et al.* (1991), Perkins *et al.* (1992), Wolf et Hartsel (1995) ainsi que celui de Fujii *et al.* (1997) ont suggéré que les stérols ne sont pas nécessaires à la formation des pores membranaires et que l'AmB pouvait interagir avec le phospholipide de façon spécifique. Ces résultats sont donc compatibles avec l'interprétation que nous avons faite suite à l'analyse de la figure 6.6 où le cholestérol et l'AmB exerçaient leur effet sur les molécules de DPPC de façon distincte.

En résumé, à la lumière des résultats calorimétriques obtenus, que ce soit en présence ou en absence de cholestérol, l'AmB induit une séparation de phase importante dans la matrice lipidique. La présence de molécules d'AmB a sur son environnement lipidique un effet structurant puisque les valeurs de température de transition des deux transitions de phase associées aux molécules de DPPC en interaction avec l'antifongique sont supérieures à celle de la transition associée à la phase "pure" en DPPC. Ce qu'il est de plus étonnant de constater de plus c'est la persistance de la région lipidique pauvre en cholestérol, malgré le mode de préparation liposomale utilisé qui force tous les constituants membranaires à interagir entre eux.

Le fait que la transition de la phase pauvre en cholestérol soit toujours présente en DSC nous amène à nous interroger sur l'existence des phases riches en cholestérol que l'on retrouve pour les mélanges binaires DPPC/cholestérol. En présence d'AmB, ces phases sont-elles toujours présentes, leur signal étant superposé à celui des deux phases riches en AmB ou bien n'existent-elles plus? Nous ne pouvons répondre

clairement à cette question uniquement à l'aide des résultats calorimétriques cependant, les résultats de décomposition montrent que la température des deux dernières transitions obtenues en présence d'AmB n'est pas affectée par la présence du cholestérol mais que leur largeur à mi-hauteur est affectée, par rapport aux bicouches ne contenant que l'AmB. Donc, il est fort probable que la phase L_o existe toujours (environnement des pores) mais que son faible signal soit caché par celui des deux transitions associées aux molécules de DPPC en interaction avec l'AmB. La présence de l'AmB dans les bicouches contenant le cholestérol semblerait plutôt enrichir la phase pauvre en cholestérol et par conséquent, augmenter la proportion de la phase L_o .

Les résultats calorimétriques de ce chapitre, que nous avons publiés pour la plupart en 1998, apportent donc de fortes évidences que l'AmB n'interagirait pas de façon spécifique avec le cholestérol puisqu'entre autre les données d'enthalpie montrent que le cholestérol et l'AmB exercent de façon indépendante leur effet respectif sur l'arrangement des molécules de DPPC à l'intérieur de la matrice lipidique. Cependant, les molécules de DPPC sous l'influence du cholestérol (phase L_o) peuvent très bien être préférées par les molécules d'AmB, par rapport aux molécules de DPPC de la phase pauvre en cholestérol. En effet, plusieurs auteurs (HsuChen et Feingold 1973, Cohen 1998, Counthino et Prieto 1995 et Castanho *et al.* 1999) ont obtenu que les macrolides polyéniques, dont fait partie l'AmB, possèdent une plus grande affinité envers les lipides plus ordonnés en milieu lipidique, condition caractérisant les bicouches de DPPC contenant du cholestérol.

6.2 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE FTIR

Dans le but de compléter l'étude calorimétrique de la section précédente, nous avons enregistré les spectres infrarouges correspondant aux mélanges étudiés par calorimétrie, c'est-à-dire aux mélanges contenant à la fois la DPPC, le cholestérol et l'AmB. Les courbes de fusion obtenues pour ces deux mélanges lipidiques contenant du cholestérol et de l'AmB, sont présentées aux figures 6.7 A et B, respectivement.

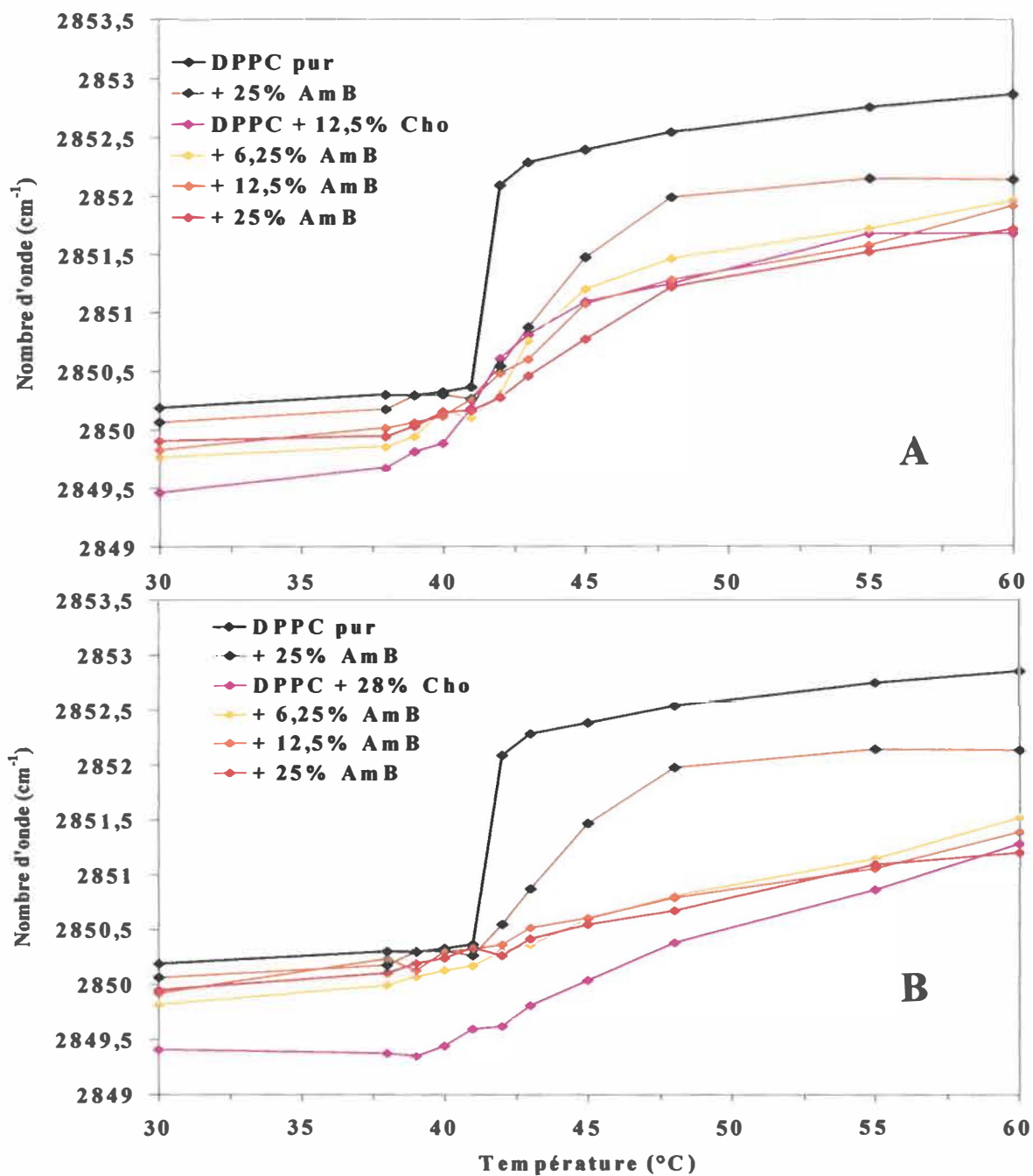


FIGURE 6.7: Courbes de fusion obtenues, par FTIR, pour les mélanges DPPC/12,5%cholestérol/AmB (A) et DPPC/28%cholestérol/AmB (B) (écart-type moyen de $\pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$).

Sur cette figure, la courbe de fusion obtenue pour l'échantillon liposomal pur (courbe noire), celle de la DPPC contenant 25% en mole d'AmB (courbe orangée, point

noir) et celle de la DPPC contenant 12,5% ou 28% en mole de cholestérol (courbe fuchsia) ont été rajoutées afin de faciliter l'analyse des résultats.

La figure 6.7 A montre que les trois courbes de fusion enregistrées pour les mélanges lipidiques ternaires contenant 12,5% en mole de cholestérol et les trois concentrations d'AmB sont identiques. Le même comportement est observé pour les bicouches contenant à la fois 28% en mole de cholestérol et l'AmB (figure 6.7 B).

Dans le but de faciliter l'interprétation des résultats IR, les courbes de fusion seront séparées en trois sections: il y aura donc premièrement la section comprenant la région de températures précédant la transition de phase, deuxièmement la région de la transition et enfin, la portion de la courbe située au-dessus de la transition de phase.

Premièrement, les résultats présentés à la figure 6.7 A et B indiquent que pour les températures situées en-dessous de la transition de phase, la présence simultanée du cholestérol et de l'AmB conduit à une valeur de nombre d'onde pour les groupements CH_2 de la DPPC d'environ 2850 cm^{-1} et ce, pour les trois concentrations en AmB. Cette valeur est très près de celle enregistrée pour les matrices de DPPC pures, qui est de $2850,2\text{ cm}^{-1}$ (chapitre V, figure 5.8).

Si l'on compare la valeur enregistrée pour les bicouches ne contenant que 12,5% en mole de cholestérol (figure 6.7 A, courbe fuchsia) ou 28% en mole de cholestérol (figure 6.8 B, courbe fuchsia), avec celles obtenues pour les mélanges ternaires (courbes orangées), il est clair que la présence d'AmB dans ces matrices lipidiques atténue l'effet induit par le cholestérol sur le nombre d'onde des groupements CH_2 et ce, de façon plus prononcée pour les bicouches contenant 28% en mole de cholestérol. L'AmB semble donc influencer l'effet normalement induit par le cholestérol sur les molécules de DPPC. Par calorimétrie, nous avons proposé que l'interaction DPPC/AmB semblait être favorisée par la présence du cholestérol dans la bicouche. Cette interaction aurait comme conséquence possible une augmentation de la concentration en cholestérol dans l'environnement lipidique des pores membranaires. Par conséquent, l'interaction

DPPC/AmB diminuerait le nombre de molécules de DPPC en interaction avec le cholestérol, d'où diminution de l'effet du cholestérol sur l'ordre conformationnel de la DPPC, par rapport à celui normalement induit par le cholestérol dans les mélanges binaires DPPC/cholestérol. La présence simultanée du cholestérol et de l'AmB induirait donc une séparation de phase importante entre les molécules de DPPC et de cholestérol de sorte que l'effet normalement induit par le cholestérol sur les chaînes aliphatiques de la DPPC est modifié.

Les données obtenues pour la région de températures situées sous la transition de phase sont donc complémentaires aux précédents résultats obtenus par calorimétrie puisque les deux composantes, soient le cholestérol et l'AmB, n'interagiraient pas directement l'une avec l'autre mais exerceraient plutôt de façon indépendante leurs effets respectifs sur l'environnement lipidique.

L'analyse des données comprises dans la région située avant la transition de phase montre une autre information : étonnamment, il suffit de 6,25% en mole d'AmB (courbe orange pâle) pour réduire de façon maximale l'effet de 12,5% (figure 6.7 A) ou de 28% en mole de cholestérol (B) sur la valeur du nombre d'onde des bicouches de DPPC (courbe fuchsia). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'induction, en présence de molécules d'AmB, de la séparation de phase entre les molécules de DPPC et de cholestérol, dans la matrice lipidique. Il est de plus surprenant de constater que lors de l'analyse des données calorimétriques, nous avons vu à l'aide de la figure 6.4 que l'enthalpie de la première transition de phase observée subissait une brusque diminution, pour une concentration de 6,25% en AmB. Par la suite, la valeur d'enthalpie de cette transition demeurait pratiquement stable en fonction de la concentration en AmB. Les résultats calorimétriques et infrarouges sont donc concordants puisqu'ils montrent qu'à 6,25% en mole d'AmB, l'effet de cet antifongique est maximal sur son environnement lipidique pour les bicouches contenant le cholestérol.

La comparaison des courbes de fusion présentées à la figure 6.7 montre, deuxièmement, que la présence simultanée du cholestérol et de l'antifongique élargit la transition de phase globale du processus thermotropique (courbes en orangé en A et B), par rapport à celle observée sur la courbe des mélanges binaires DPPC/cholestérol (courbes en fuchsia en A et B). Cet élargissement reflète, comme dans le cas des stérols, une diminution de la coopérativité globale de la transition thermotropique, phénomène aussi observé par calorimétrie. De plus, pour cette région de température, il est important de noter que pour les bicouches contenant 12,5% en mole de cholestérol et l'AmB (courbes orangées en A), la transition enregistrée est plus étroite que celles observées pour les bicouches contenant à la fois 28% en mole de cholestérol et l'AmB (courbes orangées en B). Cette observation correspond tout à fait à celle faite par l'analyse des transitions de phase enregistrées par calorimétrie précédemment décrites dans ce chapitre. De plus, il est aussi important de mentionner que la transition de phase observée pour les bicouches de DPPC contenant 28% en mole de cholestérol et 25% d'AmB est toujours détectée, quoique assez diffuse, ce qui coïncide aussi avec les données calorimétriques (figure 6.4).

Troisièmement, la comparaison des données obtenues pour la région de température située au-dessus de la transition de phase globale montre des valeurs enregistrées identiques à celle obtenue pour le mélange binaire DPPC/cholestérol, sans AmB (figure 6.7 A et B, courbe fuchsia). Contrairement à ce qui avait été observé dans la région située en-dessous de la transition de phase globale, à 60°C, le nombre d'onde observé correspond à celui enregistré pour les mélanges binaires DPPC/cholestérol et par conséquent, à l'effet engendré par les molécules de cholestérol seules sur les chaînes aliphatiques de la DPPC. Nous tentons d'expliquer ce résultat par la possibilité que l'augmentation de la fluidité (transition de phase), induite par la chaleur, pourrait solubiliser les molécules de cholestérol à l'intérieur de la matrice lipidique, qui étaient agrégées sous la température de transition. Cette interprétation est soutenue par les résultats de simulation Monte Carlo publiés de Huang *et al.* (1999) qui montrent que la chaleur et le temps d'incubation permettent la resolubilisation partielle des agrégats de cholestérol. Si tel est le cas et comme l'effet de l'AmB sur ces chaînes aliphatiques

(figure 6.7, courbe orangée, point noir) est plus faible que celui engendré par les molécules de cholestérol (courbe fuchsia), l'effet de l'AmB sur la moyenne du nombre d'onde ne peut être détecté. Ce résultat apporte encore une fois l'évidence que le cholestérol et l'AmB n'interagissent pas de façon spécifique entre eux mais qu'ils influencent leur environnement lipidique de façon indépendante.

La spectroscopie FTIR fournit donc des éléments d'analyse complémentaires à ceux obtenus par calorimétrie. En effet, l'analyse de la présente section met en évidence une importante séparation de phase entre les molécules de DPPC interagissant avec le cholestérol et celles en interaction avec les molécules d'AmB puisque sous la température de transition globale, le cholestérol serait agrégé dans l'environnement lipidique des pores membranaires, pour les bicouches de DPPC contenant 28% en mole de cholestérol et l'AmB. Cependant, la chaleur semblerait suffisante pour solubiliser ces agrégats de cholestérol, observation faite par FTIR. De plus, la spectroscopie FTIR montre aussi, comme la DSC, que le cholestérol et l'AmB exerceraient leur effet respectif sur l'environnement lipidique de façon indépendante. Ce comportement est mis en évidence dans la région située au-dessus de la transition de phase en FTIR et par les données d'enthalpie présentées précédemment à la section précédente. Les données IR sont donc complémentaires à l'interprétation formulée suite à l'analyse des résultats calorimétriques.

6.3 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE RMN-²H

Dans le but de vérifier l'effet sur l'écart quadripolaire qu'aura la présence simultanée du cholestérol et de l'AmB dans la matrice lipidique de DPPC-d₃₁, les résultats présentés à la figure 6.8 ont été compilés. Nous avons publié ces résultats pour la première fois en 2002 (Paquet *et al.*). Sur cette figure, les valeurs d'écart quadripolaire mesurées pour le carbone près de la tête polaire (C2) sont présentées en A et celles obtenues pour le carbone en bout de chaîne (C16), en B. La courbe obtenue

pour la DPPC- d_{31} pur est représentée en noir et celles obtenues pour les deux concentrations en cholestérol, soit 12,5% et 28%, sous différentes teintes de rose.

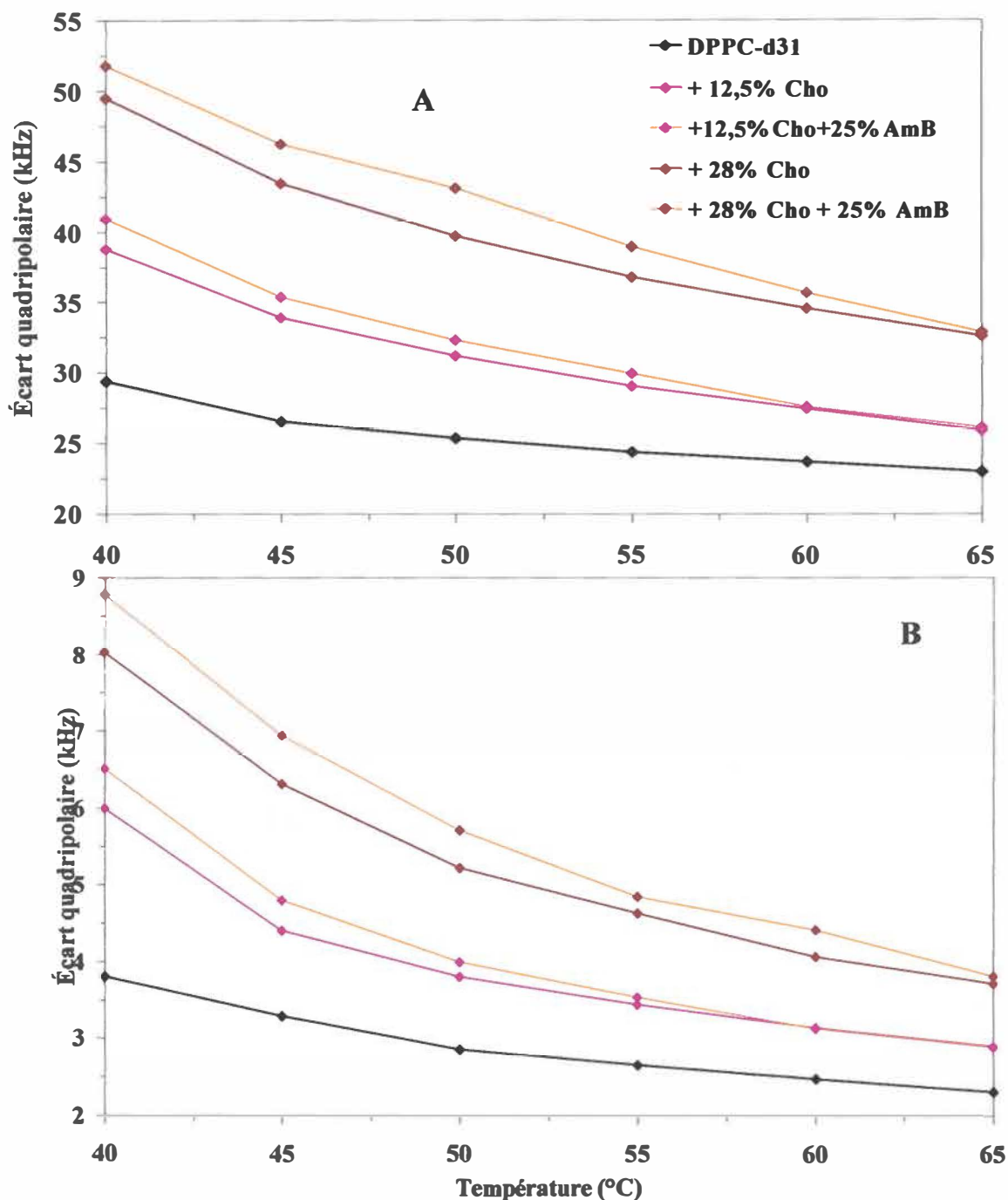


FIGURE 6.8 Écarts quadripolaires obtenus pour le carbone près de la tête polaire (A) et en bout de chaîne (B) en fonction de la température pour les mélanges DPPC- d_{31} /cholestérol/25%AmB. L'écart-type moyen est de l'ordre de $\pm 0,2$ kHz pour les données recueillies pour la région près de la tête polaire (A) et de $\pm 0,1$ kHz pour celles correspondant au lien C-D en bout de chaîne (B).

Afin de faciliter la présentation de ces deux graphiques et d'utiliser les résultats illustrant l'effet maximal de l'AmB sur les valeurs d'écart quadripolaire, seule la courbe obtenue pour les bicouches contenant 25% en mole d'AmB est représentée en orangé, pour chacune des concentrations utilisées en cholestérol.

La figure 6.8 montre tout d'abord que l'effet de l'AmB sur les molécules de DPPC se fait sentir de la même façon aussi bien près de la tête polaire qu'en bout de chaîne, puisque les variations des valeurs d'écart quadripolaire enregistrées sont les mêmes (figure 6.8).

