

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

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

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU GRADE DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (BIOPHYSIQUE)

par

NORMAND DENICOURT

LA DIFFUSION LATÉRALE DES PHOSPHOLIPIDES
EN COUCHE MONOMOLÉCULAIRE

OCTOBRE 1990

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.

À Florence,
pour son amour et son courage

À Denise et Jean-Guy,
pour leur patience

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le cadre des Accords Franco-Québécois. Le professeur P. Tancrede (Québec) et le Dr J. Teissié (France) en sont les initiateurs. Leur assiduité et leur enthousiasme ont permis une coopération fructueuse, je leur en suis gré.

Cette thèse est le résultat de travaux effectués sous la bienveillance du professeur P. Tancrede du département de chimie-biologie de l'Université du Québec à Trois-Rivières. Sa compétence, sa rigueur et ses qualités humaines ont éclairé ma démarche. Je lui suis aussi reconnaissant de sa confiance, de son encadrement et de l'amitié qu'il m'a toujours témoignée.

C'est auprès du Dr J. Teissié du Centre de Recherche de Biochimie et de Génétique Cellulaires (C.R.B.G.C.) du C.N.R.S. à Toulouse (France) que j'ai réalisé la majeure partie de la collecte des résultats expérimentaux. Sa compétence, sa confiance et son support m'ont permis de réaliser nos projets. Je lui en suis reconnaissant.

Merci aux Drs J.F. Tocanne, J. deBony et M. Prats (C.R.B.G.C.) à qui je dois de nombreuses et stimulantes discussions.

À Marc Brullemans et à Serge Gauvin, étudiants gradués de

l'U.Q.T.R. qui ont toujours eu bon accueil et qui ont témoigné un intérêt attentif aux projets qui m'animent. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde estime.

Je remercie chaleureusement Michel Degout pour son aide quant à la rédaction de ce manuscrit.

Finalement, à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont soutenu tout au cours de cette coopération, je les remercie tous.

RÉSUMÉ

Les propriétés de dynamique latérale et d'organisation structurale d'un lipide saturé et de lipides insaturés en couche monomoléculaire à l'interface air / solution furent investiguées à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ par la technique de recouvrement de fluorescence après photodimérisation d'une sonde, la 12-(9-anthroyl-oxy) acide stéarique.

Nous examinons d'abord la transition de phase de la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). Nous montrons que le coefficient de diffusion latérale (D_{lat}) de la sonde diminue abruptement de trois ordres de grandeur lors de la transition liquide / solide du film de DPPC. De plus, nous montrons que les valeurs de ce coefficient pour chacune des phases sont systématiquement plus élevées que les valeurs de D_{lat} du DPPC en système multibilipidique ou en monocouche fixée à une lamelle de verre silanisée. L'analyse de nos résultats nous amène à la conclusion que la dynamique moléculaire à l'interface air / eau est beaucoup plus rapide que celle qu'on retrouve dans les systèmes bilipidiques et qu'elle n'est pas associée à des phénomènes de convection de surface comme il a été rapporté dans la littérature.

Par ailleurs, nous avons effectué une étude comparative des isothermes de pression de surface du DPPC, de même que du comportement diffusif de ce lipide en fonction de l'aire moléculaire lorsque le DPPC est comprimé soit par compression continue ou par additions successives du lipide. Selon les deux modes de compression, les isothermes furent enregistrées sur des sous-phases de forces ioniques différentes. Nous montrons que la chute diffusif de la DPPC est systématiquement amorcée au début de la phase liquide-condensé (LC) du lipide, c'est-à-dire correspondant à une gamme d'aires moléculaires s'étendant de la fin de la transition de phase liquide-expansé (LE) / liquide-condensé du DPPC, jusqu'au début de la phase solide-condensé (SC). Une comparaison de nos résultats expérimentaux obtenus en monocouche avec ceux obtenus par d'autres auteurs sur des multicouches de DPPC nous permet de conclure que l'encombrement stérique associé à l'eau d'hydratation des têtes polaires du DPPC en monocouche est responsable de la chute abrupte du coefficient de diffusion latérale enregistrée au début de la phase LC.

De plus, une étude fine des caractéristiques de fluorescence de la sonde que nous utilisons indique qu'une réorganisation structurale des chaînes d'acide gras du lipide se produit dans la phase LC. Ainsi, nos résultats indiquent que les chaînes adoptent dans cette phase une

configuration tout-trans. Nous concluons donc que la phase LC du DPPC est une région de transition intermédiaire entre une phase purement liquide et une phase solide à l'intérieur de laquelle les lipides montrent une réduction significative de leur diffusion latérale. Cette réduction est associée à la réorganisation structurale à la fois de leur région polaire et aliphatique. De plus, nos résultats mettent aussi en évidence le fait que deux transitions orientationnelles se produisent lors de la compression du film de DPPC, l'une, de second ordre thermodynamique, se produisant lors de la transformation LC / SC, l'autre se produisant à l'entrée de la phase LC. Dans ce dernier cas, nous proposons un modèle original qui décrit le film de DPPC comme ayant un double aspect de phase unique et de présence simultanée de trois phases (LC, SC et LE) en coexistence thermodynamique.

Finalement, nous présentons une étude exploratoire des effets des régions hydrocarbonées et polaires sur la dynamique moléculaire de phospholipides insaturés (phosphatidylcholine (PC), phosphatidyl-éthanolamine (PE) et phosphatidylsérine (PS)) à l'interface air / solution, en présence et en absence d'ions calcium dans la sous phase. Les résultats montrent que les ions calcium n'ont aucune influence sur la dynamique moléculaire des PC et que la mobilité latérale des PC insaturées est identique à celle de la PC saturée en phase fluide. Par contre, nous montrons que le coefficient de diffusion latérale de la sonde diminue lorsque les ions divalents sont présents dans la sous-phase des PE et des PS.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
 CHAPITRE I : INTRODUCTION	 1
1.1 Développement expérimental des films de surface	1
1.2 Le polymorphisme des systèmes lipidiques modèles	4
1.2.1 Le polymorphisme en monocouche	4
1.3 La mobilité latérale dans les membranes biologiques	13
1.4 La diffusion latérale dans les membranes biologiques et leurs modèles	16
 CHAPITRE II : MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	 23
2.1 La pureté des produits	23
2.2 Appareillage	26
2.2.1 La cuve de Langmuir	26
2.2.1.1 La pression de surface.....	27
2.2.2 Le fluorimètre d'interface	28
2.3 Description d'une expérience de recouvrement de fluorescence après photoaveuglement (F.R.A.P.)	31
2.4 Propriétés de fluorescence de la sonde	32
2.5 Les mesures de photoaveuglement et de recouvrement de fluorescence	33
2.5.1 Le photoaveuglement	35
2.5.1.1 L'intensité de fluorescence de la sonde	35

2.5.1.2 La dimérisation de la sonde	36
2.5.1.3 Composantes de la constante de dimérisation	38
2.5.2 Le recouvrement de fluorescence	39
2.5.2.1 Détermination du coefficient de diffusion latérale	41
2.6 Résumé des paramètres	43
 CHAPITRE III : LA DIFFUSION LATÉRALE DU DPPC EN MONOCOUCHE	44
3.1 Introduction	44
3.2 L'isotherme de pression de surface	46
3.3 Les propriétés de fluorescence	48
3.3.1 L'intensité de fluorescence réduite	48
3.3.2 La constante de dimérisation	50
3.4 Les propriétés dynamiques	53
3.4.1 La constante de diffusion latérale	53
3.4.2 La diffusion et les phénomènes de convection	54
3.4.3 La divergence des résultats de dynamique latérale dans la littérature	58
3.5 Conclusion	61
 CHAPITRE IV : LA TRANSITION DIFFUSIONNELLE DE LA PHASE LIQUIDE-CONDENSÉ DU DPPC EN MONOCOUCHE	63
4.1 Introduction	63
4.2 Effets du mode de compression	64
4.2.1 Les isothermes de pression de surface	64
4.2.2 La diffusion latérale des monocouches de DPPC	66
4.3 Effets de la force ionique de la sous-phase	68
4.3.1 Les isothermes de pression de surface et la diffusion latérale	68
4.4 Les propriétés de dimérisation des divers types de films	70
4.5 Définition de la phase liquide-condensé	72
4.6 La phase LC et les propriétés d'hydratation	75
4.7 Interprétations du comportement du film dans la phase LC	77

4.8 Conclusion	83
 CHAPITRE V : LA NATURE DE LA TRANSFORMATION LIQUIDE / SOLIDE DES FILMS DE DPPC.....	
5.1 Introduction	84
5.2 Comportement idéal des changements d'états dans les films de surface	85
5.3 Comportement réel des changements d'états dans les films de surface	88
5.4 Processus d'orientation lors de la transformation liquide / solide des films de DPPC	92
5.4.1 Les brisures de symétrie rotationnelle	93
5.5 Les aires moléculaires caractéristiques des phases	94
5.5.1 Les lipides interfaciaux	99
5.6 Modèle structural de la transformation de la monocouche.	100
5.7 Détermination du point critique du DPPC en monocouche	103
5.8 Températures de transformations de phase du DPPC en monocouche et en bicouche.	106
5.9 Conclusion.	109
 CHAPITRE VI : LA DIFFUSION LATÉRALE DES PHOSPHOLIPIDES INSATURÉS	
6.1 Introduction	112
6.1.1 Présentation du modèle	113
6.2 Les propriétés des films de phosphatidylcholines insaturées	115
6.2.1 Les isothermes de pression de surface	115
6.2.2 Les propriétés de fluorescence	118
6.2.2.1 L'intensité de fluorescence réduite	118
6.2.2.2 La constante de dimérisation de la sonde	121
6.2.3 La diffusion latérale de la sonde	123
6.3 Les propriétés des films de phosphatidylsérines insaturées	126
6.3.1 Les isothermes de pression de surface	126
6.3.2 Les propriétés de fluorescence	128
6.3.2.1 L'intensité de fluorescence réduite	128

6.3.2.2 Les constantes de dimérisation de la sonde	130
6.3.3 La diffusion latérale des films de phosphatidylsérines	132
6.4 Les propriétés des films de phosphatidyléthanolamines insaturées	136
6.4.1 Les isothermes de pression de surface	136
6.4.2 Les propriétés de fluorescence de la sonde dans les films de PE	136
6.4.2.1 L'intensité de fluorescence réduite	136
6.4.2.2 Les constantes de dimérisation de la sonde	139
6.4.3 Les propriétés de diffusion latérale	142
6.5 Conclusion	144
CHAPITRE VII : CONCLUSION GÉNÉRALE	148
BIBLIOGRAPHIE	157

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I : Coefficient de diffusion latérale du DPPC dans les monocouches et les bicouches lipidiques	59
Tableau II : Coefficient de diffusion latérale et aires moléculaires lors des transitions de phases du DPPC suivant diverses conditions expérimentales	72
Tableau III : Formes moléculaires modèles des phospholipides	114
Tableau IV : Résumé des coefficients de diffusion latérale des phospholipides	125
Tableau V : Aires moléculaires des phospholipides suivant leurs compressions	127

LISTE DES FIGURES

	Page
<p>Figure 1 : Représentation schématique d'isothermes de pression de surface de monocouches étalées à l'interface air / eau à diverses températures. Π : pression de surface. A : aire moléculaire. LO : basse température. HI : haute température. (T_c)_c : Température critique de cristallisation. (T_c)_l : Température critique de liquéfaction. G : gazeux. L : liquide. S : solide. M : mésomorphe (tirée de Dervichian, (1939))</p>	6
<p>Figure 2 : Représentation (modèle CPK) de l'organisation des amphiphiles à l'interface air / eau lorsque le film de surface est dans l'état gazeux idéal (G) (adaptée de Robertson, (1983))</p>	7
<p>Figure 3 : Enregistrement courant d'une isotherme de pression de surface (π (mN·m⁻¹) vs A (Å²·molécule⁻¹)) pour une monocouche étalée à l'interface air / eau, (i) courbe continue, lorsque (T_c)_c < T < (T_c)_l, et (ii) courbe discontinue, lorsque T < (T_c)_c, G : gazeux. LE : liquide-expansé. LC : liquide-condensé. SC : solide-condensé (tirée de Gaines, (1966))</p>	9
<p>Figure 4 : Représentation de l'organisation des amphiphiles (modèle CPK) à l'interface air / eau lorsque le film de surface est dans l'état liquide-expansé (LE) (tirée de Robertson, (1983))</p>	11
<p>Figure 5 : Représentation de l'organisation des amphiphiles (modèle CPK) à l'interface air / eau lorsque le film de surface est dans l'état solide-condensé (SC) (tirée de Robertson, (1983))</p>	13
<p>Figure 6 : Représentation moléculaire de la sonde de fluorescence, le 12-9-AS : 12-9-anthroyloxy acide stéarique, de la phosphatidylcholine (PC), de la phosphatidyléthanolamine (PE), et de la phosphatidylsérine (PS)</p>	24

Figure 7	: La cuve de Langmuir et la méthode de Wilhelmy	27
Figure 8	: Schéma de l'optique du fluorimètre d'interface. PM : photomultiplicateur. L : lentilles. P : polariseurs. s : obturateur du photomultiplicateur, f : filtre	29
Figure 9	: Schéma de la disposition géométrique des vecteurs électriques (E) de la lumière incidente lors de l'insertion du prisme optique. Les intensités de fluorescence I_x et I_{yz} décrites dans le texte furent observées lorsque le vecteur électrique de la lumière incidente était parallèle à E_x et à E_{yz} respectivement (tirée de Teissié, (1979))	30
Figure 10	: Schéma des étapes de photoaveuglement et de recouvrement de fluorescence lors d'une expérience de F.R.A.P.	34
Figure 11	: Détermination de la constante de vitesse de la réaction de dimérisation (K_d) par le graphe de la réciproque de l'intensité de fluorescence en fonction du temps de photodimérisation	37
Figure 12	: Représentation moléculaire de la formation du dimère de la sonde de fluorescence	40
Figure 13	: Isotherme de compression d'une monocouche de DPPC à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ en présence de 2% (mole/mole) de 12- 9-AS. La sous-phase est une solution de NaCl 0,1 M. LE: état liquide-expansé, LC: état liquide-condensé, SC: état solide-condensé	47
Figure 14	: L'intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS (unités arbitraires) tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, le DPPC. Le rapport sonde / lipide est de 2%	49
Figure 15	: La constante de vitesse de dimérisation de la photoréaction de la sonde tracée en fonction de l'aire moléculaire du DPPC	51
Figure 16	: Le coefficient de diffusion latérale (tracé en log de D_{lat}) en fonction de l'aire moléculaire du DPPC	54
Figure 17	: Schéma du montage pour vérifier la présence possible de flux de convection à l'interface	57

Figure 18	: Isothermes de pression de surface du DPPC + 2% (mole/mole) de 12-9-AS à l'interface air / solution. T= 21+/- 1°C. Sous-phase: NaCl 0,1 M. Compression continue: trait plein. Addition successive: pointillés	65
Figure 19	: Coefficient de diffusion latérale en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. Sous-phase: NaCl 0,1 M. (a) compression continue, (b) addition successive de lipides	67
Figure 20	: (a) Isotherme de pression de surface du DPPC + 2% (mole/mole) de 12-9-AS à l'interface air / solution. Mode de compression : continue. (b) Coefficient de diffusion latérale en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. T= 21+/- 1°C. Sous-phase : NaCl 1,0 M	69
Figure 21	: Constante de dimérisation de la sonde, K_d , en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. (a) Compression continue du film, NaCl 1,0 M. (b) Compression continue du film, NaCl 0,1 M. (c) Addition successive des lipides, NaCl 0,1 M	71
Figure 22	: Représentation schématique de la transition de phase LC / SC du second ordre (tirée de Albrecht et coll., (1978))	73
Figure 23	: Isothermes de pression de surface du DPPC soumis à une compression et une décompression continues (tirée de Snik, (1983))	80
Figure 24	: Isotherme de pression de surface idéalisée	87
Figure 25	: Rapport des constantes de dimérisation suivant le plan de polarisation de la lumière incidente en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. T= 21+/- 1°C. Sous-phase : NaCl 0,1 M	93
Figure 26	: Isothermes de pression de surface et du degré de cristallisation en fonction de l'aire moléculaire du DPPC à l'interface air / NaCl 0,1 M (tirée de Heckl et coll., (1987))	96
Figure 27	: Schéma de l'organisation latérale des lipides interfaciaux (LC) formant l'interface entre la phase fluide (LE) et la phase solide (SC)	98

- Figure 28 : Évolution de l'aire moléculaire au début de la transition LE / LC (A_t) en fonction de la température. (carré): Hui et coll., (1975). (rond): Phillips et Chapman, (1968). (triangle): Rice et coll., (1987) 104
- Figure 29 : Isothermes de pression de surface du DPPC à l'interface air / solution à plusieurs températures: 1: 9,0°C, 2: 15,5°C, 3: 19,0°C, 4: 22,8°C, 5: 25,5°C, 6: 29,2°C, 7: 33,8°C, 8: 37,2°C, 9: 41,1°C, 10: 41,7°C, 11: 42,8°C, 12: 44,0°C (tirée de Hui et coll., (1975)) 105
- Figure 30 : (a) Isotherme de pression de surface du DPPC + 2% 12-9-AS. (b) Isotherme de pression de surface de la PC (S.E.B.) + 2% 12-9-AS. Sous-phases : NaCl 0,1 M ou NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21+/- 1°C 117
- Figure 31 : Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte: (a) le DPPC et (b) la PC (S.E.B.). Sous-phases : NaCl 0,1 M ou NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21+/- 1°C 119
- Figure 32 : La constante de dimérisation structurale de la photoréaction de la sonde tracée en fonction de l'aire moléculaire: (a) du DPPC et (b) de la PC (S.E.B.). Sous-phases : NaCl 0,1 M ou NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T= 21+/- 1°C 122
- Figure 33 : Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire de la PC (S.E.B.) (flèche ; ligne continue) et du DPPC (points). Sous-phases : NaCl 0,1 M ou NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T= 21+/- 1°C 124
- Figure 34 : Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T= 21+/- 1°C 128
- Figure 35 : Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T= 21+/- 1°C 129

Figure 36	: Constante de vitesse de dimérisation structurale du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl ₂ 0,01M. T= 21 +/- 1°C	131
Figure 37	: Constante de vitesse de dimérisation structurale du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl ₂ 0,01 M. T=21 +/- 1°C	132
Figure 38	: Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl ₂ 0,01 M. T= 21 +/- 1°C	133
Figure 39	: Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl ₂ 0,01 M. T= 21 +/- 1°C	134
Figure 40	: Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl ₂ 0,01 M. T= 21 +/- 1°C	137
Figure 41	: Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl ₂ 0,01 M. T= 21 +/- 1°C	138
Figure 42	: Constante de vitesse de dimérisation structurale du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl ₂ 0,01 M. T= 21 +/- 1°C	140
Figure 43	: Constante de vitesse de dimérisation structurale du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M+ CaCl ₂ 0,01 M. T= 21 +/- 1°C	141

- Figure 44 : Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T= 21+/- 1°C 142
- Figure 45 : Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T= 21+/- 1°C 144

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Développement expérimental des films de surface

On sait depuis longtemps que l'huile déversée à la surface d'une mer houleuse a pour effet de la rendre plus calme. La première expérimentation scientifique liée à cette observation remonte à 1774 alors que Benjamin Franklin constate qu'un peu d'huile d'olive sur un étang rend sa surface aussi lisse qu'un miroir (Gershfeld, (1976)). Il constate ainsi que certaines huiles (lipides) s'étalent spontanément sur l'eau pour former des films minces aux dimensions moléculaires. Il faut attendre Pockels (1891) pour qu'on réalise une mesure quantitative de l'extension d'un film mince en utilisant une barrière transversale posée à la surface de l'eau. Un peu plus tard, on a suggéré que ces films minces n'ont qu'une molécule d'épaisseur, c.-à-d., ils sont monomoléculaires. C'est en 1913 que Devaux introduit l'utilisation de solvants organiques pour déposer et restreindre la quantité de matériel lipidique déposé sur la surface aqueuse. Il propose que les films

monomoléculaires étalés avec un solvant possèdent des états analogues aux phases tridimensionnelles (solide et liquide) lorsqu'ils sont comprimés latéralement.

Ces développements expérimentaux réalisés avec des films minces déposés sur la surface aqueuse ont donné naissance à la méthode dite des films insolubles ou des monocouches. Il existe aussi une seconde approche expérimentale qui a permis de réaliser l'étude de films minces qui sont adsorbés sur la surface aqueuse. Avec cette méthode, le film bidimensionnel est formé par l'adsorption à la surface, d'un matériel tensio-actif présent dans la solution aqueuse adjacente à cette surface. Cette approche expérimentale provient à la fois des analyses théoriques de la capillarité et des effets de la tension de surface (Defay et coll., (1966)). L'analyse thermodynamique, élaborée par Gibbs (1961), pose les fondements pour l'étude systématique de ces films adsorbés à la surface. Ainsi, Gibbs relia la tension de surface d'une solution aqueuse à sa concentration en soluté surfactant. Dans son manuscrit original sur les équilibres des substances hétérogènes, Gibbs utilise, pour la dérivation de cette relation, plusieurs notations thermodynamiques qui sont maintenant désuètes. Ce sont les concepts impliqués dans cette dérivation originale qui ont été repris plus récemment par Prigogine (Defay et coll., (1966)) en utilisant le symbolisme thermodynamique moderne.

En 1917, Irving Langmuir développe la forme moderne de la "balance à film" qu'on nomme aujourd'hui la "cuve de Langmuir". Il démontre que les films formés par étalement (avec un solvant) ou formés par adsorption du

matériel lipidique sont essentiellement monomoléculaires et sont orientés à la surface suivant les propriétés chimiques du composé formant le film. Il prévoit aussi qu'à une certaine concentration de surface des lipides d'un film, une augmentation de la longueur des chaînes hydrocarbonées du lipide provoque la transition de l'état de surface gazeux (gaz bidimensionnel) à l'état de surface liquide (liquide bidimensionnel) du film de surface. Ses attentes sont confirmées ultérieurement avec des films lipidiques formés à la surface de l'eau ; d'abord par Frumkin en 1925 (Gershfeld, (1976)) pour des films adsorbés à la surface puis, en 1926, par Adam et Jessop pour des films étalés avec un solvant puis soumis à une compression. Les travaux de Langmuir sont aussi à l'origine de plusieurs des travaux de Adam ((1941) et (1968)) et de Rideal ((1930) et (1951)) où les films lipidiques étalés puis comprimés sur l'eau sont étudiés afin d'élargir la connaissance de l'architecture moléculaire et son influence sur la relation entre les phases bidimensionnelles que les films peuvent assumer (polymorphisme en monocouche) et les réactions chimiques se produisant dans ces films de surface.

En plus de former des films monomoléculaires à l'interface, les matériaux lipidiques synthétiques ou naturels peuvent former d'autres systèmes lipidiques tels que des vésicules, des liposomes, et des membranes planes. Les études du polymorphisme de ces systèmes bilipidiques ont apporté une grande quantité de données additionnelles concernant les propriétés physiques de la structure lipidique des membranes biologiques.

1.2 Le polymorphisme des systèmes lipidiques modèles

De par la nature amphiphile (un pôle (région) hydrophobe et un pôle hydrophile sur la même molécule) des lipides qui composent les membranes biologiques (phospholipides et acides gras principalement), ces derniers montrent une modification continue et discontinue (transition) de leurs entassements moléculaires durant les expansions thermiques et durant les transitions successives à travers leurs diverses phases : solide, liquide-cristalline (ou l'équivalent: liquide-cristal, liquide-anisotrope, phase smectique), liquide isotrope et gazeux. Ils subissent des altérations structurales et des transitions ordre / désordre suivant leur contenu en eau (mésomorphisme lyotrope des systèmes bilipidiques), la température (mésomorphisme thermotrope des systèmes bilipidiques et des monocouches) et leurs degrés de compression latérale (dans les monocouches). Un comportement mésomorphique particulier dépend de la nature de la tête polaire et de la structure des chaînes hydrocarbonées. Il peut dépendre aussi de la taille et de la composition lipidique d'un système modèle membranaire donné. En conséquence, les phospholipides peuvent assumer plusieurs types de phases structurales qui montrent un haut degré d'organisation à longue portée en une, deux ou trois dimensions, tout en maintenant un désordre considérable au niveau moléculaire. De fait, le polymorphisme exceptionnellement grand des phospholipides hydratés qui existe dans un écart étroit de pression, de température et d'hydratation leur est caractéristique et les distingue de tous les autres liquides.

1.2.1 Le polymorphisme en monocouche

Les films lipidiques peuvent exister sous des états condensés qu'on

pense analogues aux phases lipidiques tridimensionnelles (Devaux, (1913) et Langmuir, (1917)). En effet, la littérature des années 30 et 40 sur les films lipidiques étalés sur l'eau, réfère à une variété d'états analogues aux liquides , "liquid like phase" (Adam, (1941)) et à des états liquide-cristal ou liquide fortement organisé, "liquid crystalline" (Rideal, (1930)). Toutefois, l'analogie prétendue n'est pas appuyée par des mesures de type énergétique. Elle dérive plutôt de propriétés moins directes telles que la viscosité et la compressibilité de surface, ainsi que de l'aire occupée par les molécules du film. Ainsi, les isothermes des films bidimensionnels (pression de surface vs aire moléculaire) ressemblent aux isothermes des matériaux tridimensionnels (pression vs volume) parce que les films comportent des états dont les caractéristiques qualitatives sont similaires à celles que possède la matière tridimensionnelle. Cependant, il n'y a pas de comparaison complète entre la matière en deux et trois dimensions; des différences subtiles de structure demeurent. Ceci provient du fait que les molécules amphiphiles des films bidimensionnels à l'interface air / eau sont organisées de telle sorte que les groupes polaires sont orientés vers le substrat aqueux alors que les chaînes hydrocarbonées tendent à s'éloigner de ce substrat (propriété d'amphiphilicité). Une structure donnée est stabilisée par les interactions entre les chaînes, entre les têtes polaires et entre les régions polaires et le substrat (c.-à-d., la solution comportant l'organisation lipidique).

L'étude systématique du polymorphisme des lipides en monocouche remonte à Adam et Jessop (1926) et à Dervichian ((1939) et (1952)). Nous présentons ici quelques généralités sur les divers états physiques d'un

matériel tensioactif unique en film monomoléculaire en suivant les conceptions et les terminologies des deux auteurs : Adam (1968) et Dervichian (1939). Les divers états physiques possibles des lipides en monocouche sont illustrés à la figure 1.

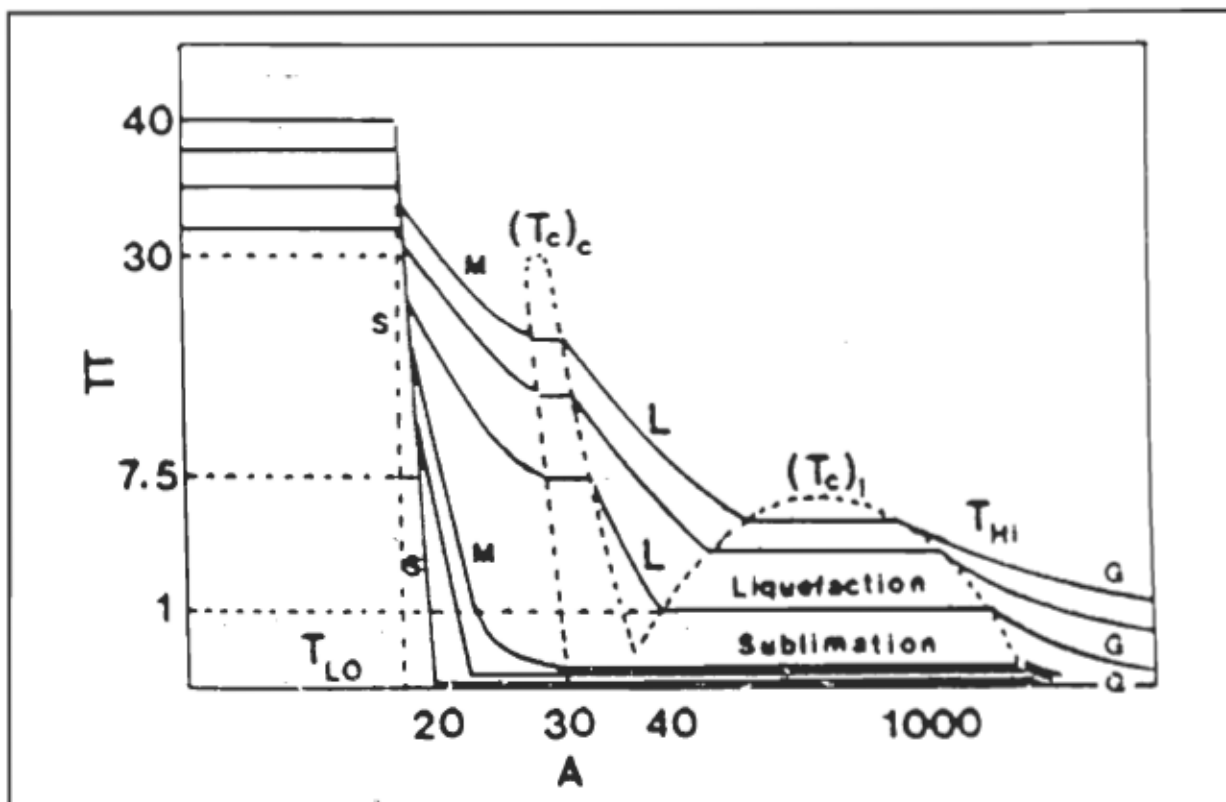


Figure 1 :

Représentation schématique d'isothermes de pression de surface de monocouches étalées à l'interface air / eau à diverses températures. Π : pression de surface. A : aire moléculaire. LO : basse température. HI : haute température. $(T_c)_c$: température critique de cristallisation. $(T_c)_l$: température critique de liquéfaction. G : gazeux. L : liquide. S : solide. M : mésomorphe (tirée de Dervichian, (1939))

L'état gazeux (G): à des aires moléculaires élevées et aux faibles pressions de surface, les films de surface sont gazeux (indices "G", figure 1). Les groupes polaires des lipides sont alors immergés dans la sous-phase aqueuse, tandis que les chaînes sont présumément à peu près parallèles à la

surface (fig. 2). Une variation positive d'énergie libre prévient l'immersion des chaînes, bien que l'enthalpie de l'interaction chaîne-substrat demeure négative (exothermique) (Cadenhead. (1985)).

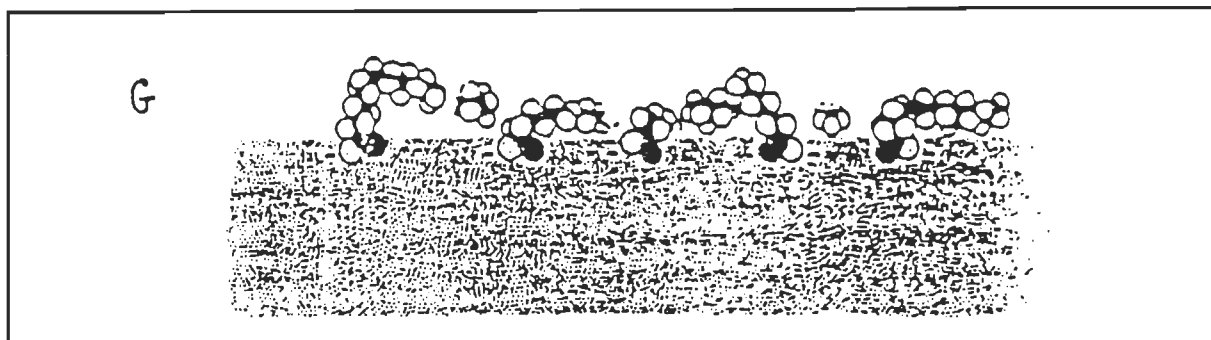


Figure 2 :

Représentation (modèle CPK) de l'organisation des amphiphiles à l'interface air / eau lorsque le film de surface est dans l'état gazeux idéal (G) (adaptée de Robertson, (1983))

Il y a donc suffisamment d'interaction entre les têtes polaires et le substrat pour que les molécules ne soient pas entraînées dans la phase vapeur au dessus de la surface aqueuse, et les amphiphiles sont presque complètement insolubles dans l'eau.

Cependant, la description adéquate de cet état par l'équation de Van der Waals adaptée à la matière en deux dimensions indique que les interactions à l'intérieur du film sont généralement significatives (Gershfeld, (1970)). Il ne s'agit donc pas d'un gaz au comportement idéal. La microscopie de fluorescence montre en effet que même à de très grande aire moléculaire, l'état gazeux présente des trous contenant une très faible concentration de lipides (phase gazeuse idéale) entourés de lipides dans une phase liquide (Moore et coll., (1986) et Lösche et coll., (1983)). L'ellipsométrie montre un plateau dans l'état gazeux qui proviendrait du remplissage de ces

trous par la phase liquide lors de la réduction d'aire moléculaire (Rasing et coll., (1988), et Ducharme et coll., (1990)).

L'état liquide: pour les amphiphiles à longues chaînes, des transitions se produisent entre l'état gazeux et des états liquides ayant davantage d'interaction intermoléculaire dans le film. Ces transitions montrent une forte ressemblance avec la condensation de la vapeur vers l'état liquide des systèmes tridimensionnels. Les films de surface comportent divers états liquides, ce sont l'état liquide (L) et mésomorphique (M) dans la terminologie de Dervichian (1939) présentée à la figure 1. Ce sont aussi respectivement les phases liquide-expansé (LE) et liquide-condensé (LC) dans la terminologie de Adam (1968) qui seront détaillées plus loin. Ainsi, si le gaz bidimensionnel est sous sa température critique de liquéfaction et au-dessus de sa température critique de sublimation, soit $(T_c)_c < T < (T_c)_l$, la compression latérale du film entraîne une transformation de la phase gazeuse à la phase liquide (L). Sous sa température critique de sublimation cependant, $T < (T_c)_c$, la compression latérale du film entraîne une transformation de la phase gazeuse à la phase mésomorphique (M) (fig. 1).

Le début de la condensation du gaz bidimensionnel dans l'état L ou dans l'état M se produit à une pression de surface trop faible pour être mesurée couramment. La figure suivante (fig. 3) présente des isothermes enregistrées en routine en suivant la terminologie de Adam.