Pour les bicouches contenant à la fois 12,5% ou 28% en mole de cholestérol et 25% en mole d'AmB, une légère augmentation de l'écart quadripolaire est observée, par rapport à celui enregistré pour le mélange binaire sans AmB (courbes fuchsia et bourgogne) et ce, seulement pour des températures inférieures à 60°C. Cet effet d'ordonnement par les molécules d'AmB est plus marqué pour les bicouches contenant 28 % en mole de cholestérol et est fonction de la concentration en AmB. Ces résultats sont compatibles avec ceux publiés de Dufourc *et al.* (1984b).

Le fait que l'influence des molécules d'AmB sur l'ordre orientationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC est plus importante pour les bicouches qui contiennent 28% en mole de cholestérol peut s'expliquer de la façon suivante. Nous avons vu au chapitre IV que les molécules de DPPC dans la bicouche contenant uniquement 28 % en mole de stérol forment une phase L_o , phase qui est caractérisée par des chaînes aliphatiques très ordonnées et une réorientation axiale symétrique rapide au temps de la RMN (Vist and Davis 1990). Par conséquent, l'effet structurant des molécules d'AmB dans le mélange DPPC/cholestérol/AmB sera observable directement sur les valeurs d'écart quadripolaire, contrairement aux bicouches ne contenant que l'AmB (chapitre V) où aucun effet des molécules d'AmB sur l'écart quadripolaire ne fut observé.

Cependant, pour les bicouches de DPPC contenant à la fois 12,5% en mole de cholestérol et l'AmB, l'effet d'ordonnement induit par les molécules d'AmB sera

moindre que celui observé pour les bicouches contenant 28 % en mole de cholestérol puisqu'à 12,5% en mole de cholestérol, il y a coexistence de phases pauvres et riches en cholestérol (chapitre IV). Or nous avons vu plus tôt dans ce chapitre, par DSC, que les phases formées par l'AmB et la DPPC, en présence ou en absence de cholestérol, sont de même nature c'est-à-dire que le cholestérol n'est pas impliqué dans la formation des pores membranaires d'AmB mais qu'il est présent dans son environnement immédiat. À 12,5% en mole de cholestérol, il est normal que l'effet de l'AmB sur l'écart quadripolaire soit moindre que celui observé pour les bicouches contenant 28% en mole de cholestérol puisque dans le premier cas, l'effet induit est sensiblement le même que celui observé pour les bicouches ne contenant que l'AmB (chapitre V, section 5.3).

Les résultats présentés à la figure 6.8 A et B montrent de plus que pour des températures supérieures à 60°C, aucun effet de l'AmB n'est visible sur l'écart quadripolaire et ce, pour les bicouches contenant 12,5% ou 28% en mole de cholestérol et l'AmB. Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus par FTIR puisque pour une température de 60°C, aucun effet de l'AmB n'était visible par cette dernière technique.

D'autre part, nous avons vu au chapitre précédent que les spectres originaux enregistrés à 40°C pour les bicouches de DPPC contenant l'AmB révélaient la présence d'une contribution spectrale caractéristique de lipide à l'état gel (fraction de spectre "type-gel"). Dans le but de vérifier si les mêmes bandes sont présentes sur les spectres enregistrés pour les mélanges DPPC/cholestérol/AmB, les spectres originaux ont été analysés. Sur ces spectres (données non-présentées), aucune contribution spectrale associée à des lipides à l'état gel n'est détectable. Il ne semble donc pas y avoir de molécules de DPPC qui se retrouvent en une phase "type gel" lorsqu'il y a du cholestérol. Ce résultat n'est pas surprenant, compte tenu des résultats obtenus précédemment par calorimétrie et par FTIR, puisqu'en présence du cholestérol, ce ne serait pas la phase "pure" en DPPC qui environnerait les pores membranaires mais plutôt les phases pauvres et riches (L_o) en cholestérol.

Afin d'extraire le maximum d'informations des spectres originaux, le second moment (M_2) des spectres a été calculé et mis en graphique en fonction de la température. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 6.9 pour les bicouches de DPPC- d_{31} contenant 12,5% (courbe fuchsia) et 28% (courbe bourgogne) en mole de cholestérol. Les deux courbes correspondant aux deux mélanges ternaires DPPC/cholestérol/25% en mole d'AmB sont aussi illustrées, en orangé.

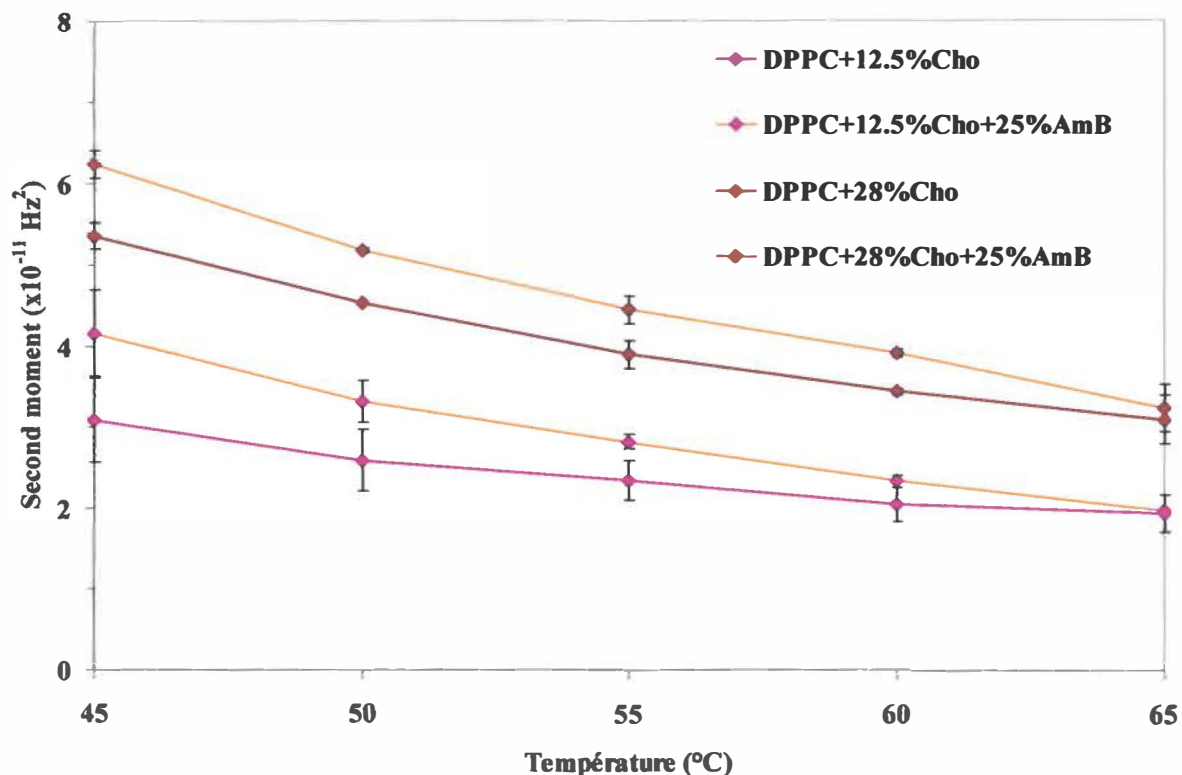


FIGURE 6.9 : Variation du second moment spectral en fonction de la température pour les bicouches contenant 12,5% ou 28% en mole de cholestérol et d'AmB.

Sur cette figure, il est possible de constater que la valeur du second moment augmente en présence d'AmB et ce, pour les deux concentrations en cholestérol utilisées. Puisque le moment second est proportionnel au carré de l'écart quadripolaire (section 2.2.2.3), il est normal que le moment second varie de façon plus prononcée que ne le font les valeurs d'écart quadripolaire.

Malgré le fait qu'aucune composante "type gel" n'est présente sur les spectres originaux et que la variation du moment second ne révèle pas de façon claire une possible contribution d'une composante large, comme ce qui avait été observé pour le mélange binaire DPPC/AmB, nous n'excluons pas l'existence probable d'un autre type de composante large, présente dans le spectre original et constante en fonction de la température. En effet, Dufourc *et al.* (1984b) ont observé une composante large qui correspondrait à une phase lipidique ne possédant pas de symétrie axiale et qui serait associée à des molécules de DPPC immobilisées par des molécules d'AmB. Cependant, cette composante large ne peut être isolée sur les spectres originaux puisque le rapport signal sur bruit est trop faible.

En résumé, les données RMN mettent donc en évidence une phase lipidique formée de molécules de DPPC possédant une symétrie axiale donc une liberté de mouvement. Cette phase, possiblement la phase L_o , semble être affectée par l'incorporation de l'AmB puisque l'écart quadripolaire augmente légèrement avec 25% en mole d'AmB et ce, pour des températures inférieures à 60°C (figure 6.8). Comme l'effet du cholestérol sur l'ordre orientationnel de la DPPC est toujours présent, ce résultat est compatible avec les données calorimétriques puisque, nous l'avons vu, le cholestérol semble être exclu des différentes organisations membranaires de l'AmB impliquant le phospholipide.

Les résultats retrouvés dans la littérature concernant ce mélange lipidique ternaire ne sont pas nombreux mais le groupe de Dufourc *et al.* (1984b) a obtenu des résultats RMN- 2H comparables, en partie, à ceux présentés dans cette section. Cependant, le lipide qu'ils ont utilisé pour les mélanges lipide/cholestérol/AmB est la DMPC. Ils ont observé pour ces bicouches une nouvelle composante, très large, sous le spectre original. Cette composante, contrairement à la composante associée au spectre "type gel", est constante en fonction de la température et ne disparaît pas. Ils ont associé cette composante large à des molécules de lipides "immobilisées" par l'antifongique en interaction avec le cholestérol, environnement où il n'y a essentiellement pas symétrie axiale en dessous de 25°C. Au-dessus de cette température, les mouvements à symétrie

axiale augmentent en fonction de la température, résultat non-surprenant selon eux puisque le complexe cholestérol-AmB est prévu pour se dissocier en fonction de la température. Ils mettent donc en évidence une interaction cholestérol/AmB que nos résultats n'appuient pas. Le type de lipide utilisé, soit chez eux la DMPC qui possède 14 carbones et chez nous la DPPC qui en possède 16, peut influencer grandement les résultats obtenus puisque le phénomène de "mismatch", précédemment décrit, est différent dans les deux cas. Les résultats publiés du groupe de Dufourc *et al.* (1984b) ne peuvent donc pas être comparés directement avec les résultats présentés dans ce chapitre mais tous ces résultats vont dans le sens d'une rigidification de l'environnement lipidique par l'AmB.

6.4 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

Au chapitre précédent, soit celui concernant les bicouches de DPPC contenant uniquement l'AmB, nous avons vu que l'AmB interagissait avec la DPPC et qu'elle était présente sous forme d'oligomères dans la bicouche. Dans ce chapitre, nous voulons déterminer premièrement quel est l'état d'organisation de l'AmB dans la matrice lipidique et deuxièmement, si l'AmB interagira avec les molécules de DPPC, comme le laissent supposer les résultats présentés précédemment dans ce chapitre, ou avec le cholestérol. Pour ce faire, un contrôle a été effectué dans un premier temps dans le but de déterminer la position de la bande d'absorption caractérisant l'interaction cholestérol/AmB en solution aqueuse. La solution utilisée pour ce contrôle est formée par la dissolution de l'AmB avec le cholestérol dans une solution aqueuse 5% propanol. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus sont comparés à ceux enregistrés pour les échantillons liposomaux.

La figure 6.10 présente les spectres obtenus pour le contrôle en A, enregistré pour une dispersion, en solution aqueuse 5% propanol, du cholestérol $5,5 \times 10^{-5}$ M et de l'AmB $5,5 \times 10^{-5}$ M. Le second spectre (spectre B) correspond à celui enregistré pour l'échantillon liposomal de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole de cholestérol et

12,5% en AmB ($6,8 \times 10^{-4} \text{M}$). Cette concentration en AmB a été choisie afin de bien visualiser l'effet de l'AmB sur les bicouches de DPPC tout en conservant une quantité moyenne de molécules de DPPC dans chacune des trois phases lipidiques mises en valeur par calorimétrie.

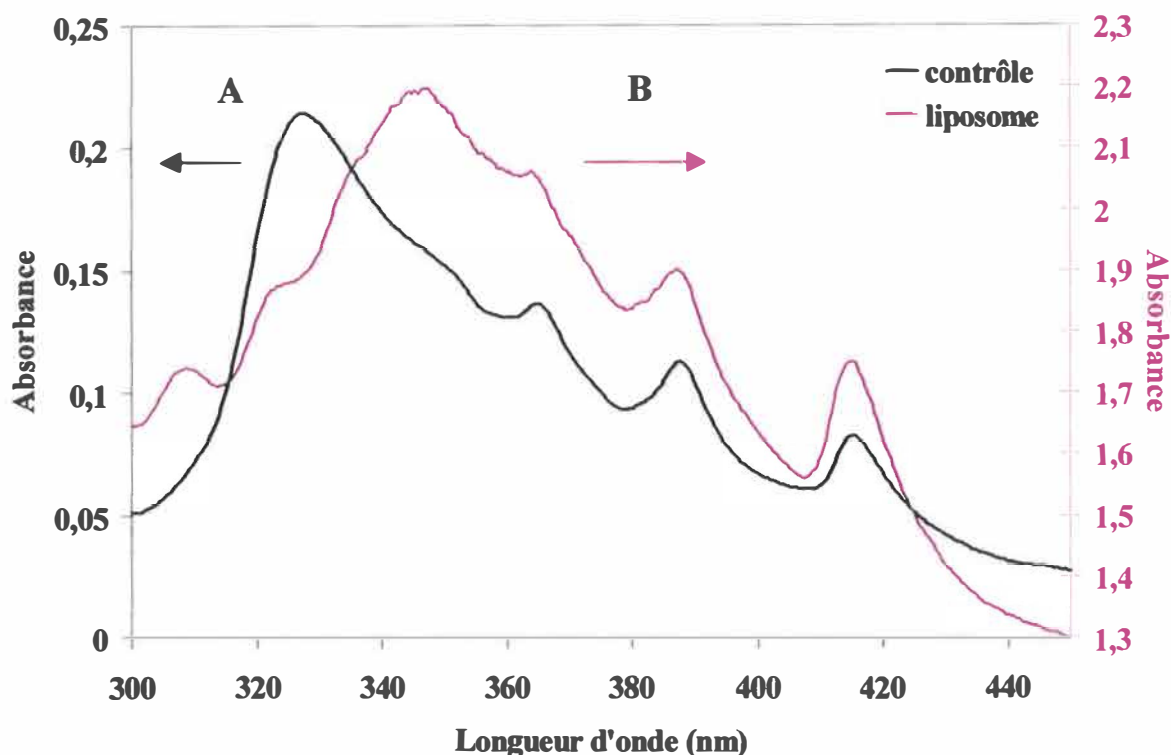


FIGURE 6.10: Spectres UV-visible d'une dispersion en solution aqueuse 5% propanol du cholestérol et de l'AmB (A, cuvette de 1 cm) et d'un échantillon liposomal de DPPC contenant 12,5% en mole de cholestérol et 12,5% en mole d'AmB (B, cuvette de 0,1 cm).

Cette figure montre dans un premier temps, sur le spectre contrôle, une bande d'absorption située à 415,2 nm, correspondant à l'interaction de l'AmB avec le cholestérol en milieu aqueux. De son côté, l'analyse du spectre obtenu pour l'échantillon liposomal montre une bande d'absorption située à 414,9 nm. Compte tenu du fait que l'interaction de l'AmB avec la DPPC est caractérisée par une bande d'absorption située à 415,2 nm en milieu lipidique organisé (chapitre V, section 5.4), il nous sera impossible de déterminer avec cette technique si l'AmB interagit avec le cholestérol ou la DPPC en milieu lipidique organisé.

Dans un deuxième temps, le spectre de l'échantillon liposomal (B) montre que la bande la plus intense est centrée autour de 348 nm, cette bande étant associée à l'AmB sous forme d'oligomères (Barwicz *et al.* 1992). Le fait que l'AmB se retrouve sous forme agrégée à l'intérieur des matrices lipidiques contenant à la fois le cholestérol suggère donc que, comme pour les bicouches ne contenant que l'AmB, l'AmB se retrouve sous forme de pores membranaires. Cependant, il est important de remarquer que sur le spectre contrôle, cette bande est située aux alentours de 328 nm ce qui correspond toujours à l'AmB agrégée (oligomères) mais dans un environnement différent de la matrice lipidique, soit une solution aqueuse contenant 5% en volume de propanol. La figure 6.10 montre donc aussi que l'AmB ne se retrouve pas à l'extérieur des liposomes mais dans la matrice lipidique.

Cette technique a donc permis de confirmer que l'AmB est présente sous forme d'oligomères dans la matrice, forme associée aux pores membranaires. Cette technique ne permet cependant pas de déterminer si l'AmB interagit avec le cholestérol ou la DPPC car leurs bandes d'absorption respectives sont trop rapprochées.

6.5 CONCLUSIONS PARTIELLES

Les résultats obtenus par les différentes techniques présentées dans ce chapitre mènent à la conclusion que l'AmB ne semble pas interagir spécifiquement avec le cholestérol en milieu lipidique organisé. La calorimétrie met en évidence des phases contenant les molécules de DPPC influencées par l'AmB, se comparant étonnamment avec celles obtenues pour le mélange lipidique ne contenant pas de cholestérol. Cependant, la présence de ce dernier dans la bicouche semble favoriser l'interaction de l'AmB avec la DPPC.

La calorimétrie montre de plus une séparation de phase importante dans la matrice lipidique et les deux phases formées en présence d'AmB sont situées à des températures supérieures à celle retrouvée pour les bicouches lipidiques pures. Ceci

indique donc que l'environnement immédiat des molécules d'AmB se retrouve stabilisé ou structuré par ces molécules et ce, même en présence du cholestérol. Cette étude ne réfute donc pas l'hypothèse de formation de pores membranaires avancée par plusieurs auteurs de la littérature.

Les résultats spectroscopiques sont complémentaires à ceux obtenus par calorimétrie. Dans un premier temps, les données IR semblent indiquer que l'interaction AmB-DPPC provoquerait une augmentation de la concentration en cholestérol dans l'environnement lipidique des pores membranaires ce qui aurait comme conséquence une diminution du nombre de molécules de DPPC en interaction avec les molécules de cholestérol et pour les bicouches contenant 28% en mole de cholestérol, il y aurait formation d'agrégats de cholestérol. Pour une température de 60°C, les données IR montrent que le cholestérol et l'AmB exerceraient leur effet d'ordonnement sur la DPPC de façon indépendante, indiquant ainsi que ces deux molécules n'interagiraient pas entre elles et que la température semble suffisante pour resolubiliser ces agrégats de cholestérol.

Dans un deuxième temps, les résultats obtenus par RMN-²H montrent avec évidence une phase où il y a perte de symétrie axiale, présente seulement en présence d'AmB et associée aux molécules de DPPC en interaction avec l'AmB. Puisque les données calorimétriques montrent une séparation de phase évidente, nous n'excluons pas cependant l'existence d'une autre phase, ayant une symétrie axiale et qui serait associée à des molécules de DPPC immobilisées par des molécules d'AmB.

Finalement, les résultats observés par spectroscopie UV-visible montrent la présence d'AmB sous forme d'oligomères dans la matrice lipidique, ce qui tend à montrer que l'AmB est présente sous une forme organisée à l'intérieur de la bicouche de DPPC. Cette technique révèle donc la forte probabilité que l'AmB soit présente sous forme de pores membranaires dans la bicouche lipidique, appuyant ainsi l'interprétation formulée suite à l'analyse des résultats calorimétriques où l'AmB formerait, dans la matrice de DPPC, des pores membranaires n'impliquant pas le cholestérol. Cette

organisation structurée de l'AmB serait responsable de la seconde transition de phase observée par calorimétrie.

À la lumière des résultats présentés dans ce chapitre, l'influence du cholestérol sur l'interaction de l'AmB avec son environnement lipidique serait indirecte, possiblement par son effet d'ordonnement sur les chaînes aliphatiques de la DPPC plutôt que par le biais d'une interaction spécifique avec l'AmB, comme le présumaient plusieurs auteurs concernant l'interaction spécifique de l'AmB avec le cholestérol membranaire. Les résultats présentés dans ce chapitre nous permettent donc de classer l'interaction de l'antifongique avec les membranes contenant le cholestérol de "stérol-indépendante" puisque le cholestérol semble être exclu de l'organisation membranaire de l'AmB. Peu d'auteurs suggèrent ce type de mécanisme mais cependant, quelques recherches récentes, entre autres par microscopie à force atomique (Gruszecki *et al.* 2002) et par mesure de conductance (Cotero *et al.* 1998, Rucwardt *et al.* 1998) mènent à cette conclusion.

Il est important de rappeler en terminant que tous les résultats présentés dans ce chapitre sont étonnamment ressemblants à ceux obtenus pour les bicouches ne contenant que l'AmB (chapitre V). La répartition des molécules d'AmB à l'intérieur de la bicouche contenant du cholestérol ne devrait donc pas être significativement différente de celle proposée lorsque la bicouche ne contient pas de cholestérol. Cependant, l'environnement lipidique de ces pores contient vraisemblablement du cholestérol ce qui selon nous fournit l'explication de la différence de coopérativité entre les mélanges DPPC/AmB ne contenant pas de cholestérol et ceux en contenant.

CHAPITRE VII

BICOUCHES LIPIDIQUES MIXTES DPPC/Ergostérol/AmB

L'ergostérol est le stérol majoritaire des membranes des champignons pathogènes et est reconnu pour être la cible de l'AmB lors de son interaction avec les membranes de ces champignons. Nous avons donc consacré ce chapitre à l'étude de l'interaction de l'AmB envers des bicouches de DPPC contenant l'ergostérol dans le but de comparer les résultats obtenus à ceux présentés aux chapitres précédents et de vérifier si effectivement l'AmB interagit avec l'ergostérol dans la bicouche, ce qu'elle ne fait pas avec le cholestérol.

7.1 RÉSULTATS CALORIMÉTRIQUES

Les résultats calorimétriques présentés aux deux chapitres précédents, soit ceux consacrés aux bicouches de DPPC ne contenant que l'AmB et celles contenant à la fois le cholestérol et l'AmB, montraient une grande similarité entre les thermogrammes enregistrés pour ces deux mélanges lipidiques. Afin d'étudier par calorimétrie l'effet de la présence de l'ergostérol sur l'interaction de l'antifongique avec son environnement lipidique, nous avons utilisé trois concentrations en ergostérol, les mêmes que celles du chapitre précédent, soit 12,5% et 28% en mole par rapport au DPPC. De plus, trois concentrations en AmB, soit 6,25%, 12,5% et 25% en mole par rapport au nombre de moles de DPPC, ont aussi été utilisées.

7.1.1 Mélanges ternaires contenant 12,5% en mole d'ergostérol.

La figure 7.1 illustre les thermogrammes obtenus pour les bicouches de DPPC contenant 12,5% en mole d'ergostérol et celles contenant en plus l'AmB. Sur cette figure, le thermogramme en bleu correspond au mélange binaire DPPC/12,5% ergostérol et ceux en orangés, aux mélanges contenant l'AmB.

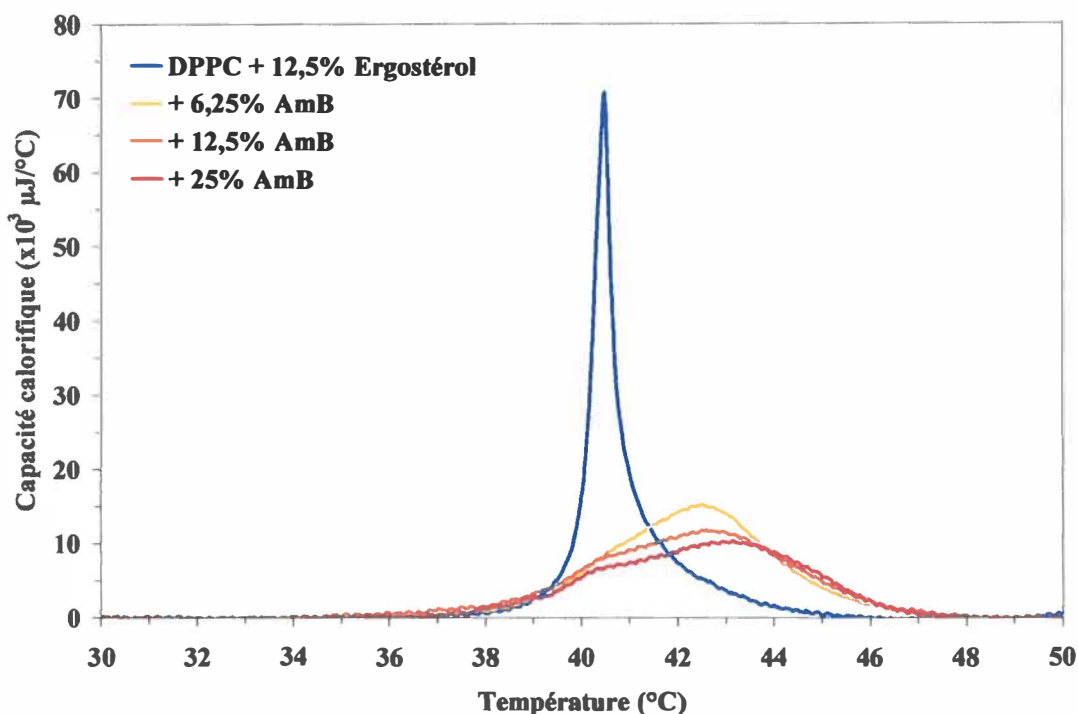


FIGURE 7.1: Thermogrammes des bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol avec et sans AmB.

a) prétransition

Il est possible de remarquer sur la figure 7.1 que pour ce mélange ternaire, la prétransition normalement observée pour la DPPC, autour de 33°C, n'est plus détectée et ce, peu importe la concentration en AmB. Comme il a été vu au chapitre IV, cette disparition est associée uniquement à la présence du stérol à l'intérieur de la matrice lipidique. De plus, il a été observé que l'AmB seule ne provoquait pas cette disparition

(chapitre V, figure 5.2). En présence d'AmB, l'ergostérol induit donc toujours son effet sur les têtes polaires de la DPPC.

b) transition principale

Les données calorimétriques obtenues pour les températures associées à la région de la transition principale montrent une importante diminution du signal enregistré avec la présence de 6,25% en mole d'AmB. Il y a de plus un élargissement du signal thermotropique vers des températures supérieures. Avec l'augmentation de la concentration en AmB, ce signal diminue légèrement. Il semble donc y avoir, à première vue, plus d'une transition sous le tracé original.

Dans le but de mieux définir cette région lipidique, une décomposition a été effectuée sur tous ces thermogrammes. Les résultats de décomposition obtenus pour le mélange lipidique contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 25% en mole d'AmB sont présentés à la figure 7.2. Seule cette concentration en AmB est illustrée ici puisqu'elle représente les composantes de décomposition types obtenues pour les deux autres concentrations en AmB. Sur cette figure, le tracé en noir représente le thermogramme original, celui en fuchsia, le tracé simulé et les tracés bleu et orangé, correspondent aux deux composantes obtenues lors de la décomposition.

Cette figure montre clairement que seulement deux composantes sont nécessaires afin de simuler de façon optimale le tracé original, la première étant située à 40,5°C et la seconde, centrée à 42,5°C. Il est important ici de rappeler que pour les bicouches ne contenant que l'AmB (chapitre V, figure 5.3) et celles contenant à la fois 12,5% en mole de cholestérol et l'AmB (chapitre VI, figure 6.2), trois composantes étaient nécessaires pour optimiser la décomposition du thermogramme original. Nous relevons donc ici une première différence importante entre les bicouches contenant à la fois l'ergostérol et l'AmB avec celles contenant uniquement l'AmB ou à la fois le cholestérol et l'AmB.

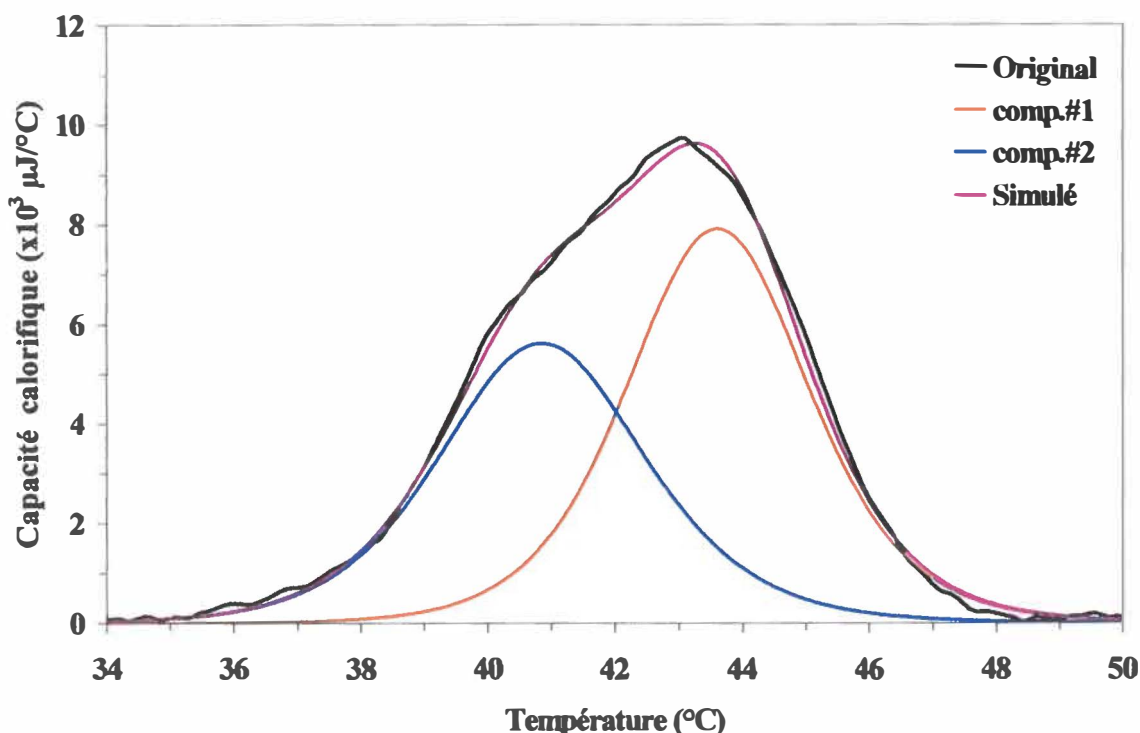


FIGURE 7.2 : Thermogramme décomposé pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 25% en mole d'AmB.

Dans le but de bien caractériser chacune de ces deux transitions, la valeur de leurs paramètres thermodynamiques respectifs est mise en graphique en fonction de la concentration en AmB, à la figure 7.3. Sur cette figure, la variation des valeurs de température de transition en fonction de la concentration en AmB est présentée en A et en B, celle des valeurs de largeur à mi-hauteur ($\Delta T_{1/2}$).

Afin de mieux définir le comportement de ces deux paramètres thermodynamiques entre 0% et 6,25% en mole d'AmB, nous avons ajouté sur ces graphiques les valeurs obtenues pour deux autres concentrations supplémentaires en AmB, soit 1% et 3% en mole. Le tracé illustré en bleu correspond aux données obtenues pour la première transition de phase (située à la température la plus faible) et celui en orangé, à la seconde transition. Afin de comparer les données obtenues pour les mélanges DPPC/12,5%ergostérol contenant ou non l'AmB, la valeur des paramètres associés aux deux transitions de phases observées pour le mélange binaire DPPC/12,5%ergostérol, analysé au chapitre IV, ont été identifiées sur l'axe des

ordonnées: la région lipidique pauvre en ergostérol est représentée par un point noir et la région riche, par un point fuchsia.

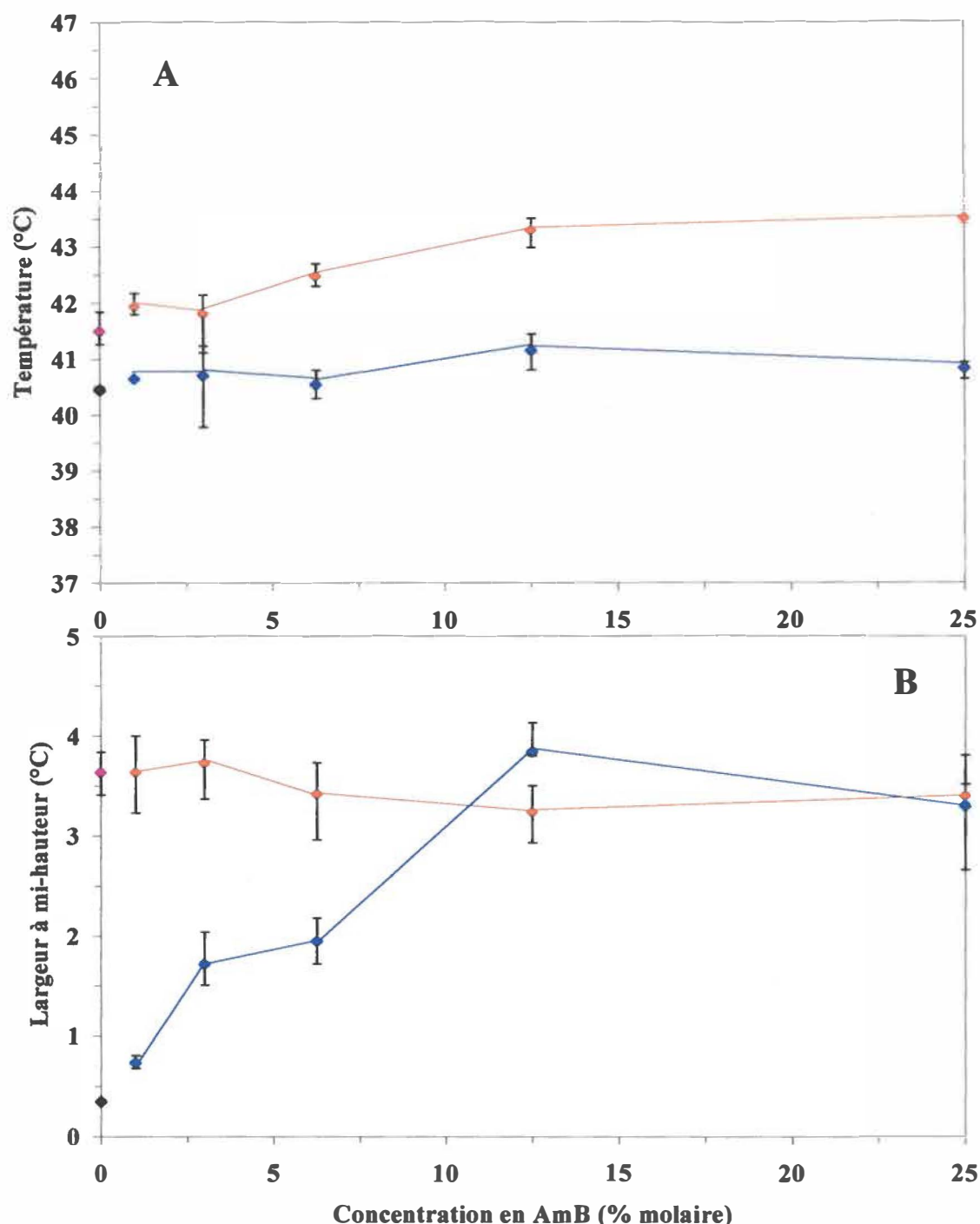


FIGURE 7.3: Graphiques de la température de transition (A) et de la largeur à mi-hauteur (B) en fonction de la concentration en AmB pour les deux transitions de phase résultant de la décomposition des thermogrammes pour les bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol et d'AmB.

Le graphique 7.3A montre dans un premier temps que la température de la première transition (courbe bleue) est située à environ 40,7°C et demeure constante avec l'augmentation de la concentration en AmB. De son côté, la seconde transition de phase est centrée à 41,9°C et augmente légèrement en fonction de la concentration en AmB.

Dans un deuxième temps, la variation des valeurs de largeur à mi-hauteur de ces deux transitions est mise en évidence sur le graphique 7.3B. Sur cette figure, il est possible de constater que la valeur de la largeur à mi-hauteur de la première transition, observée à 1% en mole d'AmB, est de 0,7°C (courbe bleue) et qu'elle augmente jusqu'à 12,5% en mole d'AmB pour ensuite demeurer constante jusqu'à 25% en mole d'AmB, en tenant compte de l'erreur expérimentale. La seconde transition de phase observée est caractérisée par une largeur à mi-hauteur de 3,6°C (courbe orange) et conserve cette même valeur avec l'augmentation de la concentration en AmB.

Afin de faciliter l'interprétation de la figure 7.3, nous analyserons les paramètres de chacune des deux transitions de phases séparément. Pour ce qui est de la première transition de phase, la valeur de sa température pour une concentration en AmB de 1% en mole, est similaire à celle obtenue pour la phase pauvre en ergostérol pour le mélange binaire DPPC/12,5%ergostérol (figure 7.3A, point noir sur l'axe des ordonnées). De plus, la valeur de sa largeur à mi-hauteur se rapproche aussi de celle obtenue pour cette phase pauvre en ergostérol (figure 7.3B, point noir sur l'axe des ordonnées). Par conséquent, nous associons la première transition de phase enregistrée pour les bicouches contenant à la fois 12,5% en mole d'ergostérol et l'AmB à celle des régions pauvres en ergostérol. La température de cette transition demeure donc constante en fonction de la concentration en AmB mais sa largeur à mi-hauteur, entre 1% et 12,5% en mole d'AmB, augmente pour ensuite plafonner entre 12,5% et 25% en mole d'AmB.

De son côté, la deuxième transition de phase observée pour les bicouches contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 1% en mole d'AmB, centrée à 41,9°C, possède une valeur de température légèrement plus élevée que celle de la transition de phase associée aux phases riches en ergostérol (figure 7.3A, point fuchsia sur l'axe des

ordonnées). Cependant, la valeur de sa largeur à mi-hauteur est identique à celle de la transition de ces régions riches en ergostérol (figure 7.3B, point fuchsia sur l'axe des ordonnées) ce qui laisse supposer que la seconde transition de phase enregistrée pour les bicouches contenant à la fois 12,5% en mole d'ergostérol et l'AmB correspondrait à celle des phases riches en ergostérol. Il est étonnant de constater que malgré le mode de préparation utilisé pour la formation des liposomes, les deux phases normalement rencontrées pour les bicouches de DPPC contenant uniquement l'ergostérol sont toujours présentes, même en présence d'AmB.

De plus, il a été vu aux deux chapitres précédents que deux transitions de phase, associées à des molécules de DPPC en interaction directe avec l'AmB, sont observées pour les mélanges DPPC/AmB et DPPC/cholestérol/AmB. Puisque qu'aucune de ces deux transitions de phase n'apparaît sur les thermogrammes enregistrés pour les mélanges contenant à la fois l'ergostérol et l'AmB, il est possible de penser qu'en présence d'ergostérol, l'AmB serait en contact direct avec ce dernier.

Afin d'illustrer chacune des phases présentes dans les bicouches contenant à la fois l'ergostérol et l'AmB, nous proposons de façon schématique à la figure 7.4 et non statique, l'organisation des composantes, soit l'ergostérol et l'AmB, dans la matrice lipidique de DPPC. Nous avons créé cette représentation en tenant compte, en plus de nos résultats, que plusieurs auteurs ont obtenu des preuves indirectes que l'AmB formait des pores membranaires en présence d'ergostérol (Brajtburg *et al.* 1990, Bolard *et al.* 1991, Brutyan et McPhie 1996, Milhaud *et al.* 2002, Matsumori *et al.* 2002, Huang *et al.* 2002), la plupart de ces études étant faites par des mesures de conductance. Sur cette figure, nous voyons que l'AmB se retrouve sous forme de pores membranaires, comme pour les deux autres mélanges lipidiques étudiés précédemment, mais cette fois-ci, le stérol serait impliqué directement dans la structure de ces pores membranaires. À ce propos, l'article publié de Baginski *et al.* (1997) propose, suite à une étude par simulation moléculaire, que les molécules d'ergostérol soient situées à l'extérieur du pore d'AmB.

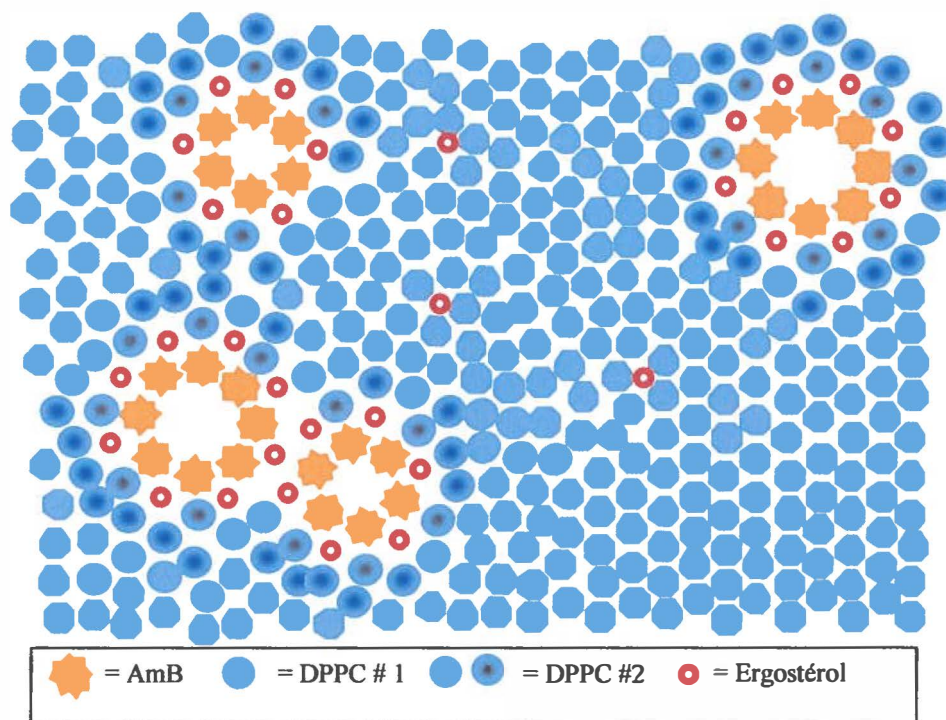


FIGURE 7.4 : Schéma hypothétique de la distribution des molécules d'AmB dans une bicouche de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 12,5% en mole d'AmB.