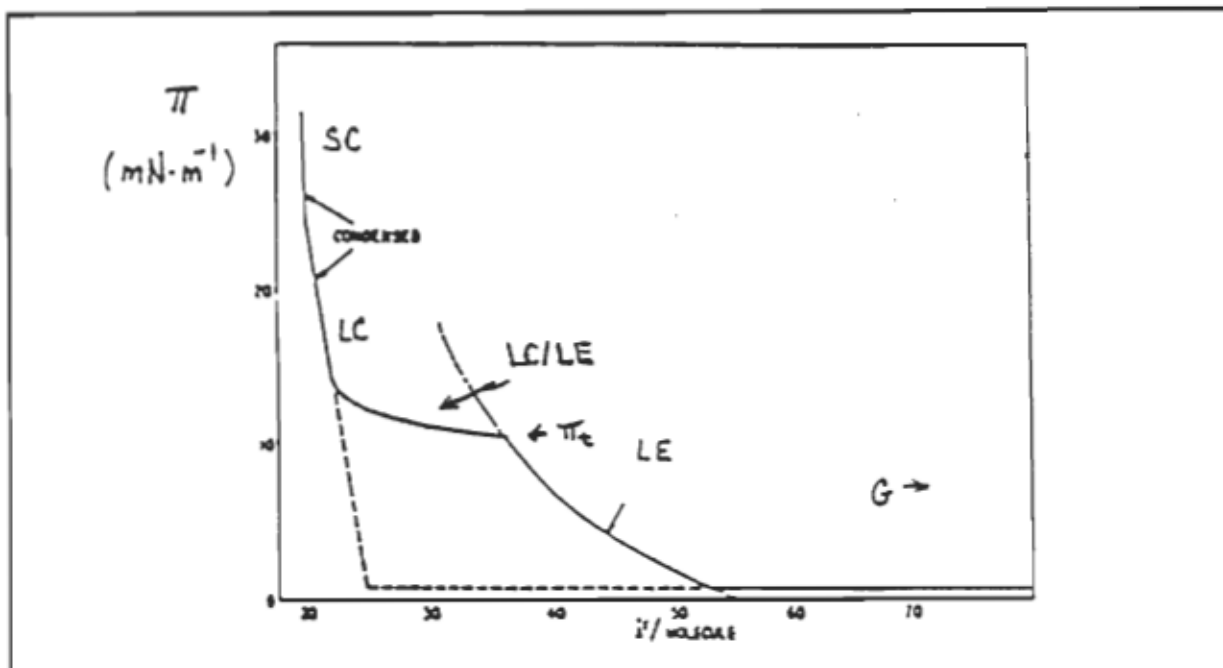


Figure 3 :

Enregistrement courant d'une isotherme de pression de surface (π ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$) vs A ($\text{\AA}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$)) pour une monocouche étalée à l'interface air / eau, (i) courbe continue, lorsque $(T_c)_c < T < (T_c)_l$, et (ii) courbe discontinue, lorsque $T < (T_c)_c$, G : gazeux. LE : liquide-expansé. LC : liquide-condensé. SC : solide-condensé (tirée de Gaines, (1966))

On observe la discontinuité de la transition G / LE (ou G / L) (courbe continue) et la discontinuité de la transition G / LC (ou G / M) (pointillés) du côté des faibles aires moléculaires. Ces discontinuités marquent respectivement le début de la phase LE et de la phase LC (fig. 3). Pour les acides gras, le début de la condensation dans l'état LC se produit habituellement à une pression latérale de l'ordre de $0,01 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ et à une aire située entre $1\,000$ à $10\,000 \text{ \AA}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$ (Adam et Jessop, (1926)). De son côté, le début de la condensation dans l'état LE se produit à une pression de surface d'environ $0,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ à $1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ et à une aire moléculaire située entre 100 à $1\,000 \text{ \AA}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$ (Adam et Jessop, (1926)).

Les transitions G / LE et G / LC sont dites du 'premier ordre' puisque chacune de ces transitions est caractérisée par deux cassures nettes et une discontinuité horizontale de l'isotherme de pression de surface. En fait, depuis longtemps, Dervichian (1939) et Joly (1950) ont montré que la classification thermodynamique d'Ehrenfest sur les transformations des phases peut être étendue aux films monomoléculaires. Ce sont eux qui montrèrent que les dérivations successives du potentiel chimique de surface (μ^S) par rapport à π déterminent le degré d'ordre de la transformation. Ainsi, ils montrent que :

$$(i) (\partial\mu^S/\partial\pi)_T = A$$

$$(ii) (\partial^2\mu^S/\partial^2\pi)_T = \partial A/\partial\pi$$

où $(\partial A/\partial\pi)_T = -A \cdot C_s$, C_s étant la compressibilité de surface. On obtient en (i) qu'une transformation du premier ordre (c.-à-d. une transition ordre / désordre des chaînes hydrocarbonées (Cadenhead, (1977))) est caractérisée par une discontinuité de l'aire moléculaire (A) comme le montre la transformation des films de surface gazeux vers les états condensés (fig. 3). La pression de surface est alors constante à π_v (pression de vapeur de surface) le long de la réduction de l'aire de surface (Gershfeld et Pagano, (1972)). La transition du second ordre (c.-à-d. une transition conformationnelle (Baret et coll., (1982))) est présentée en (ii). Elle est caractérisée par une discontinuité soudaine de la compressibilité de surface, C_s (Albrecht et coll., (1978)), comme le montre la transformation de l'état liquide-condensé à l'état solide-condensé des films monomoléculaires (fig. 3).

L'état liquide-expansé (LE): la figure 4 présente l'organisation moléculaire des lipides d'un film monomoléculaire en phase liquide-expansé. On observe que les chaînes hydrocarbonées sont dans un état désordonné bien que les interactions entre elles soient importantes. Le film comporte alors une cohésion beaucoup plus importante que dans la phase gazeuse idéale.

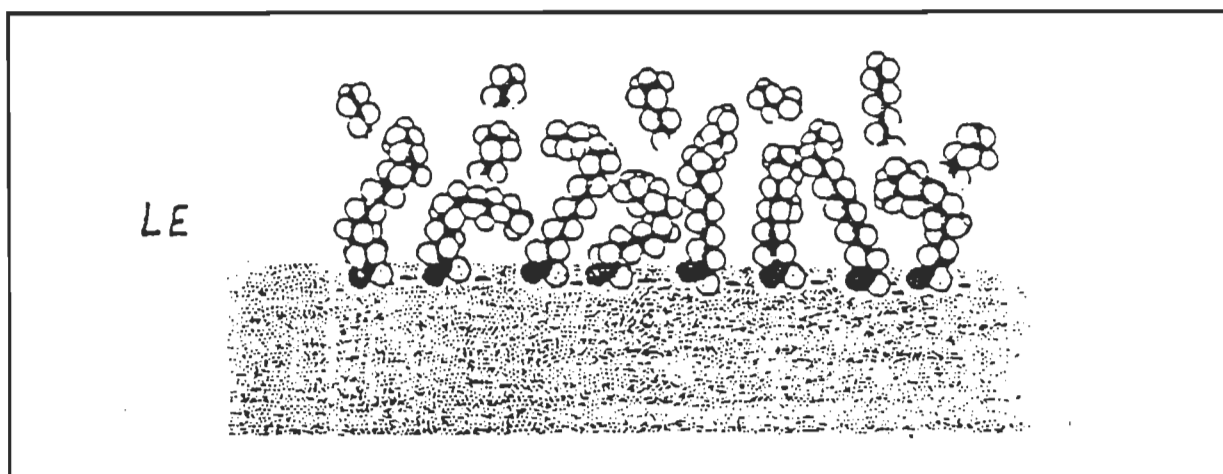


Figure 4 :

Représentation de l'organisation des amphiphiles (modèle CPK) à l'interface air / eau lorsque le film de surface est dans l'état liquide-expansé (LE) (tirée de Robertson, (1983))

La phase liquide-condensé (LC): le comportement du lipide dans la phase LC est similaire à celui qu'on observe pour la phase LE mais le film montre une compressibilité (C_s) plus faible que ce dernier. Tel que mentionné, cet état est aussi présenté sous l'appellation "phase mésomorphe" (M).

La transition liquide-expansé / liquide-condensé (LE / LC): dès sa première observation par Labrouste (Gershfeld, (1976)), cette transition fut la source de nombreuses controverses. Elle est encore aujourd'hui l'objet des

mêmes litiges. C'est Langmuir (1933) qui a initialement suggéré que cette transformation débutant à π_t (pression de surface de la transition LE / LC, fig. 3), reflète la transition de la phase liquide-expansé à la phase liquide-condensé lors de la compression d'un film étalé à la surface. Il a également suggéré que cette transformation résulte de la formation de micelles bidimensionnelles dans le film. Suivant ces suggestions, Harkins (1952) conclua que la transition est une autre phase, c.-à-d. la phase intermédiaire, I. La nature des phases des films de surface impliquées dans cette transformation à l'interface fut aussi interprétée comme la transition de la phase liquide à la phase mésomorphique, la transition étant l'état mésomorphe-expansé (Dervichian, (1952)).

L'état solide: on le nomme aussi l'état solide-condensé (SC) (Adam, (1968)); il est caractérisé par une courbe linéaire et une faible compressibilité de l'isotherme de pression de surface. La valeur de C_s est en effet comparable à ce qu'on retrouve pour les matériaux tridimensionnels en phase solide. Les chaînes hydrocarbonées des lipides sont alors très rapprochées et les interactions de Van der Waals sont très importantes. La figure 5 illustre ce haut degré de cohésion du film monomoléculaire des lipides à la surface d'un substrat lorsque le film est dans un état solide. On observe sur cette figure que les chaînes hydrocarbonées sont alors très ordonnées et qu'il n'y a pas de contact entre la région hydrocarbonée du lipide et le substrat.

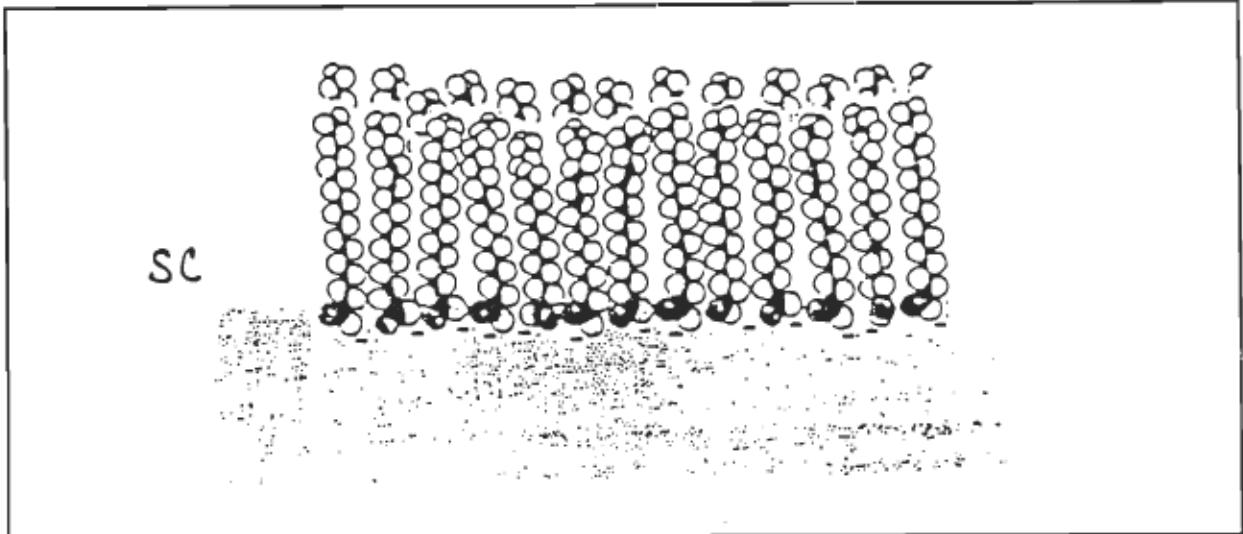


Figure 5 :

Représentation de l'organisation des amphiphiles (modèle CPK) à l'interface air / eau lorsque le film de surface est dans l'état solide-condensé (SC) (tirée de Robertson, (1983))

1.3 La mobilité latérale dans les membranes biologiques

C'est la méthode des couches monomoléculaires à l'interface air / eau qui donne à Gorter et Grendel (1925) la première indication de la nature bimoléculaire des membranes cellulaires. Ils proposèrent en effet que la membrane biologique est constituée d'un double feuillet lipidique. On sait aujourd'hui qu'en dehors de leur grande diversité fonctionnelle, la structure commune de la plupart des membranes biologiques est la bicouche lipidique. Il fallut cependant attendre très longtemps pour inférer l'existence d'une propriété de mobilité latérale aux composantes lipidiques et protéiques des membranes biologiques.

En effet, ce n'est qu'en 1968 que Adam et Delbruck présentent pour la première fois la membrane biologique comme un fluide bidimensionnel. Leurs assertions qualitatives concernant la fluidité de la membrane biologique ont été ensuite reprises par Cuatrecasas (1974), qui confère à la

dynamique translationnelle des constituants membranaires un rôle crucial dans la propagation latérale de l'information le long de la membrane cellulaire. Cette proposition provenait de constatations multiples sur la fertilisation, la différenciation cellulaire et la régulation hormonale. Plus récemment, Skulachev (1980) proposa que la diffusion latérale peut potentiellement servir à la "canalisation" d'énergie pour des métabolites et des électrons le long du corps de la cellule en utilisant des protéines "transporteuses" spécialisées dans le transport latéral de la membrane.

Une expérience qualitative a originalement montré l'existence de la mobilité latérale des constituants des membranes cellulaires. Cette expérience concerne la mobilité latérale des antigènes de la surface cellulaire. En effet, la diffusion latérale de protéines membranaires a été montrée expérimentalement pour la première fois par Frye et Edidin en 1970 par le mélange des deux types d'antigènes de surface (souris et humain) dans la membrane d'un hétérocaryon formé de ces deux espèces cellulaires fusionnées par le virus de Sandaï. Ils utilisèrent des anticorps fluorescents (fluorescéine) pour suivre l'envahissement de l'antigène marqué (par histocompatibilité) de l'hémisphère "souris" à l'hémisphère "humain" dans chacun des hétérocaryons. Les observations indiquèrent qu'environ 10 minutes sont nécessaires à la redistribution des antigènes sur la surface des hétérocaryons.

Ce sont ces expériences qui figurèrent d'éléments clefs dans la formulation de l'hypothèse du modèle membranaire de la "mosaïque fluide" de Singer et Nicholson en 1972. En effet, ce modèle des membranes

biologiques donne une propriété de fluidité (et implicitement de diffusion latérale, D_{lat}) aux constituants du bifeuillet lipidique organisés en réseau (mosaïque) et aux protéines qui y sont adsorbées ou insérées.

La première détermination quantitative de la mobilité translationnelle des composantes des membranes biologiques résultent des travaux expérimentaux de Poo et Cone en 1974 sur la rhodopsine contenue dans la membrane discale des bâtonnets rétiniens de grenouille et de salamandre. En mesurant l'absorbance des rhodopsines non blanchies, alternativement, de chaque côté d'un segment externe du bâtonnet rétinien préalablement "blanchi" (ou aveuglé) d'un des côtés, Poo et Cone ont suivi à la fois le retour des pigments non blanchis vers le côté illuminé et la perte des pigments non aveuglés provenant du côté non illuminé. Les auteurs ont obtenu un coefficient de diffusion latérale de la rhodopsine d'une valeur de $3,9$ et $3,5 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ pour la salamandre et la grenouille respectivement. Liebman et Entine (1974) ont obtenu des résultats similaires, soit, $4,7$ et $5,5 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ pour les segments externes du bâtonnet rétinien de la salamandre et de la grenouille respectivement.

Il serait peut-être utile de donner ici une représentation de l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion latérale en relation au déplacement et la vitesse d'une composante membranaire. On peut, par exemple, calculer le temps requis à une molécule de lipide pour diffuser le long d'une cellule sphérique de $5 \mu\text{m}$ de rayon. On sait que le coefficient de diffusion latérale du lipide est de $10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$. Puisque:

$$\langle x^2 \rangle = 4 \cdot D_{\text{lat}} \cdot t$$

où $\langle x^2 \rangle$ est la moyenne du carré du déplacement durant le temps t , on trouve un temps de déplacement d'environ 15 min, ce qui correspond à une vitesse de déplacement latéral de l'ordre de $10^{-7} \text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$. On sait aussi que les protéines membranaires se déplacent d'environ $0,2 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$, soit $200 \text{nm} \cdot \text{sec}^{-1}$. Ceci correspond à un coefficient de diffusion latérale de $10^{-10} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$. Si le coefficient de diffusion était près de celui de l'eau, $10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$, on aurait une vitesse de déplacement de $64 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ ($64\,000 \text{nm} \cdot \text{sec}^{-1}$).

1.4 La diffusion latérale dans les membranes biologiques et leurs modèles

Les valeurs du coefficient de diffusion latérale ont par la suite été déterminées pour de nombreux constituants lipidiques et protéiques dans les membranes biologiques et dans les systèmes modèles bilipidiques. Les techniques suivantes ont permis une détermination plus précise du coefficient de diffusion latérale des lipides et des protéines dans ces systèmes: i) la résonance de spin électronique (RPE) (Devaux et McConnell, (1972)), ii) la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Lindblom et coll., (1976)), et iii) le photoblanchiment de la fluorescence. Avec cette dernière technique de mesure, le coefficient de diffusion latérale est estimé à partir de molécules de sondes de fluorescence dispersées dans le milieu lipidique. Des sondes telles que le pyrène (Galla et Sackmann, (1974)) ou les dérivés de l'acide 9-anthroylcarboxylique (McGrath et coll., (1976)) sont largement utilisées. Les valeurs du coefficient de diffusion latérale sont calculées indirectement à partir des expériences de photoblanchiment en comparant le comportement de la sonde dans un solvant organique (McGrath et coll.,

(1976)). Les valeurs du coefficient de diffusion latérale peuvent aussi être calculées directement à partir de la cinétique de la formation d'excimère (Galla et Sackmann, (1974)) ou du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment ("fluorescence recovery after photobleaching", le F.R.A.P.) (Axelrod et coll., (1976), et Koppel et coll., (1976)). Avec le système modèle des films monomoléculaires à l'interface air / solution, les données de diffusion latérale proviennent des techniques suivantes: i) la dynamique de flux à l'interface (Lösche et Möhwald, (1984)), ii) l'autoradiographie (Stroeve et Miller, (1975)), iii) la dynamique d'excimère (Loughran et coll., (1980)), et iv) le recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (Teissié et coll., (1978); Von Tascharner et McConnell, (1981a et b), et Peters et Beck, (1983)).

Bien qu'un grand nombre de mesures quantitatives des différents mouvements moléculaires aient été obtenues, le rôle fonctionnel réel de ces mouvements n'a été mis en évidence que pour un nombre restreint de phénomènes biologiques (Edidin, (1987)). C'est le cas par exemple d'une enzyme membranaire, l'adénylate cyclase, dont l'activité dans le plan de la membrane est liée à sa mobilité latérale pour la formation d'un complexe avec le récepteur de l'épinéphrine en présence de l'hormone (Cuatrecasas, (1974), et Hanski et coll., (1979)). Mentionnons aussi que les collisions au hasard des complexes protéiques et des transporteurs d'électrons (ubiquinone et cytochrome-c) de la chaîne de transport des électrons sont suffisantes pour rendre compte du taux de transfert d'électrons, sans qu'il soit nécessaire d'inférer la présence d'une organisation particulièrement structurée de ces composantes (Hackenbrock, (1981)).

A l'aide des modèles multibilipidiques des membranes biologiques on a montré qu'il se produit une augmentation significative de la diffusion latérale des lipides à la température de transition de phase solide / liquide (Fahey et Webb, (1978)). Plusieurs études sur ces modèles multibilipidiques (MLV) ont montré l'importance de cette transition de phase (appelée aussi la transition gel / cristal-liquide) dans de nombreux processus biologiques. Par exemple, il a été montré que cette transition de phase implique i) des changements de la mobilité transverse de perméants tels que le sodium (Na^+) (Papahadjopoulos et coll., (1973)), le potassium (K^+) (Block et coll., (1975)), l'anilinonaphtalènesulfonate (ANS) (Tsong, (1975)), le glucose (Singer, (1981)), et la tempocholine (Marsh et coll., (1976)); ii) une susceptibilité anormalement élevée des lipides à la phospholipase A2 (Op den Kamp (1979)), de même qu'au venin d'abeille (Upreti et Jain, (1980)); iii) une augmentation significative de l'échange lipidique entre vésicules (Sackmann, (1983)) et iv) une incorporation maximale de certaines drogues tel que la chlorpromazine (Luxnat et Galla, (1986)).

L'étude des films monomoléculaires montre aussi que le coefficient de diffusion latérale de certains lipides saturés diminue dans la région de transition de phase liquide / solide. C'est le cas par exemple du DPPC (Teissié et coll., (1978)) et du DPPG (Theretz et coll., (1984)) dans certaines conditions ioniques de la sous-phase. L'importance de cette transition de phase provient de plusieurs observations expérimentales associées à cette transition soit i) l'activité de la phospholipase devient maximale (Op den Kamp et coll., (1974) et (1975)); ii) il y a une augmentation de la pénétration du glucagon et de la mélitine (Hendrickson et coll., (1983)) et iii) il y a une

incorporation de la chlorpromazine (Beurer et Galla, (1987)) ou du β -naphtol (Cadenhead et coll., (1977)), au maximum de leurs concentrations lorsqu'ils sont présents dans la sous-phase de films préformés de DPPC.

Les observations précédentes concernent plus précisément la fin de la transition de phase LE / LC des films monomoléculaires d'une phosphatidylcholine saturée, le DPPC. Cette molécule est caractérisée par la saturation complète de ses chaînes hydrocarbonées et la nature zwitterionique (double charge partielle : une positive et une négative) de sa région polaire. Les cholines saturées forment le groupe de phospholipides le plus répandu dans les membranes biologiques et le DPPC est le principal représentant des phospholipides complètement saturés.

Nous n'avons pas discuté jusqu'à maintenant des zones de modifications continues de la pression latérale dans les films de surface lors de la compression latérale. En effet, les lipides saturés n'offrent pas de moyen de modifier facilement leur comportement à l'intérieur d'une phase pure. On sait cependant que les lipides insaturés montrent une modification continue de la pression de surface sur toute la gamme de leur compression sans montrer de transition de phase. Dans les membranes de mammifères on retrouve fréquemment les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidylsérines (PS) et les phosphatidylcholines (PC) sous leurs formes hautement insaturées. Ces phospholipides ne montrent donc pas de transition de phase liquide / solide en monocouche mais ils sont responsables de processus membranaires importants.

Ainsi, la PS est le phospholipide anionique majeur des membranes des mammifères (McMurray, (1973)). On le retrouve en particulier dans le système nerveux périphérique et le système nerveux central, les érythrocytes et les globules blancs (White, (1973)). Aussi, on sait depuis longtemps que la PS, en présence d'ions calcium, est responsable de séparation latérale de phases (Newton et coll., (1978), et Hauser et coll., (1977)) et de la séparation latérale des phases (Ohnishi et Ito, (1974), et Van Dijk et coll., (1978)) dans les vésicules, et qu'elle augmente l'efficacité de l'aggrégation et de la fusion cellulaire. De plus, avec les ions magnésium, lithium et calcium, elle entraîne des changements structuraux des bicouches lipidiques (Hauser et Shipley, (1981)).

Par ailleurs, on a aussi montré l'importance de la phosphatidyléthanoline dans les zones de courbure des membranes. On reconnaît aussi leurs implications dans des topologies particulières de la surface membranaire (c.-à-d., phase hexagonale) (Navarro et coll., (1984)), dans le fonctionnement de certaines enzymes, dans le mouvement transmembranaire de grosses molécules, et elles ont un rôle clef dans la fusion cellulaire (Jensen et Schutxback, (1984), et Verkleij, (1984)). La PE en présence d'ions calcium (Ca^{+2}) peut modifier la résistance de la membrane (ex: neurone) (Cole, (1949)), le potentiel d'action et de repos des membranes des cellules nerveuses (Adelman et Adams, (1959), Adelman et Daltow, (1960), et Adelman et Moore (1961)) par des changements de la perméabilité aux ions K^+ , Na^+ et à l'eau (Adelman et Moore, (1961), et Lidicky et Bryant, (1963)).

Un certain nombre de propriétés structurales des bicouches

lipidiques mixtes et des monocouches sont rationalisées par un modèle dans lequel les lipides sont représentés par des structures géométriques. Ces "formes moléculaires associées" des molécules hôtes telles que décrites par Israelachvili et coll. (1980) nous permettent d'interpréter la plupart de nos observations sur les comportements structuraux et dynamiques des lipides à l'interface air / solution.

Le présent travail comporte donc deux parties. La première partie porte sur l'étude des propriétés dynamiques des lipides lors de la transition de phase liquide / solide. On étudiera en particulier la transition de phase du principal phospholipide complètement saturé des membranes de mammifères, le DPPC. La première section de cette partie concerne la nature diffusionnelle des diverses phases bidimensionnelles : LE, LC, et SC du DPPC à l'interface air / solution (chapitre III). Dans la seconde section, on tentera d'établir une définition opérationnelle de la phase LC en relation à ses propriétés diffusionnelles (chapitre IV). La dernière section de cette partie comporte une redétermination de la nature de la transformation liquide / solide du DPPC en monocouche (chapitre V).

La seconde partie de ce travail (chapitre VI) porte sur l'étude des propriétés de la dynamique latérale des phospholipides à l'intérieur d'une phase unique, la phase LE. On étudiera en particulier les propriétés diffusionnelles d'une phosphatidylcholine insaturée, et de deux types de phosphatidylsérines et de phosphatidyléthanolamines respectivement, moyennement et hautement insaturée. On entreprendra une étude du rôle de la nature du groupement polaire et du degré d'insaturation des chaînes

hydrocarbonées. L'effet de la présence des ions divalents calcium dans la sous-phase aqueuse sera aussi déterminé.

CHAPITRE II

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

2.1 La pureté des produits

Les types de produits utilisés dans ce travail sont présentés à la figure 6. Le DPPC (PC où $R = C_{16}$) et la sonde de fluorescence, le 12-9-AS proviennent de la compagnie Sigma (St-Louis, Mo). Leur pureté fut contrôlée par chromatographie sur couche mince et trouvée satisfaisante (une seule tache). Ils furent donc utilisés sans purification additionnelle. La phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine d'origine bovine furent purifiées et caractérisées par chromatographie à haute pression liquide dans le laboratoire du professeur Tancrède (Auger et coll., (1988)). Les phospholipides hydrogénés d'origine bovine (PS (H) et PE (H)) sont des lipides obtenus de la compagnie P.L. Biochemical (Milwaukee).

La PC (S.E.B.), PS (S.E.B.) et la PE (S.E.B.) furent extraites et purifiées des segments externes des bâtonnets réiniens bovins (Tancrede et

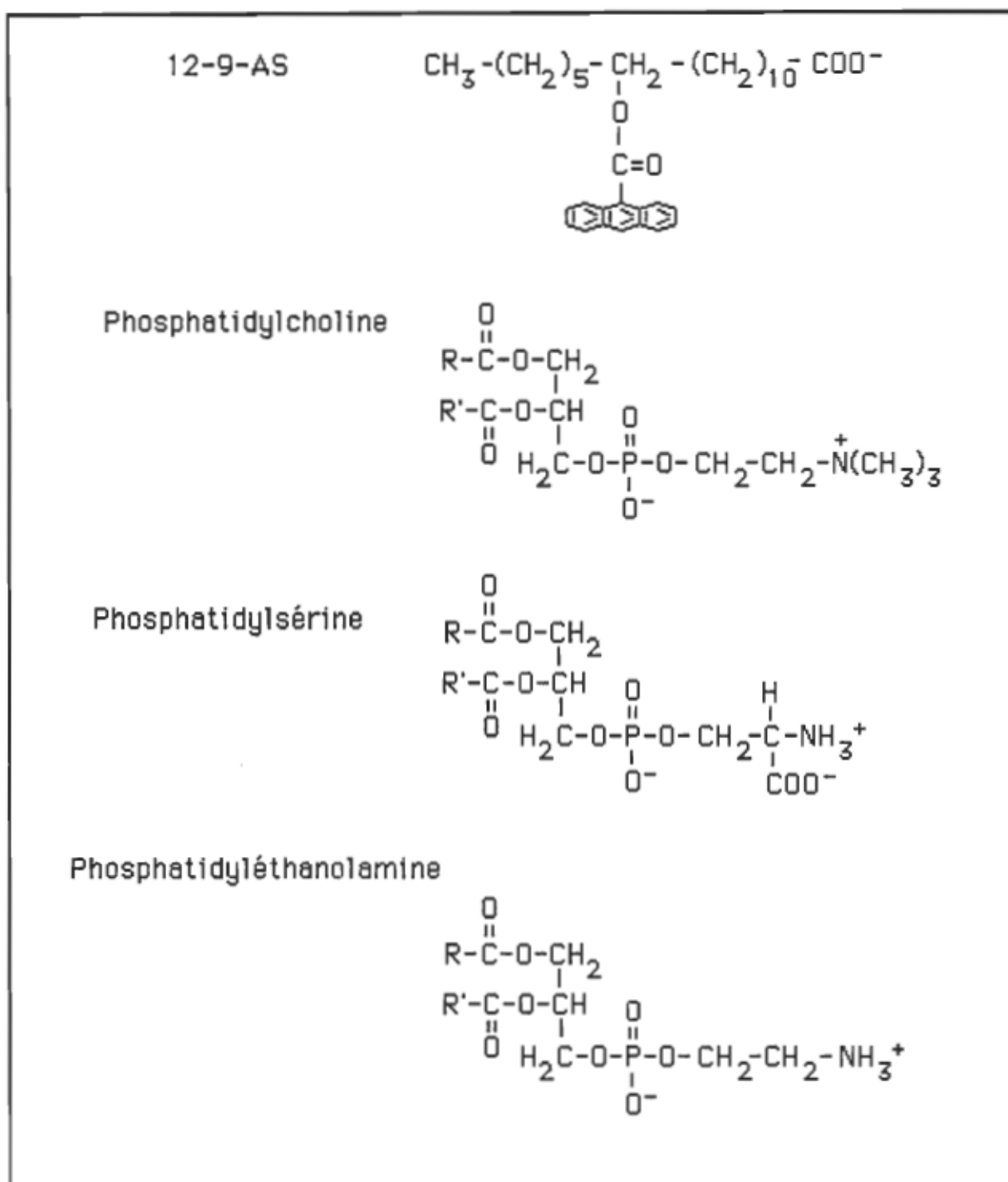


Figure 6 :

Représentation moléculaire de la sonde de fluorescence, le 12-9-AS : 12-9-anthroyloxy acide stéarique, de la phosphatidylcholine (PC), de la phosphatidyléthanolamine (PE), et de la phosphatidylsérine (PS). R et R' : chaîne aliphatiques.

coll., (1982), et Salesse et coll., (1983)). La pureté des phosphatidylsérines fut

vérifiée en chromatographie sur couche mince en utilisant le mélange de solvants suivant: $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ (25:15:4:2, v/v). Le mélange de solvants : $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v) fut utilisé pour les phosphatidyléthanamines et les phosphatidylcholines.

La PC (S.E.B.) comporte 50% de chaînes saturées (principalement le 16:0 à 30,6%) et 50% de chaînes insaturées (principalement le 22:6w3 à 35,9%) (Drenthe et coll. (1981)).

La PS (H) commerciale comporte 34,9% de chaînes saturées (principalement le 18:0 à 33,6%) et 65,1% de chaînes insaturées (principalement le 18:1w9 à 32,2%). De son côté, la PS (S.E.B.) comporte 16,8% de chaînes saturées (principalement le 18:0 à 16,6%) et 83,2% de chaînes insaturées (principalement le 22:6w3 à 48,8%). Dans l'ensemble, la PS (H) contient environ 12% de chaînes d'acides gras poly-insaturés (c.-à-d., 22:6w3, 22:4w3, etc.) alors que la PS (S.E.B.) est constituée d'environ 83% de tels acides gras poly-insaturés (Auger et coll., (1988)). Les détails de la composition en acide gras de la PS (S.E.B.) présentée ici sont compatibles avec les résultats présentés par Drenthe et coll. (1981) et Mijanich et coll. (1979).

La PE (H) commerciale comporte 48% de chaînes saturées (principalement le 18:0 à 31%) et 52% de chaînes insaturées (principalement le 18:1w9 à 28,0%). De son côté, la PE (S.E.B.) comporte 37,6% de chaînes saturées (Drenthe et coll., (1981)), principalement l'acide stéarique (18:0, 24,6%) (Robert et coll., (1983)) et 62,4% de chaînes insaturées,

principalement l'acide docosahexaénoïque (22:6w3, 45,3%) (Robert et coll., (1983)).

Tous les sels utilisés (chlorures de sodium et de calcium) sont de qualité analytique et proviennent de la compagnie Merck (Allemagne). De l'eau très pure (résistivité spécifique supérieure à 17×10^6 ohm·cm fut obtenue d'une industrie spécialisée dans la fabrication de semiconducteurs (Motorola, Toulouse, France).

2.2 Appareillage

2.2.1 La cuve de Langmuir

La cuve de Langmuir fut moulée dans le Plexiglass afin de minimiser les problèmes de diffusion de la lumière. Les dimensions de la cuve (20 mm de large, 250 mm de long et 5 mm de profondeur) furent choisies de telle sorte qu'une large gamme d'états de compression soit obtenue en comprimant la monocouche avec une barrière mobile de Teflon. Pour certaines expériences, une autre méthode de compression fut utilisée. Les isothermes de pression de surface et les mesures de fluorescence furent en effet enregistrées sur une monocouche obtenue de l'addition successive d'une certaine quantité de la solution phospholipidique à un film de surface d'aire fixe. On utilise toujours pour ces expériences la surface disponible maximale afin de s'assurer qu'aucun artéfact en provenance des bordures de la cuve ne puisse se produire. La cuve de Langmuir était équipée d'une lame de platine afin d'enregistrer la tension de surface au cours de la compression de la monocouche. Pour les expériences réalisées sur des phospholipides insaturés, la phase gazeuse au-dessus de la monocouche

était saturée d'argon pour éviter l'oxydation des liaisons insaturées des chaînes hydrocarbonées.

2.2.1.1 La pression de surface

La pression de surface provient du changement d'énergie libre de surface par unité de surface. Le travail est produit par la présence d'une couche monomoléculaire positionnée à l'interface. La pression de surface (π) à l'interface air / solution est obtenue de la différence entre les tensions superficielles de la solution (γ_o) et de la solution en présence du film (γ):

$$\pi = \gamma_o - \gamma$$

La méthode de Wilhelmy, illustrée à la figure 7 nous permet de mesurer la tension superficielle, γ et donne, par l'équation précédente, la pression de surface qu'exerce le film.