De plus, nous avons illustré sur cette figure les pores constitués d'AmB et d'ergostérol en utilisant un ratio molaire de 1:1 entre ces deux composantes et ce, pour deux raisons. Premièrement, nous avons vu auparavant à la figure 7.3B que la largeur à mi-hauteur de la première transition de phase augmente jusqu'à 12,5% en mole d'AmB et que par la suite, les valeurs demeurent constantes. Ces résultats suggèrent donc une association 1:1 entre l'ergostérol et l'AmB. Deuxièmement, c'est l'hypothèse la plus généralement admise dans la littérature (Kleinberg et Finkelstein 1984, Bolard 1986 et plusieurs autres).

Cette représentation schématique est en relation avec les différentes phases de DPPC enregistrées lorsque la bicouche contient à la fois l'ergostérol et l'antifongique. La première transition de phase enregistrée (figure 7.2), correspondrait donc aux molécules de DPPC de la phase pauvre en ergostérol, c'est-à-dire à celles qui ne sont pas à proximité des pores formés par d'AmB (DPPC#1). Il est important de mentionner que cette phase, pauvre en ergostérol pour les mélanges contenant aussi l'AmB, est distincte

de la phase pure en DPPC, puisque la température de ces deux transitions est différente (DPPC pure: 41,5°C, phase pauvre en ergostérol : 40.7°C).

Pour sa part, la seconde transition de phase obtenue pourrait être reliée aux molécules de DPPC entourant les molécules d'ergostérol qui, elles, seraient en interaction directe avec l'AmB, retrouvée sous forme de pores membranaire (DPPC #2). Cette seconde phase ressemblerait étrangement à la phase riche en ergostérol puisque, nous l'avons vu au chapitre IV, les phases riches en stérol correspondent aux molécules de phospholipides ordonnées par celles des stérols. Cette interaction entre les molécules d'AmB avec les molécules d'ergostérol induit probablement un effet de structuration sur les molécules de DPPC environnantes de sorte que la température de transition de cette phase (figure 7.3A, courbe orangée) soit légèrement augmentée par rapport à celle des phases riches en ergostérol (figure 7.3A, point fuchsia sur l'axe des ordonnées).

Suite à cette analyse, le fait que la largeur à mi-hauteur de la première transition de phase augmente en fonction de la concentration en AmB, tandis que sa température demeure constante, peut être expliquée de la façon suivante : plus la concentration en AmB augmente dans la bicouche, plus il y a de pores membranaires (chapitre V). Cependant, nous avons vu aux deux chapitres précédents que l'augmentation de la concentration en pores membranaires n'influençait aucunement les valeurs de largeur à mi-hauteur. En présence d'ergostérol, la nature de ces pores membranaires est donc nécessairement différente de celle des pores d'AmB retrouvés dans les matrices contenant uniquement l'AmB ou celles contenant aussi le cholestérol, ce qui va effectivement dans le sens d'une implication de l'ergostérol dans la structure des pores membranaires d'AmB. De plus, l'augmentation de la valeur de la largeur à mi-hauteur plafonne à 12,5% en mole d'AmB. Puisque la bicouche contient aussi 12,5% en mole d'AmB, ces résultats laissent donc supposer qu'il y aurait une association possible entre les molécules d'ergostérol et d'AmB et ce, dans un rapport molaire 1 :1. Nous verrons plus loin dans cette section si cette hypothèse est fondée.

Afin de compléter l'analyse de ces deux transitions de phase, nous avons porté en graphique leur valeur d'enthalpie respective, ainsi que celle du processus thermodynamique total, en fonction de la concentration en AmB. La figure 7.5 montre donc les courbes d'enthalpie obtenues où la courbe en bleue correspond à celle de la première transition et celle en orangé, à la seconde. Le tracé illustré en vert correspond à celui de l'enthalpie totale du processus thermodynamique. De plus, afin de faciliter l'analyse de cette figure, les données obtenues pour le mélange binaire DPPC/12,5%ergostérol sont indiquées sur l'axe des ordonnées : le point noir correspond à la transition des phases pauvres en ergostérol et celui en fuchsia, à celle des phases riches en ergostérol.

Tout d'abord, nous pouvons voir sur cette figure que les deux transitions enregistrées pour les mélanges ternaires correspondent bel et bien aux deux transitions de phase présentes pour le mélange binaire DPPC/12,5% en mole d'ergostérol puisque les valeurs d'enthalpie de chacune de ces transitions se rapprochent de celles enregistrées pour le mélange binaire DPPC/12,5%ergostérol.

De plus, la figure 7.5 montre aussi que l'enthalpie associée à la première transition de phase observée (courbe bleue) diminue entre 1% et 6,25% en mole d'AmB pour ensuite augmenter entre 6,25% et 12,5% en mole d'AmB. La valeur d'enthalpie enregistrée atteint ensuite un plateau. Pour ce qui est de la seconde transition enregistrée (courbe orangée), le comportement de la valeur d'enthalpie de transition correspond exactement à l'inverse de celui observé pour la première transition c'est-à-dire qu'elle augmente entre 1% et 6,25% en mole d'AmB pour ensuite diminuer entre 6,25% et 12,5% en mole d'AmB. La valeur d'enthalpie enregistrée atteint ensuite ici aussi un plateau. L'allure de ces deux courbes entre 1% et 12,5% en mole d'AmB indique qu'il y aurait un transfert possible, d'une phase à l'autre, de molécules de DPPC associées à chacune de ces deux phases.

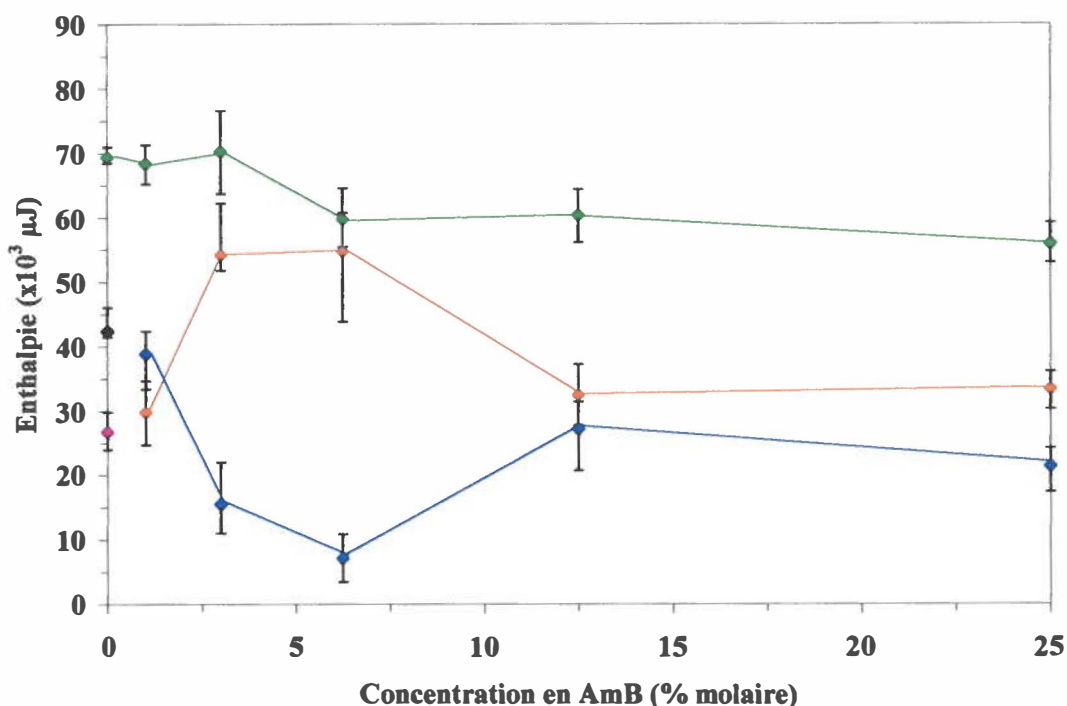


FIGURE 7.5: Enthalpie de transition en fonction de la concentration en AmB pour la première transition de phase (courbe bleue), la seconde (courbe orangée) et l'enthalpie totale (courbe verte) pour les mélanges DPPC/12,5%ergostérol/AmB.

Afin d'alléger l'analyse de cette figure, les différentes courbes seront séparées par section, en fonction de la concentration en AmB. Premièrement, entre 0% et 6,25% en mole d'AmB, les résultats obtenus indiquent qu'il y aurait de moins en moins d'ergostérol "libre" dans la bicouche c'est-à-dire des molécules d'ergostérol qui n'interagiraient pas avec l'AmB. Par conséquent, le nombre de molécules de DPPC interagissant avec ces molécules d'ergostérol diminuerait (phase pauvre en ergostérol, 1^{ière} transition de phase, courbe bleue) et le nombre de molécules de DPPC interagissant avec l'ergostérol, qui est en association avec les pores d'AmB (2^{ème} transition, courbe orangée), augmenterait. Sachant que la variation de l'enthalpie d'une transition, qui conserve la même température en fonction de la concentration en AmB, correspond à la variation du nombre de molécules impliquées dans cette transition, cette explication est donc la plus plausible selon nous pour interpréter les résultats obtenus pour les concentrations en AmB situées entre 0% et 6,25% en mole.

Deuxièmement, les données obtenues entre 6,25% et 12,5% en mole d'AmB montrent que l'enthalpie de la première transition de phase augmente tandis que celle de la seconde diminue. Nous expliquons ces variations en fonction de la concentration en AmB par l'agréation des pores membranaires d'AmB-ergostérol. Dans ce cas, il y aurait de moins en moins de DPPC en interaction avec l'ergostérol des pores membranaires (2^{ème} transition, courbe orangée) et par conséquent, il y aurait plus de DPPC dans la phase pauvre en ergostérol (1^{ère} transition, courbe bleue).

Troisièmement, la figure 7.5 montre qu'entre 12,5% et 25% en mole d'AmB, les valeurs obtenues plafonnent. Nous suggérons donc qu'au-delà de 12,5% en mole d'AmB, il n'y a plus de nouveaux pores d'AmB de formés, impliquant des molécules d'ergostérol. Autrement dit, compte tenu de la stoechiométrie de type 1 :1 impliquant l'AmB et l'ergostérol dont nous avons parlé ci-dessus, au-delà de 12,5% en mole d'AmB, il n'y aurait plus d'ergostérol disponible pour interagir avec les nouveaux pores d'AmB qui, eux, ne seraient formés que d'AmB seule. Par conséquent, pour une bicouche contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 25% en mole d'AmB, il y aurait environ 12,5% en mole d'AmB de libre c'est-à-dire n'interagissant pas avec l'ergostérol. Ces molécules d'AmB sont possiblement présentes sous forme de pores membranaires, sans ergostérol, comme nous l'avons schématisé au chapitre V, figure 5.6).

Pour ce qui est de la variation des valeurs d'enthalpie totale du processus thermodynamique (courbe verte) en fonction de la concentration en AmB, nous pouvons voir sur la figure 7.5 que ces valeurs diminuent légèrement et continuellement jusqu'à 6,25% en mole d'AmB. Au-delà de cette concentration, aucune diminution n'est observée. Cette variation des valeurs d'enthalpie totale en fonction de la concentration en AmB peut facilement être expliquée par la somme des valeurs d'enthalpie des deux transitions de phase mises en évidence par décomposition, précédemment décrites. Ce résultat est très différent de celui observé pour les deux autres mélanges lipidiques étudiés précédemment puisque dans ces deux derniers cas, il y avait diminution jusqu'à 25% en mole d'AmB.

À la lumière des résultats dont nous venons de discuter, il semblerait donc que dans le mélange ternaire DPPC/ergostérol/AmB, la fine balance des interactions moléculaires prévalant entre ces composantes penche en faveur d'interactions AmB-ergostérol davantage privilégiées. Cela conduirait à une concentration accrue d'ergostérol au voisinage des pores d'AmB, contrairement à ce que nous avons observé pour le cholestérol au chapitre précédent. Ce modèle est compatible avec la rigidité de la molécule d'AmB et de celle de l'ergostérol.

Cette analyse peut aussi fournir des renseignements expliquant la prédominance de l'activité thérapeutique de l'AmB sur sa toxicité. En effet, l'implication directe des molécules d'ergostérol dans la structure des pores membranaires d'AmB modifie fort probablement l'intensité des liens AmB-AmB, ce qui peut modifier les paramètres structuraux et dynamiques de ces pores membranaires, par rapport à ceux rencontrés dans les mélanges DPPC/AmB et DPPC/cholestérol/AmB. Cohen (1986) a montré par des études de perméabilité que le diamètre des pores d'AmB est différent lorsque cet antifongique est en présence ou non d'ergostérol. D'autres renseignements contenus dans la littérature révèlent que les cellules ou liposomes contenant l'ergostérol montrent une plus grande perméabilité aux cations Ca^{2+} que les membranes contenant la même quantité de cholestérol (Ramos *et al.* 1989, Cohen 1986). La nature de ces structures organisées d'AmB doit donc être différente, comme le montrent nos résultats, selon qu'il y ait de l'ergostérol ou non.

7.1.2 Mélanges ternaires contenant 28% en mole d'ergostérol.

Comme nous l'avons vu au chapitre IV, à 28% en mole d'ergostérol, il ne reste pratiquement plus de régions phospholipidiques non-touchées par le stérol, en fait, nous ne sommes en présence pratiquement que d'une seule phase, la phase L_o . Lorsque ce mélange lipidique contient aussi différentes quantités d'AmB, correspondant aux concentrations de 6,25%, 12,5% et 25% en mole, les thermogrammes suivants sont obtenus et présentés en orangé sur la figure 7.6. Sur cette figure, le thermogramme illustré en bleu correspond à celui enregistré pour les bicouches de DPPC contenant 28% en mole d'ergostérol.

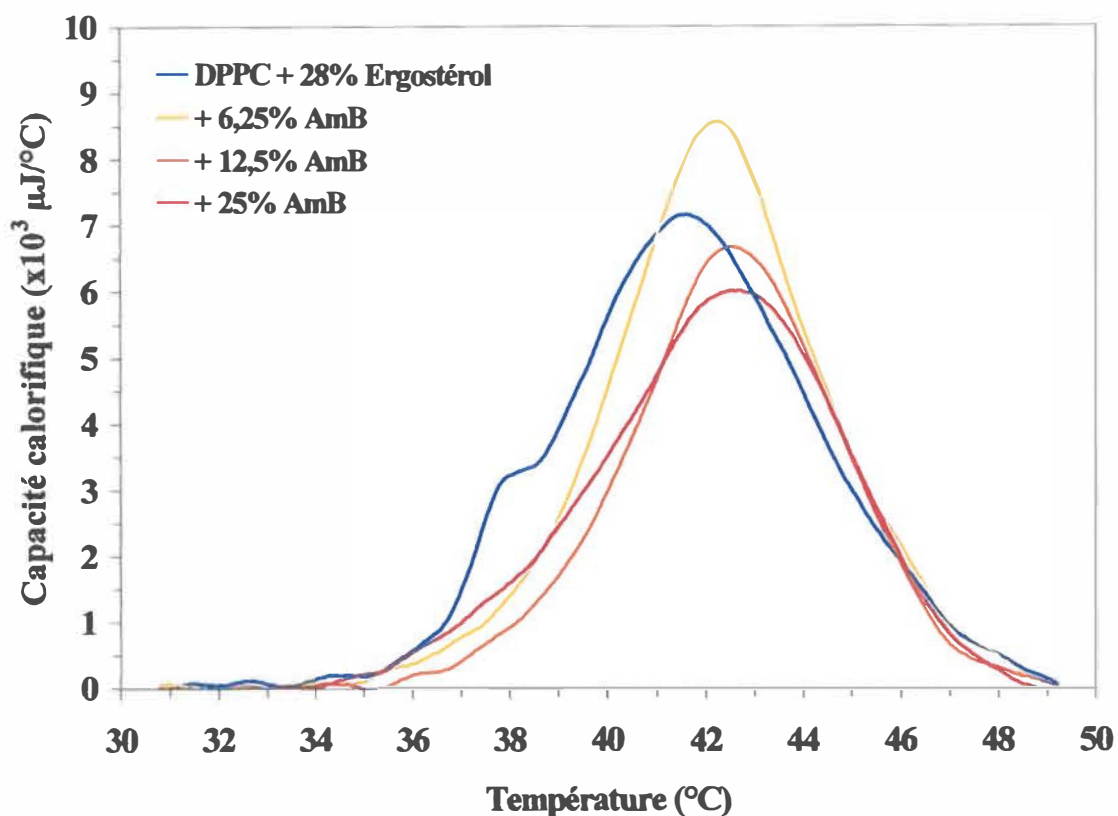


FIGURE 7.6: Thermogrammes des bicouches de DPPC 4 mg/mL contenant 28% en mole d'ergostérol avec et sans AmB.

Cette figure montre essentiellement que lorsque la concentration en AmB augmente, le signal thermique enregistré, centré aux alentours de $43^\circ C$, diminue légèrement sans pour autant que sa température soit déplacée significativement. Il y a donc ici aussi, comme pour les bicouches DPPC/28% cholestérol, un effet visible de la part de l'AmB et ce, même en présence de 28% en mole d'ergostérol.

L'interprétation formulée suite à l'analyse des résultats obtenus pour le mélange lipidique contenant 12,5% en mole d'ergostérol en présence d'AmB tient ici aussi puisque pour une concentration de 28% en mole d'ergostérol et 6,25% en mole d'AmB, en supposant une association 1 :1 entre ces molécules, il resterait environ 22% en mole d'ergostérol libre dans la bicouche, molécules qui exercent toujours leur effet sur le signal thermotropique de la DPPC. Pour 12,5% en mole d'AmB, cette concentration en ergostérol serait d'environ 16% en mole et finalement, il ne resterait pratiquement aucun ergostérol libre pour une concentration en AmB de 25% en mole. Il ne faut cependant

pas oublier que la DPPC est toujours en interaction avec l'ergostérol, même en présence d'AmB, ce qui induit pratiquement le même effet sur le thermogramme global, que celui induit par l'incorporation de 28% en mole d'ergostérol.

7.1.3 Comportement global des bicouches contenant l'ergostérol et l'AmB

L'analyse calorimétrique sera ici complétée en comparant l'effet de l'AmB sur les valeurs d'enthalpie totale pour chacun des mélanges étudiés. Pour ce faire, ces données sont portées en graphique en fonction de la concentration en AmB à la figure 7.7. Sur cette figure, la courbe obtenue pour le mélange DPPC/AmB est représentée en noir et celles en bleu correspondent aux trois mélanges contenant à la fois l'ergostérol et l'AmB.

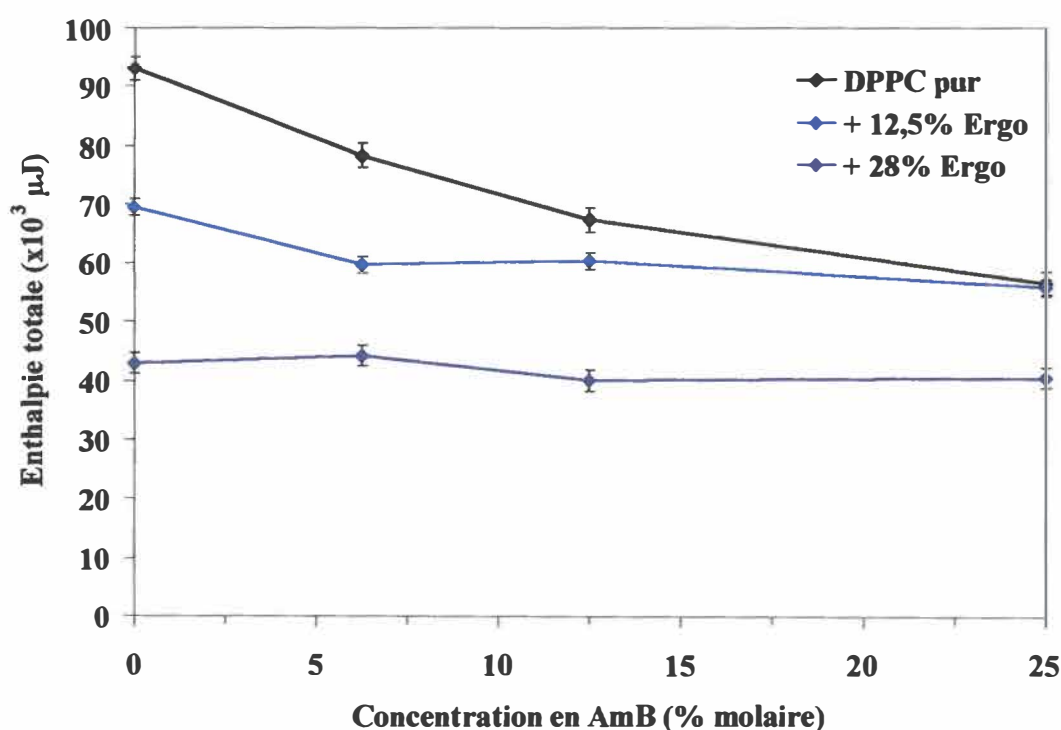


FIGURE 7.7 : Enthalpies totales pour le mélange DPPC/AmB et pour les mélanges ternaires DPPC/ergostérol/AmB en fonction de la concentration en AmB.

Cette figure montre que pour les mélanges sans AmB (données à 0% d'AmB), la valeur de l'enthalpie totale du processus thermodynamique diminue en fonction de la concentration en ergostérol. L'interprétation de ces résultats a été largement discutée au chapitre IV.

La figure 7.7 montre aussi que l'enthalpie totale des bicouches sans stérol diminue progressivement, en fonction de la concentration en AmB (courbe noire). Cette diminution a aussi été discutée au chapitre V. Par contre, en présence d'ergostérol, pour chacune des trois concentrations utilisées, les valeurs d'enthalpie totale de la transition globale demeurent sensiblement constantes en fonction de la concentration en AmB (courbes bleues), reflétant ainsi une annulation de l'effet normalement induit par la présence des molécules d'AmB sur l'enthalpie totale de la DPPC. Ces résultats indiquent donc fortement que l'AmB interagit avec l'ergostérol, au détriment des interactions DPPC-AmB. En ce sens, si on considère l'ensemble des interactions possibles dans le mélange DPPC/ergostérol/AmB, il est clair que les interactions AmB-AmB sont déterminantes puisqu'à la base de la formation d'agrégats (pores) dans la membrane. Il est clair aussi que les interactions hydrophobes AmB-ergostérol semblent elles aussi importantes, nous l'avons vu, à la lumière des résultats discutés dans ce chapitre. L'organisation latérale des composantes dans la bicouche DPPC/ergostérol/AmB (pores d'AmB impliquant l'ergostérol) reflète donc la fine balance des interactions homo- et hétéromoléculaires prévalant entre les différentes molécules impliquées.

À la lumière de tous les résultats calorimétriques présentés et analysés dans cette section, nous avons mis en évidence une différence importante entre les bicouches contenant 12,5% en mole de cholestérol, qui donnent un signal quasi-identique à celui des bicouches contenant uniquement l'AmB, et celles contenant la même quantité d'ergostérol. Pour ces dernières, nous proposons que l'AmB se retrouve aussi sous forme de pores membranaires, ainsi que sous forme d'agrégats de ces pores d'AmB. Cependant, ces pores d'AmB seraient entourés de molécules d'ergostérol, fort probablement dans un rapport molaire 1:1. De plus, les résultats obtenus pour les matrices contenant 28% en mole d'ergostérol supportent cette interprétation.

7.2 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE FTIR

Dans l'optique d'étudier quel effet aura l'ergostérol sur l'ordre conformationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC en présence des molécules d'AmB, la figure 7.8 présente les courbes de fusion obtenues pour les matrices lipidiques contenant à la fois l'ergostérol, soit 12,5% (A) ou 28% en mole d'ergostérol (B), et l'AmB. De plus, sur cette figure, ont été rajoutées la courbe de fusion enregistrée pour l'échantillon liposomal pur (courbe noire), celle de la DPPC contenant 25% en mole d'AmB (courbe orangée, point noir) et celle de la DPPC contenant uniquement l'ergostérol (courbe bleue).

Les résultats présentés à la figure 7.8, obtenus pour les bicouches contenant soit 12,5% (A) ou 28% en mole d'ergostérol (B) et l'AmB, montrent que par rapport au nombre d'onde enregistré pour le mélange binaire DPPC/ergostérol, la présence additionnelle de l'AmB augmente la valeur du nombre d'onde de la bande de vibration du groupement CH_2 des molécules de DPPC et ce, peu importe la température. Cette augmentation est plus importante pour les bicouches qui contiennent 28% en mole d'ergostérol (B). Puisque l'effet engendré par la présence simultanée de l'ergostérol et de l'AmB est plus important pour les bicouches contenant 28% en mole d'ergostérol, nous utiliserons, pour la suite de cette section, uniquement les données obtenues pour les bicouches qui contiennent 28% en mole d'ergostérol et ce, dans le but de simplifier la lecture de ce texte.

De façon plus détaillée, la figure 7.8 (B) montre donc qu'en-dessous de la transition de phase globale, la valeur du nombre d'onde obtenue pour les bicouches contenant à la fois 28% en mole d'ergostérol et 6,25% en mole d'AmB est de $2849,2 \text{ cm}^{-1}$ (courbe jaune). Notons que pour les bicouches ne contenant que 28% en mole d'ergostérol (courbe bleue), cette valeur est de $2848,6 \text{ cm}^{-1}$ et qu'une différence de $0,5 \text{ cm}^{-1}$ en FTIR est significative, compte tenu que la valeur de l'écart-type moyen est de $\pm 0,1 \text{ cm}^{-1}$. Pour une concentration de 12,5% en mole d'AmB (courbe orangée), cette

valeur augmente aux alentours de $2849,7\text{ cm}^{-1}$ pour ensuite demeurer stable entre 12,5% et 25% en mole d'AmB (courbes orangée et rouge).

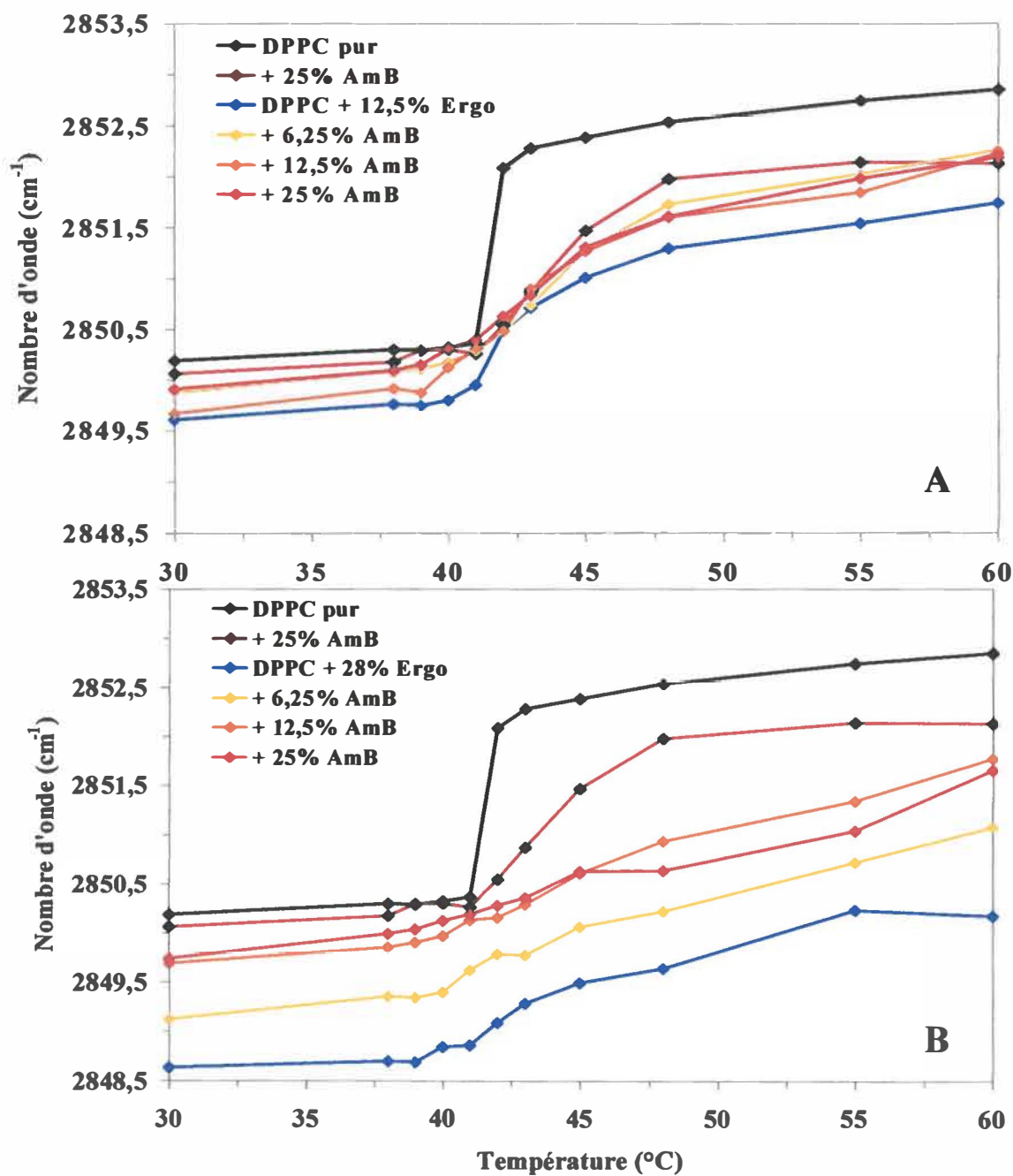


FIGURE 7.8: Courbes de fusion obtenues, par FTIR, pour les mélanges DPPC/12,5% ergostérol/AmB (A) et DPPC/28% ergostérol/AmB (B) (écart-moyen de $\pm 0,1\text{ cm}^{-1}$).

Ces résultats mettent donc en évidence un effet de l'augmentation de la concentration en AmB sur la valeur du nombre d'onde enregistrée, contrairement aux résultats obtenus pour les deux autres matrices lipidiques étudiées où aucun effet de l'augmentation de la concentration en AmB ne fût observé. En présence d'ergostérol, plus la concentration en AmB augmente, plus la valeur du nombre d'onde se rapproche de celle enregistrée pour les bicouches lipidiques pures ou celles ne contenant que l'AmB (courbe noire et orangée avec points noirs). L'antifongique diminue donc l'effet normalement induit par la présence de 28% d'ergostérol sur les chaînes aliphatiques de la DPPC.

La comparaison des courbes de fusion présentées à la figure 7.8 B montre par la suite que la présence simultanée de 28% en mole d'ergostérol et de l'antifongique ne semble pas affecter le profil de la transition de phase globale du processus thermotropique (c'est-à-dire entre 41°C et 47°C), par rapport à celle obtenue lorsque la bicouche ne contient que 28% en mole d'ergostérol (courbe bleue). Cette observation coïncide parfaitement avec les résultats calorimétriques puisque le signal thermotropique enregistré pour cette concentration en ergostérol ne change pratiquement pas lorsque la bicouche contient ou non l'AmB (figure 7.6). Ce qui est important de noter pour cette région de température, tout comme pour le mélange contenant le cholestérol, c'est que même par FTIR, une transition de phase est toujours détectée pour les bicouches de DPPC contenant 28% en mole d'ergostérol et 25% d'AmB, ce qui coïncide aussi avec les résultats calorimétriques.

Pour la région de température située au-dessus de la transition de phase globale (c'est-à-dire au-dessus de 47°C), la figure 7.8 montre aussi que la présence simultanée de l'ergostérol et de l'AmB augmente la valeur du nombre d'onde de la bande de vibration du groupement CH₂ de la DPPC, par rapport à celle enregistrée pour les bicouches qui contiennent uniquement l'ergostérol (courbe bleue). Cet effet est aussi plus important en fonction de la concentration en AmB et plafonne à 12,5% en mole d'AmB.

Tous ces résultats IR montrent jusqu'à maintenant que peu importe la température de l'échantillon, l'effet induit par les molécules d'AmB sur l'ordre conformationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC est le même c'est-à-dire qu'il y a augmentation de la valeur du nombre d'onde, par rapport à celle enregistrée pour les bicouches de DPPC contenant uniquement l'ergostérol (courbe bleue). Ceci apporte l'évidence que l'AmB interagit préférentiellement avec les molécules d'ergostérol à l'intérieur de la matrice lipidique, empêchant ainsi l'ergostérol d'exercer son effet d'ordonnement, normalement induit, sur les chaînes aliphatiques de la DPPC. Cette association ainsi formée entre les molécules d'ergostérol et d'AmB semble de plus prévaloir même à plus haute température.

Cette interprétation est appuyée dans la littérature par les résultats obtenus suite à des études de monocouches, parus dans deux articles, l'un de Barwicz et Tancrède (1997) et l'autre, de Seoane *et al.* (1998). Les premiers auteurs ont démontré entre autre que l'AmB interagissait avec l'ergostérol (13% et 30% en mole) contenu dans des monocouches de DOPC par des mesures de pression de surface. Les seconds auteurs ont appuyé leurs résultats, en utilisant aussi la technique des monocouches, mais cette fois-ci sur des monocouches formées uniquement de stérols et d'AmB. Ces derniers ont démontré que l'AmB formait une interaction très forte avec l'ergostérol. Ces résultats renforcent donc les résultats que nous avons obtenus par spectroscopie FTIR où nous démontrons que l'AmB atténue l'effet d'ordonnement engendré normalement par les molécules d'ergostérol sur la DPPC, impliquant nécessairement que l'AmB et l'ergostérol sont mobilisés par le biais d'interactions entre eux.

Cette interaction entre les molécules d'AmB et d'ergostérol serait favorisée, comme l'ont démontré Charbonneau *et al.* (2001), par la présence d'une double liaison supplémentaire en position 7 sur l'ergostérol, par rapport au cholestérol. Cette double liaison contribue à accentuer le caractère planaire de la molécule d'ergostérol, favorisant probablement ainsi le rapprochement entre les molécules d'ergostérol et d'AmB et par conséquent, l'établissement d'interactions hydrophobes fortes entre ces molécules serait favorisé.

Puisque les résultats présentés à la figure 7.8 montrent que la présence simultanée de l'ergostérol et de l'AmB induit une diminution du nombre de conformères gauches du lipide, par rapport aux bicouches ne contenant que l'ergostérol, il est possible de penser qu'en interagissant avec les membranes des cellules de champignons, l'AmB induirait une redistribution des molécules d'ergostérol dans ces membranes. Les cellules pathogènes se retrouveraient alors en déséquilibre homéostatique ce qui pourrait aussi expliquer l'activité thérapeutique de l'AmB, conjointement à la formation de pores membranaires. En effet, Hsu et Burnette (1997) suggèrent, suite à des études de conductance, que les molécules d'ergostérol normalement impliquées dans le fonctionnement des protéines membranaires ne pourraient plus, en présence d'AmB, exercer leur fonction normale.

La figure 7.8 révèle de plus un autre point important. L'atténuation de l'effet de l'ergostérol sur l'ordre conformationnel des chaînes de la DPPC, par la présence d'AmB, semble plafonner pour une concentration de 12,5% en mole d'AmB, avec une valeur de nombre d'onde de $2849,7 \text{ cm}^{-1}$. Il semble donc à priori que l'association AmB-ergostérol implique un rapport molaire 1 :2 puisque l'effet est maximal pour ce ratio molaire. Par contre, ces résultats n'excluent pas la possibilité d'un arrangement 1 :1 puisque pour une bicouche contenant 28% en mole d'ergostérol et 12,5% en mole d'AmB (courbe orangée), les molécules d'ergostérol restantes, environ 15,5% en mole d'ergostérol, seraient alors dispersées dans la bicouche phospholipidique. La valeur du nombre d'onde de la vibration d'élongation du groupement CH_2 alors enregistrée lorsque la bicouche contient à la fois 28% en mole d'ergostérol et 12,5% en mole d'AmB, vient appuyer cette hypothèse puisqu'elle correspond parfaitement à celle obtenue pour le mélange DPPC contenant 12,5% en mole d'ergostérol (figure 7.8A, courbe bleue), autant avant qu'après la transition de phase. En effet, la valeur enregistrée dans les deux cas est de $2849,5 \text{ cm}^{-1}$, pour des températures inférieures à la transition de phase globale.

Comme il a été mentionné au chapitre I, plusieurs auteurs se sont avancés quant à la stoechiométrie des molécules impliquées dans la formation des pores membranaires.

Parmi eux, le groupe de Oehlschlager et Laks (1980) et celui de Bolard *et al.* (1980) ont conclu que le complexe AmB/ergostérol peut aussi bien exister dans une stoechiométrie de 1 : 1 que de 1 : 2. Cependant, à la lumière des résultats que nous avons présentés dans ce chapitre, tant par DSC que par FTIR, nous soutenons fortement l'hypothèse de l'existence d'une association 1 :1 entre les molécules d'AmB et d'ergostérol dans la formation d'un pore membranaire.

Toutes les données FTIR appuient donc l'interprétation énoncée suite à l'analyse des résultats calorimétriques, présentés plus tôt dans ce chapitre, où nous avançons l'hypothèse que l'AmB interagissait directement avec les molécules d'ergostérol dans la bicouche lipidique. La FTIR montre de plus que cette association, fort probablement dans un rapport molaire 1 :1, semble prévaloir même jusqu'à 60°C.

7.3 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE RMN-²H

Les résultats RMN obtenus pour les bicouches de DPPC contenant l'une ou l'autre des deux concentrations en ergostérol utilisées, soit 12,5% et 28% en mole, en présence ou non d'AmB, sont présentés à la figure 7.9. Nous avons publié ces résultats pour la première fois en 2002 (Paquet *et al.*).

Sur cette figure, les valeurs d'écart quadripolaire mesurées pour le carbone près de la tête polaire (C2) sont présentées en A en fonction de la concentration en AmB et celles obtenues pour le carbone en bout de chaînes (C16), en B. La courbe obtenue pour la DPPC-*d*₃₁ pur est représentée en noir et celles obtenues pour les trois concentrations en ergostérol, par les différentes teintes de bleu. Seuls les résultats obtenus pour les mélanges lipidiques contenant l'ergostérol et 25% en mole d'AmB sont présentés sur cette figure pour fins de clarté. De plus, ces résultats représentent l'effet maximal qu'a l'AmB sur l'écart quadripolaire. Les courbes obtenues pour les bicouches contenant l'AmB y sont finalement illustrées en orangé.

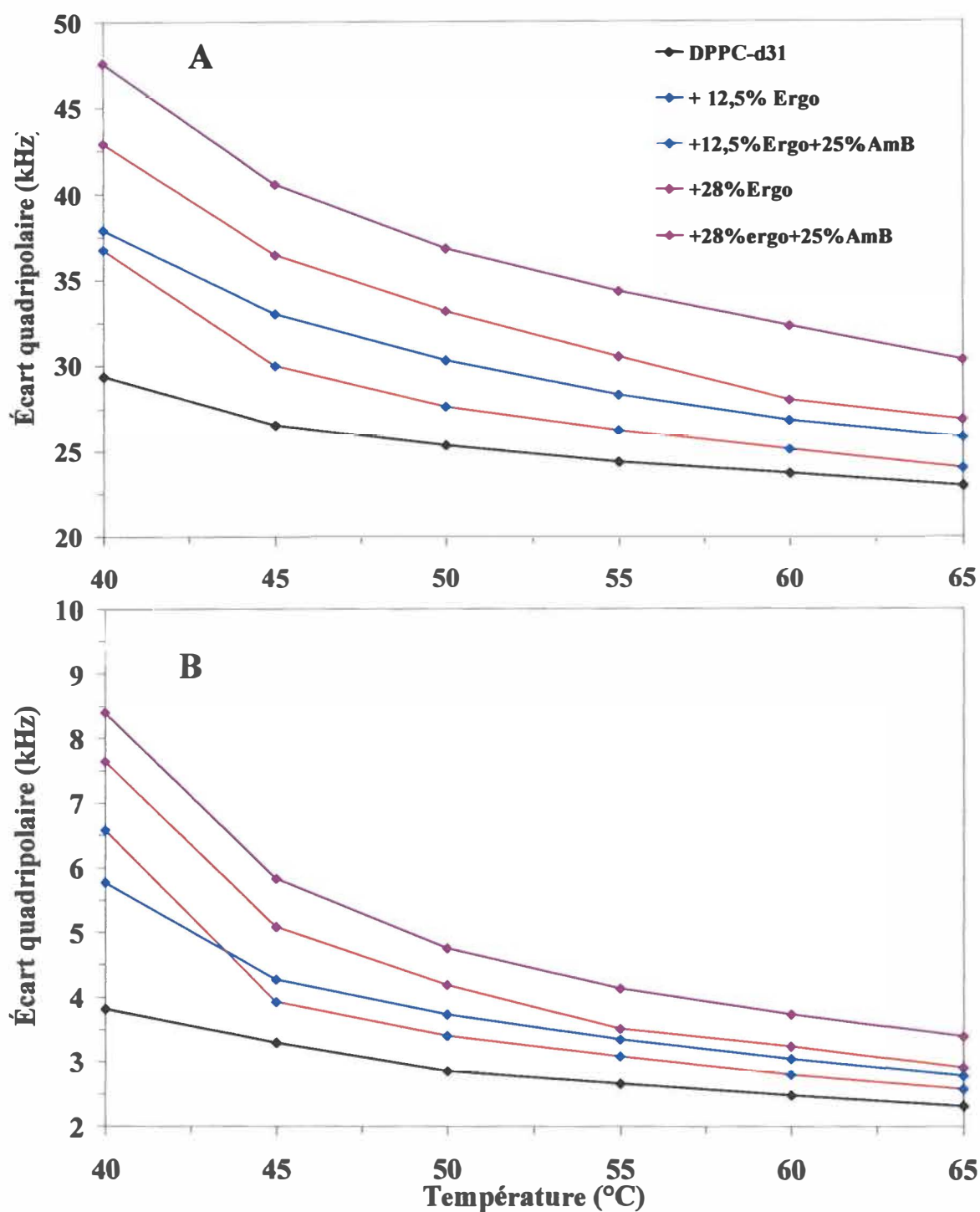


FIGURE 7.9: Écarts quadripolaires obtenus pour le carbone près de la tête polaire (A) et en bout de chaîne (B) en fonction de la température pour les mélanges DPPC- d_{31} /ergostérol/25%AmB. L'écart-type moyen est de l'ordre de $\pm 0,2$ kHz pour les données recueillies pour la région près de la tête polaire (A) et de $\pm 0,1$ kHz pour celles correspondant au lien C-D en bout de chaîne (B).