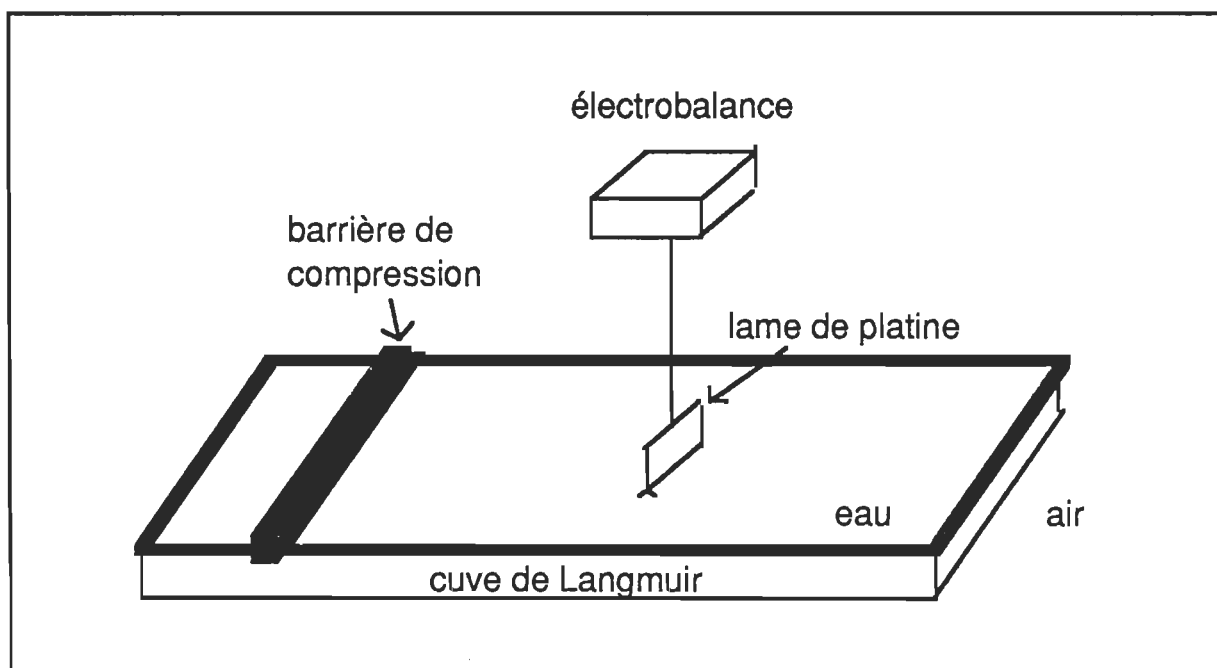


Figure 7 :
La cuve de Langmuir et la méthode de Wilhelmy

Comme on l'observe sur la figure 7, la tension de surface est mesurée avec une lame mince de platine partiellement immergée dans la solution (la sous-phase) et suspendue à une électrobalance. Un certain poids d'eau s'accroche à la lame suivant la relation suivante:

$$F = 2 \cdot l \cdot \gamma \cos \varnothing$$

où l , est la longueur de la lame (épaisseur négligeable), γ , la tension de surface liquide / air, et \varnothing , l'angle entre la direction de la force et la tangente à la surface du liquide au point d'attache de la lame.

Cette mesure de la tension superficielle ne peut être réalisée que pour une lame parfaitement mouillable, c'est à dire que \varnothing devient nul. Ceci est réalisé avec une lame dépolie et très propre. On obtient donc que:

$$F = 2 \cdot l \cdot \gamma$$

2.2.2 Le fluorimètre d'interface

Le fluorimètre d'interface (fig. 8) fut conçu et fabriqué au laboratoire du Dr J. Teissié à Toulouse (Teissié et coll., (1978) et Theretz et coll., (1984)). La figure 8 montre schématiquement le montage optique de l'appareil.

L'illumination provient d'une lampe à arc de mercure d'une puissance de 100 W (Orsam, Allemagne) et la surface illuminée est approximativement un disque circulaire de 2 mm de rayon. La fluorescence de la surface illuminée fut enregistrée pour divers états de compression de la monocouche. La direction du faisceau d'excitation et l'observation forme un angle de 45°, la direction d'observation étant perpendiculaire à la surface du

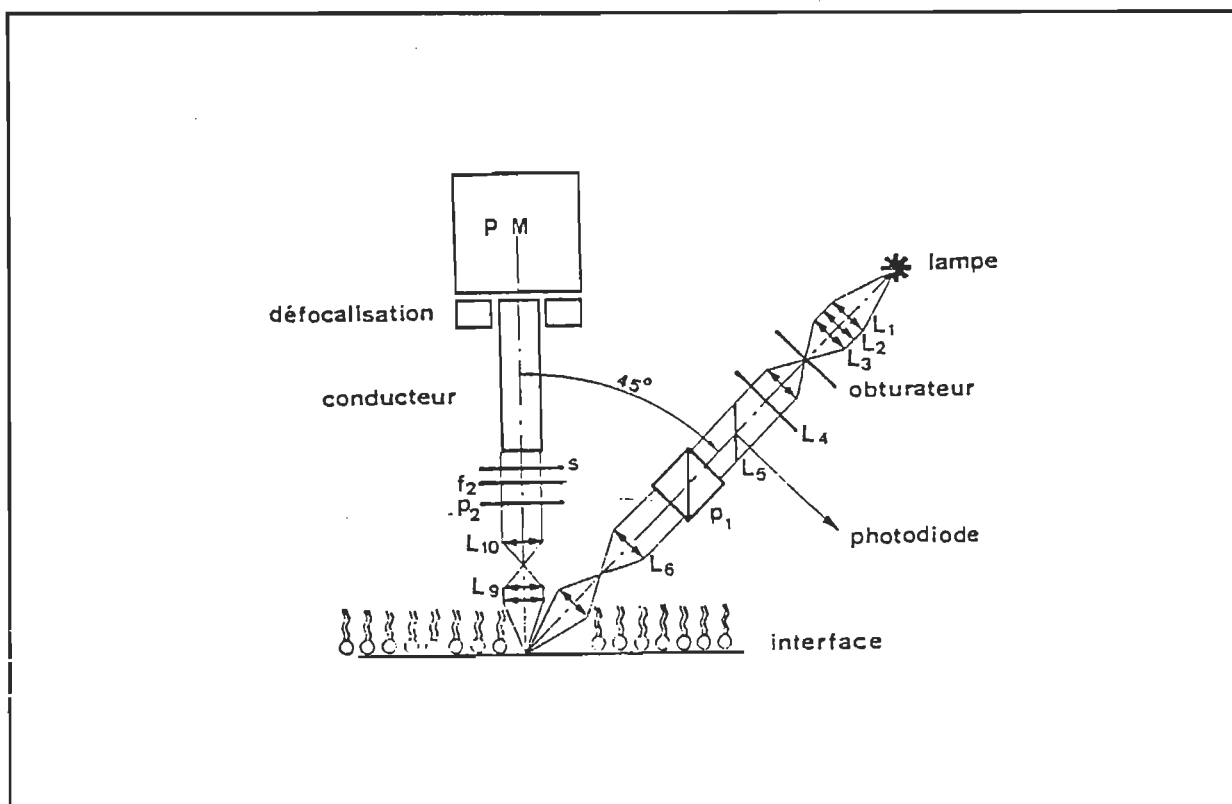


Figure 8 :

Schéma de l'optique du fluorimètre d'interface. PM : photomultiplicateur. L : lentilles. P : polariseurs. s : obturateur du photomultiplicateur, f : filtre

film. La longueur d'onde d'illumination fut sélectionnée par le moyen de filtres optiques. Lors de l'excitation, nous avons utilisé un filtre Schott UG1 (Allemagne) qui sélectionne une raie d'émission du mercure à 360 nm ; pour l'observation, on a utilisé un filtre MTO DH-525c' (France) plus un filtre à large bande, le Kodak 2E (USA), pour transmettre la lumière de longueur d'onde supérieure à 420 nm.

Pour certaines expériences, un prisme fut inséré sur le trajet d'excitation. Il fut basculé suivant 2 positions afin de déterminer le passage d'une lumière polarisée soit dans le plan de la monocouche (I_x) soit dans le plan incident (I_{yz}), (fig. 9).

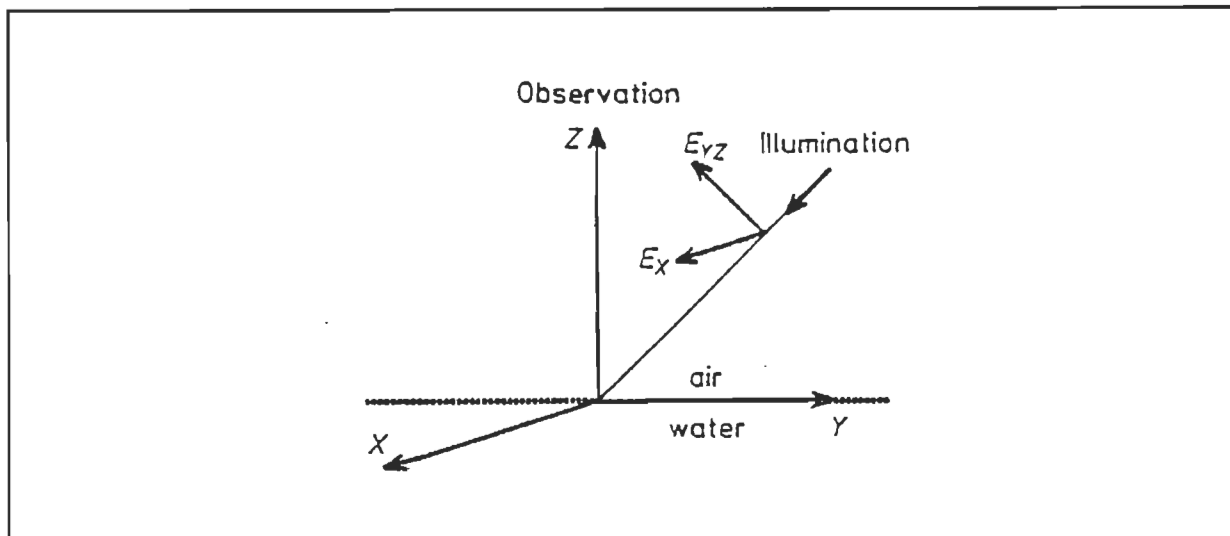


Figure 9 :

Schéma de la disposition géométrique des vecteurs électriques (E) de la lumière incidente lors de l'insertion du prisme optique. Les intensités de fluorescence I_x et I_{yz} décrites dans le texte furent observées lorsque le vecteur électrique de la lumière incidente était parallèle à E_x et à E_{yz} respectivement (tirée de Teissié, (1979))

L'intensité de l'émission de fluorescence fut détectée par un photomultiplicateur de haute sensibilité (EMI 9558, Angleterre) relié à une unité d'acquisition de données. Les résultats furent tracés sur un enregistreur ou transférés à un micro-ordinateur (Ohio Challenger, USA) via un convertisseur analogique / numérique. Le traitement des données de photoaveuglement (voir section suivante) fut opéré directement lors de l'acquisition des mesures, en utilisant une approche mathématique spécifique à une illumination en forme de disque et d'intensité uniforme (Teissié et coll., (1978)). De plus, dans le but d'améliorer la justesse de ce traitement, une analyse statistique des données expérimentales fut réalisée pour prendre en compte la relation non linéaire entre la période de recouvrement et la durée de la prise des données de recouvrement de la fluorescence.

Au cours des expériences, D_{lat} fut déterminée à partir de cinq mesures successives de recouvrement de fluorescence pour chacune des pressions de surface étudiées (typiquement 5, 15, 25, et 35 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ pour les lipides insaturés). Aussi, la période maximale allouée pour réaliser une expérience de recouvrement fut fixée à 15 minutes dans le but d'éviter des problèmes, tels que, l'évaporation de la sous-phase. Ainsi, prenant en considération les recouvrements enregistrés et la dimension de la surface illuminée, le fluorimètre de surface peut détecter avec précision des valeurs de D_{lat} plus élevées que $10^{-8} \text{ cm}^2\cdot\text{sec}^{-1}$.

2.3 Description d'une expérience de recouvrement de fluorescence après photoaveuglement

Typiquement, une expérience de photoaveuglement est réalisée de la façon suivante. Le signal de bruit de fond, dû à la diffusion de lumière par la sous-phase (lipides saturés : NaCl 0,1 M et 1,0 M; lipides insaturés : NaCl 0,1 M avec cations divalents (CaCl_2 à 10 mM)), fut électroniquement ajusté à une fluorescence de zéro. Un mélange de la sonde et des molécules d'un lipide (2% mole/mole en sonde) est dissous dans le mélange chloroforme:méthanol (5:1) (lipides saturés) ou dans l'hexane:éthanol (9:1) (lipides insaturés), puis déposé à la surface de la solution aqueuse. Ceci est réalisé dans l'obscurité afin d'éviter la photodimérisation des molécules de sonde. Après quelques minutes (environ 10 min) nécessaires à l'évaporation du solvant, le film est comprimé à une pression de surface donnée par l'une des deux méthodes de compression déjà décrites. Le film est conservé à cette pression de surface pour une période de 5 min nécessaire à l'équilibration. L'obturateur devant le trajet optique d'excitation est ensuite retiré et la réaction de dimérisation

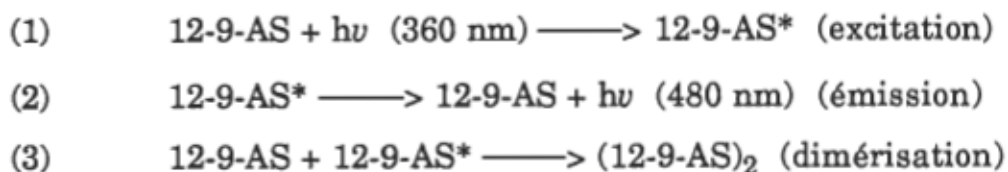
de la sonde est suivie par la réduction de l'intensité d'émission de fluorescence qui se produit en présence de la lumière incidente naturelle ou linéairement polarisée.

Pour certaines expériences, on illumine pendant 15 s en lumière polarisée puis on poursuit immédiatement d'une seconde période d'illumination de 15 s en lumière polarisée perpendiculairement à la première. Aucune mesure du signal de recouvrement n'a été réalisée lors de ces mesures. Dans les autres expériences, on utilise une lumière naturelle. Une période de 30 s de photoaveuglement est alors allouée avant que l'obturateur soit remplacé dans le trajet d'excitation. Pour ces expériences en lumière naturelle, dans une seconde étape, le signal de recouvrement est ensuite détecté en enregistrant l'intensité d'émission de fluorescence obtenue par une illumination brève (1 s) de la monocouche. Cette procédure se répète cinq fois à des intervalles fixes après le photoaveuglement. La valeur de D_{lat} est calculée à partir de ces cinq mesures de recouvrement de fluorescence. Le film est ensuite comprimé à un nouvel état de compression et une nouvelle expérience de photoaveuglement est réalisée.

2.4 Propriétés de fluorescence de la sonde

La molécule fluorescente que nous utilisons perd ses propriétés d'émission de fluorescence suite à une réaction secondaire de dimérisation qui est photoinduite (photodimérisation). En effet, en présence de lumière, le dérivé anthracénique que nous utilisons, le 12-9-AS, produit une réaction de dimérisation par la formation de liaisons de covalence entre les deux noyaux anthracéniques dont l'un est excité. Ceci conduit à la perte de la

conjugaison des liaisons doubles et donc à la formation d'un dimère non fluorescent. Les réactions d'excitation (1), d'émission (2) et de dimérisation (3) de cette sonde de fluorescence sont les suivantes:



où 12-9-AS est le monomère de la sonde, 12-9-AS* le monomère à l'état excité et (12-9-AS)₂ est le dimère de sonde qui n'est pas fluorescent.

2.5 Les mesures de photoaveuglement et de recouvrement de fluorescence

Les étapes de photoaveuglement et de recouvrement de fluorescence sont schématiquement présentées à la figure 10. Lors de la première étape d'une expérience de F.R.A.P., une petite région (zone d'illumination, fig. 10 a) de la monocouche est exposée quelques secondes (20 s) à un rayon lumineux excitateur, c'est le photoaveuglement. Durant cette étape, la sonde est dimérisée (petits triangles, figure 10 a) dans la zone éclairée du film monomoléculaire à l'interface (éq. 3). L'intensité de fluorescence (I_{flu0}) diminue par suite de la formation du photodimère non fluorescent (fig. 10 b). A la fin de cette période l'intensité de fluorescence (I_{flu0}) atteint la valeur I_1 . Cette étape nous permet de déterminer les deux paramètres suivants: i) la constante de dimérisation de la sonde (K_d) et ii) l'intensité de fluorescence initiale de la sonde dans le film phospholipidique (I_f). Après cette première étape de photodimérisation des sondes du film, la monocouche est mise à l'obscurité.

lipidique à cinq brèves périodes d'illumination : c'est l'étape de recouvrement de fluorescence (fig. 10 a). Un certain retour de la fluorescence est observé ($I(t)$, fig. 10 b), lié à la diffusion latérale des molécules de sonde. Cette diffusion des sondes est elle-même conditionnée par la diffusion latérale des molécules de lipide constituant la couche monomoléculaire.

2.5.1 Le photoaveuglement

2.5.1.1 L'intensité de fluorescence de la sonde

Puisque la concentration des molécules de sondes augmente quand on comprime la monocouche, l'intensité de fluorescence est exprimée par un terme de "fluorescence réduite" (I_f), proportionnelle au rendement quantique du chromophore. Ce paramètre est calculé dès le début de la phase de photoaveuglement des expériences de F.R.A.P. Il est le produit de l'intensité de fluorescence, observée au début de la période de photoaveuglement, par l'aire moléculaire de la matrice lipidique (pour un rapport sonde / lipide donné) (Teissié et coll., (1978), et Theretz et coll., (1984)).

I_f étant proportionnelle au rendement quantique du chromophore, elle reflète la nature de l'environnement immédiat du chromophore (effet Franck-Condon). Dans l'analyse de nos résultats expérimentaux, nous tiendrons compte de ce paramètre important pour connaître directement la nature de l'environnement moléculaire des sondes, en particulier l'hydrophobicité (ou la structuration de la région hydrophobe) du milieu dans la région du douzième carbone et la contrainte de la cage de "solvant".

L'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la concentration superficielle de sondes libres :

$$(4) \quad I_{\text{fluo}} = h [12-9\text{-AS}]$$

où $[12-9\text{-AS}]$, est la concentration superficielle de sondes libres et h , une constante qui dépend de l'environnement de la sonde et de la géométrie de l'appareil. Cette constante est simplement déterminée à partir de l'extrapolation, à temps de photodimérisation de zéro, de l'intensité de fluorescence.

2.5.1.2 La dimérisation de la sonde

La réaction de dimérisation qu'effectue le 12-9-AS durant la période d'illumination apporte aussi des informations importantes concernant l'assemblage de la monocouche. Le processus de dimérisation est du second ordre pour la sonde. Puisque le dimère n'est pas fluorescent, le signal de fluorescence mesuré en provenance de la surface éclairée est alors relié à la concentration du monomère sur cette surface.

Il est donc possible de suivre le degré de réaction de dimérisation à partir de la décroissance de l'émission de la fluorescence enregistrée durant la période d'aveuglement (étape 1, fig. 10 b). En fait, la constante de vitesse de la réaction de dimérisation (K_d) est obtenue par le graphe de la réciproque de l'intensité de fluorescence en fonction du temps d'illumination (Theretz et coll., (1984)). La figure 11 montre le tracé de ce graphe nécessaire à l'obtention de la valeur de K_d .

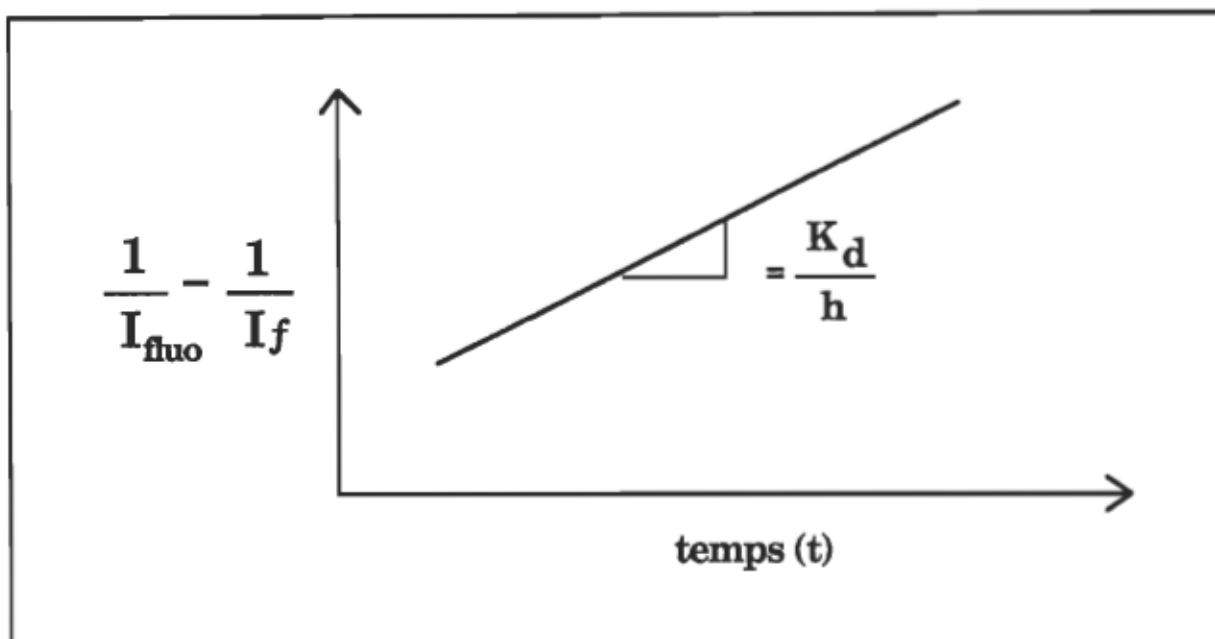


Figure 11 :

Détermination de la constante de vitesse de la réaction de dimérisation (K_d) par le graphe de la réciproque de l'intensité de fluorescence en fonction du temps de photodimérisation

En fait, la valeur de K_d est calculée dès les premières étapes des expériences de F.R.A.P. et, dans des expériences contrôles régulières, on voit à ce qu'il n'y ait aucune déviation de la linéarité (Teissié et coll., (1978)). K_d est un paramètre qui permet de connaître le comportement de la sonde dans le lipide hôte.

Ainsi, on a que sous l'illumination, la concentration de monomères de la sonde diminue suite à la photodimérisation en suivant une réaction du deuxième ordre, soit:

$$(5) \quad d[12-9-AS] / dt = -K_d [12-9-AS]^2$$

on obtient des équations 4 et 5 que:

$$(6) \quad 1 / I_{\text{fluo}} - 1 / I_f = (K_d / h) \cdot t$$

où K_d est la constante de dimérisation

L'efficacité d'absorption de lumière par les monomères incorporés dans un système structuré, tel que les monocouches, est liée à l'orientation relative du moment de transition du chromophore et du vecteur électrique de la lumière excitatrice (voir fig. 9). Ainsi, les changements d'orientation des chromophores furent aussi obtenus par la dimérisation de la sonde sous lumière incidente polarisée et en enregistrant le rapport K_{dx} / K_{dyz} , où K_{dx} est la constante de dimérisation mesurée lorsque le champ électrique de la lumière incidente est parallèle au plan de l'interface, alors que K_{dyz} est la constante de dimérisation obtenue quand le champ électrique de la lumière est perpendiculaire au plan de la monocouche (fig. 9). On peut aussi évaluer les changements d'orientation des sondes de fluorescence à partir des rapports des intensités de fluorescence réduite, I_{fx} / I_{fyz} mais la méthode de photodimérisation est plus performante que la méthode d'intensité conventionnelle (Theretz et coll., (1984)), cette dernière étant affectée par la période de la photoréaction.

2.5.1.3 Composantes de la constante de dimérisation

La constante de dimérisation expérimentale, K_d est elle-même le produit de deux contributions, soit une contribution spectroscopique, $K_{d\emptyset}$ reliée à l'intensité de fluorescence réduite, I_f , et une contribution structurale, K_{ds} , qui reflète l'influence de l'organisation des molécules de sonde dans leur milieu et la dynamique de l'environnement lipidique (Theretz et coll. (1984)). K_{ds} est obtenue par le rapport K_d / I_f . Plus spécifiquement, K_{ds} est liée à l'ajustement des anneaux anthroxyloxy en

position réactionnelle au niveau des carbones 12 des deux monomères en présence (fig. 12). Il dérive de la mise en place d'une configuration adéquate des anneaux anthroyloxy, ou d'une flexibilité qui puisse permettre l'existence suffisamment fréquente de cette configuration pour permettre à la réaction 9-9' et 10-10' de se produire entre les unités du dimère en formation (Teissié et coll., (1978)). La figure 12 illustre cette formation d'un dimère par les sondes.

2.5.2 Le recouvrement de fluorescence

Après l'illumination de l'étape d'aveuglement, la concentration locale du monomère dans la région de surface préalablement illuminée est plus basse que dans la région périphérique restée dans l'obscurité. Un gradient de concentration est alors présent entre les deux zones et il détermine le 'remplissage' de la zone aveuglée par des monomères fluorescents provenant de la périphérie (fig. 10 a). La taille de la région périphérique est beaucoup plus importante que celle de la zone éclairée, elle sert donc de réservoir de molécules de sonde pour la région aveuglée. La vitesse de recouvrement de fluorescence est donc une fonction directe du coefficient de diffusion latérale, D_{lat} , de la sonde (Teissié et coll., (1978), et Theretz et coll., (1984)). Les expériences de recouvrement de fluorescence après photoaveuglement furent ensuite réalisées. La formulation mathématique de l'analyse phénoménologique de la phase de retour de fluorescence du F.R.A.P. a été élaborée par plusieurs auteurs dont Axelrod et ses collaborateurs (1976). Les arguments théoriques derrière l'analyse des résultats expérimentaux présentés ici ont été décrits plus en détail dans les articles de Teissié et Toccane (Teissié et coll., (1978), et Theretz et coll.,

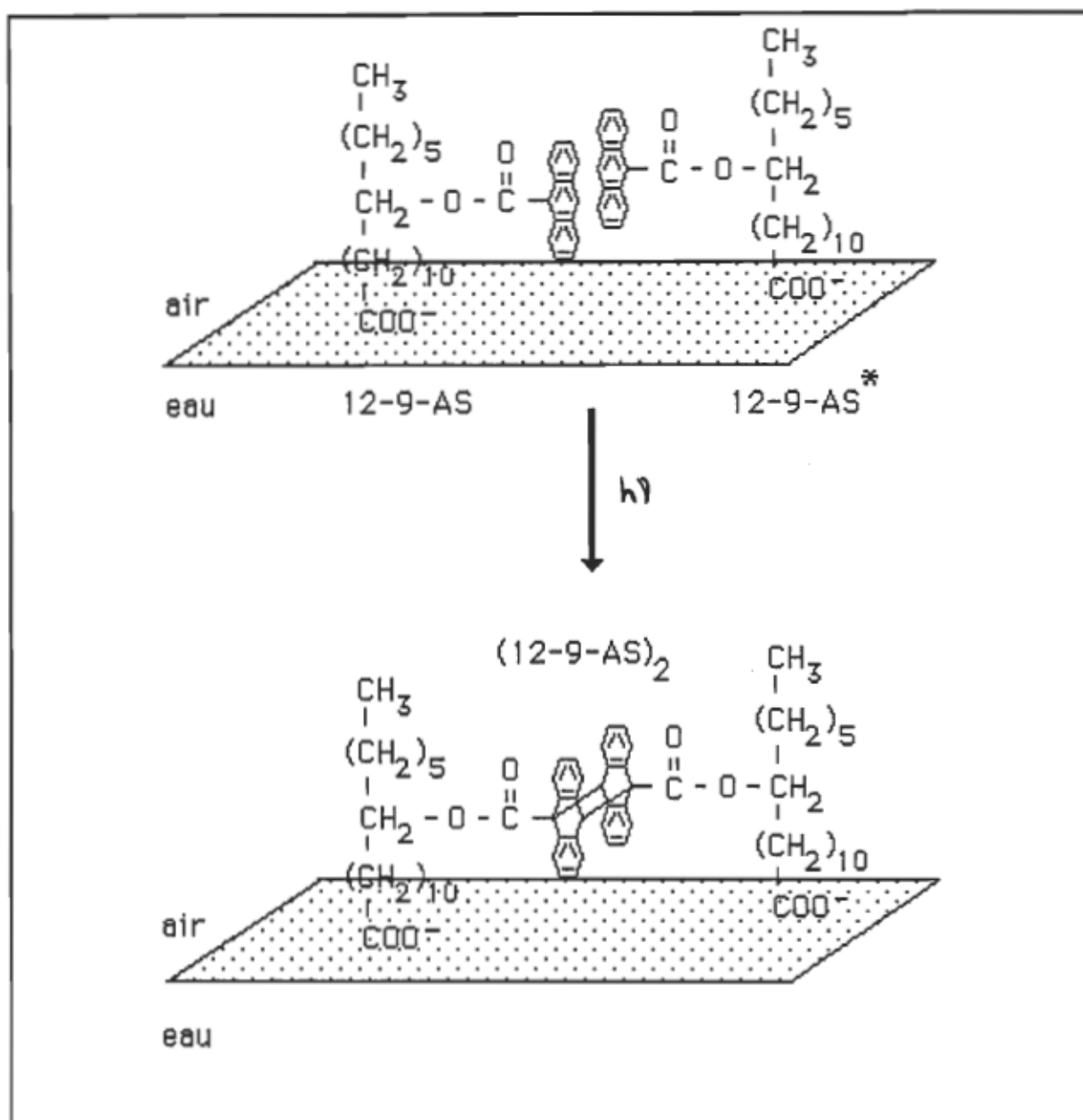


Figure 12 :
Représentation moléculaire de la formation du dimère de la sonde de fluorescence

(1984)). Pour ces laboratoires, une comparaison détaillée des conditions aux frontières de la zone éclairée et des solutions en série du retour de fluorescence est présentée dans Lopez et coll. (1988).

2.5.2.1 Détermination du coefficient de diffusion latérale

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer les mécanismes moléculaires responsables du déplacement du lipide dans une bicouche ou dans une monocouche lors de sa diffusion latérale. Il faut bien distinguer les équations phénoménologiques (ou formelles) qui décrivent de façon géométrique les phénomènes naturels (par des coefficients ou des fonctions), et les modèles explicatifs (basés sur la structure physique et / ou cinétique) qui réfèrent à la nature intime des phénomènes. Dans les équations phénoménologiques, le sens physique de certaines de ces équations est bien compris et la valeur du coefficient peut être déduite à partir de concepts familiers dans d'autres secteurs de la physique. Pour d'autres équations (telles que celles qui nous préoccupent), une représentation satisfaisante du phénomène décrit reste à trouver et, ainsi, les coefficients ne sont seulement que des constantes (ou des fonctions dans certains cas) déterminées empiriquement.

La formulation d'une équation formelle est la première étape essentielle pour apporter une description physique quantitative, peu importe si le sens du coefficient est compris ou non, car les équations formelles sont utilisées dans les calculs pour lesquels les relations entre les diverses quantités sont déterminées et les événements physiques prévus. Une équation très générale de la sorte peut servir de point de départ pour la description de plusieurs processus de transport. Elle fut dérivée par Teorell (1956):

$$\text{Flux} = \text{Mobilité} \times \text{Concentration} \times \text{Force motrice}$$

ou, de façon équivalente :

$$J = \mu \cdot C \cdot F_m$$

où le flux est le nombre de composantes par unité de temps qui traversent une unité d'aire perpendiculaire à la direction du transport. Cette équation assumera une forme spécifique qui décrit différents types de transport, suivant le type de force motrice (agissant sur une mole de substance) qui va être substituée dans l'équation. Cette démonstration est présentée dans le livre de Kotyk et Janacek (1975). On y démontre ainsi l'équation qui donne la variation de la concentration à travers un espace en fonction du temps (seconde loi de Fick) :

$$\partial C / \partial t = D_{lat} \cdot \nabla \cdot C$$

où D_{lat} est le coefficient de diffusion latérale, ∇ est l'opérateur Laplacien, C la concentration et D , le coefficient de diffusion.

Dans le cas de phénomènes diffusionnels dans les monocouches, la cinétique de retour de fluorescence obéit à la deuxième loi de Fick appliquée à un espace à deux dimensions. Compte tenu de la géométrie de l'appareil, cette équation est exprimée en coordonnées cylindriques (r, \varnothing, z) :

$$\partial C / \partial t = D_{lat} \left(\partial^2 C / \partial r^2 + (1/r) (\partial C / \partial r) \right)$$

où $C = C(r, t)$ est la concentration des molécules de marqueur à une distance r du centre de la tache illuminée et à un instant t . La résolution de cette équation, dans le cas où la concentration de sonde est uniforme dans la zone qui sera éclairée nous conduit à l'expression suivante :

$$[I_1 - I(t)] / [I_f - I_1] = 4 \sum_{n=1}^{\infty} \left[e^{(-\alpha_n^2 D_{lat} / r^2 t)} \right] / \alpha_n^{-2}$$

où I_f est l'intensité (initiale) de fluorescence au début de la phase de dimérisation, I_1 est l'intensité de fluorescence à la fin de la période de

dimérisation, $I(t)$ est l'intensité de fluorescence après t seconde d'obscurité, τ est le temps de recouvrement de la fluorescence, et " $\propto n$ " est la racine des fonctions de Bessel de première espèce d'ordre 0. Les coefficients de diffusion latérale sont obtenus par résolution graphique de cette équation après une extension jusqu'à $n=7$. Le paramètre suivant, D_{lat} , provient du transport latéral des lipides à la surface. Il a été traité théoriquement de plusieurs façons (Cohen et Turnbull, (1959), Galla et coll., (1979), et Vaz et coll., (1985)). On n'a pas encore aujourd'hui un modèle unique capable de décrire correctement toutes les gammes des processus de diffusion. La difficulté associée aux modèles courants est soit qu'ils sont basés sur des paramètres phénoménologiques ou qu'ils contiennent des quantités expérimentales inaccessibles (Clegg et Vaz, (1985)).

2.6 Résumé des paramètres

En résumé, les investigations de fluorescence concernent i) l'intensité de fluorescence réduite, I_f ; ii) la constante de vitesse de la réaction de dimérisation, K_d et sa partie structurale, K_{ds} ; et iii) le coefficient de diffusion latéral, D_{lat} . On présente aussi une investigation expérimentale avec des faisceaux de lumière incidente polarisée perpendiculairement qui détermine le rapport des intensités de fluorescence, I_{fx} / I_{fyz} et le rapport des constantes de dimérisation K_{dx} / K_{dyz} . La variation de ces quantités est rationalisée par le biais des modifications de la structure et de la dynamique de la monocouche hôte durant la compression.

CHAPITRE III

LA DIFFUSION LATÉRALE DU DPPC EN MONOCOUCHE

3.1 Introduction

Des études de la dynamique latérale du DPPC en monocouche ont été réalisées par le Dr J. Teissié (Teissié et coll., (1978)). Elles ont montré i) une chute abrupte du coefficient de diffusion latérale à la fin de la région de transition liquide / solide, et ii) que les coefficients de diffusion des films monomoléculaires à l'interface air / solution étaient, avant et après la transition de phase liquide / solide, d'au moins deux ordres de grandeur plus importants que ceux obtenus dans les systèmes de multibicouches (liposomes) (Fahey et Webb, (1978)) montrant ainsi l'effet de frottement résultant des monocouches en interaction à l'intérieur de chacune des bicouches.

Toutefois, des travaux récents réalisés sur une monocouche de ce lipide déposée sur une lamelle de verre silanisée (Von Tschärner et

McConnell, (1981a et b)) ou déposée à l'interface air / eau (Peters et Beck, (1983), et Beck et Peters, (1982)) ont ébranlé ces conclusions. Dans ces expériences, l'illumination de la monocouche fut réalisée à travers les lentilles d'un microscope de fluorescence. Von Tscharner et McConnell, (1981a) rapportent qu'ils ne peuvent mesurer précisément la diffusion latérale des films lipidiques directement à l'interface air / eau, suite à certains problèmes spécifiquement reliés à leur montage expérimental (c.-à-d., oscillations de faibles amplitudes de leur microscope entraînant la convection de leur monocouche). Les coefficients de diffusion furent donc mesurés sur des films de DPPC adsorbés, à diverses pressions de surface, sur des lamelles de verre silanisées. Leurs données diffusionnelles pour de telles monocouches sont similaires à ce qu'on trouve pour des liposomes de DPPC. Aussi, puisque les frange de fluorescence des monocouches à l'interface air / eau est qualitativement le même que celui des films adsorbés sur les lamelles silanisées, ils infèrent que les deux types de monocouches sont identiques et qu'ils ont donc les mêmes propriétés dynamiques.

De leur côté, dans le but d'éviter les processus de convection apparemment présents à l'interface air / eau, Peters et Beck (1983) ,et Beck et Peters, (1982) ont pris une autre voie. Ils ont réduit à 3 mm de diamètre la dimension de leur monocouche dans la région d'illumination. La monocouche est aussi protégée des effets résultant de l'évaporation du coeur de phase ainsi que des courants aériens par une lamelle de verre silanisée qui couvre la région d'étude à moins de 1 mm au-dessus de la surface. Avec cette technologie, ils obtinrent un coefficient de diffusion similaire à ce qui est observé dans les systèmes multibilipidiques, c.-à-d., environ deux ordres

de grandeurs inférieurs à ce qui fut obtenu par Tessié et coll. (1978). Cependant, ils purent reproduire la réduction abrupte du coefficient de diffusion latérale observée à la fin de la transition de phase liquide / solide des monocouches de DPPC (Teissié et coll., (1978)).

Cette divergence a stimulé la reprise des mesures du coefficient de diffusion des monocouches de DPPC à l'interface air / eau. La transition de phase du DPPC fut donc analysée par la technique de F.R.A.P. présentée au chapitre précédent. Les résultats montrent essentiellement une réaffirmation des premières conclusions (Teissié et coll., (1978)) soit: i) que la diffusion latérale des lipides à l'interface air / solution est un phénomène plus rapide que dans les bicouches lipidiques, et ii) que les lipides montrent un changement soudain de leur dynamique à la fin de la transition de phase liquide / solide.

3.2 L'isotherme de pression de surface

L'enregistrement de l'isotherme de pression de surface du DPPC comportant 2% (molaire) de 12-9-AS est présenté à la figure 13. Cette isotherme est identique à celle qui est enregistrée à partir d'un film monomoléculaire de DPPC pur, ce qui indique que la faible concentration de sondes utilisée ne perturbe pas le comportement des films de DPPC à l'interface air / NaCl 0,1 M. En effet, l'isotherme de pression de surface du DPPC en présence de la sonde présente les caractéristiques connues des films purs de DPPC qu'on trouve dans la littérature (Phillips et Chapman, (1968); Albrecht et coll., (1978); Rice et coll., (1987); Hui et coll., (1975); Von Tschärner et McConnell, (1981a); Cadenhead et coll., (1980), et Lösche et

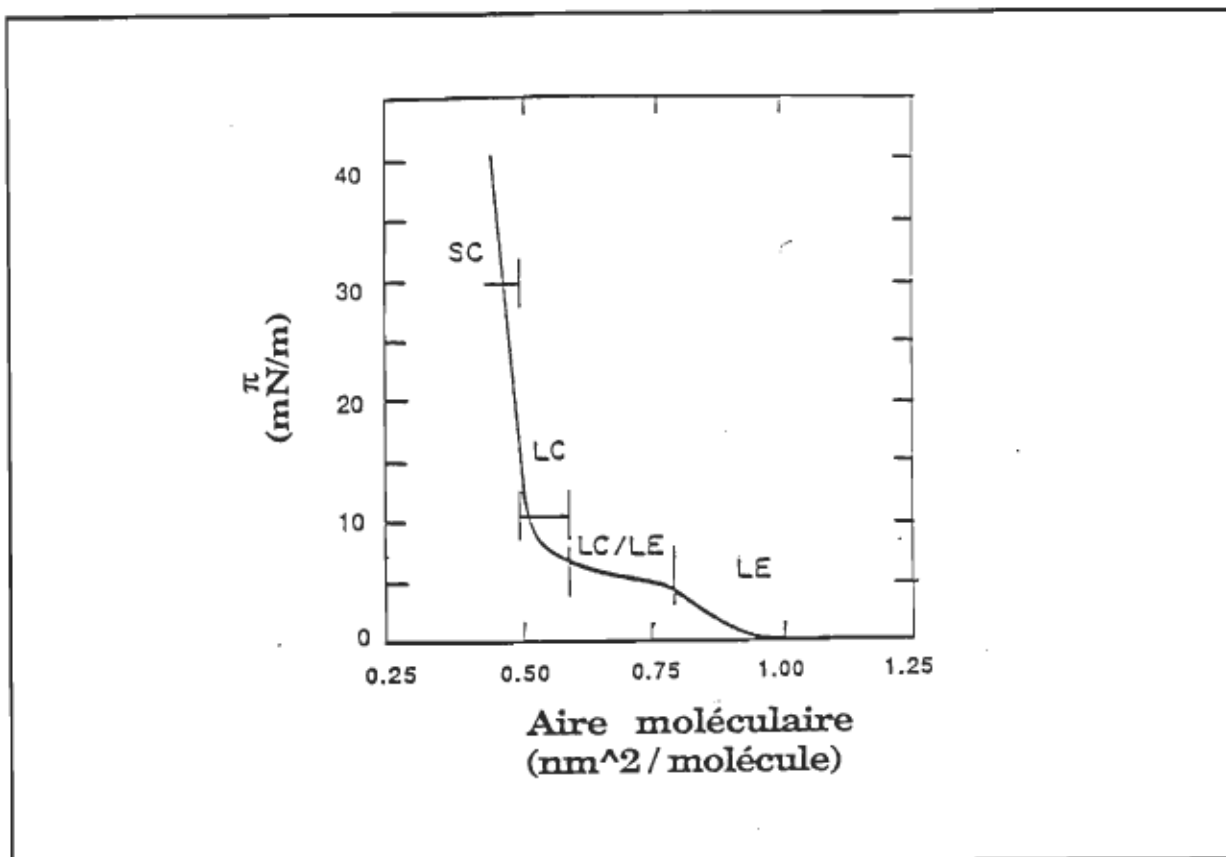


Figure 13 :

Isotherme de compression d'une monocouche de DPPC à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ en présence de 2% (mole/mole) de 12-9-AS. La sous-phase est une solution de NaCl 0,1 M. LE: état liquide-expansé, LC: état liquide-condensé, SC: état solide-condensé

Möhwald, (1984)), c'est-à-dire (terminologie de Adam, (1968)), une région liquide-expansé (LE) aux grandes aires moléculaires ($> 0,75 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$), un plateau de transition représentant un équilibre entre les états liquide-expansé (LE) et liquide-condensé (LC), une région LC à la fin de ce plateau de transition, correspondant au début de la courbure de l'isotherme à la fin de la région de transition LE / LC, et une région solide-condensé (SC) aux pressions de surface élevées ($> 15 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$). Cette absence de perturbation de la sonde sur le comportement tensioactif des films réalisés avec le mélange DPPC:12-9-AS est appuyée par les résultats de Kellner (1977) qui a montré

que l'isotherme de compression du DPPC n'est pas affectée par la présence de la sonde, du moins aux faibles concentrations utilisées au cours de nos expériences. Cependant, l'isotherme de compression était effectivement altérée lorsque la concentration relative de 12-9-AS était beaucoup plus élevée que la concentration utilisée dans le présent travail (c.-à-d., 0,5 à 2%).

3.3 Les propriétés de fluorescence

3.3.1 L'intensité de fluorescence réduite

Les propriétés de fluorescence du 12-9-AS dans ce film monomoléculaire de DPPC furent étudiées en traçant l'intensité de fluorescence réduite, I_f , en fonction du degré de compression de la matrice du lipide hôte. Tel que mentionné au chapitre II (méthodes expérimentales), I_f est l'intensité de fluorescence réduite mesurée au début de la photodimérisation. Elle représente donc le comportement des molécules individuelles de sonde (monomères) dans leur environnement lipidique. Les résultats sont présentés à la figure 14.

On observe que I_f varie légèrement suivant la compression du lipide: une légère réduction de I_f est observée durant la transition LE / LC, tandis que I_f augmente légèrement à la fin de l'état LC. Bien que la dimension de ces changements soit petite, ils sont systématiquement reproduits lorsque les expériences sont répétées.

Il peut paraître étrange que I_f varie si faiblement en fonction de l'état du film lipidique. Puisque l'environnement autour de la sonde est connu pour altérer grandement son rendement quantique, on pourrait

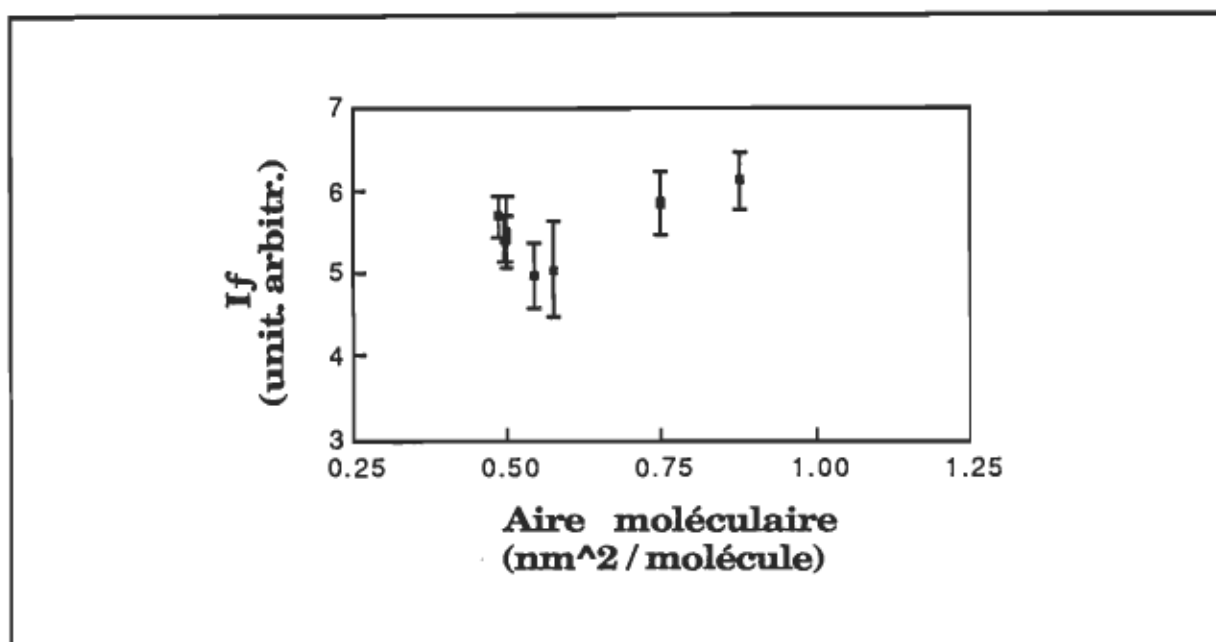


Figure 14 :

L'intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS (unités arbitraires) tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, le DPPC. Le rapport sonde / lipide est de 2%

s'attendre, sur la base de l'effet Franck-Condon, à ce que I_f soit fortement sensible à l'état physique des lipides hôtes. Les légers changements de I_f observés expérimentalement indiquent donc que l'environnement moléculaire de la sonde ne semble pas changer beaucoup durant la compression du film de DPPC et les transitions de phases qui en résultent. Ceci peut donc impliquer que les sondes sont associées en microdomaines dans le film monomoléculaire, la grandeur minimale de ce microdomaine étant d'au moins deux molécules du dérivé du groupement anthroyloxy. Cette situation suppose que l'unité diffusante dans l'expérience de recouvrement de fluorescence n'est pas le monomère mais le microdomaine lui-même. Cependant, l'impact de ce comportement est mineur pour l'étude de la dynamique qui est présentée plus loin, puisqu'il a été montré que les coefficients de diffusion latérale qui sont calculés et observés

expérimentalement sont indépendants de la dimension de l'unité diffusante (Clegg et Vaz, (1985)).

3.3.2 La constante de dimérisation

La présence de tels microdomaines peut aussi être inférée à partir des études de la constante de vitesse, K_d , de la réaction de dimérisation de la sonde. Comme il est décrit au chapitre des méthodes expérimentales, la constante de vitesse est obtenue de la décroissance de l'intensité d'émission de fluorescence enregistrée lors des premières étapes des réactions se produisant lors de l'illumination du milieu. Les résultats sont présentés à la figure 15, qui montre les valeurs expérimentales de K_d tracées en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. On observe que K_d diminue légèrement durant la transition LE / LC mais il augmente abruptement dans la région LC pour atteindre un maximum dans l'état SC de la matrice lipidique.

Ce comportement de K_d est rationalisé si on se rappelle que la réaction de dimérisation impliquant la sonde dépend d'un terme dynamique (c.-à-d., les molécules en monomère doivent diffuser pour réagir et former un dimère) et un terme spectroscopique (c.-à-d., la réaction de dimérisation est suivie par l'enregistrement de la décroissance de fluorescence) (Theretz et coll., (1984), et chapitre II, fig. 11). Le terme dynamique affectera la réaction uniquement si les molécules qui réagissent sont dispersées de façon homogène dans le milieu, c.-à-d., la monocouche lipidique dans nos expériences. A la lumière du comportement de I_f , on a montré précédemment que ce n'est pas le cas ici. Cependant, puisque la réaction impliquant la molécule de sonde résulte de la formation d'un dimère sous

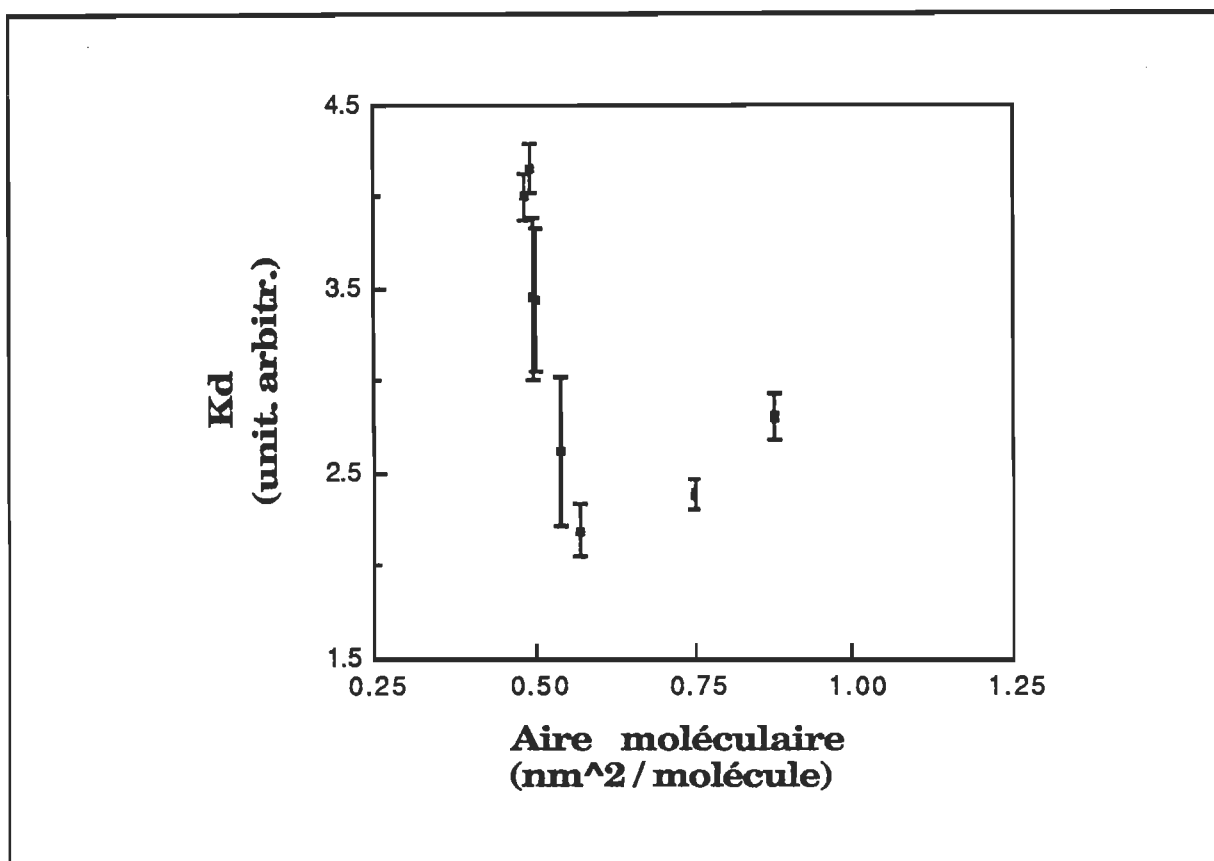


Figure 15 :

La constante de vitesse de dimérisation de la photoréaction de la sonde tracée en fonction de l'aire moléculaire du DPPC

l'influence de la lumière, il s'en suit que la réaction de dimérisation est nécessairement sous le contrôle de l'organisation structurale du système lipide / sonde : les plans des deux molécules d'anthracène doivent en effet être parallèles pour établir la formation des ponts 9-9' et 10-10' des molécules de sondes adjacentes lors de la formation des dimères (chapitre II, fig. 12, Teissié et coll., (1978), et Theretz et coll., (1984)). Les comportements des vitesses de dimérisation (K_d) et des coefficients de diffusion latérale (D_{lat}) suivant le degré de compression latérale n'ont aucune relation directe contrairement à ce que prévoient les lois chimiques des réactions de dimérisation en milieu homogène (Theretz et coll., (1984)). Cette observation

implique directement que les molécules de sonde n'ont pas à diffuser pour réagir ; elles interagissent donc déjà dans des microdomaines préexistants. L'analyse de K_d appuie ainsi la conclusion obtenue lors de l'analyse du comportement de I_f .

Le comportement de K_d en fonction de l'aire moléculaire du DPPC tel qu'on l'observe à la figure 15 permet aussi une description plus détaillée des microdomaines des dérivés des groupements anthroyloxy. Il est clair, à partir de la figure 15, que les microdomaines sont sensibles à l'état lipidique de leur environnement, K_d étant modulé par le degré de compression de la monocouche. En effet, la valeur de K_d , beaucoup plus élevée dans la partie SC de l'isotherme suggère que dans cet état, les anneaux anthroyl des molécules de 12-9-AS adjacentes ont une configuration qui leur permet de dimériser avec une plus grande efficacité. Dans cette configuration, induite par la rigidité de l'environnement lipidique autour des molécules de sonde, les anneaux anthroyl doivent être à peu près parallèles (chapitre II, fig. 12), l'un par rapport à l'autre, et ne doivent pas osciller grandement autour de leur position d'équilibre. D'un autre côté, lorsque le DPPC est dans l'état LE, les molécules de 12-9-AS peuvent s'éloigner des positions les plus réactives, puisque l'environnement lipidique est beaucoup plus désordonné autour d'elles. On s'attendrait donc à ce que la valeur de K_d diminue dans la région LE, comme on l'observe expérimentalement.

Suivant cette optique, il est possible de rationaliser davantage le comportement de K_d (fig. 15) et les légères modifications des valeurs de I_f (fig. 14) en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. Pour réaliser cet objectif,

il faut utiliser une lumière excitatrice linéairement polarisée (Theretz et coll., (1984)) afin d'évaluer les changements d'orientation de la sonde de fluorescence suivant la compression du film monomoléculaire et les changements consécutifs sur K_d et I_f . Le résultat de ce type d'analyse est présenté au chapitre V.

3.4 Les propriétés dynamiques

3.4.1 La constante de diffusion latérale

Les propriétés dynamiques des films de DPPC mesurées sur l'appareil de F.R.A.P. sont présentées à la figure 16, qui montre le coefficient de diffusion latérale, D_{lat} , (tracé en log) en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. Une chute abrupte de trois ordres de grandeur est observée à la fin de la transition LE / LC. En effet, le coefficient de diffusion latérale passe d'une valeur de $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ à $10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$. Cette chute, très forte, se produit à l'intérieur d'une variation de pression de surface de moins de $8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ (c.-à-d., entre 7 et $15 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) et d'une variation d'aire moléculaire de $0,10 \text{ nm}^2$ (c.-à-d., entre $0,58$ et $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$). D'un autre côté, durant la transition LE / LC, la valeur de D_{lat} demeure constante, dans les limites des erreurs expérimentales. Ces caractéristiques dynamiques générales des monocouches de DPPC ont été rapportées et discutées dans une publication de Teissié et coll. (1978). Elles sont aussi en accord (sauf les valeurs absolues) avec les études rapportées par d'autres laboratoires utilisant la technique de photoblanchiment (Von Tschärner et McConnell, (1981b), et Peters et Beck, (1983)), sur des monocouches de DPPC utilisant le N-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole phosphatidyléthanolamine d'oeuf (NBD-PE).

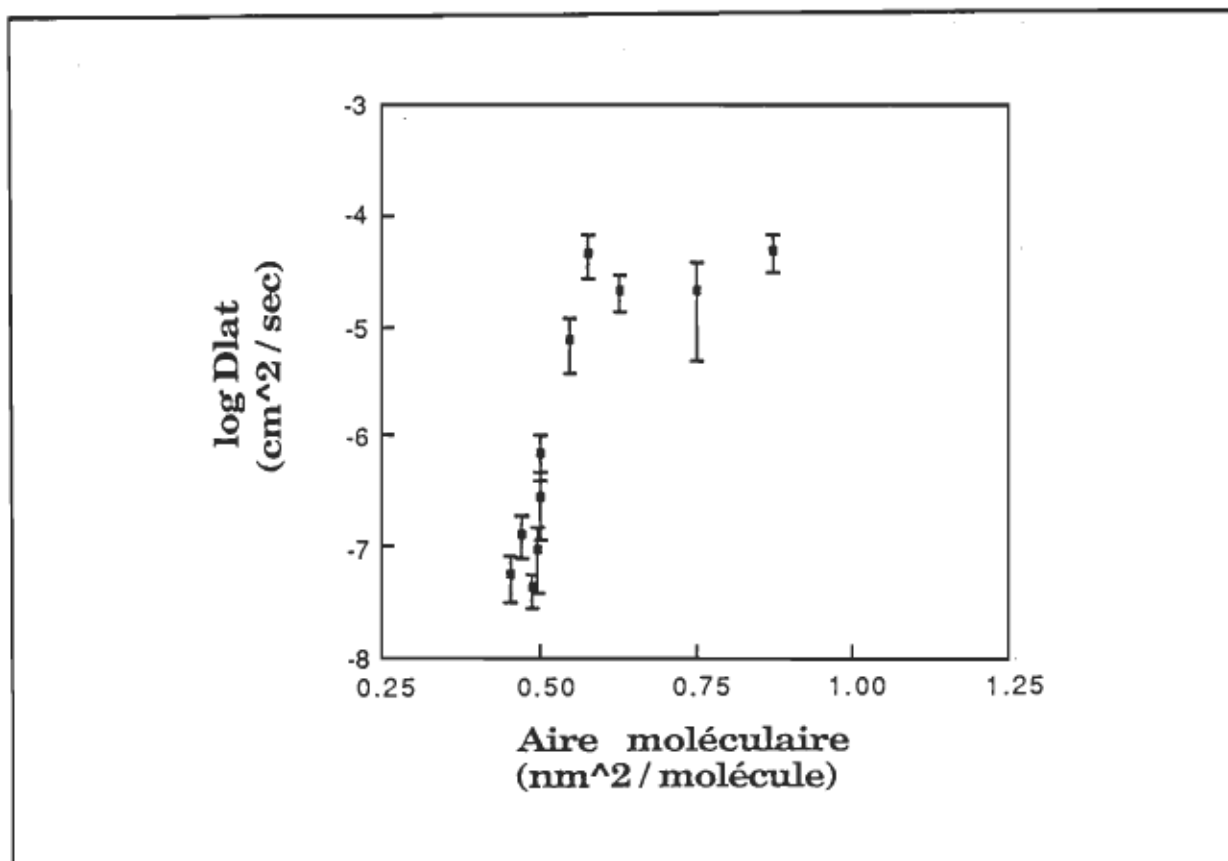


Figure 16 :

Le coefficient de diffusion latérale (tracé en log de D_{lat}) en fonction de l'aire moléculaire du DPPC

3.4.2 La diffusion et les phénomènes de convection

Les valeurs de D_{lat} trouvées dans le présent travail confirment la valeur du coefficient de diffusion latérale d'une monocouche fluide telle que rapportée par Teissié et coll. (1978), et Theretz et coll. (1984). Ces valeurs sont systématiquement de l'ordre de $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$, c.-à-d., environ deux ordres de grandeur plus élevés que les valeurs trouvées pour les systèmes en multibicouches lipidiques sous des conditions similaires (Fahey et Webb, (1978)), montrant ainsi que les lipides à l'interface air / NaCl 0,1 M diffusent beaucoup plus rapidement que les lipides dans une bicouche. Il a été soulevé (Peters et Beck, (1983)) que cette mobilité plus rapide des lipides à l'interface

air / eau comparée aux bicouches lipidiques peut être associée au phénomène de flux ou de mouvement de convection à l'interface air / eau. Cependant, il n'y a pas de doute que le processus de recouvrement de nos expériences de fluorescence est essentiellement associé au processus de diffusion, tel que démontré par les faits qui suivent :

i) une analyse statistique fut réalisée sur les résultats obtenus dans le laboratoire sur plus de 40 monocouches différentes, chacune des monocouches impliquant cinq périodes de recouvrement. La courbe de recouvrement de chacune des expériences était exponentielle. Un processus induit par un flux de convection plutôt qu'un processus induit par la diffusion aurait entraîné une courbe de recouvrement de fluorescence de forme sigmoïde (Beck et Peters, (1982), et Axelrod et coll., (1976)).

ii) les valeurs de D_{lat} déterminées sont identiques pour plusieurs échelles de temps de recouvrement (c.-à-d., de 10 s à quelques minutes). On s'attendrait à ce qu'un processus de convection de surface affecte le comportement de D_{lat} lorsqu'il est mesuré en fonction du temps de recouvrement, ce qui n'est pas observé ici.

iii) les valeurs de D_{lat} mesurées sont indépendantes du temps alloué à la photodimérisation et ce, sur de longues périodes (c.-à-d., 5 à 30 s). Des effets thermiques sont donc négligeables, ainsi qu'on pouvait s'y attendre compte tenu de la faible intensité de lumière émise par la lampe de photoaveuglement utilisée.

iv) la présence de mouvement de convection à la surface de la monocouche doit être reliée à la forme de la cuve (c.-à-d., cylindrique ou rectangulaire) ou à sa dimension (avec la restriction importante que la cuve de Langmuir soit assez large pour éviter des effets de "bordure de la cuve" connus pour affecter la monocouche (Gaines, (1984 et 1966))). On s'attendrait donc à ce que la forme de la courbe de recouvrement de fluorescence reflète ces conditions expérimentales si les mouvements de convection étaient importants. Cependant, au cours des dernières années, des cuves de diverses dimensions et diverses formes ont été utilisées dans le laboratoire du Dr Teissié (communication personnelle) sans jamais affecter la forme, la courbe de recouvrement, la reproductibilité ou les valeurs de D_{lat} .

Dans le but de vérifier la présence possible de flux de convection, on a réalisé des expériences sous des conditions similaires à celles qui sont décrites par Peters et Beck (1983). La partie de la monocouche où est réalisée l'étude de fluorescence fut isolée du reste du film lipidique en y insérant un cylindre appuyé directement sur le fond de la cuve. La figure 17 illustre ce cylindre qui est inséré dans la cuve de Langmuir dès le début des expériences, c.-à-d., avant même le dépôt du film à la surface.

Le cylindre dépassait de 1 mm la surface de la solution aqueuse. Son diamètre de 20 mm fut considéré comme étant assez large pour éviter des effets de bord. Deux canaux furent réalisés dans le cylindre pour permettre au film lipidique de pénétrer librement dans la zone de surface déterminée par le cylindre et d'équilibrer cette région avec le reste du film. On a aussi déposé une lamelle de verre sur le cylindre pour minimiser la convection

aérienne de la masse d'air au-dessus de la monocouche (non présentée à la fig. 17).

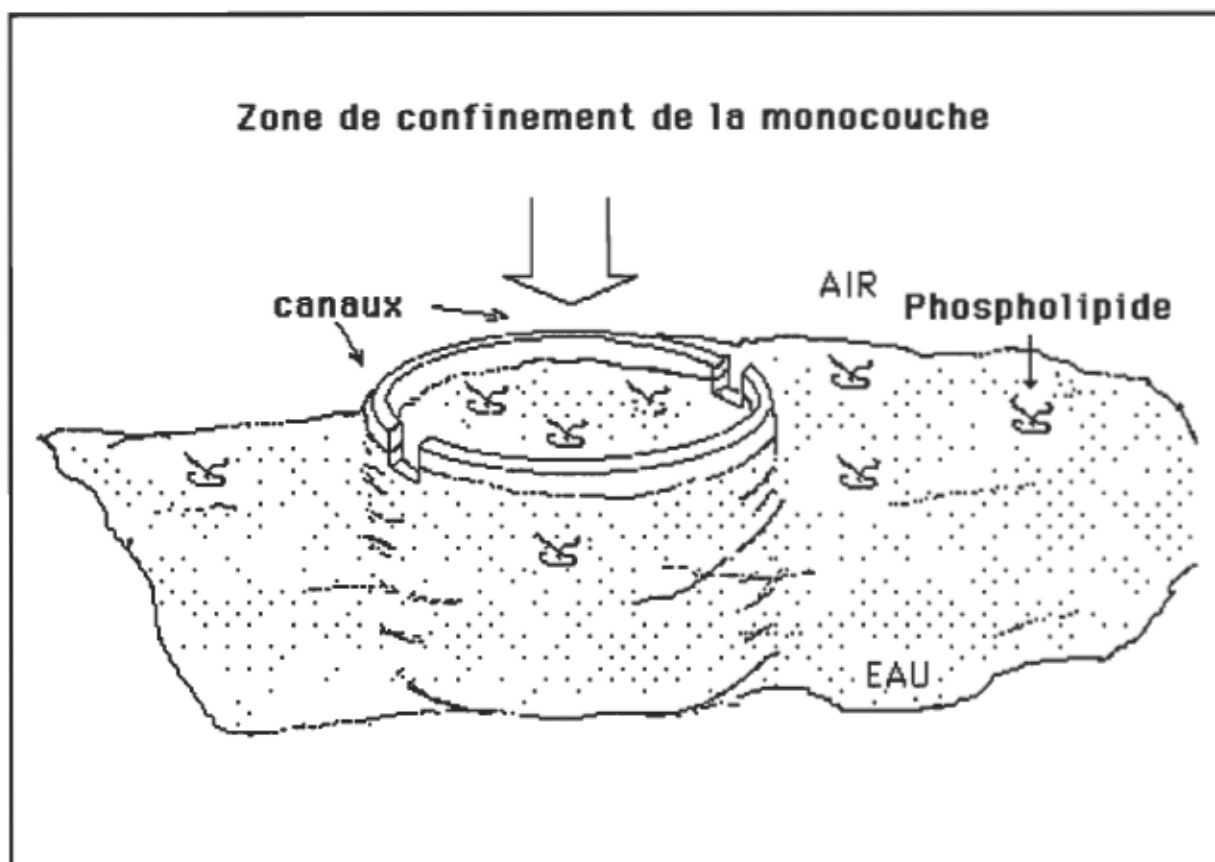


Figure 17 :
Schéma du montage pour vérifier la présence possible de flux de convection à l'interface

Les valeurs de D_{lat} mesurées avec ce montage et la forme des courbes de recouvrement furent identiques, à l'intérieur des erreurs expérimentales, à celles rapportées avec le montage précédent. Ceci suggère, que les mouvements de convection n'interfèrent pas dans le processus de recouvrement.

v) nos résultats sont aussi en complet accord avec les résultats

publiés plus tôt par Loughran et coll. (1980) obtenus de la dynamique d'excimères à l'interface air / eau ou par Stroeve et Miller (1975). Dans ce dernier cas, la diffusion latérale fut observée par le moyen d'une technique autoradiographique. Sous leur condition expérimentale, les mouvements des molécules pouvaient être visualisés. Leur analyse mathématique montre que les coefficients sont appropriés à des processus de diffusion et qu'aucune convection n'était présente.

3.4.3 La divergence des résultats de dynamique latérale dans la littérature

Bien que les comportements présentés s'accordent bien (c.-à-d., comportement similaire de D_{lat} en fonction de la compression du film) avec les résultats de la littérature (Von Tschärner et McConnell, (1981b), et Peters et Beck, (1983)), une divergence sérieuse des valeurs de D_{lat} est observée. Le tableau I présente les valeurs de D_{lat} du DPPC en monocouche et en multibicouche (MLV) (fluide et gel) disponibles dans la littérature.