La figure 7.9 permet de constater que pour tous les mélanges lipidiques étudiés, la valeur mesurée de l'écart quadripolaire diminue en fonction de la température, que ce soit près de la tête polaire (A) ou en bout de chaîne (B), ce qui reflète donc ici aussi l'augmentation de la fluidité membranaire.

Pour les deux concentrations en ergostérol utilisées, soit 12,5% et 28% en mole, la figure 7.9 montre que la présence de 25% en mole d'AmB diminue la valeur de l'écart quadripolaire enregistrée par rapport à celle enregistrée pour le mélange binaire correspondant, sans AmB. La présence d'AmB diminue donc l'ordre conformationnel induit par l'ergostérol seul sur les chaînes aliphatiques de la DPPC. Ces résultats concordent parfaitement avec ceux obtenus par spectroscopie FTIR puisque par cette dernière technique, nous avons aussi observé une atténuation de l'effet de l'ergostérol, par la présence d'AmB, sur l'ordre des chaînes aliphatiques de la DPPC. L'interaction AmB-ergostérol se fait donc au détriment de l'interaction DPPC/ergostérol.

Afin de compléter l'analyse des résultats RMN, le second moment (M_2) des spectres originaux a été calculé et les valeurs obtenues ont été mises en graphique (figure 7.10), en fonction de la température. Cette figure présente une courbe illustrée en bleue, associée aux bicouches de DPPC- d_{31} contenant 12,5% d'ergostérol, et une autre en vert, correspondant aux bicouches contenant 28% en mole de ce stérol. Les courbes obtenues pour ces deux mélanges lipidiques contenant en plus 25% en mole d'AmB sont aussi illustrées en orange sur cette figure. Seule cette concentration en AmB est utilisée ici aussi afin de faciliter l'analyse et de plus, l'effet observé à cette concentration est maximal.

Cette figure montre que la présence de cette concentration en AmB dans le mélange lipidique diminue la valeur du second moment, par rapport à celle enregistrée pour le mélange binaire sans AmB et ce, de façon beaucoup plus marquée pour les bicouches contenant 28% en mole d'ergostérol. Nous observons donc ici aussi cet effet de désordonnement des chaînes aliphatiques, induit par la présence d'AmB, par rapport

à l'ordre orientationnel des molécules de DPPC dans le mélange binaire DPPC/ergostérol.

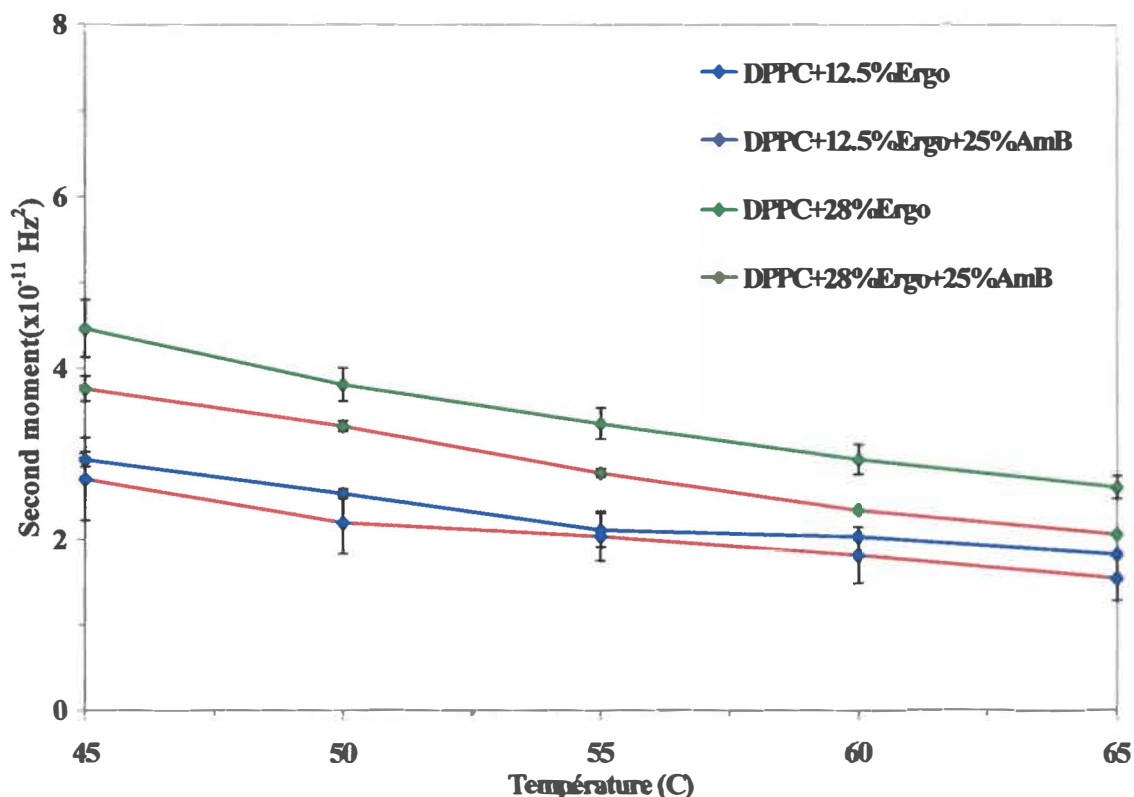


FIGURE 7.10: Graphique du second moment spectral en fonction de la température pour les bicouches de DPPC- d_{31} , 20 mg/mL contenant 12,5% ou 28% en mole d'ergostérol et l'AmB.

Il est important de mentionner ici que cette variation des valeurs du second moment en fonction de la concentration en AmB suggère que l'AmB n'induit pas de perte de symétrie axiale sur les molécules de DPPC puisque dans ce cas, il y aurait eu augmentation de la valeur du second moment lorsque les bicouches contiennent l'AmB (voir figure 5.11 chapitre V). Ce résultat signifie donc que l'AmB n'induit pas l'apparition d'une composante large et stable en fonction de la concentration en AmB, comme ce qui avait été obtenu pour le mélange lipidique DPPC/AmB (chapitre V). De plus, les spectres obtenus ne contiennent pas une fraction de spectre type gel, comme ce qui avait été observé pour le mélange DPPC/AmB.

Le fait que les résultats obtenus par RMN pour ce mélange lipidique ne mettent pas en évidence des phases où l'AmB interagit directement avec la DPPC, soit une fraction du spectre type "gel" ou une composante large, appuie l'interprétation formulée suite à l'analyse des résultats calorimétriques. En effet, par cette dernière technique, les deux transitions de phases enregistrées ont été associées à deux phases où les molécules de DPPC ne sont pas en contact direct avec l'antifongique, mais en contact avec les molécules d'ergostérol qui, elles, le sont.

À la lumière des résultats obtenus par cette technique, il est clair ici aussi que l'AmB interagit préférentiellement avec les molécules d'ergostérol dans la matrice lipidique, atténuant ainsi leur effet sur les chaînes aliphatiques de la DPPC. Ce résultat est cohérent avec les données calorimétriques et FTIR puisque par la première technique, il y avait augmentation du nombre de molécules de DPPC en phase pauvre en ergostérol en fonction de la concentration en AmB. Par FTIR, nous avons aussi observé cet effet, induit par la présence de molécules d'AmB dans le mélange DPPC/ergostérol/AmB.

7.4 RÉSULTATS DE SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

Afin de caractériser l'interaction AmB/ergostérol en milieu lipidique, un contrôle est tout d'abord effectué à l'aide d'une solution aqueuse 5% propanol contenant l'AmB et l'ergostérol afin de caractériser l'interaction AmB/ergostérol, en absence de phospholipide. Dans un deuxième temps, les résultats obtenus seront comparés à ceux enregistrés pour les échantillons liposomaux contenant à la fois la DPPC, l'ergostérol et l'AmB. La figure 7.11 présente en A le spectre obtenu pour le contrôle, où la concentration en ergostérol est $5,5 \times 10^{-5}$ M et celle de l'AmB, de $5,5 \times 10^{-5}$ M. Le second spectre présenté (B), correspond à celui enregistré pour l'échantillon liposomal de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 12,5% en AmB ($6,8 \times 10^{-4}$ M).

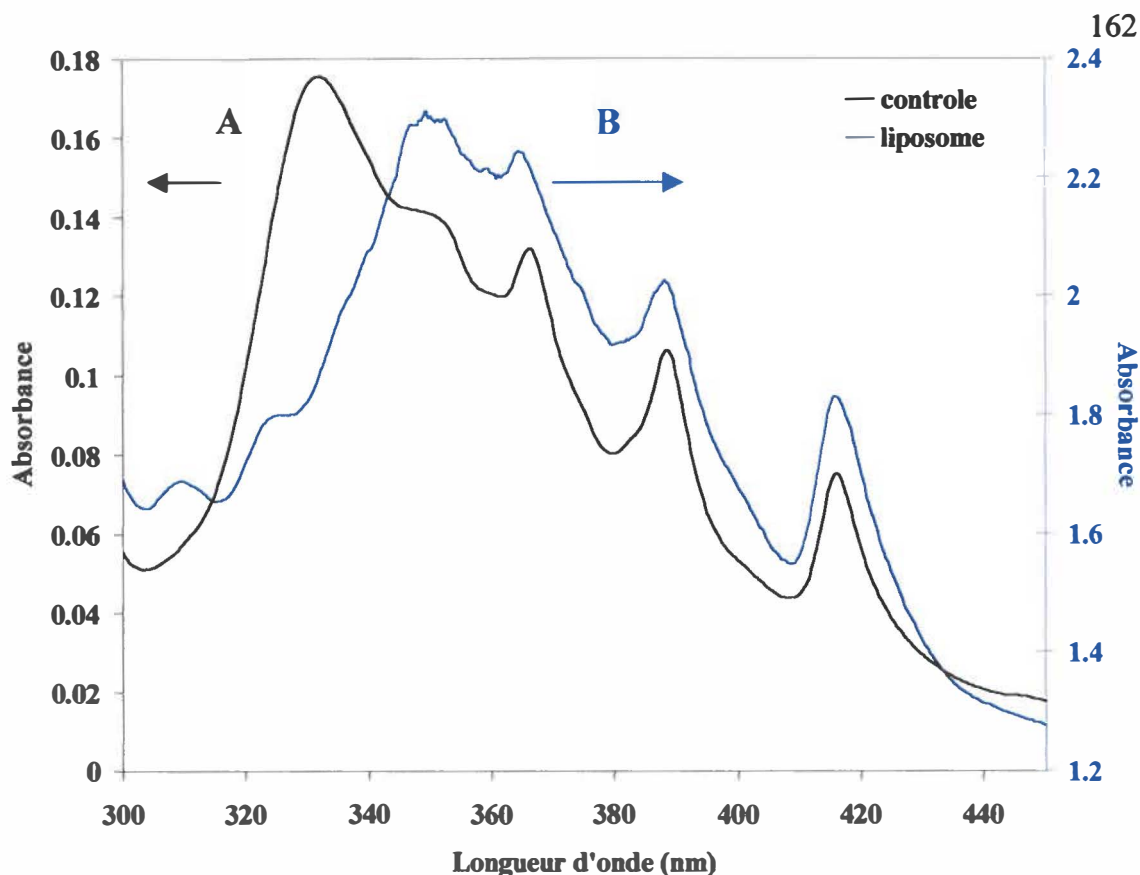


FIGURE 7.11: Spectres UV-visible d'une dispersion en solution aqueuse 5% propanol d'ergostérol et de l'AmB (A, cuvette de 1 cm) et d'un échantillon liposomal de DPPC 4 mg/mL contenant 12,5% en mole d'ergostérol et 12,5% en mole d'AmB (B, cuvette de 0,1 cm).

Les spectres UV-visibles présentés à la figure 7.11 montrent premièrement une bande d'absorption située à 416,3 nm sur le spectre contrôle (spectre A). Cette bande caractérise donc, comme il a été mentionné au chapitre II, l'interaction de l'AmB avec l'ergostérol. En milieu lipidique organisé, la valeur obtenue pour la position de cette bande est identique à celle enregistrée pour le contrôle, soit 416,3 nm. Cette technique nous permet donc de conclure, contrairement aux bicouches contenant le cholestérol, que l'AmB interagit avec les molécules d'ergostérol et ce, à l'intérieur d'un milieu lipidique organisé parce que la bande caractéristique de l'interaction AmB/DPPC se trouve à 415,2 nm.

Sur cette figure, on note dans un deuxième temps, que lorsque l'AmB est en milieu lipidique organisé, la bande d'absorption principale est centrée aux alentours de

348 nm ce qui indique que l'AmB est présente sous forme d'oligomères (Barwicz *et al.*, 1998). Cependant, en solution aqueuse 5% propanol, le spectre obtenu montre une bande d'absorption principale située aux alentours de 333 nm, qui est aussi associée à l'AmB sous forme d'oligomères, mais dans un environnement différent de la matrice lipidique. Ces résultats montrent donc que l'AmB est présente sous forme de pores membranaires en milieu lipidique organisé en présence d'ergostérol et que l'AmB ne se retrouve pas à l'extérieur des liposomes.

Les résultats présentés dans cette section sont différents de ceux obtenus pour les bicouches contenant le cholestérol (chapitre VI, figure 6.10) puisque dans ce dernier cas, il avait été impossible de déterminer si l'AmB interagissait avec le cholestérol ou la DPPC lorsqu'elle est solubilisée en milieu lipidique organisé. Les résultats UV-visibles présentés dans ce chapitre montrent donc de façon directe que l'AmB interagit avec l'ergostérol à l'intérieur de la bicouche de DPPC, ce qui valide l'interprétation formulée suite à l'analyse des résultats calorimétriques discutés précédemment et qui nous avaient amenés à considérer que les molécules d'AmB sont en interaction directe avec les molécules d'ergostérol. De plus, cette interaction AmB-ergostérol est effectuée au sein d'une organisation précise de l'AmB, soit sous forme de pore membranaire, à l'intérieur de la matrice lipidique de DPPC.

7.5 CONCLUSIONS PARTIELLES

Les résultats présentés dans ce chapitre ont montré que l'effet de l'AmB sur des bicouches lipidiques contenant l'ergostérol est complètement différent de l'effet induit par cet antifongique sur des bicouches lipidiques pures ou sur celles contenant du cholestérol. Dans ces deux derniers cas, nous avons vu que l'effet était semblable mais que la présence de molécules de cholestérol favorisait l'interaction de l'AmB avec le phospholipide, sans pour autant qu'il y ait interaction spécifique avec le cholestérol. En

présence d'ergostérol par contre, l'AmB interagirait directement avec ce stérol, formant probablement une association hydrophobe 1 :1 entre ces deux composantes.

Dans un premier temps, les thermogrammes enregistrés pour le mélange lipidique DPPC/ergostérol/AmB ont révélé la présence de seulement deux phases lipidiques, associées aux deux transitions de phases normalement rencontrées pour le mélange binaire DPPC/ergostérol soit la phase pauvre et la phase riche en ergostérol. En fonction de la concentration en AmB, la DSC a montré qu'il y avait un échange entre les molécules de DPPC contenues dans ces deux phases lipidiques. L'analyse de ces résultats suggère donc qu'il y a une interaction directe entre les molécules d'ergostérol et d'AmB puisque les deux transitions de phases normalement rencontrées pour les mélanges DPPC/AmB et DPPC/cholestérol/AmB, associées aux molécules de DPPC en interaction avec l'AmB, ne sont pas présentes lorsque la bicouche contient à la fois l'AmB et l'ergostérol.

Les spectroscopies FTIR et RMN-²H ont démontré que cette interaction préférentielle de l'AmB avec l'ergostérol dans la matrice lipidique se faisait aux dépens de l'interaction DPPC-ergostérol, puisque l'AmB semble atténuer l'effet de l'ergostérol sur les molécules de DPPC. L'effet global de cette association AmB-ergostérol en serait un de rigidification sur son environnement lipidique puisque par FTIR, en phase L α , l'état final est plus ordonné que celui induit par l'AmB seule sur la matrice lipidique. Cependant, cette interaction AmB-ergostérol a comme conséquence une augmentation de l'ordre moléculaire, par rapport à celle des bicouches ne contenant que l'ergostérol. Cet effet, engendré par la présence simultanée de l'AmB et de l'ergostérol, pourrait être, s'ajoutant à la présence de pores membranaires, un mécanisme additionnel expliquant l'activité thérapeutique de l'AmB.

De son côté, l'analyse des résultats obtenus par spectroscopie UV-visible suggère que l'AmB est présente sous forme de pores membranaires dans la matrice lipidique contenant l'ergostérol et que l'AmB interagit directement avec l'ergostérol en milieu lipidique organisé.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

L'interaction de l'Amphotéricine B avec les stérols membranaires est l'hypothèse la plus généralement acceptée pour expliquer le mécanisme d'action de cet antifongique puisque dans la plupart des études menées jusqu'à maintenant, la présence de ces stérols semble augmenter la sensibilité des membranes cellulaires vis-à-vis l'AmB (Andreoli 1969, Cass 1970 et Holtz et Finkelstein 1970 et plusieurs autres). Cependant, l'interaction de cet antifongique avec les stérols en milieu membranaire est encore aujourd'hui étudiée puisque son mécanisme d'action demeure incompris. Il est donc nécessaire de bien comprendre le ou les mécanismes d'action de cet antifongique afin de mieux cibler son interaction avec les cellules de champignons pathogènes et par le fait même, augmenter son activité thérapeutique.

Le but premier du présent travail était d'obtenir des informations relatives aux bases moléculaires impliquées dans la sélectivité d'interaction de l'AmB envers le cholestérol et l'ergostérol, interactions présumées responsables de sa toxicité et de son activité thérapeutique, respectivement. A l'aide de notre modèle d'étude simplifié, soit le liposome multilamellaire de DPPC, ainsi que par différentes techniques utilisées, soit la calorimétrie différentielle à balayage, les spectroscopies FTIR, RMN-²H et UV-visible, nous avons caractérisé les différents mélanges lipidiques contenant ou non chacun des deux stérols ainsi que l'AmB.

Les principales conclusions de ce travail sont donc:

1) Nous avons démontré clairement que l'AmB interagissait avec des bicouches lipidiques pures, sans stérol. Les résultats calorimétriques et spectroscopiques suggèrent fortement que la présence de l'AmB dans la matrice lipidique engendre une importante séparation de phase entre une phase pure en DPPC et deux autres phases dans lesquelles les molécules de DPPC se retrouvent rigidifiées par l'AmB. En plus, par spectroscopie UV-visible, nous avons montré que l'AmB est présente dans la matrice lipidique sous forme oligomère, forme probablement associée aux pores membranaires d'AmB.

Toutes ces données assemblées, il est évident que l'AmB s'organise dans la matrice lipidique, même en absence de stérol. Cette organisation, vraisemblablement sous forme de pores membranaires, influence son environnement lipidique de sorte que les molécules de DPPC en contact avec les molécules d'AmB soient davantage structurées que celles contenues dans la phase lipidique pure et ce, peu importe la température. Suite à cette étude, nous proposons donc un modèle d'organisation des molécules d'AmB dans l'environnement lipidique où les molécules d'antifongique se retrouvent sous formes de pores membranaires ainsi que sous formes d'agrégats de ces pores. Ces informations que nous apportons concernant l'interaction AmB/phospholipide font en partie l'originalité de notre étude puisqu'aucune autre publication à l'heure actuelle ne met en évidence ces précisions.

2) En présence de cholestérol, les résultats obtenus par toutes les techniques montrent une surprenante similitude avec ceux obtenus pour le mélange DPPC/AmB. D'une part, en calorimétrie, des phases lipidiques de mêmes nature que celles rencontrées avec le lipide pur sont observées, associées aux molécules de DPPC en interaction directe avec l'antifongique. D'un autre côté, nous avons clairement observé que chacune de ces composantes membranaires, soit le cholestérol et l'AmB, influence de façon indépendante les molécules de phospholipides composant la bicouche (par DSC, spectroscopies FTIR et RMN-²H). Nous concluons donc que les molécules d'AmB et de cholestérol n'interagissent pas l'une avec l'autre, signifiant donc que ce stérol ne soit que peu impliqué dans la structure des pores membranaires d'AmB. Notre conclusion contredit donc une des hypothèses depuis longtemps soutenue dans la littérature voulant que le cholestérol soit une composante des pores membranaires d'AmB (Andreoli 1974, Ockman 1974, de Kruijff et Demel 1974, Bonilla-Marin *et al.* 1991, Khutorsky 1992, Hartsel *et al.* 1993).

Cependant, malgré le fait que le cholestérol n'interagisse pas avec l'AmB, il se retrouve dans l'environnement lipidique de ces pores d'AmB; il est important de souligner que l'effet du cholestérol sur la DPPC modifie l'interaction AmB-DPPC,

résultat observé par calorimétrie par les largeurs à mi-hauteur. Nous avons conclu à ce moment que la présence de ce stérol favorisait l'interaction AmB-DPPC.