Ainsi, par exemple, les valeurs de D_{lat} présentées ici (10^{-5} et 10^{-8} $\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ pour les phases liquide et solide respectivement) sont de deux ordres de grandeur plus élevées que celles trouvées par von Tschärner et McConnell (1981 b) ou par Peters et Beck (1983) (c.-à-d., 10^{-7} et 10^{-10} $\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ pour les phases fluide et solide respectivement). Cette situation est peu surprenante si on réalise que pour les premiers, la monocouche à l'étude est adsorbée sur une lamelle de verre prérecouverte de chaînes aliphatiques de 18 carbones de long. La monocouche de DPPC est alors dans une situation similaire à ce que l'on trouve dans une bicouche. En effet, de cette façon, la monocouche de DPPC diffuse contre des chaînes hydrocarbonées plutôt que

de diffuser contre l'air comme dans le cas d'une monocouche réelle à l'interface air / eau. On devrait donc s'attendre à obtenir des valeurs de D_{lat} comparables pour les monocouches adsorbées de cette façon et pour les bicouches de DPPC. C'est effectivement ce qui se produit, les valeurs typiques des multibicouches lipidiques du DPPC dans l'état gel étant de l'ordre de $10^{-11} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$, comparées à $10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ pour l'état liquide (Fahey et Webb, (1978)). De plus, ces valeurs sont comparables à celles qu'on retrouve respectivement pour l'état condensé et l'état liquide dans les travaux de von Tscharner et McConnell (1981 b).

Tableau I :
Coefficient de diffusion latérale du DPPC dans les monocouches et les bicouches lipidiques

$D_{lat} (\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1})$		Système membranaire modèle	Source
fluide	gel		
10^{-5}	10^{-8}	Monocouche	Denicourt et coll., (1987)
10^{-7}	10^{-10}	Monocouche adsorbée sur lamelle de verre	Von Tscharner et McConnell, (1981 b)
10^{-7}	10^{-10}	Monocouche confinée	Peters et Beck, (1983)
10^{-7}	10^{-11}	Multibicouche	Fahey et Webb, (1978)

D'un autre côté, il est plus troublant de constater que nos valeurs de D_{lat} sont de deux ordres de grandeur plus élevées que les valeurs obtenues par Peters et Beck (1983) sur toutes les régions de l'isotherme de pression de

surface. Dans les deux cas, le système est apparemment le même, c.-à-d., une monocouche de DPPC à l'interface air / eau. Des éléments concernant l'origine de cette divergence peuvent être obtenus si l'on examine attentivement le montage expérimental et la méthodologie que ces auteurs utilisent. Par exemple ils mentionnent la présence de difficultés sérieuses associées aux processus de convection de surface apparemment présents sous leur condition expérimentale. Selon nous, ces processus de convection peuvent être associés à l'intensité de la lumière utilisée dans leur technique de photoaveuglement. Nous avons calculé que nos conditions d'illumination sont de 100 à 1000 fois plus faibles que les leurs.

Aussi, dans le but de réduire ces processus de convection, Peters et Beck ont utilisé une condition expérimentale plutôt drastique considérant le fait que les monocouches sont des entités fragiles. Les expériences de photoaveuglement sont en effet réalisées sur des monocouches qui sont confinées, par des parois en Teflon, à l'intérieur d'une surface d'aire extrêmement petite, soit seulement 3 mm de diamètre. Cette surface est liée, par un canal de 2 mm de diamètre uniquement, à la surface libre contenant le lipide. Il est bien documenté que les propriétés des monocouches sont fortement affectées par les "effets de bord" (Gaines, (1984 et 1966)), de même que par la façon dont elles sont préparées (Horn et Gershfeld, (1977)). Les effets de bord par exemple, peuvent affecter la fluidité d'une monocouche, comme l'a montré Langmuir (1917) dans son manuscrit classique où il a observé qu'une poudre étalée à l'interface air / eau et déplacée en insufflant de l'air, montre des mouvements qui sont beaucoup plus lents le long de la bordure de la cuve. Suivant cette observation, n'importe quel type

d'interaction attractive entre les molécules du lipide et les parois de Teflon devrait avoir tendance à réduire la mobilité moléculaire à l'interface. Aussi, l'existence de problèmes réels à confiner une monocouche dans une petite surface est évidente dans les travaux de Peters et Beck (1983) puisqu'ils mentionnent que selon la viscosité de la monocouche, des canaux plus larges que 2 mm doivent être utilisés afin que la monocouche puisse atteindre la région d'aire où sont réalisées les expériences de fluorescence. Il se peut donc que Peters et Beck (1983) obtiennent des valeurs de diffusion qui reflètent des mobilités moléculaires restreintes par d'importants effets de bord, plutôt que de refléter la mobilité plus élevée des molécules confinées dans une interface qui n'est pas affectée par de tels effets. Que leurs valeurs de D_{lat} des monocouches lipidiques soient similaires aux valeurs trouvées dans les systèmes de multicouches lipidiques de DPPC peut donc être purement accidentel.

3.5 Conclusion

En conclusion de la présente étude et en accord avec les résultats de Tessié et coll. (1978), il apparaît que le processus de diffusion translationnelle est beaucoup plus rapide dans les monocouches étalées à l'interface air / eau que dans les systèmes multibilipidiques (Axelrod et coll., (1976), et Fahey et Webb, (1978)) ou que dans les monocouches fixées sur une lamelle de verre silanisée (von Tschärner et McConnell, (1981b)). Cette conclusion est aussi en accord avec les résultats obtenus dans les laboratoires de Teissié et coll. (1979) sur la polarisation de fluorescence de sondes incorporées dans une monocouche à l'interface air / eau. En effet, l'émission de fluorescence du dansylphosphatidyléthanolamine dans la lécithine n'est pas polarisée;

quand on la compare à la lumière polarisée émise par la même sonde incorporée dans le même lipide organisé dans une bicouche lipidique (Faucon et Lussan, (1973)). La mobilité rotationnelle apparaît donc elle aussi plus rapide dans les monocouches.

Le fait que les mobilités rotationnelles et translationnelles sont limitées dans les bicouches lipidiques a été relié à un effet de frottement d'une interface de la bicouche sur l'autre (Teissié et coll., (1978)). En effet, il est maintenant bien décrit dans la littérature que la vitesse de diffusion d'un lipide d'un réseau lipidique est reliée à l'aire moléculaire libre dans la bicouche, ceci étant modulé par les forces de frottement qu'expérimentent les lipides au niveau de l'interface aqueuse et au niveau de l'interface du plan moyen de la bicouche (Vaz et Hallman, (1983); Galla et coll., (1979), et Vaz et coll., (1985)). Cette rationalisation est aussi cohérente avec l'existence d'interactions entre les deux monocouches de chaque côté de la bicouche. Les calculs de Georgallas et coll. (1984) ont montré que les interactions entre les deux feuillets d'une bicouche de DPPC peuvent atteindre environ 2% de l'interaction maximale à l'intérieur du plan de chacun des feuillets. Ces interactions peuvent être une conséquence d'interdigitations (Theretz et coll., (1983)) ou de fluctuations transverses des composantes dans l'épaisseur de la membrane (Feix et coll., (1984)).

CHAPITRE IV

LA TRANSITION DIFFUSIONNELLE DE LA PHASE LIQUIDE-CONDENSÉ DU DPPC EN MONOCOUCHE

4.1 Introduction

Un examen attentif des aires moléculaires du film lipidique de DPPC où se produit la chute diffusionnelle et l'incorporation massive de plusieurs composés dissouts dans la sous-phase aqueuse (voir l'introduction) nous montre que ces changements ont lieu précisément dans une zone bien délimitée de la région de transition liquide / solide, soit dans la région liquide-condensé pure. Dans ce contexte, nous nous sommes demandés si la zone de transition diffusionnelle est toujours intimement liée à la phase LC de ce lipide. Nous avons aussi voulu connaître quelles propriétés du film interfacial entrent en jeu lors de cette transition. Ainsi nous avons varié la concentration ionique de la sous-phase saline pour déterminer l'importance de l'hydratation des têtes polaires du lipide lors de la transition. Aussi, les isothermes obtenues par l'addition successive de lipides, présentées par

Pallas et Pethica (1985) montrent une transformation de la région de transition LE / LC. Nous avons donc utilisé ce mode de compression du lipide pour l'étude de la dynamique moléculaire du DPPC étalé à l'interface air / solution.

4.2 Effets du mode de compression

4.2.1 Les isothermes de pression de surface

Les isothermes de pression de surface de la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) comportant 2% (mole/mole) de 12-9-AS sont présentées à la figure 18.

La sous-phase utilisée est le NaCl 0,1 M. Ces isothermes sont obtenues suivant deux méthodes de compression soit, i) par compression continue du film (fig. 18, trait plein) et ii) par des dépôts successifs du lipide (fig. 18, en pointillés). L'isotherme du DPPC en compression continue a déjà été présentée au chapitre précédent. Les deux types de courbe ainsi obtenues sont identiques aux enregistrements des lipides déposés sans la présence de sonde, suivant leurs modes de compression respectifs (résultats non présentés).

Les frontières entre les diverses phases sont plus ou moins établies arbitrairement. En particulier, la phase LC pure est habituellement déterminée avec le début de la courbure de l'isotherme à la fin de la région de transition LE / LC. Les mesures de diffusion latérale qui sont décrites plus loin nous permettent de localiser avec davantage de précision le début de la

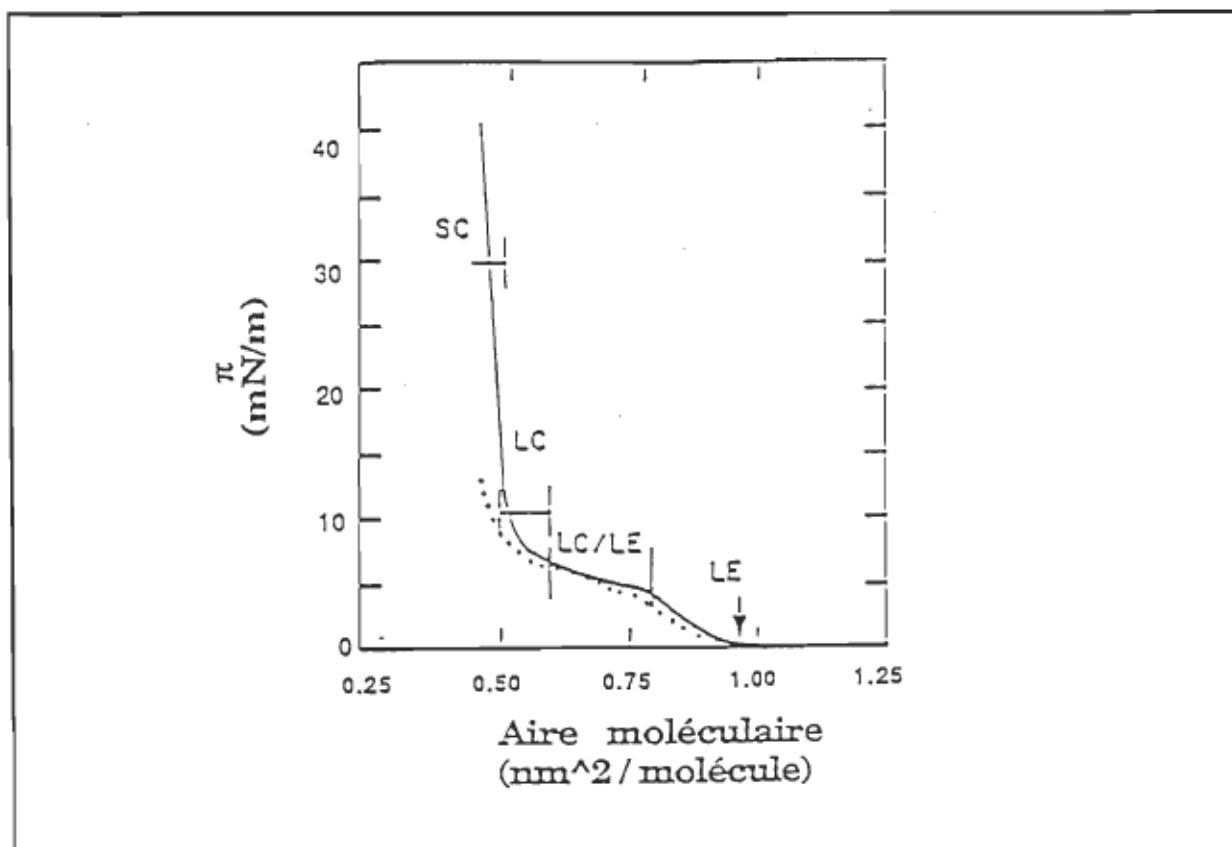


Figure 18 :

Isothermes de pression de surface du DPPC + 2% (mole/mole) de 12-9-AS à l'interface air / solution. $T = 21 \pm 1^\circ\text{C}$. Sous-phase: NaCl 0,1 M. Compression continue: trait plein. Addition successive: pointillés

phase LC pure. Ainsi, ces mesures montrent que la phase LC pure s'insère entre 0,58 nm² et 0,48 nm²·molécule⁻¹ de DPPC pour l'isotherme de pression de surface obtenue lors de la compression continue du lipide. D'un autre côté, lorsque l'isotherme est enregistrée par le dépôt successif du lipide, la phase LC pure est maintenant observée aux aires moléculaires couvrant 0,52 nm² à 0,48 nm²·molécule⁻¹. L'isotherme du DPPC obtenue par le dépôt successif (fig. 18, en pointillés) montre donc par rapport à celle obtenue par compression continue, un accroissement de la région des aires moléculaires où se présente le plateau caractéristique de la transition LE / LC, avec une réduction correspondante (0,06 nm²·molécule⁻¹) de la région des aires

moléculaires où se présente la phase LC pure.

4.2.2 La diffusion latérale des monocouches de DPPC

La figure 19 présente l'isotherme de diffusion ($\log D_{lat}$ vs aire moléculaire) du film de DPPC pour chacun des deux modes de compression (a, compression continue; b, addition successive de lipides). Pour les deux types de compression on observe une chute de trois ordres de grandeur du coefficient de diffusion latérale (D_{lat}) lors de la transition entre les états fluides (phases LE et LC / LE) et l'état condensé, SC. Pour chacun de ces états, la valeur de D_{lat} ne dépend pas du mode de compression, soit environ $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ dans les régions fluides et environ $10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ dans l'état condensé. Le changement du comportement dynamique du film lors de la transition diffusionnelle s'opère de façon continue sur $0,10 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ lors de la compression continue du lipide (fig. 19a) et sur $0,04 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ lors du dépôt successif du lipide (fig. 19 b).

Les isothermes de diffusion latérale de la figure 19 indiquent aussi que, pour les deux modes de compression, la fin de la transition diffusionnelle est à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ de DPPC. Cependant, le début de la transition diffusionnelle est modulé suivant la manière dont la monocouche a été comprimée. En effet, lorsque la monocouche est comprimée par une réduction continue de la surface, le début de la transition est observée à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ (fig. 19 a), tandis qu'il est déplacé à $0,52 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ dans le cas d'un dépôt successif des lipides (fig. 19 b).

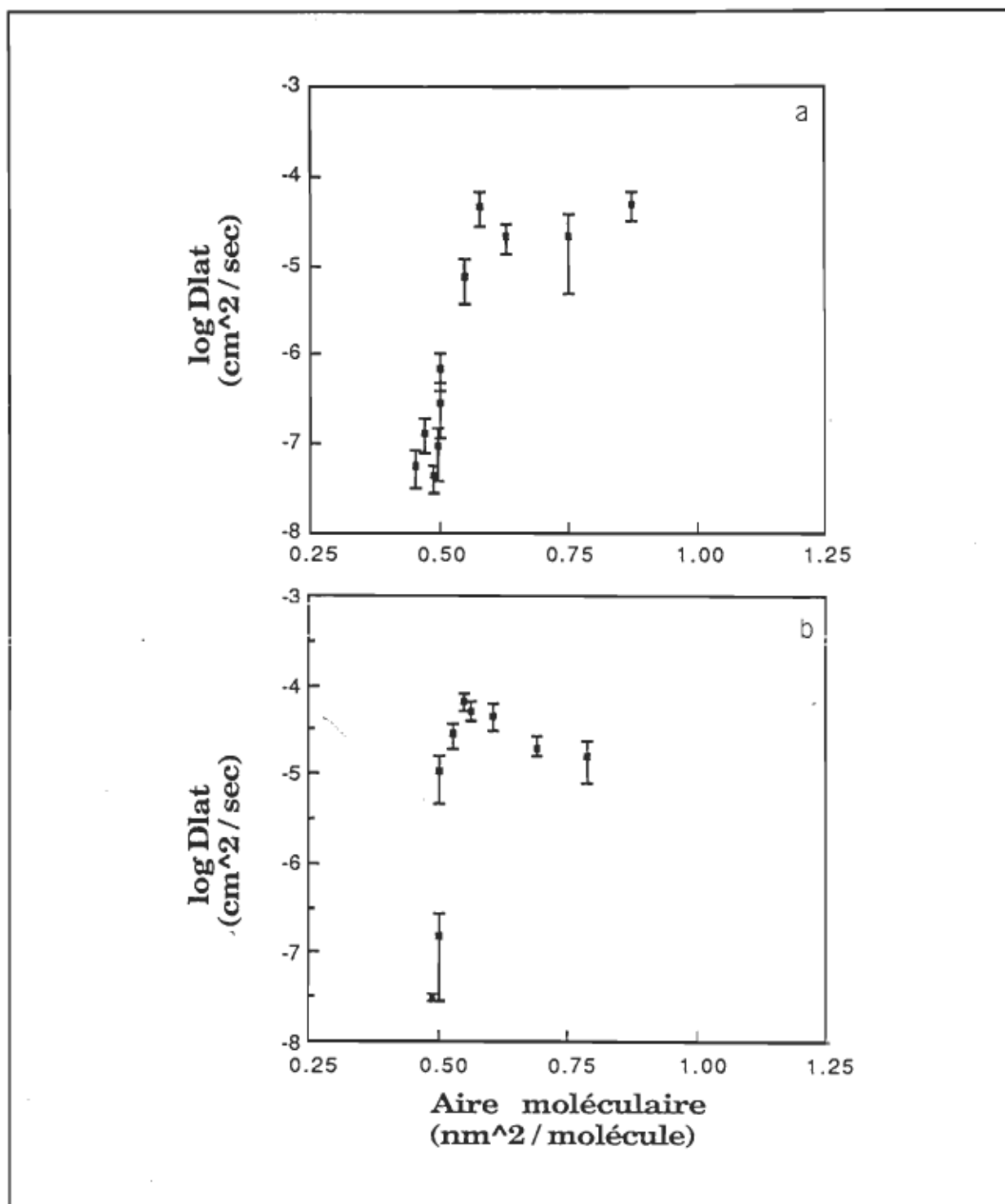


Figure 19 :

Coefficient de diffusion latérale en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. Sous-phase: NaCl 0,1 M. (a) compression continue, (b) addition successive des lipides

Avec les deux modes de compression, il est intéressant de constater que l'aire moléculaire, où se produit le début de la transition diffusionnelle,

se compare bien avec les aires moléculaires qui peuvent être établies pour les débuts de la région LC pure respective en assumant que la phase LC correspond au début de la courbure de l'isotherme de pression de surface à la fin de la région de transition LE / LC, tel que mentionné précédemment.

4.3 Effets de la force ionique de la sous-phase

4.3.1 Les isothermes de pression de surface et la diffusion latérale

La figure 20 montre le comportement de l'isotherme de pression de surface (fig. 20 a) et du coefficient de diffusion latérale (fig. 20 b) du DPPC + 2% (mole/mole) 12-9-AS à l'interface air / solution, la sous-phase étant dans ce cas, le NaCl 1,0 M.

Les isothermes furent obtenues par une compression continue de la monocouche. Le comportement observé ici est qualitativement le même qui est observé lorsque le lipide est déposé sur le NaCl 0,1 M (chapitre III et Denicourt et coll., (1987)) c.-à-d., le coefficient de diffusion latérale chute abruptement en passant d'une phase fluide à une phase condensée. Bien plus, on observe à nouveau que cette réduction se produit quand le film atteint la phase LC pure. Cependant, par rapport à l'isotherme obtenue à l'interface air / NaCl 0,1 M, l'isotherme effectuée en présence de 1,0 M NaCl dans la sous-phase est déplacée vers de plus grandes aires moléculaires.

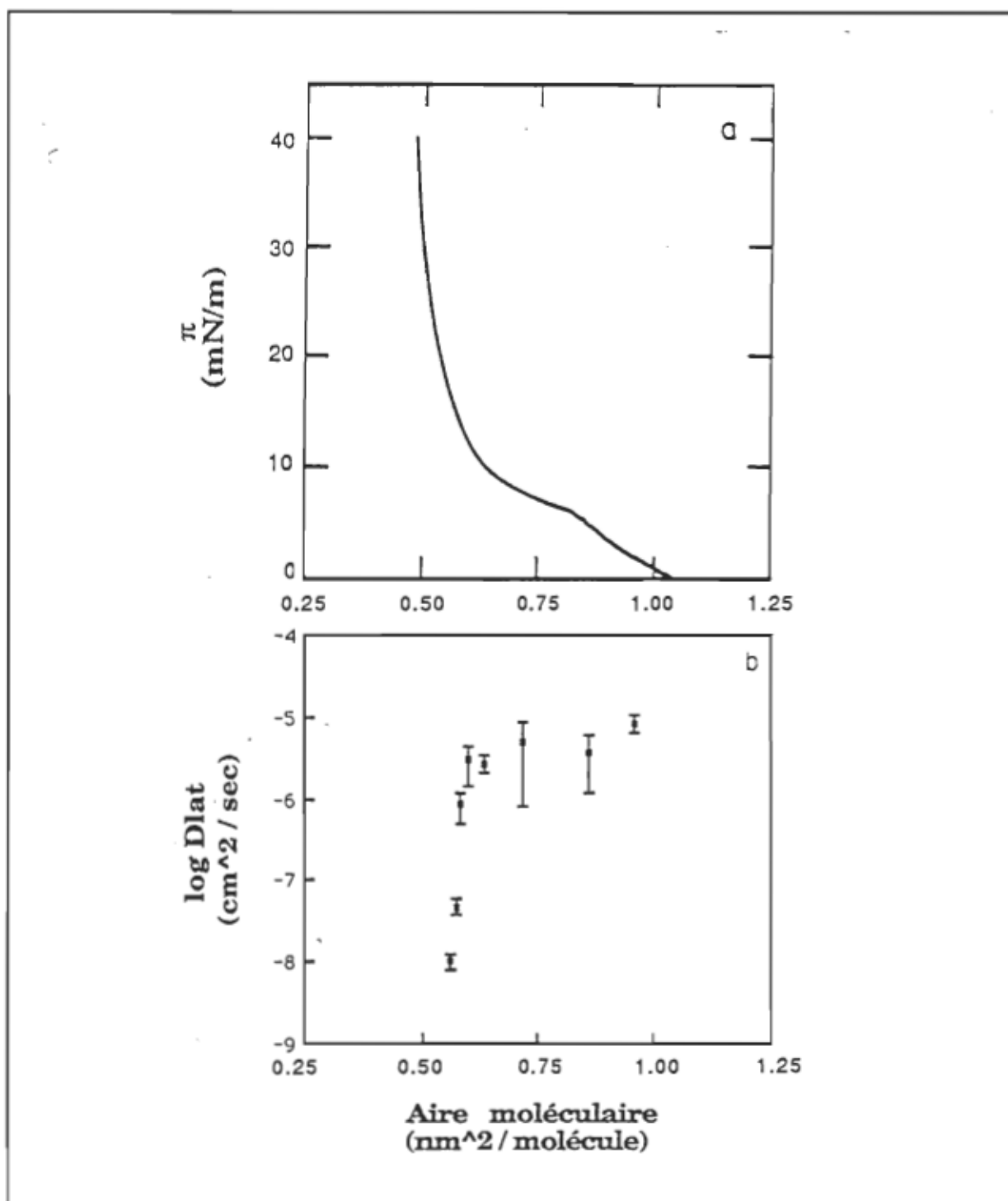


Figure 20 :

(a) Isotherme de pression de surface du DPPC + 2% (mole/mole) de 12-9-AS à l'interface air / solution. Mode de compression : continue. (b) Coefficient de diffusion latérale en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. $T = 21 \pm 1^\circ\text{C}$. Sous-phase : NaCl 1,0 M

Ainsi, la transition diffusionnelle se produit maintenant entre 0,64 et

0,56 nm².molécule⁻¹ comparativement à 0,58 nm².molécule⁻¹ et 0,48 nm².molécule⁻¹ quand on utilise le NaCl 0,1 M. De plus, le coefficient de diffusion latérale du lipide dans la région fluide est réduit d'un ordre de grandeur avec le NaCl 1,0 M. Il est maintenant de 10⁻⁶ cm².sec⁻¹ plutôt que 10⁻⁵ cm².sec⁻¹ avec la sous-phase NaCl 0,1 M.

4.4 Les propriétés de dimérisation des divers types de films

L'effet du mode de compression et celui de la force ionique sont maintenant regroupés afin d'en observer les conséquences sur les propriétés de la phase LC du DPPC en monocouche. Ainsi, à la figure 21 on présente la constante de dimérisation, K_d , pour le DPPC + 2% (mole/mole) de 12-9-AS dans les conditions expérimentales suivantes: compression continue avec NaCl 1,0 M (courbe a) ou NaCl 0,1 M (courbe b) et additions successives de lipides avec NaCl 0,1 M (courbe c).

Pour ces diverses conditions expérimentales, on observe que K_d diminue dans la région des aires moléculaires associées à la transition de phase LE / LC pour atteindre une valeur minimale aux points correspondant exactement à l'entrée du film dans la phase LC pure, c.-à-d., 0,64, 0,58 et 0,52 cm².sec⁻¹ pour les courbes 'a' à 'c' respectivement. Ainsi, le minimum de la valeur de K_d à la figure 21 correspond au début de la transition diffusionnelle observée sur les figures 18 et 19 précédentes. K_d augmente ensuite pour

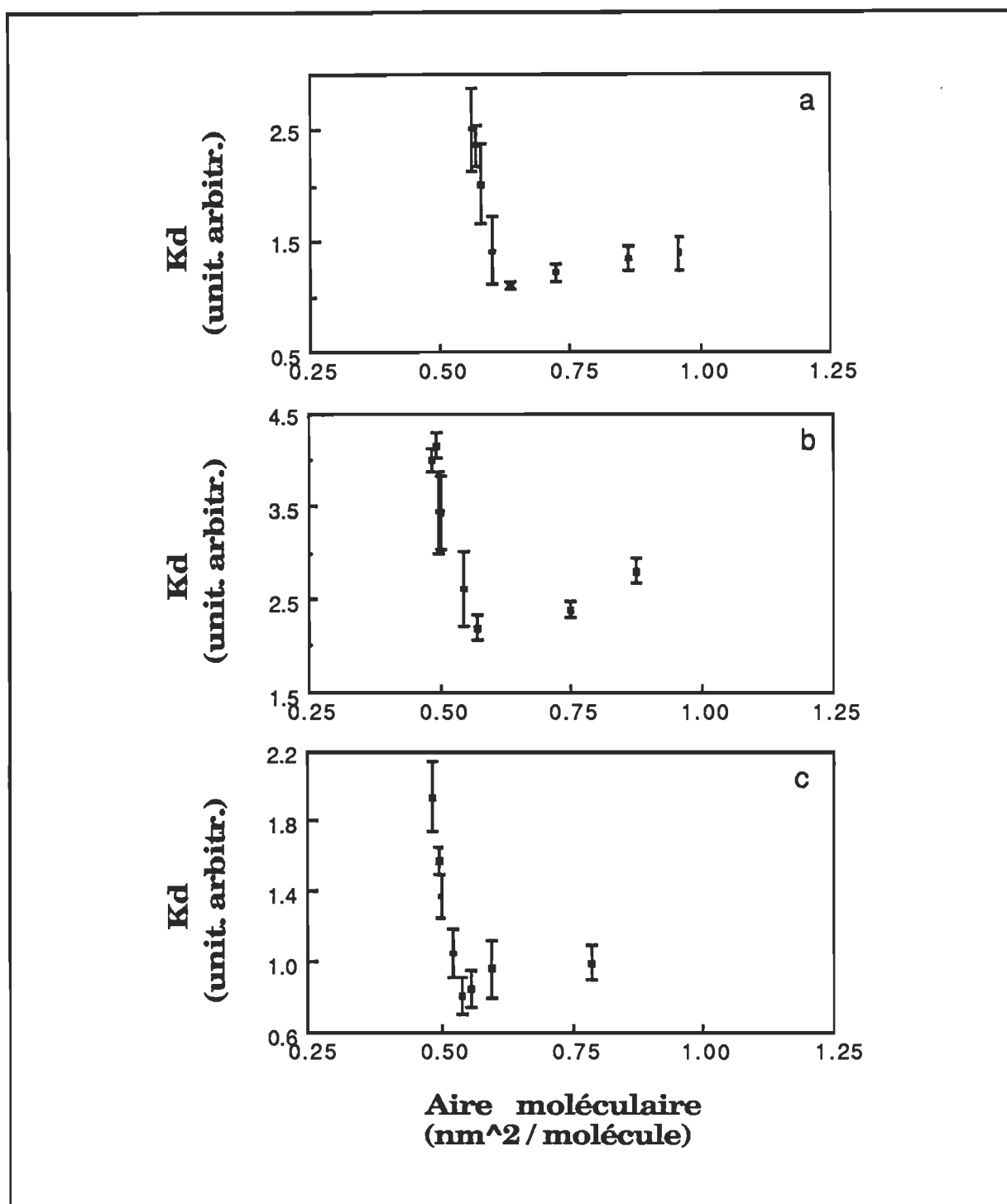


Figure 21 :

Constante de dimérisation de la sonde, K_d , en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. (a) Compression continue du film, NaCl 1,0 M. (b) Compression continue du film, NaCl 0,1 M. (c) Addition successive des lipides, NaCl 0,1 M

atteindre une valeur maximale à la fin de la phase LC pure et il demeure

constant quand on réduit davantage l'aire moléculaire. Aussi, on observe (résultat non présenté) que l'intensité de fluorescence de la sonde, I_f , demeure constante sur toute l'isotherme.

4.5 Définition de la phase liquide-condensé

Le tableau suivant (tableau II) donne un aperçu des différentes aires moléculaires caractéristiques de la transition diffusionnelle du DPPC suivant le mode de compression et la nature ionique de la sous-phase.

Tableau II :
Coefficient de diffusion latérale et aires moléculaires lors des transitions de phases du DPPC suivant diverses conditions expérimentales

Conditions expérimentales	Aires moléculaires de la transition diffusionnelle (nm ² ·molécule ⁻¹)	D _{lat} fluide – gel (cm ² ·sec ⁻¹)	
Compression continue sur NaCl 0,1 M	0,58 à 0,48	10 ⁻⁵	10 ⁻⁸
Compression continue sur NaCl 1,0 M	0,64 à 0,56	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
Compression discontinue sur NaCl 0,1 M	0,52 à 0,48	10 ⁻⁵	10 ⁻⁸

L'isotherme de diffusion latérale présentée à la figure 19 a montre que la fin de la transition diffusionnelle est atteinte à 0,48 nm²·molécule⁻¹. Cette aire moléculaire correspond à un point d'inflexion dans l'isotherme de

pression de surface qu'on rencontre aussi à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$, et qui est associé à l'apparition de la phase solide-condensé (SC) (fig. 18, trait plein). Albrecht et coll. (1978) ont attribué ce point à une transition de phase du second ordre entre une phase cristalline "tiltée" (c.-à-d., la phase LC) et une phase cristalline droite ("non-tiltée") (c.-à-d., la phase SC) (fig. 22).

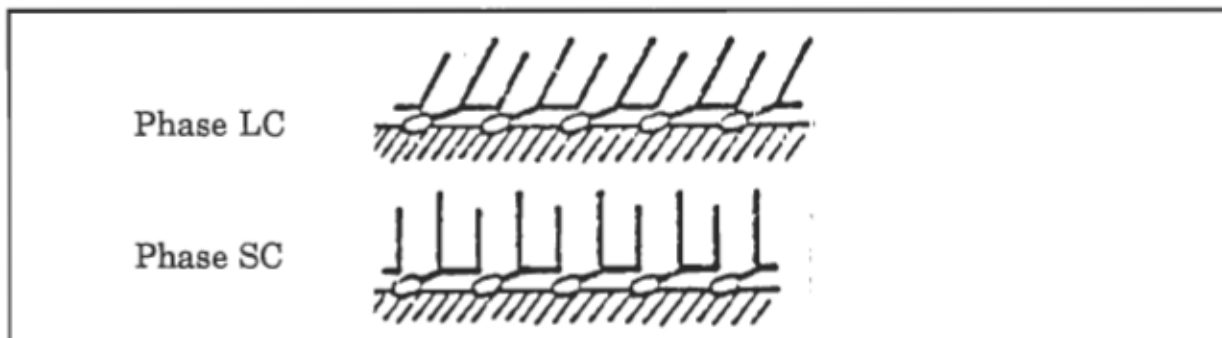


Figure 22 :

Représentation schématique de la transition de phase LC / SC du second ordre (Albrecht et coll., (1978))

La figure 19 démontre clairement aussi que, suivant le mode de compression du film de DPPC qui intervient, la transition diffusionnelle ne débute pas à la même valeur d'aire moléculaire. Lorsque le film de DPPC est comprimé continuellement (fig. 18 a), la transition débute à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$, correspondant à l'entrée du film dans la phase LC pure. Ce résultat est en accord avec ceux rapportés par Lösche et coll. (1983) qui ont montré que la chute du coefficient de diffusion latérale, D_{lat} , utilisant le même mode de compression, prend place aux aires moléculaires situées entre $0,55 - 0,60$ et $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ à 20°C . Cependant, la réduction qu'ils observèrent n'est que de deux ordres de grandeur comparativement à trois dans nos résultats. Ceci pourrait être expliqué par leur mesure indirecte de D_{lat} à partir des mouvements de convection à l'interface.

Nos résultats sont aussi compatibles avec ceux de Peters et Beck (1983) qui ont montré que la transition diffusionnelle prend place entre 8 et 15 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ comparativement à 7 et 15 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ dans nos résultats. Il n'est pas possible de comparer les aires moléculaires impliquées puisque ces auteurs n'ont pas présenté l'isotherme de pression de surface de leur DPPC. D'un autre côté, ils ont aussi observé que le coefficient de diffusion diminue d'un facteur trois en passant des phases fluides aux phases plus condensées. Cependant, leur valeurs de la constante de diffusion diffèrent des nôtres par environ deux ordres de grandeur. Nous avons déjà présenté dans le chapitre précédent la discussion détaillée des causes possibles de cette divergence (voir aussi Denicourt et coll., (1987)).

Lorsque le film de DPPC est comprimé par le dépôt successif du lipide, la fin de la transition diffusionnelle se produit, elle aussi, à une valeur située autour de $0,48 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$ (fig.19 b). Cette valeur comporte cependant une certaine incertitude liée au fait que la limite de résolution de l'instrumentation est atteinte. Cependant, sous ce mode de compression, le début de la transition diffusionnelle est observé à $0,52 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$ qui encore une fois, correspond à l'entrée du lipide dans la phase LC pure (fig. 18, en pointillés). Cette valeur est comparable à celle rapportée dans le travail de Pallas et Pethica (1985) soit, $0,52 - 0,54 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$ pour le même mode de compression. Avec les deux différents modes de compression utilisées ici, on observe donc que la transition diffusionnelle se produit dans la gamme d'aires moléculaires qui caractérise la phase liquide-condensé pure. Comme il fut mentionné précédemment, la phase LC est habituellement déterminée arbitrairement par le début de la forte

courbure de l'isotherme à la fin de la transition de phase LE / LC. Les mesures de diffusion latérale peuvent donc servir à positionner précisément les frontières de cette phase.

Les résultats que nous venons de présenter nous amènent donc à conclure que la phase LC est caractérisée par la disparition des régions hautement fluides à l'intérieur du film, la sonde que nous utilisons étant préférentiellement solubilisée dans ces régions fluides du film (Thulborn, (1981)). Ainsi, en comprimant la monocouche, le coefficient de diffusion chute progressivement dans la phase intermédiaire moins fluide (LC) pour atteindre un minimum lorsque le film entre dans la région solide-condensé (SC). Le coefficient de diffusion est alors constant à une valeur d'environ $10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$. Dans la région LC, la mobilité latérale des molécules de DPPC à l'interface est progressivement restreinte quand l'aire moléculaire est réduite jusqu'à ce que se produise une transition de phase LC / SC du second ordre à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$.

4.6 La phase LC et les propriétés d'hydratation

Il est possible d'obtenir certains éclaircissements sur la réduction de D_{lat} lors de l'entrée dans la phase LC, en examinant les propriétés d'hydratation des molécules de DPPC. Par exemple, il est certain que l'encombrement stérique entre les têtes polaires hydratées des molécules de lipides dans le film monomoléculaire est particulièrement important pour les aires moléculaires inférieures à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ c.-à-d., à l'entrée de la phase LC pure. Cet encombrement stérique des régions polaires est particulièrement mis en évidence, en couche monomoléculaire, lors des

expériences impliquant des interactions film-substrat. Ainsi, Cadenhead (1977) a montré que la facilité d'entrée du β -naphthol à partir de la sous-phase dans une monocouche préformée de DPPC commence à diminuer à partir d'une pression de surface de $7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ à 20°C , ce qui correspond précisément à l'entrée dans la phase LC. Dans le même type d'expériences, Beurer et Galla (1987) ont montré qu'à une pression de surface supérieure à $7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, une réduction de l'entrée de chlorpromazine est observée. Ces expériences montrent que dans la phase LC, l'entassement des molécules du lipide produit une barrière effective à la pénétration de substrats provenant de la sous-phase pour incorporer le film monomoléculaire. En fait, Ivkov (1986) a montré que l'aire moléculaire intrinsèque d'une tête polaire de DPPC complètement hydratée est de $0,59 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$. Ceci implique qu'au début de la phase LC pure (qui se produit à $0,58 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$) l'entassement des molécules de DPPC hydratées du film est à son maximum et que la facilité de pénétration commence à diminuer. Pour les plus grandes aires moléculaires (c.-à-d., dans la transition LE / LC), le film comporte un mélange de deux phases et la structure de défauts bidimensionnels (l'interface des deux phases) qui en résulte semble jouer un rôle dans l'aptitude du β -naphthol à pénétrer le film (Cadenhead, (1977)). Ces expériences montrent clairement qu'à $0,58 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$, les interactions entre les têtes polaires hydratées des molécules du lipide dominent les propriétés de surface du film.

En plus, l'état d'hydratation des molécules de DPPC affecte directement leurs mobilités latérales. McCown et coll. (1981) ont montré que le coefficient de diffusion latérale du DPPC en dispersion bilipidique (MLV)

chute en fonction du degré d'hydratation des têtes polaires variant dans une gamme de 40 à 5%. La réduction est particulièrement significative sous 20% d'hydratation. La réduction de la mobilité latérale au-dessous de 20% d'hydratation fut associée à la diminution de la distance intermoléculaire entre les têtes polaires hydratées du lipide, augmentant ainsi l'encombrement stérique intermoléculaire. A 20% d'hydratation, Chapman et coll. (1967) ont montré que l'aire des molécules de DPPC est de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$, correspondant exactement à l'aire moléculaire observée dans ce travail à l'entrée de la phase LC pure. Pour cette aire moléculaire, White et King (1985) ont déterminé qu'environ 10 molécules d'eau d'hydratation sont fortement liées aux têtes polaires de chaque lipide, cette couche d'eau liée étant organisée par le champ électrique local associé au groupe polaire chargé du DPPC (Gruen et Marcelja, (1983), et Peinel et coll., (1983)).

4.7 Interprétations du comportement du film dans la phase LC

Dans ce contexte, il est donc possible de rationaliser le changement abrupt de D_{lat} lors de l'entrée de la monocouche dans la phase LC. Pour les aires moléculaires supérieures à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$, les sondes étant préférentiellement solubles dans la portion fluide du film, le coefficient de diffusion est élevé (approx. $10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$), valeur caractéristique du milieu fluide. En comprimant la monocouche jusqu'à atteindre cette aire moléculaire, l'hydratation des têtes polaires du DPPC diminue de 40 à 20% sans aucun changement de D_{lat} . À $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$, les molécules du lipide ont environ 10 molécules d'eau fortement liées à leur têtes polaires. Une réduction additionnelle de la surface entraîne un encombrement

stérique significatif entre les têtes polaires hydratées adjacentes, ce qui donne lieu à une réduction du coefficient de diffusion latérale. A ce point, le lipide entre dans la phase LC. D_{lat} continue à diminuer (et les têtes polaires continuent à perdre des molécules d'eau) durant la compression jusqu'à ce que la phase SC soit atteinte à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ où l'hydratation est maintenant inférieure à 5%, soit 2 molécules d'eau d'hydratation (White et King, (1985)).

D'un autre coté, on a signalé précédemment que lorsque qu'une monocouche est comprimée par additions successives de lipides, la réduction de D_{lat} ainsi que le début de la phase LC pure sont déplacés à $0,52 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ comparativement à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ lors de la compression continue. La première valeur est cohérente avec la courbe qu'on peut extraire des isothermes de pression de surface de Pallas et Pethica (1985) avec le même mode de compression. En plus, Prats et coll. (1987), à partir des résultats de conduction de protons (H^+) à l'interface, ont aussi observé que la conduction diminue à partir de $0,52 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ et ils infèrent qu'à partir de cette pression de surface, une réorganisation structurale des molécules d'eau commence. Cette idée peut être utilisée afin de rationaliser le fait que la réduction de D_{lat} et le début de la phase LC pure sont déplacés vers une aire moléculaire inférieure lors de l'addition successive de lipide. Il semble en effet possible que lorsqu'on ajoute la solution lipidique au film monomoléculaire pour réaliser la compression, le solvant utilisé pour l'étalement entraîne une déshydratation appréciable des têtes polaires des molécules du lipides. Cependant, il est bien connu, à partir des expériences d'hydratation faites sur les MLV, que le processus

d'hydratation, en particulier dans l'état gel (et, plus probablement dans l'état LC de la monocouche), est particulièrement lent (Sackmann, (1983)). Il en découle donc que l'encombrement stérique normalement rencontré à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ pourrait être plus faible, étant donné le plus faible degré d'hydratation des molécules du lipide. La monocouche peut ainsi être comprimée davantage, jusqu'à $0,52 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ où l'encombrement stérique au niveau des têtes polaires commence à prévaloir (Albon, (1983)). A ce point, le lipide entre dans la phase LC et D_{lat} diminue abruptement, tel qu'on l'observe à la figure 19 b.

Des commentaires additionnels peuvent supporter ces arguments apparemment spéculatifs. Par exemple, Snik (1983) a montré qu'une hystérèse significative se produit lorsque le DPPC est comprimé continuellement jusqu'au début du collapse, puis décomprimé vers de grandes aires moléculaires. L'isotherme de décompression est déplacée vers les plus faibles valeurs d'aires moléculaires (fig. 23).

Ceci est précisément le comportement attendu si les molécules du lipides se déshydratent appréciablement lors de la compression et qu'elles se réhydratent seulement partiellement lors de la décompression, étant donnée la lente cinétique de ce processus. Aussi, on s'attendrait, suivant des considérations thermodynamiques et pour une aire moléculaire donnée, que la tension de surface d'un film pleinement hydraté est plus faible (donc la pression de surface π , plus élevée) que la pression correspondante d'un film moins hydraté, et, que cet effet est plus important dans la phase LC. C'est en effet la situation qui prévaut expérimentalement (fig. 18), les pressions de

surface pour l'addition successive de lipides étant inférieures à celles de la monocouche comprimée en continu.

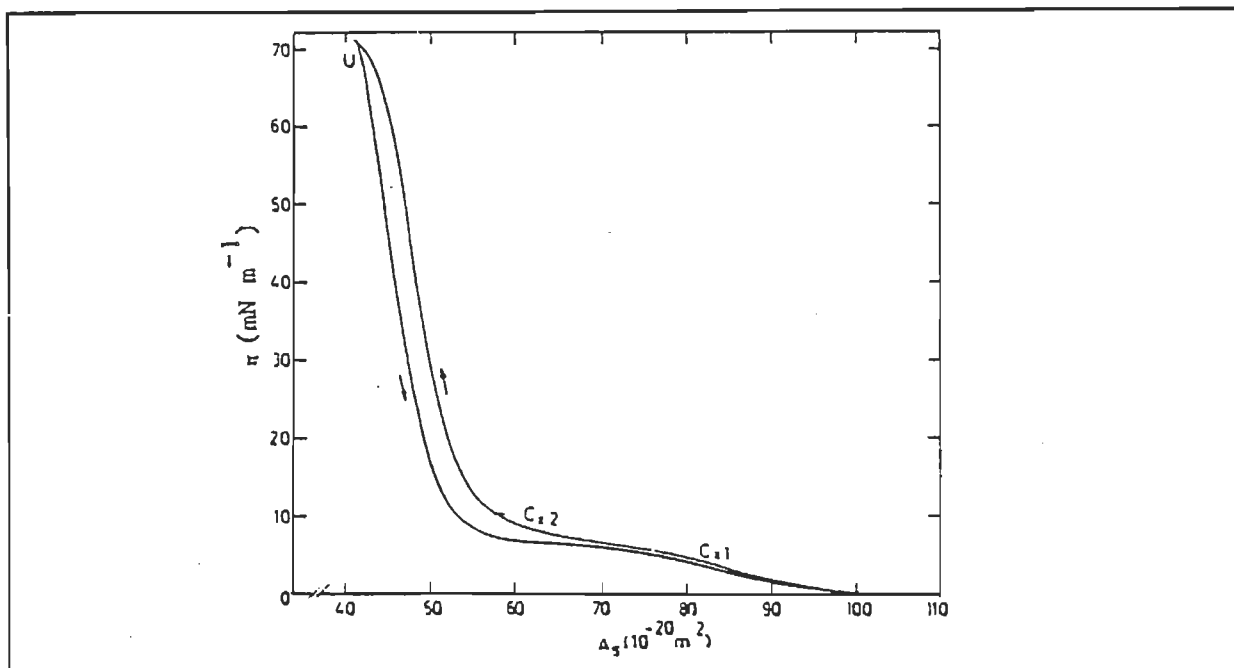


Figure 23 :

Isothermes de pression de surface du DPPC soumis à une compression et une décompression continue (tirée de Snik, (1983))

Cette conception nous permet aussi de rationaliser les résultats des isothermes de pression de surface et de diffusion latérale du DPPC sur NaCl 1,0 M (fig.20). Dans ce cas, la transition diffusionnelle (et donc la phase LC) est maintenant présente entre 0,64 et 0,56 nm²·molécule⁻¹ comparativement à 0,58 et 0,48 nm²·molécule⁻¹ dans le cas du NaCl 0,1 M en compression continue. Cet effet d'expansion de la monocouche sur une sous phase de plus haute force ionique a déjà été observé (Cadenhead et coll., (1967)). Il a été montré par des études de R.M.N. (Lindblom et coll., (1974)) que l'hydratation des têtes polaires des molécules de DPPC augmente dans des milieux de haute force ionique. Comme l'a mentionné Yeagle (1978), à

mesure que la concentration en sel augmente les interactions moléculaires entre les têtes polaires sont réduites et davantage de molécules d'eau peuvent se lier. Le volume d'une tête polaire augmente donc à mesure que davantage de molécules d'eau sont liées et l'on peut s'attendre à ce que l'encombrement stérique se produit à une aire moléculaire plus élevée, tel qu'on l'observe expérimentalement. Encore suivant des considérations thermodynamiques, on s'attendrait à ce que la tension de surface diminue dans de telles circonstances et, en effet, c'est ce qu'on trouve expérimentalement. Par exemple, la transition LE / LC dans le cas du NaCl 1,0 M se produit à des pressions de surface nettement plus élevées que pour le cas du NaCl 0,1 M (voir isothermes des figures 18 (trait plein) et 20 a).

En plus de la réorganisation structurale des têtes polaires à laquelle on a référé jusqu'ici, nos mesures de fluorescence révèlent aussi une réorganisation structurale des chaînes hydrocarbonées des molécules du lipide. La fig. 21 montre clairement que la constante de dimérisation de la sonde atteint un minimum au point précis du début de la phase LC et ce, dans les diverses situations expérimentales, c.-à-d., à $0,64 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ avec le NaCl 1,0 M (courbe a), à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ avec le NaCl 0,1 M (courbe b) et à $0,52 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ pour l'addition successive de lipide avec le NaCl 0,1 M (courbe c). En fait, en accord avec les lois chimiques des réactions de dimérisation dans les milieux homogènes, on s'attendrait à une relation de proportionnalité directe entre la réaction de dimérisation, K_d , et le coefficient de diffusion. Au contraire, on observe au début de la phase LC (c.-à-d., lorsque D_{lat} commence à diminuer), que K_d commence à augmenter. En fait, ce comportement de K_d reflète le fait que les

microdomaines de sondes sont sensibles à la structure du milieu environnant. Dans ce cas, puisque l'intensité de fluorescence ne dépend pas du degré de compression du film dans toutes les conditions expérimentales utilisées, les changements de K_d sont strictement parallèles à ceux de la constante de dimérisation structurale, K_{ds} (Teissié et coll., (1978)). Dans la phase fluide, K_d diminue jusqu'à une valeur minimale au début de la phase LC, qui reflète la désorganisation du milieu lipidique de la monocouche lors de la transition LE / LC, le film étant de nature biphasique. Pour le début de la phase LC et pour les aires moléculaires plus faibles, les microdomaines sont possiblement confinés dans un environnement plus rigide, les chaînes aliphatiques étant dans ce cas davantage dans une configuration tout-trans, plutôt que plus désordonnée (conformères gauches) comme dans la phase LE (Mitchell et Dluhy, (1986)). Cet environnement plus rigide doit favoriser la réaction de dimérisation, la conformation des noyaux anthroyl étant dans une configuration leur permettant de dimériser avec plus d'efficacité, si bien que K_d se met alors à augmenter.

4.8 Conclusion

Nous avons montré que la phase LC est caractérisée par la disparition progressive des régions hautement fluides à l'intérieur du film de DPPC. Par l'effet du mode de compression et de la force ionique de la sous-phase, nous montrons que la chute diffusionnelle est une caractéristique de l'état liquide-condensé des films lors de leur transformation liquide / solide. A l'aide des résultats disponibles dans la littérature on obtient aussi que cette réduction significative de la diffusion latérale des lipides à l'interface air / solution est associée à une

réorganisation structurale à la fois de leur région polaire et aliphatique. On montre, en particulier, que l'encombrement stérique entre les têtes polaires hydratées des molécules de lipide est particulièrement important pour les aires moléculaires inférieures à celles du début de la phase LC pure, alors que les chaînes aliphatiques adoptent progressivement une configuration tout-trans.

CHAPITRE V

LA NATURE DE LA TRANSFORMATION LIQUIDE / SOLIDE DES FILMS DE DPPC

5.1 Introduction

Malgré le nombre important de résultats et de modèles qui portent sur la transition de phase liquide-expansé / liquide-condensé des lipides en couche monomoléculaire, cette transition de phase demeure la source de nombreuses controverses. Les travaux de recherche se sont portés plus particulièrement sur le degré d'ordre de cette transition de phase, sur les arrangements moléculaires des diverses phases, sur les forces impliquées et sur la métastabilité du film interfacial. Ainsi, il n'est pas encore très clairement établi si cette transition de phase est un processus purement du premier ordre. En effet, comme nous l'avons présenté dans l'introduction, une transition du premier ordre doit montrer une coupure horizontale de l'isotherme avec des changements brusques de la pente à ses deux extrémités. Par contre, la transition LE / LC, présentée schématiquement à

la figure 3, montre un point de cassure bien défini (à π_t) à la fin de la phase LE (Cadenhead et coll., (1980)), une portion variable linéaire mais non horizontale (Albrecht et coll., (1978)) et une approche "ronde" de la phase LC avec un second point de cassure, à π_s , caractéristique de la transition LC / SC de l'isotherme de pression de surface.

Pour mieux connaître la nature des transitions de phase qui se produisent dans ces systèmes, il convient de rappeler quelles sont les caractéristiques générales des changements d'état des films de surface.

5.2 Comportement idéal des changements d'état dans les films de surface

En fait, comme on l'a présenté dans l'introduction, la classification thermodynamique d'Ehrenfest (Dervichian, (1939)) sur les transformations des phases peut être étendue aux films monomoléculaires. En prenant la température et la pression comme des variables indépendantes, le degré d'ordre des transformations est déterminé par les dérivées successives du potentiel thermodynamique de Gibbs, G , (ou du potentiel chimique de surface (μ^s)) par rapport à la pression de surface du film, π . Rappelons donc que:

$$(i) (\partial \mu^s / \partial \pi)_T = A$$

$$(ii) (\partial^2 \mu^s / \partial^2 \pi)_T = \partial A / \partial \pi$$

$$\text{où } (\partial A / \partial \pi)_T = - A C_s,$$

A étant l'aire par molécule et C_s , la compressibilité latérale du film monomoléculaire. On obtient qu'un changement d'état par compression ou expansion est une transformation du premier ordre lorsqu'il y a une discontinuité de l'aire moléculaire, A . Par exemple, lors de la transition

gaz / liquide (condensé ou expansé), la pression de surface garde une valeur constante de π_v (pression de vapeur de surface), tout le long de la réduction de l'aire de surface (Gershfeld et Pagano, (1972)). Quand il y a une variation soudaine de la compressibilité latérale, C_s , sans discontinuité de A , on observe une transition du second ordre (Albrecht et coll., (1978)). Ces définitions ne présument, bien sûr, d'aucun mécanisme moléculaire de la transformation.

En fait, il est établi depuis longtemps que la courbe de l'isotherme de pression de surface est idéalement horizontale lors des changements d'état tels que la liquéfaction, la vaporisation et la sublimation (tous trois en 2 dimensions) (Dervichian, (1939)). Ce comportement correspond à une zone de "non mélange" c'est à dire un équilibre entre deux phases immiscibles. Puisque les isothermes qui nous intéressent sont formées d'un seul constituant (le DPPC), cet équilibre s'établit entre deux états (ou formes) moléculaires immiscibles du DPPC. La figure 24 présente une isotherme de pression de surface idéalisée dans laquelle la zone de transition LE / LC est horizontale.

Examinons le mécanisme moléculaire d'une telle transition du premier ordre. Par la compression latérale, les molécules atteignent la position 'A' où chaque molécule occupe l'aire A_{LE} .

Si on comprime le film légèrement, l'aire d'occupation de chaque molécule ne devient pas $A_{LE} - dA$. En effet, la plupart des molécules retiennent leur aire moléculaire A_{LE} tandis que certaines autres passent

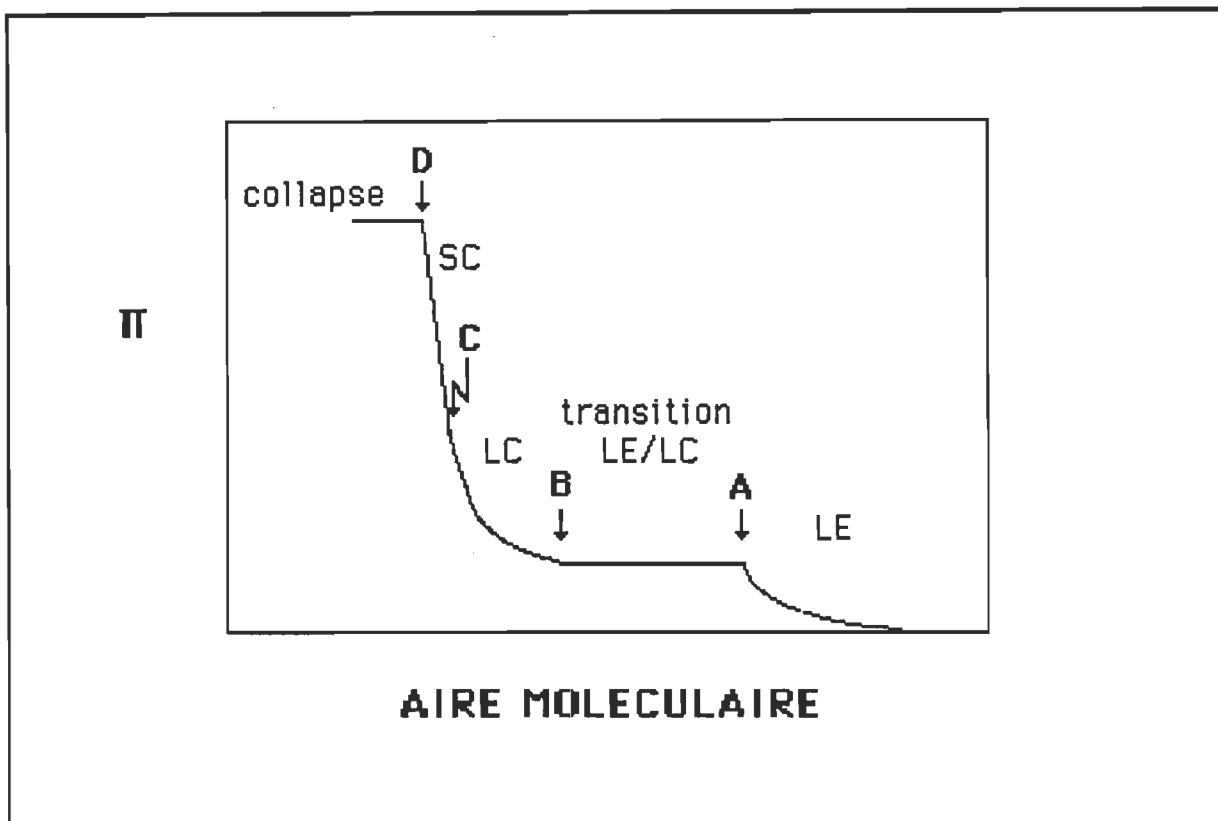


Figure 24 :
Isotherme de pression de surface idéalisée

(sautent) soudainement à une aire moléculaire A_{LC} et se regroupent en une nouvelle phase, la phase LC. L'apparition de cette phase réduit de un les degrés de liberté du système, il en résulte une pression constante durant la compression. Lorsque le film passe de la position 'A' vers la position 'B', le nombre de molécules passant de l'aire A_{LE} à l'aire A_{LC} augmente pour occuper, à la position 'B', une aire unique, A_{LC} . Nous nous retrouvons en présence d'une phase unique et le nombre de degrés de liberté du film retrouve sa valeur initiale. Qu'une transformation soit du premier ordre et non pas d'ordre plus élevé peut donc être prouvée par la présence simultanée de ces deux phases lors de la transition.

La portion 'C' à 'D' de l'isotherme de la figure 24 reflète un

comportement qui diffère de la portion 'A' à 'B'. Lorsque le film est au point 'C', toutes les molécules occupent une aire A_{SC} . En comprimant le film de 'C' à 'D', les molécules passent soudainement, mais certaines après d'autres, à une aire A_C (Aire au collapse, position 'D'). Quand la position 'D' est atteinte, toutes les molécules occupent une aire A_C . Étant donné la miscibilité complète de ces deux états moléculaires d'aires A_{SC} et A_C , une nouvelle phase macroscopique distincte n'apparaît pas. Les degrés de liberté du système ne changent pas et l'horizontalité de l'isotherme est absente.

Les considérations précédentes ont originalement été établies par Joly (1950) qui les a formulées par les postulats généraux suivants. Les molécules d'une monocouche ne peuvent exister que dans un nombre restreint d'états d'équilibres stables correspondant à une série discontinue d'états énergétiques, et peuvent donc occuper une série d'aires moléculaires discrètes qui correspondent aux points de transformations des différents ordres. Ces points de transformation apparaissent comme les points discrets des isothermes et correspondent à un film formé de molécules identiques c.-à-d. d'un seul état moléculaire. Les autres points d'une isotherme correspondent à un mélange de deux états moléculaires voisins.

5.3 Comportement réel des changements d'état dans les films de surface

Il a clairement été montré, par des études de microscopie de fluorescence du DPPC en monocouche, que la région de transition de phase LE / LC est de nature hétérogène (Lösche et coll., (1983), Peters et Beck, (1983), et Neuman et coll., (1984)). Ceci semble appuyer l'interprétation qu'une transition du premier ordre se produit à la transition LE / LC. Ainsi, par

analogie à la transition du premier ordre dans la matière à trois dimensions, l'épaulement à π_t (fig. 3) situé au début de la transition de phase LE / LC des isothermes π vs A , est alors considéré comme le lieu initial de la transformation d'une phase de faible densité de surface, la phase LE, à une phase plus dense, la phase LC. Cependant, les domaines observés (en compression lente) ont une dimension de 10 μm de diamètre (Lösche et Mohwald, (1984)), alors qu'une transition non horizontale nécessite de beaucoup plus petits domaines d'environ 100 molécules (Cadenhead, (1985), et Albrecht et coll., (1978)). Cadenhead propose tout de même que la pente non nulle de la transition LE / LC réelle résulte de la formation de domaines microscopiques et non pas macroscopiques (Cadenhead et coll., (1980), et Cadenhead, (1977)) et soutient que cette transition est du premier ordre diffus.

Par ailleurs, on a prétendu que la pente non nulle de cette région intermédiaire (transition LE / LC) dans l'isotherme de pression de surface résultait de l'influence des têtes polaires sur la tension de surface de l'eau (Scott, (1975)), d'une compression trop rapide (Nagle, (1980)) ou de la présence d'impuretés (Marcelja, (1974)). Cependant, Cadenhead a clairement établi qu'une compression même très lente ne détermine pas une pente horizontale de la transition de phase LE / LC dans l'isotherme de pression de surface (Cadenhead et coll., (1980)). Aussi, des travaux plus récents de Bois et coll. (1984) montrent, sur des échantillons très purs d'acide palmitique, que la non horizontalité persiste même après que toute la relaxation ait eu lieu. Plus récemment, Pallas et Péthica (1985) ont observé que la transition LE / LC peut être horizontale pour le DPPC "ultrapur" lorsqu'on le comprime par des

dépôts successifs du lipide à la surface, c.-à-d. sans barrière de compression. Toutefois, même dans cette étude, la région des faibles valeurs d'aires moléculaires, à la fin de la transition de phase LE / LC, ne montre pas de cassure brusque telle que requis lors d'une transition du premier ordre.

Les films interfaciaux qui sont étalés avec des solvants apparaissent, pour certains, comme métastables ou instables puisque ce genre de film peut être comprimé à des pressions de surface beaucoup plus élevées que celles qui peuvent être atteintes lorsque le film est formé par le dépôt de lipide cristallin sur la surface aqueuse (pression d'équilibre d'étalement, E.S.P., $< 0,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) ou formé par adsorption des lipides présents dans la sous-phase (Horn et Gershfeld, (1977), et Jatal et Zografi, (1979)). Gershfeld a ainsi suggéré que la transition LE / LC se produit uniquement à cause de la lente cinétique de transformation de la phase LE superficielle à une phase lipidique tridimensionnelle c.-à-d. cinétique de collapse lente (Gershfeld, (1982)). Cependant, aucune relaxation n'a lieu sur des périodes de plusieurs heures lorsque le film est dans l'état LE, et seulement une très faible relaxation ($\sim 1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) se produit dans la région de transition LE / LC (Cadenhead, (1985)).

Ces observations ont amené certains auteurs à proposer sur des bases théoriques que la transition LE / LC du DPPC soit du type 'deuxième ordre' (Baret et coll., (1982)). C'est originalement Lifschitz, suivi de Landau, qui ont considéré que des transformations dans les monocouches peuvent résulter d'un changement du degré de symétrie du réseau que forment les molécules du film (ordre positionnel) ou d'un changement du degré de symétrie des

molécules elles-mêmes (ordre orientationnel) (Joly, (1950)). Suivant ces auteurs, Joly (1950) rapporte que si la déformabilité des molécules est négligée, il ne peut se produire des transformations de degré plus élevé que deux dans les monocouches. Ainsi, il conclut qu'aux degrés de transformation plus élevés que deux, ce n'est pas uniquement l'ordre dans le film et la symétrie des molécules qui changent, mais la forme de la molécule elle-même (conformère).

Ainsi, une transition LE / LC du second ordre du DPPC en monocouche, proviendrait d'une transition conformationnelle des molécules (Cadenhead, (1977)), ou plus particulièrement d'une brisure de la symétrie rotationnelle du système (Albrecht et coll., (1978), et Baret et coll., (1982)). Ce phénomène donnerait naissance à une direction privilégiée des molécules du film dans le plan de l'interface (phase nématique bidimensionnelle). On aurait donc à π_t une transition de phase isotropique / nématique (anisotrope) du second ordre lors de la transition LE / LC dans une monocouche.

Nous avons donc entrepris une étude plus détaillée des phénomènes qui se produisent durant la transformation liquide / solide des films de DPPC comprimés. Par l'utilisation de lumière incidente linéairement polarisée appliquée à la photodimérisation de la sonde, on obtient des informations sur les changements d'orientation de la sonde à l'interface air / eau. Ce sont en effet, les rapports des constantes de vitesse de dimérisation de la sonde qui permettront d'obtenir ces renseignements (voir Teissié, (1979), Theretz et coll., (1984), et chapitre II).

5.4 Processus d'orientation lors de la transformation liquide / solide des films de DPPC

Nous présentons à la figure 25 le rapport des constantes de dimérisation de la sonde (12-9-AS), incorporée dans un film de DPPC, obtenu lorsqu'on utilise une lumière incidente linéairement polarisée. On observe sur la figure 25 que le rapport des constantes de dimérisation obtenu suivant les deux orientations de la lumière polarisée varie de façon complexe lors la compression de la monocouche de DPPC déposée et comprimée sur la solution de NaCl 0,1 M.

En effet, le rapport K_{dx} / K_{dyz} diminue le long de la transition LE / LC pour atteindre un premier minimum au début de la phase LC pure à 0,58 nm².molécule⁻¹. Lorsqu'on comprime légèrement le film, à partir de cette position, la valeur du paramètre d'orientation change abruptement. Elle reprend une valeur élevée équivalente à celle mesurée dans la phase LE.

A l'intérieur de la phase LC, le rapport des constantes de vitesse de dimérisation diminue à nouveau et atteint un second minimum à la fin de cette phase, soit à 0,48 nm².molécule⁻¹. La valeur du rapport s'élève immédiatement en entrant dans l'état SC. Ces changements complexes du paramètre d'orientation ont été systématiquement observés durant les expériences.

Ces résultats nous indiquent la présence de trois régions particulières de configurations orientationnelles des microdomaines de la sonde. Comme nous l'avons présenté au chapitre II (Méthodes expérimen-

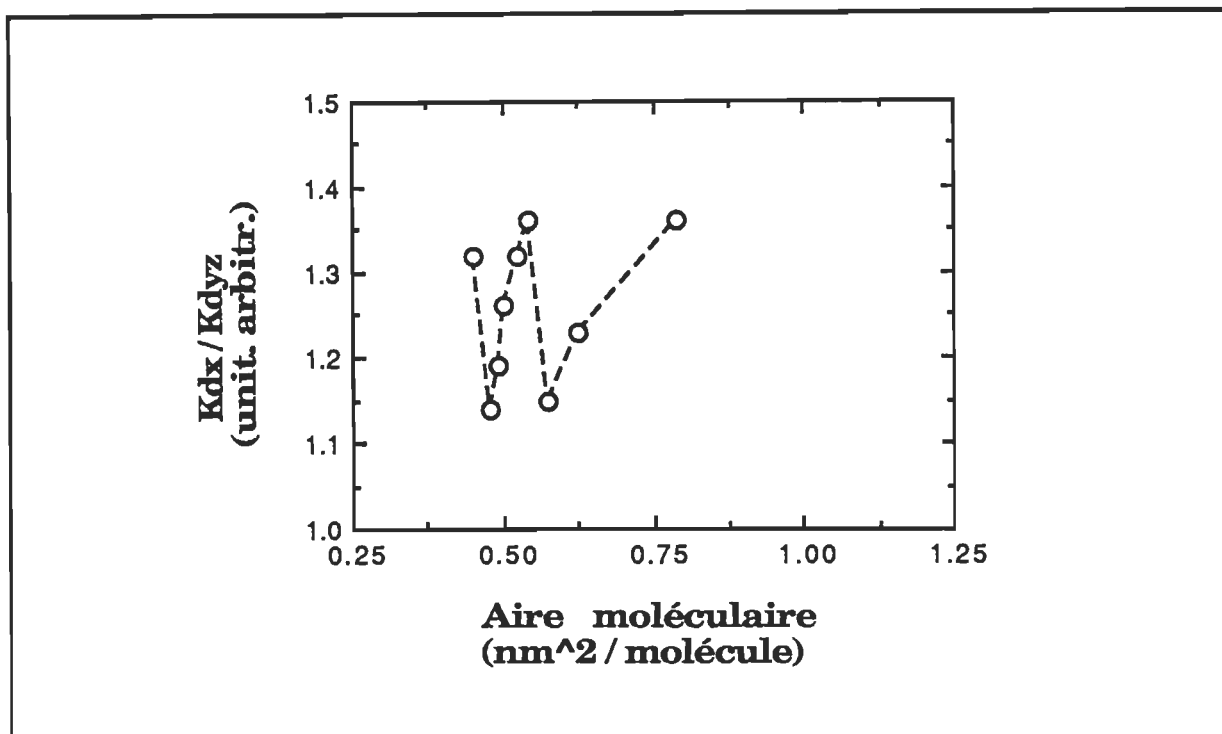


Figure 25 :

Rapport des constantes de dimérisation suivant le plan de polarisation de la lumière incidente en fonction de l'aire moléculaire du DPPC. $T=21 \pm 1^\circ\text{C}$. Sous-phase : NaCl 0,1 M

tales), le rapport K_{dx} / K_{dzy} est relié aux configurations orientationnelles des microdomaines de sondes. En effet, l'orientation des sondes varie progressivement à l'intérieur de la phase LC et le long de la transition LE / LC. Les transitions orientationnelles, qui sont très abruptes, se produisent aux aires moléculaires précisément liées aux changements de phase du film lipidique, soit à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ où se produit la transition LC / SC et à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ à la fin de la transition LE / LC (voir chapitre IV).