L'analyse des résultats obtenus pour les bicouches de DPPC contenant à la fois le cholestérol et l'AmB nous amène à proposer un schéma illustrant la répartition des molécules d'AmB dans la matrice de DPPC, très semblable à celui que nous proposons pour les bicouches de DPPC ne contenant que l'AmB. Dans ce schéma, les molécules d'AmB se retrouveraient sous forme de pores d'AmB ainsi que sous forme d'agréats de ces pores membranaires, structures n'impliquant pas les molécules de cholestérol qui elles, se retrouveraient dans l'environnement lipidique de ces structures organisées d'AmB.

3) Lorsque les bicouches de DPPC contiennent à la fois l'ergostérol et l'AmB, une situation tout à fait différente est observée. Les résultats, tant calorimétriques que spectroscopiques, nous indiquent que l'AmB interagit directement avec les molécules d'ergostérol, modifiant ainsi l'effet normalement induit de ce stérol sur son environnement lipidique. En fait, l'effet de l'ergostérol sur les paramètres thermotropiques et sur l'ordre conformationnel et orientationnel des chaînes aliphatiques de la DPPC se trouve atténué par la présence des molécules d'AmB. Nos résultats indiquent donc que l'ergostérol, contrairement au cholestérol, constitue une cible de choix pour l'AmB et que ce stérol serait impliqué directement dans la formation des structures organisées, composées à la fois d'AmB et d'ergostérol. De plus, les données obtenues par calorimétrie et par spectroscopie FTIR suggèrent une stoechiométrie au niveau des molécules impliquées dans ces structures : nos résultats sont compatibles avec le fait que ces pores membranaires soient constitués d'AmB et d'ergostérol dans une proportion de 1 molécule d'AmB pour 1 molécule d'ergostérol.

L'utilisation des spectroscopies FTIR et RMN-²H a aussi montré une augmentation de l'ordre moléculaire, par rapport aux résultats obtenus pour les bicouches ne contenant que l'ergostérol, impliquant probablement une redistribution des molécules d'ergostérol lorsque la bicouche contient aussi l'AmB. Cette mobilisation des

molécules d'ergostérol par l'AmB pourrait aussi être un mécanisme additionnel expliquant l'activité thérapeutique de l'AmB, conjointement à la formation de pores membranaires, puisque ses rôles fonctionnels que ce stérol joue normalement au sein de la cellule seraient perturbés. En effet, le stérol joue un rôle important dans la régulation de la fluidité membranaire.

Nous proposons donc, suite à l'analyse des résultats obtenus pour les mélanges DPPC/ergostérol/AmB, un schéma illustrant l'organisation des molécules d'AmB et d'ergostérol dans la matrice lipidique de DPPC. Dans cette représentation, les molécules d'ergostérol sont impliquées directement, dans un rapport 1:1, dans la structure du pore membranaire d'AmB. Cette représentation est complètement différente de celle proposée pour le mélange DPPC/cholestérol/AmB.

Le comportement général observé par les différentes techniques lors de cette étude reflète en réalité la fine balance impliquée au niveau des interactions moléculaires prévalant entre les différents constituants présents, soit le phospholipide, chacun des stérols et l'antifongique. Cette fine balance influence ultimement la distribution de chacune de ces composantes à l'intérieur de la matrice lipidique et leur organisation au sein de la bicouche.

Les résultats présentés dans ce travail sont de plus compatibles avec les données cliniques obtenues depuis plusieurs années montrant que l'activité thérapeutique de l'AmB l'emporte sur sa toxicité, sans pour autant que cette dernière soit à négliger. En effet, puisque notre étude a montré que l'AmB n'interagissait pas avec le cholestérol en milieu lipidique organisé mais que par contre l'ergostérol est impliqué dans la structure des pores membranaires d'AmB, l'interaction directe de l'AmB avec l'ergostérol membranaire expliquerait cette sélectivité d'interaction envers l'ergostérol, par rapport à celle avec le cholestérol. La toxicité de cet antifongique ne proviendrait donc pas, comme le présument plusieurs auteurs, de son interaction directe avec le cholestérol, puisque l'AmB semble s'organiser aussi en pores quand elle est incorporée seule dans la matrice lipidique de DPPC.

En résumé, puisque nous avons montré que l'AmB formait des structures hautement organisées même en l'absence de stérols membranaires et que le cholestérol n'interagit pas avec cet antifongique, il est essentiel d'axer les recherches à venir sur l'interaction de l'AmB avec l'ergostérol et ce, dans le but de cibler l'interaction de l'AmB avec les membranes des cellules pathogènes.

Au niveau fondamental, des recherches préliminaires en dichroïsme circulaire (DC) ont déjà été effectuées dans notre laboratoire et leur poursuite s'avère très prometteuse. Puisque cette technique est très sensible à l'état d'agrégation de l'AmB, nous pouvons étudier l'effet des mélanges liposomaux dans lesquels l'AmB est incorporée après la formation des liposomes, études nous permettant d'obtenir des données se rapprochant des conditions physiologiques lors du traitement. Ces recherches préliminaires ont été effectuées uniquement sur les bicouches ne contenant pas de stérol et les résultats obtenus montrent que lorsque l'AmB est incorporée avant la formation des liposomes, il ne reste plus d'AmB en solution aqueuse. Cependant, lorsqu'elle est incorporée après la formation des liposomes, on retrouve sur les spectres un signal appartenant à l'AmB agrégée en solution aqueuse et un autre, à l'AmB en interaction avec le phospholipide. De plus, les résultats obtenus révèlent aussi que plus la concentration en DPPC augmente dans les échantillons liposomaux, pour une même quantité d'AmB, plus les spectres DC obtenus montrent une grande solubilisation de l'AmB en milieu lipidique. Cette étude permettrait peut-être de différencier le type d'agrégats d'AmB présents dans l'un ou l'autre des mélanges lipidiques utilisés dans le présent travail et ce, en fonction de la température. Cette étude serait donc un excellent complément à celle réalisée lors du présent doctorat.

Puisque les cellules de mammifères et celles des champignons pathogènes sont constituées de plusieurs types de lipides, dont entre autres des phospholipides à chaînes aliphatiques mixtes, saturées et insaturées, avec des têtes polaires variées, il serait important de vérifier l'effet qu'aurait la nature du phospholipide utilisé sur les résultats obtenus dans le présent travail. Nous suggérons de compléter cette étude en utilisant d'autres lipides pour la formation des liposomes. Les phospholipides les plus rencontrés

dans les cellules biologiques, et qui ont une température de transition adéquate pour cette étude soit entre 30°C et 60°C, sont ceux à 16 et 18 carbones, saturés ou insaturés, avec comme tête polaire le PC, le PE (phosphatidyléthanolamine) et la PS (phosphatidylsérine), qui sont eux aussi les principaux lipides retrouvés dans les cellules biologiques.

BIBLIOGRAPHIE

Avanti Polar Lipids (site internet): www.avantipolarlipids.com

Adjou K.T., Deslys J.P., Lasmézas C.I., Demaimay R., Dormont D. (1997), "*Hypothèses sur les mécanismes d'action de l'Amphotéricine B et de ses dérivés dans les ESST*", M/S minisynthèse 13 (6-7): 892-897.

Aggett P.J., Fenwick P.K., Kirk H. (1982), "*The effect of amphotericin B on the permeability of lipid bilayers to divalent trace metals*", Biochim. Biophys. Acta 684 (2): 291-294.

Andreoli T.E., Dennis V.W., Weigl A.M. (1969), "*The effect of amphotericin B on the water and nonelectrolyte permeability of thin lipid membranes*", J. Gen. Physiol. 53 (2): 133-256.

Andreoli T.E. (1974), "*The structure and function of amphotericin B - cholesterol pores in lipid bilayer membranes*", Ann. N.Y. Acad. Sci. 235: 448-469.

Aracava Y., Smith I.C., Schreier S. (1981), "*Effect of amphotericin B on membranes: a spin probe study*", Biochemistry 20 (20): 5702-5707.

Asher I.M., Levin I.W. (1977), "*Effects of temperature and molecular interactions on the vibrationnal infrared spectra of phospholipid vesicles*", Biochim. Biophys. Acta 468 (1): 63-72.

Bagatolli L.A., Maggio B., Aguilar F., Sotomayor C.P., Fidelio G.D. (1997), "*Laurdan properties in glycosphingolipid-phospholipid mixtures : a comparative fluorescence and calorimetric study*", Biochim. Biophys. Acta 1325 (1): 80-90.

Baginski M.A., Tempczyk A., Borowski E. (1989), "*Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanics*", Eur. Biophys. J. 17 (3): 159-166.

Baginski M.A., Gariboldi P., Borowski E. (1994), "*The role of amphotericin B amine group basicity in its antifungal action. A theoretical approach*", Biophys. Chem. 49 (3): 241-250.

Baginski M., Resat H., McCammon J.A. (1997), "*Molecular properties of amphotericin B membrane channel: A molecular dynamics simulation*", Mol. Pharmacol. 52 (4): 560-570.

Barenholz Y. (2002), "*Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to rafts*", Progress in Lipid Research 41 (1): 1-5.

Barwicz J., Gareau R., Audet A., Morrisset J., Villard J., Gruda I. (1991), "*Inhibition of the interaction between lipoproteins and amphotericin B by some delivery systems*", Biochim. Biophys. Res. Commun. 181 (2): 722-728.

Barwicz J., Christian S., Gruda I. (1992), "*Effects of aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice*", Antimicrob. Agents Chemother. 36 (10): 2310-2315.

Barwicz J., Gruszecki W., Gruda I. (1993), "*Spontaneous organization of amphotericin B in aqueous medium*", J. Coll. Interface Sci. 158: 71-76.

Barwicz J., Tancrede P. (1997), "*The effect of aggregation state of amphotericin B on its interactions with cholesterol- or ergosterol-containing phosphatidylcholine monolayers*", Chem. Phys. Lipids 85 (2): 145-155.

Barwicz J., Gruda I. (1997), *"Is the interaction between human lipoproteins with amphotericin B responsible for the antibiotic toxicity? "*, Recent Res. Devel. in Antimicrob. Agents Chemother. 2: 105-112.

Barwicz J., Dumont I., Ouellet C., Gruda I. (1998), *" Amphotericin B toxicity as related to the formation of oxidatively modified Low-Density lipoproteins "*, Biospectroscopy 4 (2): 135-144.

Blazyk J.F., Melchior D.L., Steim J.M. (1975), *"An automated differential scanning dilatometer"*, Anal. Biochem. 68 (2): 586-599.

Bloom M., Davis J.H., MacKay A.L. (1981), *"Direct determination of the oriented sample NMR spectrum for systems with local symmetry "*, Chem. Phys. Lett. 80 (1): 198-202.

Bolard J., Seigneuret M., Boudet G. (1980), *"Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin B. Lipid state and cholesterol content dependence"*, Biochim. Biophys. Acta 599 (1): 280-293.

Bolard J. (1986), *" How the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? "*, Biochim. Biophys. Acta 864: 257-304.

Bolard J., Legrand P., Heitz F., Cybulska B. (1991), *" One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium "*, Biochemistry 30 (23): 5707-5715.

Bonilla-Marin M., Moreno-Bello M., Ortega-Blake I. (1991), *"A microscopic electrostatic model for the amphotericin B channels "*, Biochim. Biophys. Acta 1061 (1): 65-77.

Brajtburg J., Elberg S., Bolard J., Kobayashi G.S., Levy R.A., Ostlund R.E. Jr, Schlessinger D., Medoff G. (1984), "*Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B*", J. Infect. Dis. 149 (6): 986-997.

Brajtburg J., Powderly W.J., Kobayashi G.S., Medoff G. (1990a), "*Amphotericin B: Current understanding of mechanisms of action*", Antimicrob. Agents Chemother. 34 (2): 183-188.

Brajtburg J., Powderly W.G., Kobayashi G.S., Medoff G. (1990b), "*Amphotericin B: delivery systems*", Antimicrob. Agents Chemother. 34 (3): 381-384.

Brutyan R.A., McPhie P.J. (1996), "*On the one-sided action of amphotericin B on lipid bilayer membranes*", J. Gen. Physiol. 107 (1): 69-78.

Capuozzo E., Bolard J. (1985), "*Interaction of the polyene antibiotic etruscomycin with large unilamellar vesicles: binding and proton permeability inducement*", Biochim. Biophys. Acta 820 (1): 63-73.

Cameron D.G., Casal H.L., Mantsch H.H. (1980), "*Characterization of the pretransition in 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine by Fourier transform infrared spectroscopy*", Biochemistry 19 (16): 3665-3672.

Casal H.L., Mantsch H.H., Cameron D.G., Gaber B.P. (1983), "*On the subtransitions of deuterated derivatives of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*", Chem. Phys. Lipids 33 (2): 109-112.

Casal H.L., Mantsch H.H. (1984), "*Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy*", Biochim. Biophys. Acta. 779 (4): 381-401.

Cass A., Finkelstein A., Krespi V. (1970), "*The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene and antibiotics nystatin and amphotericin B*", J. Gen. Physiol. 56 (1): 100-105.

Castanho M.A.R.B., Prieto M., Jameson D.M. (1999), "*The pentane macrolide antibiotic filipin prefers more rigid DPPC bilayers: a fluorescence pressure dependence study*", Biochim. Biophys. Acta 1419 (1): 1-14.

Charbonneau C., Fournier I., Dufresne S., Barwicz J., Tancrede P. (2001), "*The interaction of amphotericin B with various sterols in relation to its possible use in anticancer therapy*", Biophys. Chem. 91 (2): 125-133.

Chen W., Bitmann R. (1977), "*Kinetics of association of amphotericin B with vesicle*", Biochemistry 16 (19): 4145-4149.

Chia N.C., Vilchère C., Bitmann R., Mendelsohn R. (1993), "*Interactions of cholesterol and synthetic sterols as deduced from infrared CH₂ wagging progression intensities*", J. Am. Chem. 115: 12050-12055.

Cohen B.E. (1986), "*Concentration- and time- dependence of amphotericin B induced permeability changes across ergosterol-containing liposomes*", Biochim. Biophys. Acta 857 (1): 117-122.

Cohen B.E. (1992), "*A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition*", Biochim. Biophys. Acta 1108 (1): 49-58.

Cohen B.E. (1998), "*Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels*", Int. J. Pharm. 162: 95-106.

Cotero B.V., Rebolledo-Antunez S., Ortega-Blake I. (1998), *"On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel"*, Biochim. Biophys. Acta 1375 (1-2): 43-51.

Countinho A., Prieto M. (1995), *"Self-association of the polyene antibiotic nystatin in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles: a time-resolved fluorescence study"*, Biophys. J. 69 (6): 2541-2557.

Cybulska B., Borowski E., Prigent Y., Gary-Bobo C.M. (1981), *"Cation permeability induced by two aromatic heptaenes, vacidin A and candicidin D on phospholipid unilamellar vesicles"*, J. Antibiot. 34 (7): 884-891.

Davies M.A., Schuster H.F., Brauner J.W., Mendelsohn R. (1990), *"Effects of cholesterol on conformational disorder in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. A quantitative IR study of the depth dependence"*, Biochemistry 29 (18): 4368-4373.

Davis J.H., Jeffrey K., Bloom M., Valic M.I., Higgs T.P. (1976), *"Quadrupolar echo deuterium magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains"*, Chem. Phys. Lett., 42 (2): 390-394.

Davis J.H. (1979), *"Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine"*, Biophys. J. 27 (3): 339-358.

Davis J.H. (1983), *"The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ^2H -NMR"*, Biochim. Biophys. Acta. 737 (1): 117-171.

Davis J.H., Clare D.M., Hodges R.S., Bloom M. (1983), *"Interaction of a synthetic amphiphilic polypeptide and lipids in a bilayer structure"*, Biochemistry 22 (23): 5298-5305.

De Kruijff B., Demel R.A. (1974), " *Polyene antibiotic-sterol interaction in membrane of *Acholeplasma Laidlawii* cells and lecithin liposomes: III Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes* ", Biochim. Biophys. Acta 339 (1): 57-70.

De Kruijff B., Gerritsen W.J. (1974), Oerlemans A., Demel R.A., Van Deenen L.L.M., " *Polyene antibiotic-sterol interaction in membranes of *Acholeplasma Laidlawii* cells and lecithin liposomes. 1. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics* ", Biochim. Biophys. Acta 339 (1): 30-43.

Dei-Cas E., Ajana F., Deldique P.H., Bonaly R., Vernes A. (1987), " *Place actuelle de l'amphotéricine B dans le traitement des mycoses profondes* ", Ann. Biol. Clin. 45 (6): 673-679.

Demaimay R., Adjou K., Lasmezas C., Lazarini F., Cherifi K., Seman M., Deslys J.P., Dormont D. (1994), " *Pharmacological studies of a new derivative of amphotericin B, MS-8209, in mouse and hamster scrapie* ", J. Gen. Virol. 75 (9): 2499-2503.

Demel R.A., De Kruijff B. (1976), " *The function of sterols in membranes* ", Biochim. Biophys. Acta 457 (2): 109-132.

Dufourc E.J., Smith I.C.P., Jarrel H.C. (1984a), " *Interaction of amphotericin B with membrane lipids as viewed by ^2H -NMR* ", Biochim. Biophys. Acta 778 (3): 435-442.

Dufourc E.J., Smith I.C.P., Jarrell H.C. (1984b), " *Amphotericin and model membranes. The effect of amphotericin B on cholesterol-containing systems as viewed by ^2H -NMR* ", Biochim. Biophys. Acta 776 (2): 317-329.

Endress E., Bayerl S., Prechtel K., Maier C., Merkel R., Bayerl T. (2002), " *The effect of cholesterol, lanosterol and ergosterol on lecithin bilayer mechanical properties at molecular and microscopic dimensions: a solid-state NMR and micropipet study* ", Langmuir 18 (8): 3293-3299.

Estep T.N., Mountcastle D.B., Biltonen R.L., Thompson T.E. (1978), "*Studies on the anomalous thermotropic behavior of aqueous dispersions of dipalmitoylphosphatidylcholine-cholesterol mixtures*", *Biochemistry* 17 (10): 1984-1989.

Feigin A.M. (1999), "*Selective modification of sterol composition of hepatomas: new opportunities for chemotherapy*", *Med. Hypotheses* 52 (5), 383-388.

Finean J.B. 1990, " *Interaction between cholesterol and phospholipid in hydrated bilayers* ", *Chem. Phys. Lipids* 54 (3-4): 147-156.

Finegold L., Singer M.A. (1984), "*Phosphatidylcholine bilayers: subtransitions in pure and in mixed lipids*", *Chem. Phys. Lipids* 35 (3): 291-297.

Fournier I., Barwicz J. Tancrede P. (1998), "*The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study*", *Biochim. Biophys. Acta* 1373: 76-86.

Fujii G., Chang J.E., Coley T., Steere B. (1997), " *The formation of amphotericin B ion channels in lipids bilayers* ", *Biochemistry* 36 (16): 4959-4968.

Gaber B.P., Yager P., Peticolas W.L. (1978), "*Interpretation of biomembrane structure by Raman difference spectroscopy. Nature of the endothermic transitions in phosphatidylcholines*", *Biophys. J.* 21 (2): 161-176.

Gagos M., Koper R., Gruszecki W.I. (2001), "*Spectrophotometric analysis of organisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers containing the polyene antibiotic amphotericin B*", *Biochim. Biophys. Acta* 1511 (1): 90-98.

Gent M.P.N., Prestegard J.H. (1976), "*Interaction of the polyene antibiotics with lipid bilayer vesicles containing cholesterol*", *Biochim. Biophys. Acta* 426 (1): 17-30.

Genz A., Holzwarth J.F., Tsong T.Y. (1986), *"The influence of cholesterol on the main phase transition of unilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. A differential scanning calorimetry and iodine laser T-jump study"*, Biophys. J. 50 (6): 1043-1051.

Gicquaud C. (1993), *"Actin conformation is drastically altered by direct interaction with membrane lipids: a differential scanning calorimetry study"*, Biochemistry 32 (44): 11873-11877.

Gold W., Stout H.A., Pagano J.F., Donovan R. (1956), *"Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete"*, Antibiotics Ann. 1955-1956: 579-586.

Gruda I., Dussault N. (1988), *"Effect of the aggregation state of amphotericin B on its interaction with ergosterol"*, Bioch. Cell Biol. 66 (3): 177-183.

Gruszecki W.I., Gagos M., Kernen P. (2002), *"Polyene antibiotic amphotericin B in monomolecular layers: spectrophotometric and scanning force microscopic analysis"*, FEBS Letters 524: 92-96.

Gruszecki W.I., Gagos M., Herec M. (2003), *"Dimers of polyene antibiotic amphotericin B detected by means of fluorescence spectroscopy: molecular organization in solution and in lipid membranes"*, J. Photochem. Photobiol. B: Biology 69 (1): 49-57.

Halstenberg S., Heimburg T., Hianik T., Kaatz U., Krivanek R. (1998), *"Cholesterol-induced variations in the volume and enthalpy fluctuations of lipid bilayers"*, Biophys. J. 75 (1): 264-271.