5.4.1 Les brisures de symétrie rotationnelle

Ces événements montrent que deux brisures de symétrie rotationnelle du film de DPPC se sont produites. La première survient lors

de la transformation liquide-condensé / solide-condensé (à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) et elle appuie l'hypothèse qu'une transformation du second ordre se produit dans cette région (Albrecht et coll., (1978)). La seconde brisure de la symétrie rotationnelle (à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) se produit à l'entrée de la phase LC pure, soit à la fin de la transition liquide-expansé / liquide-condensé du DPPC en monocouche. Il n'y a cependant aucune brisure de symétrie rotationnelle au début de la transition LE / LC.

La brisure de la symétrie rotationnelle qui se produit à l'entrée de la phase LC pure ($0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) peut résulter d'une transformation d'ordre deux ou d'un ordre supérieur à deux. Il est difficile de concilier le fait que la phase LC puisse être impliquée dans une transformation de premier ordre et d'un ordre supérieur à la fois. Pour interpréter davantage les mécanismes qui se produisent, il faut déterminer plus précisément quelles sont les phases qui sont impliquées dans la transition LE / LC linéaire et non horizontale et le changement de symétrie rotationnelle du système à la phase LC.

5.5 Les aires moléculaires caractéristiques des phases

Puisque la transition dite LE / LC ne se comporte pas idéalement, il apparaît évident que cette transition ne met pas simplement en présence un mélange immiscible de la phase LE et de la phase LC. Il nous faut donc déterminer quelle est la nature et quelles sont les aires moléculaires qui caractérisent les phases qui sont impliquées lors de cette transformation linéaire en pseudo-plateau.

La microscopie de fluorescence a permis d'établir une mesure du degré de cristallisation (\emptyset) en fonction de l'aire moléculaire d'un film de DPPC comprimé de façon isotherme (Heckl et coll., (1987)). Le degré de cristallisation, \emptyset , est déterminé par le rapport des surfaces sombres (phases sans molécule de sonde, soit les phases condensées) sur le total de l'aire de la micrographie : S. On a ainsi que,

$$\emptyset = 1 - (1 - S) A / A_f$$

où A est l'aire moléculaire moyenne et A_f est l'aire moléculaire de l'état fluide (liquide) à la pression π_t , au début de la transition LE / LC.

On note sur la figure 26 que \emptyset dépend linéairement de l'aire A quand on augmente la pression de surface au-dessus de π_t . Cette région linéaire peut être interprétée comme résultant de la coexistence de deux phases dont les aires moléculaires sont de $0,74 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ (A_f) et, $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ (A_{sc}). Ce sont les aires moléculaires du début de la transition de phase (π_t) et l'aire moléculaire obtenue de l'extrapolation de la cristallisation jusqu'à 100% (c.-à-d., $\emptyset = 1,0$). La phase fluide LE de la transition en pseudo-plateau est donc caractérisée par une aire de $0,74 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$. Comme on l'a déjà mentionné, à cette aire moléculaire, on a un point singulier c.-à-d., la présence d'un seul état moléculaire. De son côté, $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ caractérise l'aire de la phase solide-condensé, SC. C'est aussi un point singulier. Lorsque 75% de la cristallisation est atteinte lors de la transformation liquide / solide, la relation linéaire \emptyset vs A change de pente et la cristallisation, \emptyset , s'ajuste maintenant à la coexistence de deux

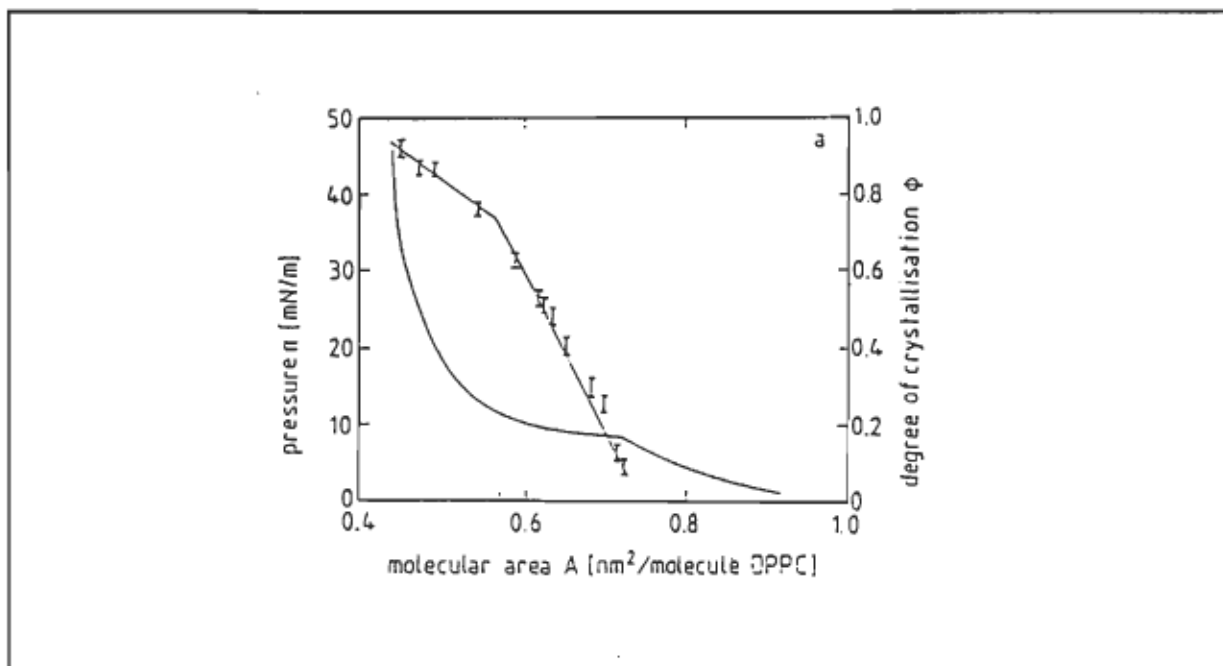


Figure 26 :

Isothermes de pression de surface et du degré de cristallisation en fonction de l'aire moléculaire du DPPC à l'interface air / NaCl 0,1 M (tirée de Heckl et coll., (1987))

nouvelles phases. Les aires moléculaires qui les caractérisent sont de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ au début de la brisure ϕ vs A et $0,42 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ lorsque la cristallisation atteint 100%. Il faut noter cependant qu'il n'y a pas de cassure intermédiaire lors de cette coexistence de phases. La nouvelle phase condensée est caractérisée par une aire de $0,42 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$; elle correspond à l'aire de collapse du film, soit l'aire du film solide présentée par Dervichian (1982). L'aire qui caractérise le début de la phase LC est de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$.

L'aire moléculaire A_{SC} ($0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) est plus grande que ce à quoi on s'attend de la phase lipidique solide (collapse) telle que déduite des isothermes de pression de surface ($A_{\text{collapse}} = 0,42 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$). Ceci indique une différence de densité de la phase condensée à différentes

pressions. La déviation de la relation \emptyset vs A observée à $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ et $0,58 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$ est donc possiblement le résultat d'un changement structural de la phase condensée.

Ainsi, la transition dite LE / LC semble impliquer le passage des molécules de l'état moléculaire d'aire A_{LE} (A_{fl}) (phase LE) à l'état moléculaire d'aire A_{SC} (phase SC) avec la formation d'un état moléculaire intermédiaire caractérisé par une aire A_{LC} (phase LC) dont la présence est signalée par la cassure de la courbe \emptyset vs A. La présence de cet état moléculaire d'aire A_{LC} peut expliquer la miscibilité apparente des deux autres phases, et par là, la non horizontalité de la transition.

En effet, il est possible de réconcilier la non horizontalité de la transition et l'observation de sa nature biphasique si cet état moléculaire d'aire A_{LC} joue le rôle d'agent de miscibilité aux interfaces entre les deux phases: fluide (LE) et les domaines de phase solide (SC). La figure 27 illustre cet arrangement des phases à l'interface air / eau.

Ainsi, la présence de domaines solides macroscopiques ($\sim 10\mu\text{m}$) observés en microscopie de fluorescence lors de la transition LE / LC signalée plus haut, peut être attribuée au fait que la sonde est exclue à la fois des domaines hautement condensés d'aire A_{SC} et des régions de lipides interfaciaux qui les encerclent, d'aire A_{LC} .

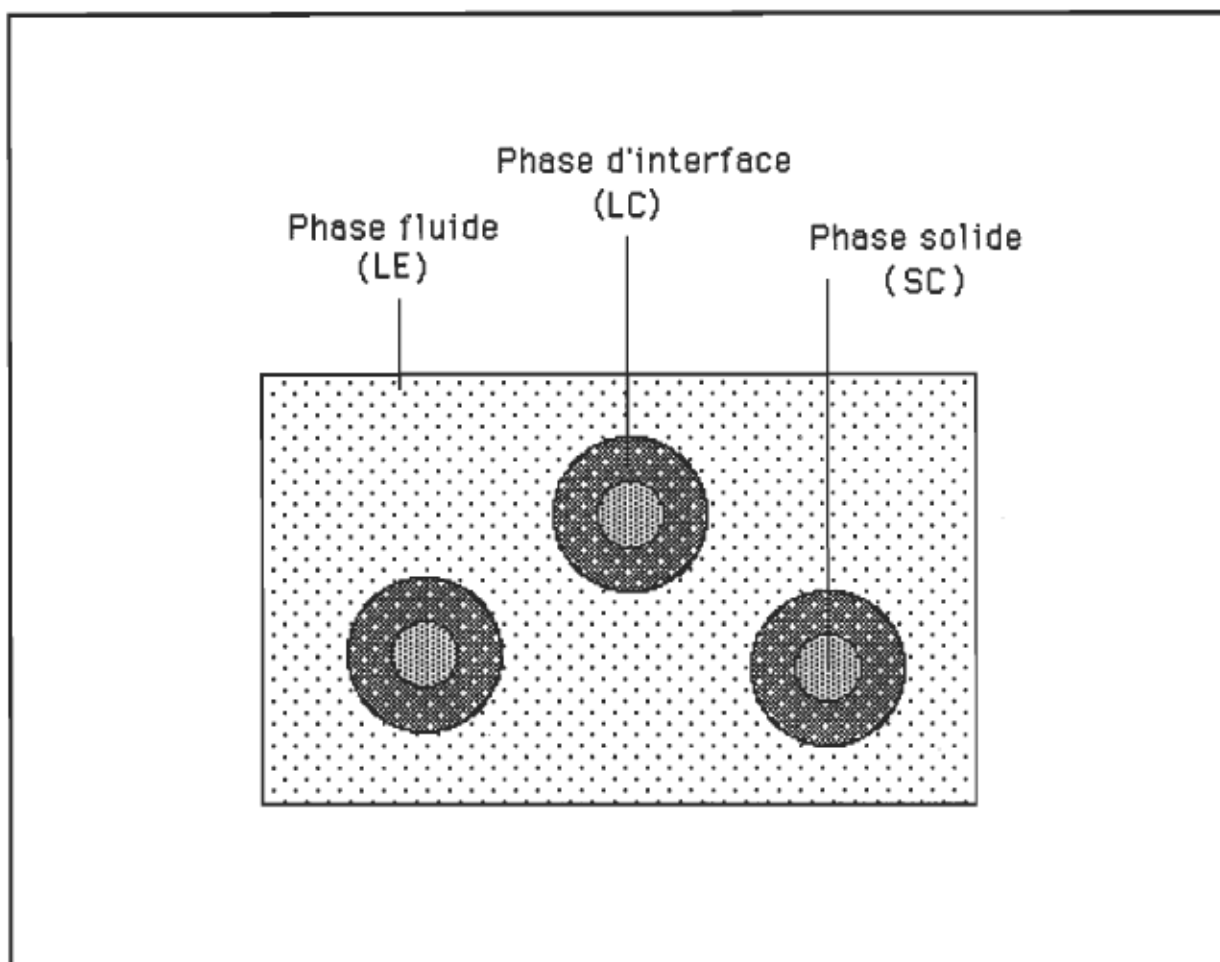


Figure 27 :

Schéma de l'organisation latérale des lipides interfaciaux (LC) formant l'interface entre la phase fluide (LE) et la phase solide (SC)

Il subsiste cependant une contradiction, l'aire moléculaire de la déviation \emptyset vs A, à $0,58 \text{ nm}^2$, se présente à la fois comme une aire moyenne où il y a la présence de trois phases (LE, LC et SC) et elle se présente aussi comme l'aire moléculaire caractéristique (un point discret formé d'un seul état moléculaire) d'une phase pure. Nous verrons plus loin qu'il n'y a en fait aucune contradiction et qu'à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ le film présente réellement ce double aspect de phase unique et de rencontre de trois phases.

5.5.1 Les lipides interfaciaux

On propose ainsi que la région de transition de phase observée sur l'isotherme de pression de surface du DPPC résulte d'une transformation globale LE / LC / SC. Trois types de domaines lipidiques existent donc, ce sont les phases solides (SC), le région fluide (LE) et le domaine des lipides "interfaciaux" qui forment la région qui juxtapose les phases solides et fluides (SC et LE), soit la phase LC (fig. 27).

L'existence de cette zone intermédiaire entre les lipides solides et fluides du film tout au long de la transformation liquide / solide est appuyée par les lois de la cinétique chimique. En effet, Cohen et Turnbull (1959) ont montré qu'une très grande fraction des molécules (5-10%) est toujours en "état activé" (état intermédiaire d'énergie d'activation très élevé lors de la transformation liquide / solide). Aussi, en accord avec les lois de la cinétique chimique, la phase LC (phase interfaciale) aura l'énergie libre la plus élevée des phases LE et SC. Ceci provient de sa position d'interface frontière entre les domaines ordonnées (phase SC) et les régions fluides (phase LE). L'énergie libre associée aux différents états LE, SC et LC provient : de l'isomérisation rotationnelle des liaisons C-C; des interactions de Van der Waals entre chaînes hydrocarbonées des molécules adjacentes; des interactions électrostatiques entre les régions des têtes polaires adjacentes et de la mobilité moléculaire d'ensemble exhibée par les chaînes.

Les lois de la cinétique chimique prévoient aussi que la coalescence des constituants d'un système lors de la transition liquide / solide augmente l'énergie potentielle du système en utilisant l'énergie cinétique de ses

constituants de sorte que l'état de transition (ou l'état activé) est atteint (Hendrickson et coll., (1970)). Comme on l'a déjà montré, l'état LC caractérise cet état de transition et la chute diffusionnelle présentée au chapitre précédent reflète l'utilisation de l'énergie cinétique microscopique du système pour atteindre la phase LC et accomplir la transition vers l'état solide.

5.6 Modèle structural de la transformation de la monocouche

L'existence des lipides interfaciaux a aussi été proposée dans un modèle structural de la transition de phase dans les structures bilipidiques (Houslay et Stanley, (1982) et Marsh et coll., (1976)). Ainsi, de façon similaire à l'approche de la transition de phase des structures bilipidiques à partir des hautes températures (condensation), le phénomène de transformation de phase LE / LC / SC de la monocouche est caractérisé par la formation de domaines ou d'îlots de lipides solides, SC ($A = 0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) dans la phase liquide-expansé, LE, qui est fluide. L'entassement moléculaire de tels domaines est variable selon le désordre de la phase liquide-expansé. A mesure que la transition progresse, le grossissement des domaines lipidiques et leurs agrégations prennent la forme d'un changement coopératif d'une phase lipidique fluide à solide. Cependant, dans les régions périphériques des domaines de phase solide, les lipides seront dans un état non cristallisé qui forment une phase métastable responsable du phénomène d'hystérèse (chapitre précédent).

L'aire moléculaire de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ n'apparaît donc pas comme une aire discrète correspondant à une position où le film de DPPC est

formé d'un nombre unique d'état moléculaire. En effet, à cette aire moléculaire moyenne, le film comporte à la fois les états moléculaires caractéristiques des phases pures SC et LE de même qu'un état moléculaire ayant une aire caractéristique de la phase intermédiaire, la phase LC. On sait cependant que cette dernière possède une aire caractéristique de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$.

Il est possible de concilier ces observations en admettant que le système fluctue entre la présence des trois états moléculaires et un seul état moléculaire à l'aire moyenne de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$. De telles fluctuations, très grandes, se produisent habituellement près d'un point critique, à l'endroit duquel la compressibilité latérale est très élevée. Villalonga (1968) a déjà montré l'augmentation "anormale" de la compressibilité latérale du DPPC qui se produit dans la région de $0,55 - 0,60 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$.

Les fluctuations critiques de l'entassement latéral des lipides du film doivent faciliter l'incorporation dans le film de divers matériaux provenant de la sous-phase puisque des espaces importants apparaissent dans la monocouche. On observe en effet qu'à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$, il y a un maximum d'activité de la phospholipase A2 (Thuren et coll., (1984)), de la pénétration du glucagon et de la mélittine (Hendrickson et coll., (1983)) et une incorporation maximale de la chlorpromazine (Beurer et Galla, (1987)) et du β -naphtol (Cadenhead, (1977)). Ainsi, de façon similaire aux observations réalisées dans les systèmes multibilipidiques (Sackmann, (1983)), des défauts résultant de l'entassement moléculaire défectueux se produisent à cette aire moléculaire moyenne et sont responsables des effets d'incorporation

maximale de plusieurs produits présents dans la sous-phase. Pour expliquer ce phénomène, une fluctuation "critique" de la densité dans la région de l'interface a été proposée (Nagle et Scott, (1978)).

La région de courbure de l'isotherme de pression de surface possède donc les propriétés d'une phase unique dont l'aire caractéristique au début de la courbure est de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$. Nous avons déjà montré qu'à 75% de la cristallisation, la relation linéaire de \emptyset vs A correspond à la coexistence de deux phases dont les aires moléculaires caractéristiques sont de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ au début de la brisure \emptyset vs A et $0,42 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ lorsque la cristallisation atteint 100%. Il faut noter cependant qu'il n'y a pas de cassure intermédiaire et que la relation de coexistence de phases passe directement par $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ à 90% de cristallisation. Cette dernière caractérise la nouvelle phase condensée qui est formée à la fin de la région LC. Entre le début et la fin de la région LC, l'isotherme de pression de surface est courbe et ne reflète donc pas le mélange plus ou moins idéal de deux phases pures mais plutôt une variation progressive de l'ensemble du film entre ces points. En effet, alors que la viscosité de surface augmente linéairement dans la zone de transition LE / LC et dans la zone SC, elle varie progressivement dans la région LC (Vilallonga, (1968), et Hard et Neuman, (1981)). Les investigations par IR-FT (Infra-Rouge Transformée de Fourier) du DPPC à l'interface nous indiquent elles aussi qu'il y a une variation progressive du film dans la région LC. En effet, la conformation des chaînes hydrocarbonnées du DPPC dans la région $0,59 - 0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ varie progressivement dans l'intermédiaire entre une organisation tout-trans propre à la phase SC et l'organisation plus désordonnée de la région LE

(Mitchell et Dluhy, (1988)).

5.7 Détermination du point critique du DPPC en monocouche

On peut retrouver l'existence d'une phase ayant un état moléculaire unique à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ en examinant deux comportements différents dans les isothermes de pression de surface du DPPC réalisées à diverses températures. En effet, la variation de l'aire moléculaire avec la température est connue pour bien révéler des transitions de phase en discontinuités soudaines ou avec des états intermédiaires (Dervichian, (1982)). L'évolution de l'aire moléculaire au début de la transition LE / LC, A_t , suivant la température est donnée à la figure 28 à partir des résultats disponibles dans la littérature.

Ces résultats indiquent que la nature du changement de phase liquide / solide change abruptement à la température de 29°C . On observe aussi sur la figure 28 que l'aire moléculaire où se produit ce changement de phase est de $0,58 - 0,59 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$. Nous avons donc un changement de phase à $0,58 - 0,59 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ et 29°C . Nous reviendrons plus loin sur la nature de ce changement de phase. Notons ici que ce changement de phase se produit à $0,64 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ pour les résultats de Albrecht et coll. (1978). Leurs résultats n'apparaissent pas à la figure 28.

L'existence d'une phase ayant un état moléculaire unique à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ peut aussi être obtenue du comportement des isothermes de pression de surface du DPPC réalisées aux basses températures. Ainsi, la figure 29 présente les isothermes de pression de surface du DPPC à

différentes températures et sont tirées d'une publication de Hui et coll. (1975).

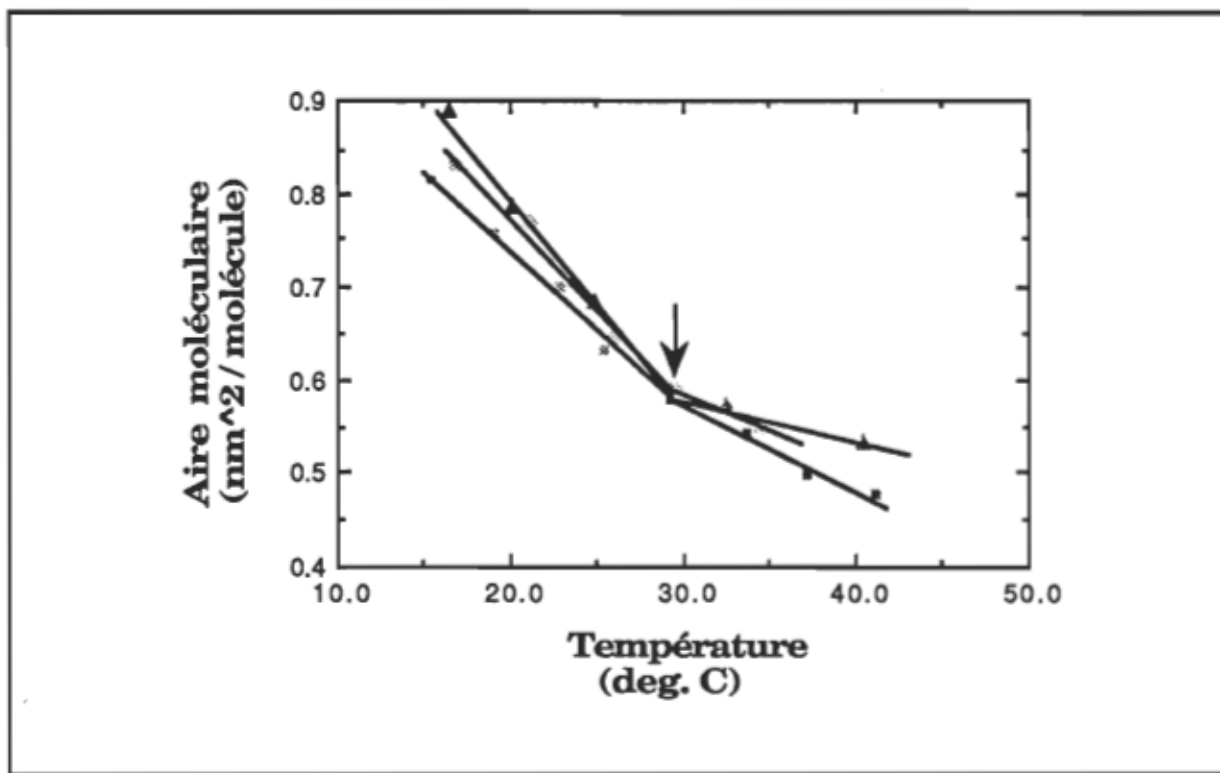


Figure 28 :

Évolution de l'aire moléculaire au début de la transition LE / LC (A_t) en fonction de la température. (carré): Hui et coll., (1975). (rond): Phillips et Chapman, (1968). (triangle): Rice et coll., (1987)

Cette méthode de détermination d'un point critique a été explicitée par Dervichian (1982). Appliquée aux isothermes de DPPC présentées par Hui et coll. (fig. 29), on obtient qu'entre les isothermes 1 et 2, l'aire moléculaire sous pression de vapeur de surface (points de décollement des isothermes) fait un "saut" (région d'expansion) d'une valeur de 0,58 à 0,85 nm²·moléculaire⁻¹. Rappelons que le point de l'isotherme ayant la plus faible pression de surface n'est pas à une aire extrapolée d'une pression de surface de zéro, mais l'aire moléculaire d'une phase solide, liquide-condensé ou liquide-expansé, quand elle est en équilibre avec la phase gazeuse de surface

($\pi < 0,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). Avec ces deux phases de surface en contact (le solide ou le liquide avec la vapeur), l'aire moléculaire est déterminée dans des conditions

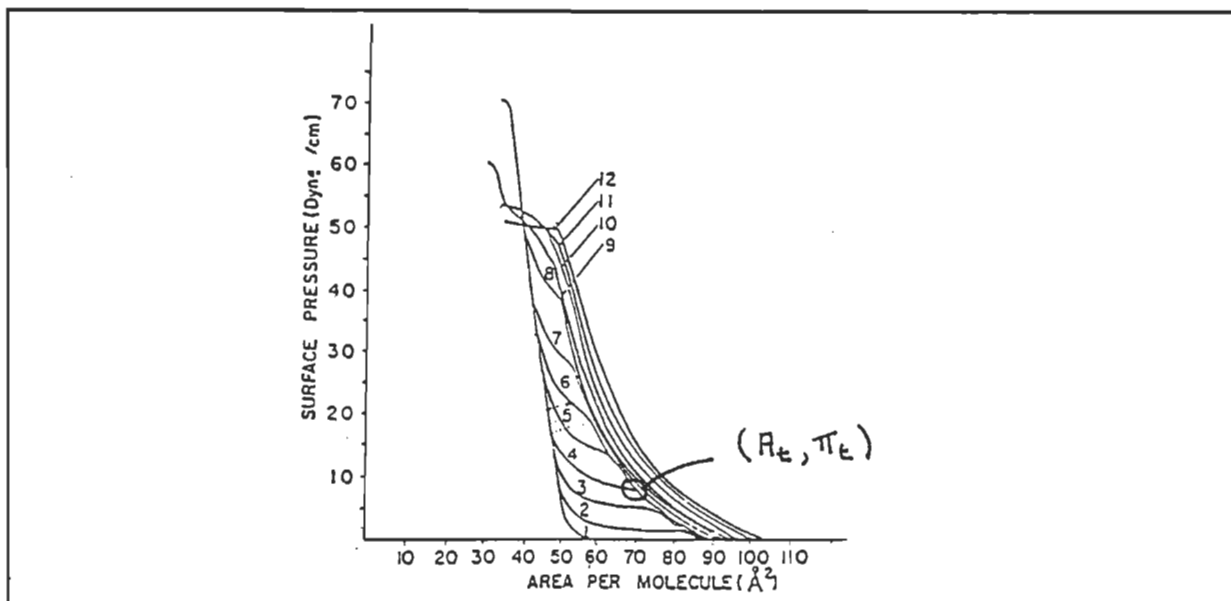


Figure 29 :

Isothermes de pression de surface du DPPC à l'interface air / solution à plusieurs températures: 1: 9,0°C, 2: 15,5°C, 3: 19,0°C, 4: 22,8°C, 5: 25,5°C, 6: 29,2°C, 7: 33,8°C, 8: 37,2°C, 9: 41,1°C, 10: 41,7°C, 11: 42,8°C, 12: 44,0°C (tirée de Hui et coll., (1975)). note : 1dyne/cm = 1 mN/m

d'un seul degré de liberté. Ainsi, à partir de 15,5°C (isotherme 2 et suivantes) une nouvelle phase apparaît entre la vapeur (condensée) et le liquide-condensé de l'isotherme 1 à la pression de vapeur de surface, c'est la phase liquide-expansé. Puisque l'aire moléculaire de décollement de l'isotherme augmente rapidement avec la température dans la région de "saut", les isothermes doivent être faites à des intervalles étroits de température. En référence à très peu de données, la température la plus basse à laquelle l'état liquide-expansé peut être détecté est de 15,5°C (Cadenhead, (1977), et Hui et coll., (1975)) et l'aire moléculaire caractéristique est à $0,58 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$ (Hui et coll., (1975)). Suivant Dervichian (1982), un point critique se produit

donc à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$. Un équilibre à trois phases existe alors entre les phases LE, LC et vapeur-condensée. C'est un point d'invariance sans aucun degré de liberté.

Entre $15,5$ et 29°C (isothermes 2 à 6 de la fig. 29) l'aire de décollement n'augmente plus, puis, au-dessus de 29°C , cette aire augmente plus lentement avec la température. Les résultats de Hui et coll. (1975) indiquent qu'à partir de 29°C , les isothermes de pression de surface montrent une expansivité de la phase prétransitionnelle (phase LE). Ceci indique que les lipides se comportent comme un gaz; c'est un état de vapeur-expansée (VE), qui a déjà été présenté dans les travaux de Adam (1926). La transition LE / LC de l'isotherme 6 et des suivantes prend alors place dans un gaz très concentré (Adam, (1926)). Il ne faut pas confondre cette transformation à la sublimation où la condensation se produit dans un gaz (bidimensionnel) très dilué (Dervichian, (1939)). Au point critique à 29°C , $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ et $18 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, les phases LC, LE et VE sont présentes.

5.8 Températures des transformations de phase du DPPC en monocouche et en bicouche

Au-dessous de $15,5^\circ\text{C}$, en bicouche, les lipides sont peu hydratés ($< 5\%$) mais une forte possibilité de la présence d'états métastables, liés à l'hydratation, a été soulevée (Sackmann, (1983)). En effet, la température de subtransition du DPPC en dispersions bilipidiques est de $15,5^\circ\text{C}$. C'est donc à partir de cette température ($T > 15,5^\circ\text{C}$) que le DPPC en bicouche peut s'hydrater. Au-dessous de $15,5^\circ\text{C}$, en monocouche, il n'y a que les phases condensées (LC et SC) en présence et on observe selon les auteurs de fortes

divergences pour l'aire moléculaire du point de décollement des isothermes réalisées sous cette température (Phillips et Chapmann, (1968), Albrecht et coll., (1978), et Kellner et coll., (1978)). Il est possible que l'hydratation joue ici un rôle déterminant.

À partir de 15,5°C, la phase LE et la transition LE / LC apparaissent en monocouche et l'aire au début de la transition LE / LC (A_t) se présente à des aires moléculaires de plus en plus faibles en suivant l'augmentation de la température. Les points " A_t, π_t " des isothermes 2 à 6 (fig. 29) atteignent des aires moléculaires de plus en plus faibles suivant la température puisque l'eau d'hydratation s'oriente de plus en plus difficilement en s'éloignant de la tête polaire quand la température est plus élevée. L'hydratation, ou l'orientation des 2ième et 3ième couches d'eau liées, est alors levée. La position du point " A_t " est ainsi déplacée vers les plus faibles aires moléculaires car les molécules interagissent (répulsions liées à l'encombrement stérique) sur une moindre portée (plus petite région polaire). L'élévation de la température n'a cependant pas d'impact sur l'effet tensio-actif global des molécules malgré leurs déshydratations puisqu'on observe que les courbes de la région LE se superposent exactement jusqu'à 29°C. Ceci nous indique que les interactions proviennent davantage des chaînes hydrocarbonées et, à ces distances moléculaires, sont attractives.

On note sur la figure 29 que la zone " A_t, π_t " des isothermes 6 à 9 "s'arrondit" fortement et devient difficile à identifier précisément. Aussi, au-dessus de 29°C (isothermes 7 et plus), les isothermes de pression de surface montrent une expansivité de la phase prétransitionnelle (phase LE). Nous

avons montré qu'une nouvelle phase apparaît, c'est la phase vapeur-expansée. C'est la température de prétransition du DPPC en dispersion bilipidique, température où le lipide peut prendre une concentration saturante en eau (20 %; $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$). On observe cependant que le point " A_t " apparaît à une aire moléculaire inférieure à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ lorsque la température excède 29°C . Le lipide se comporte comme s'il était faiblement hydraté ($< 20\%$). Ces résultats sont en accord avec Adam (1926) qui montre que le gaz très concentré de la phase vapeur-expansée se condense lorsqu'il occupe une aire moléculaire plus petite que son aire critique.

A la température de transition principale des systèmes bilipidiques du DPPC ($T_m = 41,4^\circ\text{C}$), la pression de surface maximale atteinte (au collapse) est de $50 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ (isothermes 10 à 12). On obtient une différence de $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ par rapport à la pression de collapse des isothermes réalisées sous T_m ($\pi_c = 70 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) puisque les chaînes ne peuvent se condenser en état tout-trans et contribuer au $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ supplémentaire. A cette haute température, l'aire moléculaire de la phase vapeur-expansée, VE, peut être réduite, sans changement de phase, à une valeur inférieure à celle de l'état liquide-condensé. Ainsi, au-dessus de $41,5^\circ\text{C}$, la monocouche demeure constamment dans l'état vapeur-expansée jusqu'à son point de collapse, où l'aire par molécule du DPPC est de $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ (fig. 29), soit au-dessous la valeur de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ de la phase liquide-condensé sous pression de vapeur de surface.

5.9 Conclusion

Le rapport K_{dx} / K_{dyz} lié aux configurations orientationnelles des microdomaines de la sonde nous indique la présence de trois régions particulières de ces configurations dans les diverses phases du DPPC en monocouche. En effet, l'orientation des sondes varie progressivement à l'intérieur de la phase LC et le long de la transition LC / LE. Les transitions orientationnelles, qui sont très abruptes, se produisent aux aires moléculaires précisément liées aux changements de phase du film lipidique, soit à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ où se produit la transition LC / SC et à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ à la fin de la transition LE / LC. La première survient lors de la transformation liquide-condensé / solide-condensé (à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) et elle appuie l'hypothèse qu'une transformation de second ordre se produit dans cette région (Albrecht et coll., (1978)). La seconde brisure de la symétrie rotationnelle (à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) se produit à l'entrée de la phase LC pure, soit à la fin de la transition liquide-expansé / liquide-condensé du DPPC en monocouche. Cette seconde brisure de la symétrie rotationnelle peut résulter d'une transformation d'ordre deux ou d'un ordre supérieur à deux.

Pour interpréter davantage les mécanismes qui se produisent, nous avons déterminé plus précisément quelles sont les phases qui sont impliquées dans la transition dite LE / LC linéaire et non horizontale et le changement de symétrie rotationnelle du système à l'entrée de la phase LC. Nous avons montré à partir de la courbe du degré de cristallisation en fonction de l'aire moléculaire que la transition dite LE / LC du DPPC semble plutôt impliquer le passage des molécules de l'état moléculaire d'aire A_{LE}

(A_{fl}) (phase LE) à l'état moléculaire d'aire A_{SC} (phase SC) avec la formation d'un état moléculaire intermédiaire caractérisé par une aire A_{LC} (phase LC). La présence de cet état moléculaire d'aire A_{LC} peut expliquer la miscibilité apparente des deux autres phases, et par là, la non horizontalité de la transition. Ainsi, la présence de domaines solides macroscopiques (~10 μm) observés en microscopie de fluorescence lors de la transition LE / LC peut être attribuée au fait que la sonde est exclue à la fois des domaines hautement condensés d'aire A_{SC} et des régions de lipides interfaciaux qui les encerclent, d'aire A_{LC} qui sont positionnées entre ces domaines lipidiques solides et les lipides de la phase fluide d'aire A_{LE}.