Harris J.S., Epps D.E., Davio S.R., Kezdy F.J. (1995), *"Evidence for transbilayer tail-to-tail cholesterol dimers in dipalmitoylglycerophosphocholine liposomes"*, Biochemistry 34 (11): 3851-3857.

Hartsel S.C., Benz S.K., Peterson R.P., Whyte B.S. (1991), "*Potassium-selective amphotericin B channels are predominant in vesicles regardless of sidedness*", *Biochemistry* 30 (1): 77-82.

Hartsel S.C., Hatch C., Aneyew W. (1993), "*How does amphotericin B work?: studies on model membrane systems*", *J. Liposomes Res.* 3 (3): 377-408.

Hartsel S.C., Benz S.K., Ayenew W., Bolard J. (1994), "*Na⁺, K⁺ and Cl⁻ selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics*", *Eur. Biophys. J.* 23 (2): 125-132.

Hartsel S.C. et Bolard J. (1997), "*Amphotericin B: new life for an old drug*", *Trends in pharmacol. Sciences* 17 (12): 445-449.

Hervé M., Debouzy J.C., Borowski E., Cybulska B., Gary-Bobo C.M. (1989), "*The role of the carboxyl and amino groups of the polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity: a ³¹P-NMR study*", *Biochim. Biophys. Acta* 980 (3): 261-272.

Hinz H.-J. et Schwarz F.P. (2001), "*Measurement and analysis of results obtained on biological substances with differential scanning calorimetry*", *Pure Appl. Chem.* 73 (4): 745-759.

Hodis H.N., Kramsch D.M., Avogaro P., Bittolo-Bon G., Cazzolato G., Hwang J., Peterson H., Sevanian A. (1994), "*Biochemical and cytotoxic characteristics of an in vivo circulating oxidized low density lipoprotein (LDL)*", *J. Lipid Res.* 35 (4): 669-677.

Holz R.W. (1974), "*The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes*", *Ann. N. Y. Acad. Science* 235 (0): 469-479.

Holtz R., Finkelstein A. (1970), *"The water and nonelectrolyte permeability induced in thin membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B"*, J. Gen. Physiol. 56 (1): 125-145.

Hsu S.-F. et Burnette R.R. (1997), *"Characterization of the effects of amphotericin B on ion channels in MDCK cells using the patch-clamp technique"*, Biochim. Biophys. Acta 1329 (1): 26-38.

HsuChen C.C., Feingold D.S. (1973), *"Polyene antibiotic action on lecithin liposomes: effect of cholesterol and fatty acyl chains"*, Biochim. Biophys. Res. Commun. 51 (4): 972-978.

Huang J., Buboltz J.T., Feigenson G.W. (1999), *"Maximum solubility of cholesterol in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers"*, Biochim. Biophys. Acta 1417 (1): 89-100.

Huang T.H., Lee C.W.B., Das Gupta S.K., Blume A., Griffin R.G. (1993), *"A ^{13}C and ^2H nuclear magnetic resonance study of phosphatidylcholine/cholesterol interactions: characterization of liquid-gel phases"*, Biochemistry 32 (48): 13277-13287.

Huang W., Zhang Z., Han X., Tang J., Wang J., Dong S., Wang E. (2002), *"Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol- or ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy"*, Biophysical J 83 (6): 3245-3255.

Inoue T., Yanagihara S., Misono Y., Suzuki M. (2001), *"Effect of fatty acids on phase behavior of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer: saturated versus unsaturated acids"*, Chem. Phys. Lipids 109 (2): 117-133.

Ipsen J.H., Mouritsen O.G., Zuckermann M.J. (1989), *"Theory of thermal anomalies in the specific heat of lipid bilayers containing cholesterol"*, Biophys. J. 56 (4): 661-667.

Jullien S., Capuozzo E., Salerno C., Crifo C. (1991), *"Effects of polyene antibiotics on the activation of human polymorphonuclear leukocytes"*, Biochem. Pharmacol. 41 (12): 2037-2040.

Khutorsky V.E. (1992), *"Structures of amphotericin B-cholesterol complex"*, Biochim. Biophys. Acta 1108 (2): 123-127.

Khutorsky V.E. (1996), *"Ion coordination in the amphotericin B channel"*, Biophys. J. 71 (6): 2984-2995.

Kleinberg M.E., Finkelstein A. (1984), *"Single-length and double-length channels formed by nystatin in lipid bilayer membranes"*, J. Membr. Biol. 80 (3), 257-269.

Klump H.H., Gaber B.P., Peticolas W.L., Yager P. (1981), *"Thermodynamic properties of mixtures of deuterated and undeuterated dipalmitoyl phosphatidylcholines"*, Thermochimica Acta 48 (3): 361-366.

Kodati V.R. et Lafleur M. (1993), *"Comparison between orientational and conformational orders in fluid lipid bilayers"*, Biophys. J. 64 (1): 163-170.

Kodati V.R., El-Jastimi R., Lafleur M. (1994), *"Contribution of the intermolecular coupling and librotorsional mobility in the methylene stretching modes in the infrared spectra of acyl chains"*, J. Phys. Chem. 98: 12191-12197.

Ladbrooke B.D., Williams R.M., Chapman D. (1968), *"Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction"*, Biochim. Biophys. Acta 150 (3): 333-340.

Lamy-Freund M.T., Ferreira V.F., Schreier S. (1985), *"Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation"*, J. Antibiot. 38 (6): 753-757.

Langlet J., Berges J., Caillet J., Demaret J.P. (1994), "*Theoretical study of the complexation of amphotericin B with sterols*", Biochim. Biophys. Acta 1191 (1): 79-93.

Le Bihan T., Gicquaud C. (1993), "*Kinetic study of the thermal denaturation of G actin using differential scanning calorimetry and intrinsic fluorescence spectroscopy*", Biochim. Biophys. Res. Comm. 197 (3): 1065-1073.

Legrand P., Romero E.A., Cohen B.E., Bolard J. (1992), "*Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes*", Antimicrob. Agents Chemother. 36 (11): 2518-2522.

Levin I.W., Bush S.F. (1981), "*Evidence for acyl chain trans/gauche isomerization during the thermal pretransition of dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer dispersions*", Biochim. Biophys. Acta 640 (3): 760-766.

Lopez-Berestein G., Rosenblum M.G., Mehta R. (1984), "*Altered tissue distribution of amphotericin B by liposomal encapsulation: comparison of normal mice to mice infected with Candida albicans*", Cancer Drug Deliv. 1 (3): 199-205.

Lopez-Berestein G., Fainstein V., Hopfer R., Mehta K., Sullivan M.P., Keating M., Rosenblum M.G., Mehta R., Luna M., Hersh E.M., Reuben J., Juliano R.L., Bodey G.P. (1985), "*Liposomal amphotericin B for treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study*", J. Infect. Dis. 151: 704-710.

Mantsch H.H., McElhaney R.N. (1991), "*Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy*", Chem. Phys. Lipids 57 (2-3): 213-226.

Marbrey S., Mateo P.L., Sturtevant J.M. (1978), "*High-sensitivity scanning calorimetric study of mixtures of cholesterol with dimyristoyl- and dipalmitoylphosphatidylcholines*", Biochemistry 17 (12): 2464-2468.

Marichal P., Van den Bossche H., Moereels H., Brasseur R. (1990), "*Mode of insertion of azole antifungals and sterols in membranes*" dans "*Molecular description of biological membranes components by computer aided conformational analysis*", (Ed. Brasseur R.), CRC Press, Boca Raton, Florida, vol. II: 27-42.

Marty A., Finkelstein A. (1975), "*Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin, Differences in its one-sided and two-sided action*", J. Gen. Physiol. 65 (4): 515-526.

Matsumori N., Yamaji N., Matsuoka S., Oishi T., Murata M. (2002), "*Amphotericin B covalent dimers forming sterol-dependent ion-permeable membrane channels*", J. Am. Chem. Soc. 124 (16): 4180-4181.

Maulik P.R., Shipley G.G. (1996), "*Interactions of N-stearoyl sphingomyelin with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine in bilayers membranes*", Biophys. J. 70 (5): 2256-2265.

Mazurski J., Bolard J., Borowski E. (1995), "*Effect of the modifications of ionizable groups of amphotericin B on its ability to form complexes with sterols in hydroalcoholic media*", Biochim. Biophys. Acta 1236 (1): 170-176.

McElhaney R.N. (1986), "*Differential scanning calorimetric studies of lipid-protein interactions in model membrane systems*", Biochim. Biophys. Acta 864 (3-4): 361-421.

McKenzie D., Kaczowski J., Marsh R., Aiken J. (1994), "*Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection*", J. Virol. 68 (11): 7534-7536.

McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. (1993), "*Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of homologous series of linear saturated phosphatidylcholine*", Biochemistry 32 (2): 516-522.

McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. (1994), "*Comparative differential scanning calorimetric and FTIR and ^{31}P -NMR spectroscopic studies of the effects of cholesterol and androstenol on the thermotropic phase behavior and organization of phosphatidylcholine bilayers*", Biophys. J. 66 (3 pt1): 741-752.

McMullen T.P.W., McElhaney R.N. (1995), "*New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry*", Biochim. Biophys. Acta 1234: 90-98.

McMullen T.P.W., Vilcheze C., McElhaney R.N., Bittman R. (1995), "*Differential scanning calorimetric study of the effect of sterol side chain length and structure on dipalmitoylphosphatidylcholine thermotropic phase behavior*", Biophysical J. 69 (1): 169-176.

McMullen T.P.W., McElhaney R.N. (1996), "*Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions*", Curr. Opinion Coll. Inter. Science 1: 83-90.

McMullen T.P.W., McElhaney R.N. (1997), "*Differential scanning calorimetric studies of the interaction of cholesterol with distearoyl and dielaidoyl molecular species of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine*", Biochemistry 36 (16): 4979-4986.

McMullen T.P.W., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. (2004), "*Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes*", Curr. Opinion Coll. Inter. Science 8 (6): 459-468.

Mechlinski W., Schaffner C.P., Ganis P., Avitabile G. (1970), "*Structure and absolute configuration of the polyene macrolide amphotericin B*", Tetrahedron Lett. 44 (19): 3873-3876.

Medoff G., Brajtburg J., Kobayashi G.S., Bolard J. (1983), "*Antifungal agents usefull in therapy of systemic fungal infections* ", Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23: 303-330.

Mehta R.T., Mehta K., Lopez-Berestein G., Juliano R.L. (1985), "*Effect of liposomal amphotericin B on murine macrophages and lymphocytes* ", Infect. Immun. 47 (2): 429-433.

Melchior D.L., Morowitz H.J. (1972), "*Dilatometry of dilute suspensions of synthetic lecithin aggregates*", Biochemistry 11 (24): 4558-4562.

Meyer H.W., Richter W., Brezesinski G. (1994), "*Convex-concave curvatures in bilayers of dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol induced by amphotericin B/deoxycholate after prolonged storage*", Biochim. Biophys. Acta 1190 (1): 9-19.

Miao L., Nielsen M., Thewalt J., Ipsen J.H., Bloom M., Zuckermann M.J., Mouritsen O.G. (2002), "*From lanosterol to cholesterol: structural evolution and differential effects on lipid bilayers*", Biophys. J. 82 (3): 1429-1444.

Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M., Michels B. (2002), "*Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol*", Biochim. Biophys. Acta 1558 (2): 95-108.

Nakamura T., Nishikawa M., Inoue K., Nojima S., Akiyama T., Sankawa U. (1980), "*Phosphatidylcholine liposomes containing cholesterol analogues with side chains of various lengths* ", Chem. Phys. Lipids 26 (1): 101-110.

Norris S.M. (1985), "*Amphotericin--how safe and effective?*", Infect. Control. 6 (6): 243-245.

Nyholm T.K.M., Nylund M., Slotte J.P. (2003), "*A calorimetric study of binary mixtures of dihydrosphingomyelin and sterols, sphingomyelin, or phosphatidylcholine*", *Biophys. J.* 84 (5): 3138-3146.

Ockman N. (1974), "*Interaction of amphotericin B with monolayers of egg lecithin and cholesterol: polarised absorption spectroscopy*", *Biochim. Biophys. Acta* 345 (3): 263-282.

Oehlschlager A.C., Laks P. (1980), "*Nitroxide spin-probe study of amphotericin B-ergosterol interaction in egg phosphatidylcholine multilayers*", *Can. J. Biochem.* 58 (10): 978-985.

Oku N., Nojima S., Inoue K. (1980), "*Selective release of non-electrolytes from liposomes upon perturbation of bilayers by temperature change or polyene antibiotics*", *Biochim. Biophys. Acta* 595 (2): 277-290.

Paquet M.-J., Fournier I., Barwicz J., Tancrède P., Auger M. (2002), "*The effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol- containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by ^2H -NMR*", *Chem. Phys. Lipids* 119: 1-11.

Parasassi T., Giusti A.M., Raimondi M., Ravagnan G., Saporita O., Gratton E. (1995), "*Cholesterol protect the phospholipid bilayer from oxidative damage*", *Free Radic. Biol. Med.* 19 (4): 511-516.

Paré C., Lafleur M., Liu F., Lewis R.N.A.H., McElhaney R.N. (2001), "*Differential scanning calorimetry and ^2H nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectroscopy studies of the effects of transmembrane α -helical peptides on the organization of phosphatidylcholine bilayers*", *Biochim. Biophys. Acta* 1511 (1): 60-73.

Perkins W.R., Minchey S.R., Boni L.T., Swenson C.E., Popescu M.C., Pasternack R.F., Janoff A.S. (1992), "*Amphotericin B* -phospholipid interactions responsible for reduced mammalian cell toxicity ", *Biochim. Biophys. Acta* 1107 (2): 271-282.

Presti F.T., Pace R.J., Chan S.I. (1982), "*Cholesterol-phospholipid interaction in membranes. 2. Stoichiometry and molecular packing of cholesterol-rich domains*", *Biochemistry* 21 (16): 3831-3835.

Ramos H., de Murciano A.A., Cohen B.E., Bolard J. (1989), "*The polyene antibiotic amphotericin B acts as a Ca^{2+} ionophore in sterol-containing liposomes*", *Biochim. Biophys. Acta* 982 (2): 303-306.

Rao M.R., Olinde K.D., Markow A.K. (1997), "*Protection from amphotericin B induced lipid peroxidation in rats by fructose-1,6-diphosphate* ", *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 95 (2): 217-220.

Readio J.D., Bitmann R. (1982), "*Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester and borate complex to sterols* ", *Biochim. Biophys. Acta* 685 (2): 219-224.

Rolland A., Brzokewicz A., Shroot B., Jamouille J.C. (1991), "*Effect of penetration enhancers on the phase transition of multilamellar liposomes of dipalmitoyl-phosphatidylcholine. A study by differential scanning calorimetry*", *Inter. J. Pharm.* 76 (3): 217-224.

Ruckwardt T., Scott A., Scott J., Mikulecky P., Hartsel S.C. (1998), "*Lipid and stress dependence of amphotericin B ion selective channels in sterol-free membranes*", *Biochim. Biophys. Acta* 1372 (2): 283-288.

Sankaram M.B., Thompson T.E. (1991), "*Cholesterol induced fluid-phase immiscibility in membranes* ", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (19): 8686-8690.

- Seelig J. (1977), *"Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes"*, Q. Rev. Biophys. 10 (3): 353-418.
- Senak L., Moore D., Mendelsohn R. (1992), *"CH₂ wagging progressions as IR probes of slightly disordered phospholipid acyl chain states"*, J. Phys. Chem. 96: 2749-2754.
- Seoane R., Minones J. Conde O., Casas M., Iribarnegaray E. (1998), *"Molecular organisation of amphotericin B at the air-water interface in the presence of sterols: a monolayer study"*, Biochim. Biophys. Acta 1375 (1-2): 73-83.
- Severcan F., Baykal U., Suzer S. (1996), *"FTIR studies of vitamin E-cholesterol-DPPC membrane interactions in CH₂ region"*, Anal. Bioanal. Chem. 355 (3-4): 415-417.
- Sheetz M.P., Chan S.I. (1972), *"Effect of sonication on the structure of lecithin bilayers"*, Biochemistry 11 (24): 4573-4581.
- Silvius J.R., Giudice D., Lafleur M. (1996), *"Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipides of differing acyl chain length"*, Biochemistry 35 (48): 15198-15208.
- Singer M.A. (1975), *"Interaction of amphotericin B and nystatin with phospholipid bilayer membranes: effect of cholesterol"*, Can. J. Physiol. Pharmacol. 53 (6): 1072-1079.
- Smondyrev A.M., Berkowitz M.L. (1999), *"Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: molecular dynamics simulation"*, Biophys. J. 77 (4): 2075-2089.
- Sokol-Anderson M., Brajtburg J., Medoff G. (1986), *"Sensitivity of Candida albicans to amphotericin B administered as single or fractionated doses"*, Antimicrob. Agents Chemother. 29 (4): 701-702.

Stillwell W., Dallman T., Dumaual A.C., Crump F.T., Jenski L.J. (1996), "*Cholesterol versus α -tocopherol: effects on properties of bilayers made from heteroacid phosphatidylcholines*", *Biochemistry* 35 (41): 13353-13362.

Sternberg S. (1994), "*The emerging fungal threat* ", *Science* 266 (5191): 1632-1633.

Surarit R., Shepherd M.G. (1987), "*The effects of azole and polyene antifungals on the plasma membrane enzymes of Candida albicans*", *J. Med. Vet. Mycol.* 25 (6): 403-413.

Szoka F.C., Tang M. (1993), "*AmB formulated in liposomes and lipid based system: a review*", *J. Liposome Res.* 3 (3): 363-375.

Tahir A., Grabielle-Madelmont C., Betrencourt C., Ollivon M., Peretti P. (1999), "*A differential scanning calorimetry study of the interaction of lasalocid antibiotic with phospholipid bilayers*", *Chem. Phys. Lipids* 103 (1-2): 57-65.

Tancrède P., Barwicz J., Jutras S., Gruda I. (1990), "*The effect of surfactants on the aggregation states of amphotericin B* ", *Biochim. Biophys. Acta* 1030 (2): 289-295.

Teer Link T., De Kruijff B., Demel R.A. (1980), "*The action of primaricin, estruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content*", *Biochim. Biophys. Acta* 599 (2): 484-492.

Toyran N., Severcan F. (2003), "*Competitive effect of vitamin D₂ and Ca²⁺ on phospholipid model: an FTIR study* ", *Chem. Phys. Lipids* 123 (2): 165-176.

Urbina J.A., Pekerar S., Le H.B., Patterson J., Montez B., Oldfield E. (1995), "*Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using ²H-, ¹³C- and ³¹P-NMR spectroscopy*", *Biochim. Biophys. Acta* 1238 (2): 163-176.

Utz J.P., Drouhet E. (1985), *"Treatment of Candidas infections"*, Candiasis, Raven Press 253.

Van Hoogevest P., De Kruijff B. (1978), *"Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoylphosphatidylcholine. A refinement of the model for the formation of pores by amphotericin B in membranes"*, Biochim. Biophys. Acta 511 (3): 397-407.

Van Hoogevest P., De Kruijff B. (1983), *"Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoyl phosphatidylcholine. A refinement of the mode for the formation of pores by amphotericin B in membranes"*, Biochim. Biophys. Acta 22: 2939-2944.

Van Zutphen H., Demel R.A., Norman A.W., Van Deenen L.L. (1971), *"The action of polyene antibiotics on lipid bilayer membranes in the presence of several cations and anions"*, Biochim. Biophys. Acta 241 (2): 310-330.

Vertut-Croquin A., Bolard J., Chabbert M., Gary-Bobo C. (1983), *"Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study"*, Biochemistry 22 (12): 2939-2944.

Vertut-Doi A., Hannaert P., Bolard J. (1988), *"The polyene antibiotic amphotericin B inhibits the sodium potassium pump of human erythrocytes"*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 157 (2): 692-697.

Vist M.R., Davis J.H. (1990), *"Phase equilibria of cholesterol/DPPC mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry"*, Biochemistry 29 (2): 451-464.

Warnock D.W. (1991), "*Amphotericin B: an introduction*", Journal of antimicrobial Chemother. 28 (Suppl.B): 27-38.

Wolf B.D., Hartsel S.C. (1995), "*Osmotic stress sensitizes sterol-free phospholipid bilayers to the action of Amphotericin B*", Biochim. Biophys. Acta 1238 (2): 156-162.

Wolff M., Regnier B. (1984), "*Amphotéricine B en 1984*", Méd. Mal. Infect. 14: 538.

Yang J., Appleyard J. (2000), "*The Main Phase Transition of Mica-Supported Phosphatidylcholine Membranes*", J. Phys. Chem. B 104 (34) : 8097-8100.

Yeagle P.L. (1985), "*Cholesterol and the cell membrane*", Biochim. Biophys. Acta 822 (3-4): 267-287.

Yellin N., Levin I.W. (1977), "*Hydrocarbon chain disorder in lipid bilayers. Temperature dependent Raman spectra of 1,2-diacyl phosphatidylcholine-water gels*", Biochim. Biophys. Acta 489 (2): 177-190.

Zhang Y.P., Lewis R.N.A.H, Hodges R.S., McElhaney R.N. (1992), "*Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane α -helical segment of a membrane protein with phosphatidylcholine bilayers: differential scanning calorimetric and FTIR spectroscopic studies*", Biochemistry 31 (46): 11579-11588.