La coalescence des constituants d'un système lors de la transition liquide / solide augmente l'énergie potentielle du système en utilisant l'énergie cinétique de ses constituants de sorte qu'un état de transition (état activé) est atteint (Hendrickson et coll., (1970)). L'état LC caractérise cet état de transition et la chute diffusionnelle déjà présentée reflète précisément l'utilisation de l'énergie cinétique microscopique du système pour atteindre la phase LC et accomplir la transition liquide / solide du DPPC en monocouche.

À 0,58 nm²·molécule⁻¹, le film présente réellement le double aspect de phase unique et d'aire moyenne d'un changement du comportement de la présence simultanée des trois phases LE, LC et SC. Nous avons admis que le système fluctue entre une très grande disparité de ses états moléculaires et un état moléculaire unique à l'aire moyenne de 0,58 nm²·molécule⁻¹. De telles fluctuations, très grandes, se produisent habituellement près d'un point critique. Nous avons montré que ces fluctuations critiques de

l'entassement latéral des lipides du film facilitent l'incorporation dans le film de divers matériaux provenant de la sous-phase. Ainsi, de façon similaire aux observations réalisées dans les systèmes multibilipidiques (Sackmann, (1983)), des défauts dans l'entassement moléculaire se produisent à cette aire moléculaire moyenne et sont responsables des effets d'incorporation maximale de produits présents dans la sous-phase. Pour expliquer ce phénomène, une fluctuation "critique" de la densité dans la région de l'interface a été proposée (Nagle et Scott, (1978)).

On peut retrouver l'existence d'une phase réelle ayant un état moléculaire unique à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ en examinant deux comportements différents des isothermes de pression de surface du DPPC réalisées à diverses températures. Nous avons d'abord suivi l'évolution de l'aire moléculaire au début de la transition LE / LC, A_t , suivant la température et rencontré un changement de phase à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ et à une température de 29°C . L'expansivité de la phase prétransitionnelle (phase LE) à partir de cette température nous indique que les lipides se comportent comme un état de vapeur-expansée (VE). Au point critique à 29°C , $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ et $18 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, les phases LC, LE et VE sont présentes.

Nous avons ensuite analysé le comportement des isothermes de pression de surface du DPPC au moment où apparaît la phase LE aux très basses températures. Le point ($0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) apparaît alors comme un point critique où un équilibre à trois phases existe, soit un équilibre entre les phases LE, LC et vapeur condensée.

CHAPITRE VI

LA DIFFUSION LATÉRALE DES PHOSPHOLIPIDES INSATURÉS

6.1 Introduction

Les lipides insaturés offrent le moyen de modifier le comportement d'un film de surface à l'intérieur d'une phase pure. On sait que les lipides insaturés montrent une modification continue de la pression de surface sur toute la gamme de leurs compressions sans montrer de transition de phase. On entreprend dans ce chapitre une étude des rôles du groupement polaire et du degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées sur les propriétés de fluorescence et de dynamique translationnelle des films de surface de divers phospholipides insaturés à l'intérieur d'une phase unique, la phase LE. L'effet de la présence des ions divalents calcium dans la sous-phase aqueuse est aussi déterminé. On étudiera d'abord les propriétés diffusionnelles d'une phosphatidylcholine comportant des chaînes hydrocarbonées qui sont hautement insaturées. Nous verrons ensuite les propriétés de dynamique

translationnelle de deux types (moyennement et hautement insaturés) de phosphatidylsérine et de phosphatidyléthanolamine.

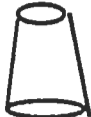



Il faut préciser cependant que l'ensemble de ce chapitre pourra apparaître plus descriptif, plus phénoménologique que les précédents. En effet, peu d'informations sur les PC, les PS et les PE insaturés sont disponibles dans la littérature comparativement à ce qu'on connaît sur le DPPC (et les phospholipides saturés ou peu insaturés). Donc, contrairement aux chapitres précédents, il nous sera impossible d'interpréter ici de manière aussi détaillée le comportement dynamique de ces phospholipides insaturés à l'interface.

Les modèles géométriques des phospholipides qui ont été présentés par Israelachvili et coll. (1980) vont toutefois nous permettre de rationaliser davantage nos observations sur les comportements structuraux et dynamiques des lipides insaturés à l'interface. En effet, Israelachvili et coll. ont montré qu'un certain nombre de propriétés structurales des bicouches lipidiques mixtes et des monocouches peuvent être rationalisées par ce modèle dans lequel les lipides sont représentés par des structures géométriques.

6.1.1 Présentation du modèle

Le tableau III présente un résumé des formes moléculaires qui modélisent les différents phospholipides. Ainsi, le DPPC constitue un segment tronconique pointant vers l'air (c.-à-d., cône tronqué) : l'aire moléculaire de projection, occupée par la région de la tête polaire, est plus

Tableau III :
Formes moléculaires modèles des phospholipides

Nature du lipide	Forme moléculaire associée
DPPC	<p>cone excisé</p> <p>air</p> <p>eau</p> 
PC insaturés	<p>cone inversé</p> <p>air</p> <p>eau</p> 
PS insaturées	<p>cone excisé</p> <p>air</p> <p>eau</p> 
PE insaturées	<p>cone inversé</p> <p>air</p> <p>eau</p> 

élevée que la projection, sur la surface aqueuse, de la région non polaire.
Les insaturations élevées de la partie apolaire de la phosphatidylcholine

déterminent cependant un segment tronconique inversé : l'aire de la région polaire est alors inférieure à la surface occupée par la région non polaire. Dans ce modèle, la phosphatidylsérine insaturée est représentée par un segment tronconique alors que la phosphatidyléthanolamine avec un nombre élevé d'insaturations constitue un cône tronqué inversé.

Ce modèle prévoit aussi que ces structures géométriques sont caractérisées par une aire moléculaire, a_0 , qui réfère à 'l'aire moléculaire optimale' définie à l'interface air / eau. Pour les phospholipides au-dessus de leur transition de phase, la surface occupée par la région polaire (à une certaine température et un certain degré d'hydratation) est absolument invariante tandis que la région hydrocarbonée peut être apparentée à un état liquide tant que les molécules ne sont pas comprimées au-dessous d'un certain angle critique (soit à $0,60 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ pour la PC saturée) (Israelachvili et coll., (1980)).

6.2 Les propriétés des films de phosphatidylcholines insaturées

Les interactions entre les lipides étalés en monocouche proviennent, en partie, des chaînes hydrocarbonées du lipide. On ne connaît cependant pas le rôle de la région hydrocarbonée des phospholipides sur leurs propriétés diffusionnelles en monocouche. On présente dans la section suivante une étude du comportement diffusionnel et des propriétés structurales des monocouches de PC hautement insaturées auxquelles on a incorporé le 12-9-AS.

6.2.1 Les isothermes de pression de surface

Les isothermes de pression de surface de deux phosphatidylcholines

(PC) sont présentées à la figure 30. L'isotherme de pression de surface du DPPC + 2% 12-9-AS sur une sous-phase de NaCl 0,1 M est présentée en a). Cette isotherme a initialement été présentée au chapitre III (fig. 13). Rappelons que cette isotherme est obtenue à partir d'un lipide complètement saturé (DPPC) et qu'elle montre la cassure caractéristique de la transition de phase LE / LC. L'isotherme de pression de surface de forme continue (fig. 30 b) provient d'un mélange de phosphatidylcholines (PC). Elles ont été extraites des segments externes des bâtonnets réiniens (S.E.B.) (voir méthodes expérimentales, chapitre II). On observe à la figure 30 b que les PC réiniennes (PC (S.E.B.)) demeurent dans l'état liquide-expansé (état LE) tout au long de la compression isotherme.

On observe aussi que l'isotherme de pression de surface des PC (S.E.B.) comporte une expansion des aires moléculaires (pour les mêmes pressions de surface) ou de plus grandes pressions de surface (pour les mêmes aires moléculaires) que l'isotherme de son analogue complètement saturé (fig. 30). Ces divergences dans les isothermes de compression persistent même aux faibles degrés de compression moléculaire. Puisque la tête polaire des deux tensio-actifs est de même nature (c.-à-d., phosphatidylcholine) pour ces deux isothermes, on conclut donc que les interactions des régions hydrocarbonées (principalement originant des forces de dispersion) du lipide insaturé se manifestent à de plus grandes aires moléculaires que pour le lipide saturé et elles déterminent aussi une réduction plus importante de la tension de surface de la sous-phase (π est plus élevée pour une même valeur de l'aire moléculaire). Les régions hydrocarbonées du matériel insaturé sont donc impliquées dans des interac-

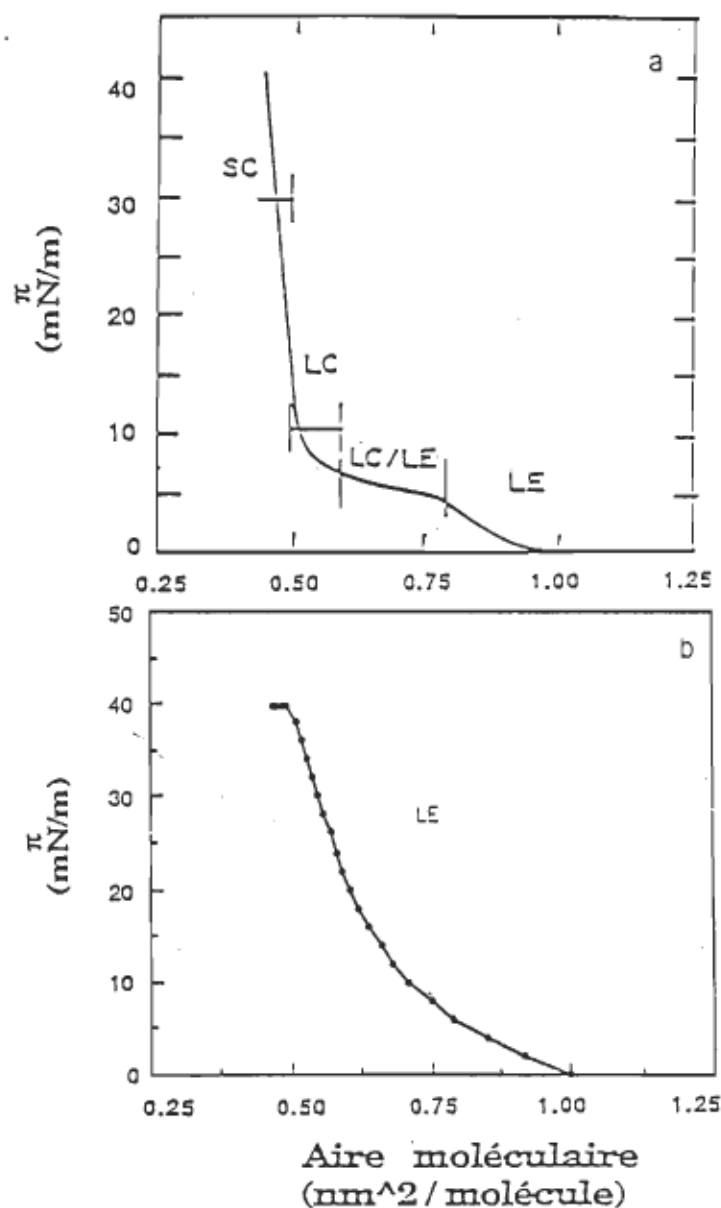


Figure 30 :

(a) Isotherme de pression de surface du DPPC + 2% 12-9-AS. (b) Isotherme de pression de surface de la PC (S.E.B.) + 2% 12-9-AS. Sous-phases : NaCl 0,1 M ou NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21 \pm 1 $^{\circ}$ C

tions intermoléculaires plus importantes.

Ajoutons que même jusqu'à une concentration de 10 mM, l'apport de calcium dans la sous-phase de ces deux films lipidiques n'entraîne aucun effet sur leurs isothermes de pression de surface. Ce comportement n'est pas étonnant étant donné la tête polaire globalement non chargée (zwittérionique) de la phosphatidylcholine.

6.2.2 Les propriétés de fluorescence

Comme nous le verrons, les lipides hautement insaturés montrent une augmentation de l'intensité de fluorescence réduite lors de leurs compressions. Afin de s'affranchir de cet effet sur la constante de dimérisation expérimentale, K_d , nous présentons dans ce chapitre la contribution structurale de cette constante, soit K_{ds} . Comme on l'a présenté dans la section 2.5.1.3. du chapitre II sur les méthodes expérimentales, K_{ds} est obtenue par le rapport K_d / I_f , et il est le reflet de l'organisation des sondes dans le milieu hydrocarboné du lipide hôte et de la dynamique latérale de cet environnement lipidique. Plus spécifiquement, K_{ds} est liée à l'ajustement des anneaux anthroyloxy en position réactionnelle au niveau des carbones 12 des deux monomères en présence. Il dérive de la mise en place d'une configuration adéquate des anneaux anthroyloxy ou d'une flexibilité qui puisse permettre aux dimères de se former.

6.2.2.1 L'intensité de fluorescence réduite

La figure 31 montre le comportement de l'intensité de fluorescence réduite (I_f) du dérivé de l'acide stéarique incorporé dans les films de

chacune des phosphatidylcholines.

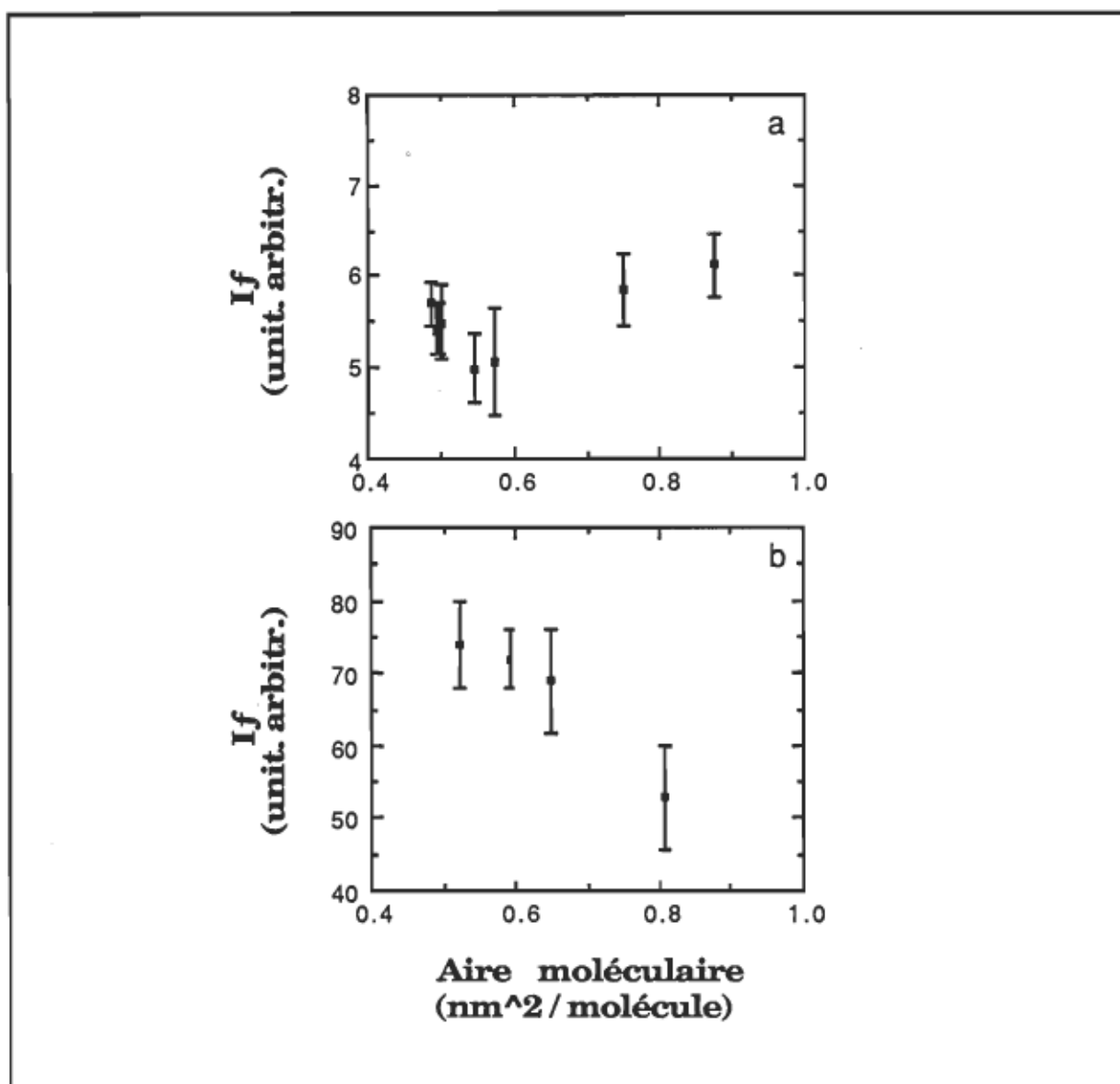


Figure 31 :

Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte: (a) le DPPC et (b) la PC (S.E.B.). Sous-phases : NaCl 0,1 M ou NaCl 0,1 M + CaCl_2 0,01 M. $T=21 \pm 1^\circ\text{C}$

On observe à la figure 31 que les valeurs de I_f sont nettement plus élevées (environ un ordre de grandeur) dans le film formé de lipides insaturés que dans le film du lipide saturé. Rappelons que le comportement

du lipide saturé a déjà été présenté à la figure 14 du chapitre III. On observe aussi à la figure 31 b que I_f augmente lors de la compression du lipide insaturé.

Ces observations viennent appuyer la conclusion énoncée à la section précédente suivant laquelle les régions hydrocarbonées du matériel insaturé sont impliquées dans des interactions moléculaires plus importantes que dans le matériel saturé. Ces interactions moléculaires sont aussi plus importantes lors de la compression du lipide insaturé. En effet, la présence d'une structuration du milieu hydrocarboné plus importante pour les lipides insaturés provient de la relaxation de la cage de chaînes grasses hautement insaturées dans l'environnement immédiat du chromophore. La relaxation est altérée par les contraintes des interactions intermoléculaires des chaînes du lipide (principalement les forces de dispersion) et le rendement quantique du chromophore augmente (donc I_f augmente), tel que le prévoit la règle de Franck-Condon. Par rapport au lipide saturé, la phosphatidylcholine ayant des régions hydrocarbonées hautement insaturées est donc davantage hydrophobe. Cette hydrophobicité du milieu hydrocarboné augmente aussi au cours de la compression du lipide insaturé. Ce comportement est en accord avec le modèle des formes moléculaires associées qui reconnaît que l'ordre (à longue portée) des PC hautement insaturées provient de la région non polaire des lipides (forme: cône tronqué).

Ajoutons ici que la présence d'ions calcium dans la sous-phase n'affecte pas le comportement de l'intensité de fluorescence. Ceci montre à nouveau le rôle prépondérant de la région hydrocarbonée des lipides sur les

propriétés de fluorescence.

6.2.2.2 La constante de dimérisation de la sonde

La constante de dimérisation de la sonde, K_d , ne varie pas suivant le degré de compression du film de PC rétinienne (résultats non présentés). Elle est de même valeur lorsque la sonde est insérée dans l'état LE du film monomoléculaire de DPPC (chapitre III) soit, 2,5 unités arbitraires. Nous avons déjà montré que ce comportement de K_d lors de la compression du DPPC implique que le 12-9-AS ne se disperse pas librement dans la matrice lipidique; il est plutôt pré-associé à l'intérieur de microdomaines (chapitre III, Teissié et coll., (1978), et Denicourt et coll., (1987)). En effet, une dispersion idéale de la sonde provoquerait une réduction importante de sa cinétique de dimérisation lors de la chute diffusionnelle. La réaction de dimérisation n'est donc pas sous le contrôle de la diffusion latérale du monomère réactif mais elle dépend des positions relatives des molécules pré-associées. Ainsi, la structure de l'environnement constitue l'élément décisif de la réaction de dimérisation. Tel que décrit dans le chapitre II, c'est la constante de dimérisation structurale, K_{ds} , qui est le paramètre de ce contrôle réactionnel.

La figure 32 b montre que la constante structurale de la vitesse de la réaction diminue avec la compression de la PC rétinienne. Ceci indique que l'entassement moléculaire de la PC (S.E.B.) produit un environnement de moins en moins favorable à la réaction de photopontage des monomères de la sonde. Toutefois, la compression progressive de la phase liquide-étendu du lipide saturé (DPPC) entraîne une chute plus légère des conditions struc-

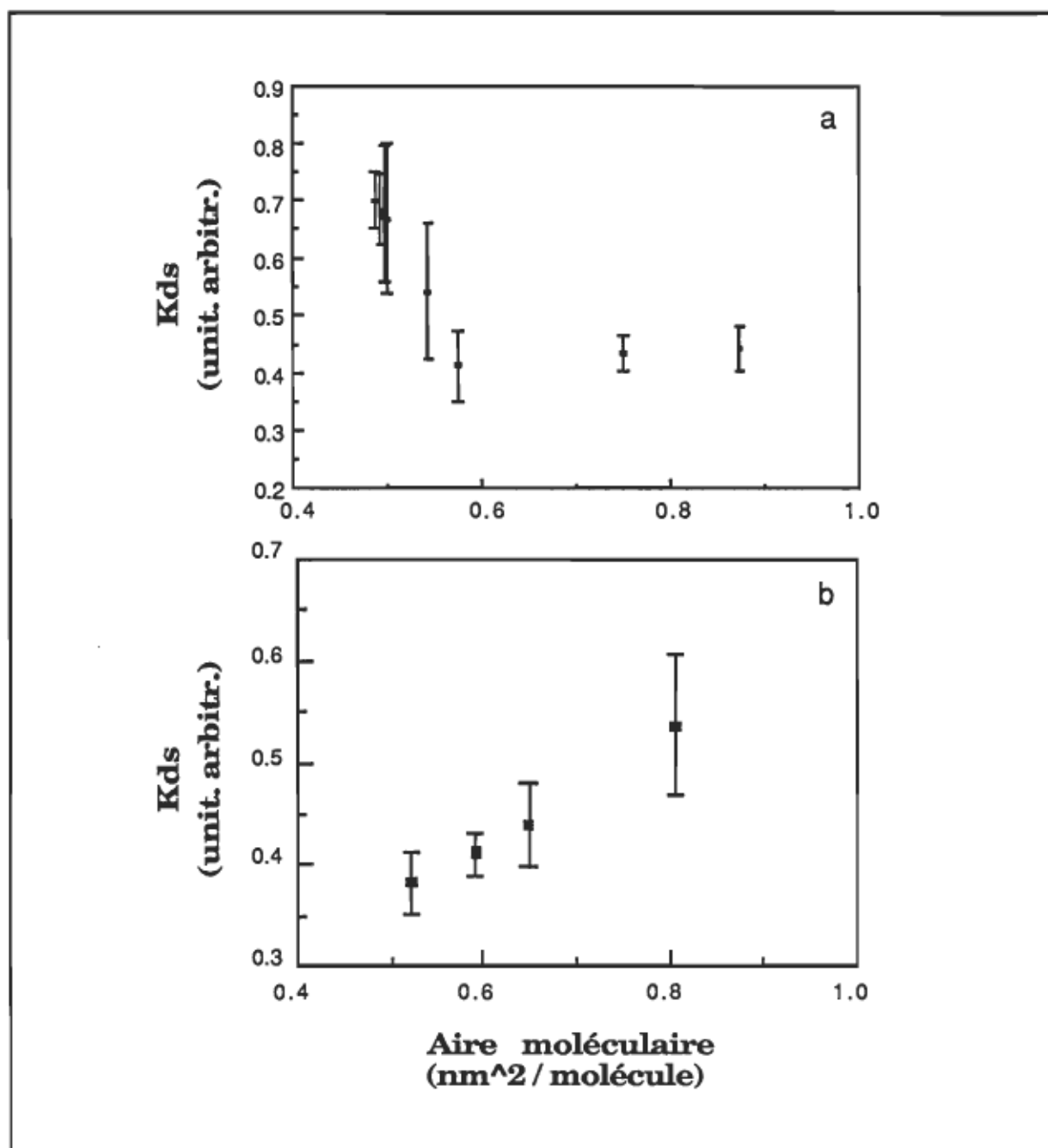


Figure 32 :

La constante de dimérisation structurale de la photoréaction de la sonde tracée en fonction de l'aire moléculaire: (a) du DPPC et (b) de la PC (S.E.B.). Sous-phases : NaCl 0,1 M ou NaCl 0,1 M + CaCl_2 0,01 M. $T=21 \pm 1^\circ\text{C}$

turales favorables à la réaction de dimérisation (K_{ds} vs A du DPPC de la fig. 32 a). Par rapport au lipide complètement saturé (phase LE); l'organisation

bidimensionnelle du film des PC insaturées apparaît cependant comme structurellement plus propice à la réactivité des sondes lors de la compression puisque les valeurs de K_{ds} sont légèrement plus élevées.

6.2.3 La diffusion latérale de la sonde

Nous avons vu que les propriétés interfaciales (π vs A) et les propriétés de fluorescence respectives, (I_f et K_{ds}), des deux PC (saturée et insaturée) diffèrent. Ceci résulte, du moins en partie, des interactions hydrophobes davantage importantes dans la région hydrocarbonée du film des PC hautement insaturées. Nous verrons maintenant quel est l'effet de l'insaturation des chaînes de PC sur son comportement diffusionnel.

La figure 33 présente le comportement diffusionnel de la PC (S.E.B.) et du DPPC en couche monomoléculaire. On note sur cette figure aucun effet de la présence du calcium dans la sous-phase et aucun effet de l'augmentation de l'entassement moléculaire du film sur la dynamique latérale des phosphatidylcholines (S.E.B.). Le comportement diffusionnel du lipide saturé a été décrit au chapitre III (fig. 16). La figure 33 montre aussi que la mobilité latérale du 12-9-AS dans la lécithine rétinienne est identique à la mobilité du marqueur dans les zones fluides (phase LE et la transition LE / LC) du lipide saturé. En effet, la PC saturée (forme: cône tronqué) montre aussi un coefficient de diffusion latérale de $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ dans les régions fluides (LE et LC / LE) malgré la saturation complète de ses chaînes hydrocarbonées. Ceci indique que les interactions hydrophobes plus importantes entre les chaînes hydrocarbonées plus insaturées des lécithines rétiniennes n'affectent pas les propriétés diffusionnelles de la sonde. On doit

conclure que le degré d'insaturation des chaînes n'est pas, à lui seul, un déterminant de la cinétique translationnelle.

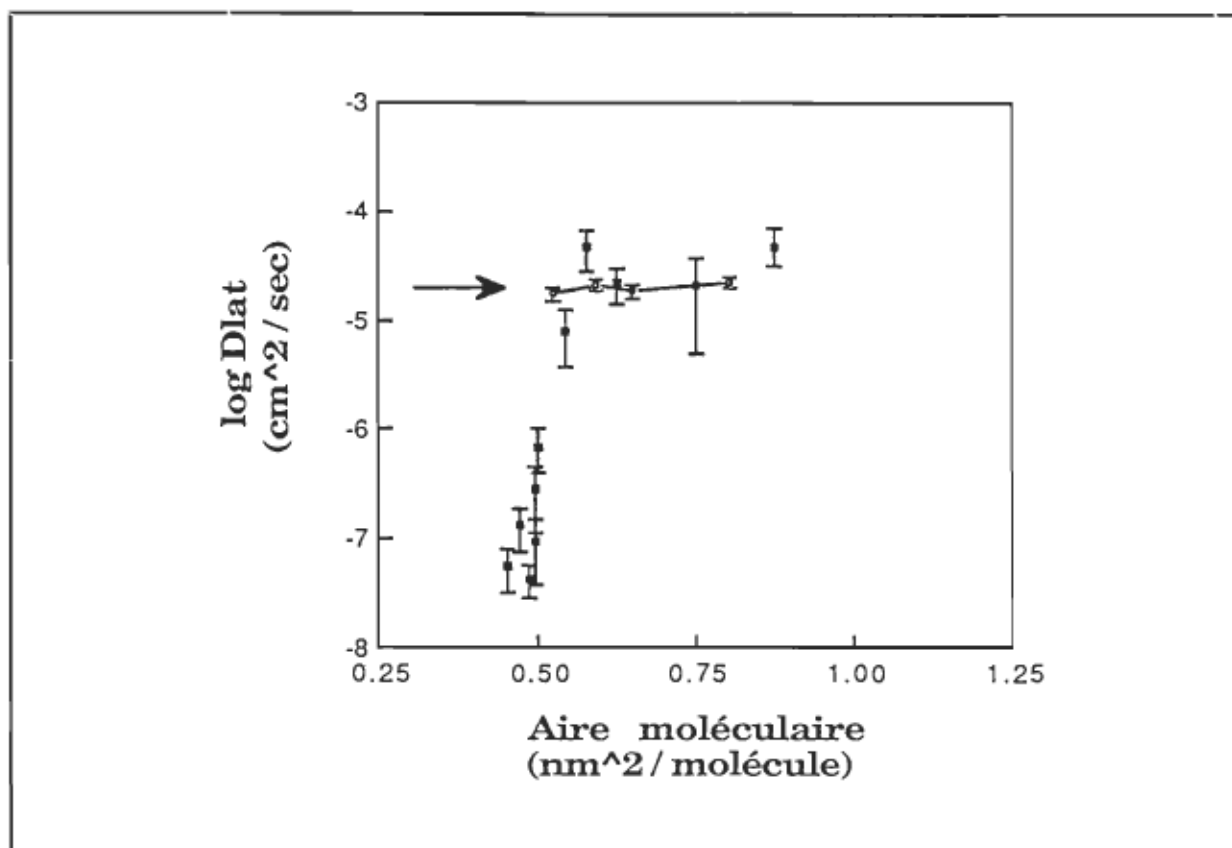


Figure 33 :

Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire de la PC (S.E.B.) (flèche ; ligne continue) et du DPPC (points). Sous-phases : NaCl 0,1 M ou NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21 \pm 1°C

Ainsi, tel qu'on l'observe au tableau suivant (tableau IV) la mobilité latérale des PC rétiniennes est indépendante du degré d'entassement moléculaire, puisque le film de PC rétiniennes demeure en phase LE tout au long de sa compression. Le tableau IV résume aussi les diverses valeurs du coefficient de diffusion latérale pour d'autres lipides qui seront présentés ultérieurement.

Tableau IV :
Résumé des coefficients de Diffusion latérale des phospholipides

Nature du lipide	Conditions ioniques de la sous-phase	D _{lat} (cm ² . sec ⁻¹)	
		$\pi=5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$\pi=35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$
DPPC	NaCl 0,1 M	$2,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-8}$
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	$2,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-8}$
PC (S.E.B.)	NaCl 0,1 M	$2,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	$2,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$
PS (S.E.B.)	NaCl 0,1 M	$6,3 \times 10^{-6}$	$6,3 \times 10^{-6}$
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	$6,3 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-6}$
PS hydrogénée	NaCl 0,1 M	$5,6 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-5}$
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	$2,2 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^{-5}$
PE (S.E.B.)	NaCl 0,1 M	$6,3 \times 10^{-5}$	$6,3 \times 10^{-5}$
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	$1,8 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-5}$
PE hydrogénée	NaCl 0,1 M	$1,6 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-6}$
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	$3,1 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-7}$

Lorsque le DPPC atteint la région LC, la diffusion chute à la suite d'une transition de phase liquide / solide (tableau IV). Dans cette phase, le modèle géométrique ne peut être appliqué puisqu'à $0,58 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$, le lipide saturé atteint une aire moléculaire proche de la valeur limite a_0 , d'une valeur de $0,60 \text{ nm}^2\cdot\text{molécule}^{-1}$ (Israëlachvili et coll., (1980)), où le lipide entre en transition diffusionnelle (Denicourt et coll., (1989), et chapitre IV).

6.3 Les propriétés des films de phosphatidylsérines insaturées

6.3.1 Les isothermes de pression de surface

Le tableau V présente les aires moléculaires de divers lipides sous diverses conditions de la nature de la sous-phase aux pressions de surface de 5 et 25 mN·m⁻¹. Les valeurs d'aires moléculaires concernant les films de PC sont aussi présentées au tableau V. Elles résument le comportement des isothermes de pression de surface analysé précédemment.

Les aires moléculaires des PS et des PE ont été mesurées à quelques pressions de surface. Les valeurs du tableau V indiquent que les lipides insaturés sont dans une phase liquide-expansé au cours de leur compression.

Plus particulièrement, on observe au tableau V que la PS des bâtonnets rétiniens est plus expansée que la PS hydrogénée d'origine bovine. Ce comportement est une conséquence du degré d'insaturation moins élevé des chaînes hydrocarbonées de cette dernière (chapitre II; méthodes expérimentales). On observe aussi au tableau V que les ions calcium entraînent une réduction de l'aire moléculaire des PS insaturées. La nature chargée de la région polaire de la phosphatidylsérine rend ce comportement peu étonnant. La fixation des ions calcium par la PS et la contraction subséquente de l'isotherme ont déjà été signalées par divers auteurs (Rojas et Tobias, (1965), et Papahadjopoulos, (1968)). En effet, les ions divalents Ca⁺² provoquent une augmentation de la température de transition des phosphatidylsérines par la neutralisation des charges (réduction des répul-

Tableau V :
Aires moléculaires des phospholipides suivant leurs compressions

Nature du lipide	Conditions ioniques de la sous-phase	Aire moléculaire (nm ²)	
		$\pi=5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$\pi=25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$
DPPC	NaCl 0,1 M	0,75	0,45
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	0,75	0,45
PC (S.E.B.)	NaCl 0,1 M	0,82	0,58
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	0,82	0,58
PS (S.E.B.)	NaCl 0,1 M	0,90	0,66
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	0,78	0,60
PS hydrogénée	NaCl 0,1 M	0,85	0,61
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	0,77	0,58
PE (S.E.B.)	NaCl 0,1 M	0,85	0,63
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	0,85	0,63
PE hydrogénée	NaCl 0,1 M	0,80	0,59
	(+CaCl ₂ 0,01 M)	0,80	0,59

sions électrostatiques et moindre hydratation), ce qui entraîne une densité superficielle plus importante des régions polaires qui se propage dans les régions hydrocarbonées (Trauble et Eibl, (1974)). Ce comportement rend compte de l'effet de condensation des ions divalents sur l'isotherme de pression de surface des PS.

6.3.2 Les propriétés de fluorescence

6.3.2.1 L'intensité de fluorescence réduite

On observe à la figure 34 a que l'intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS est très élevée et elle augmente avec la compression d'une monocou-

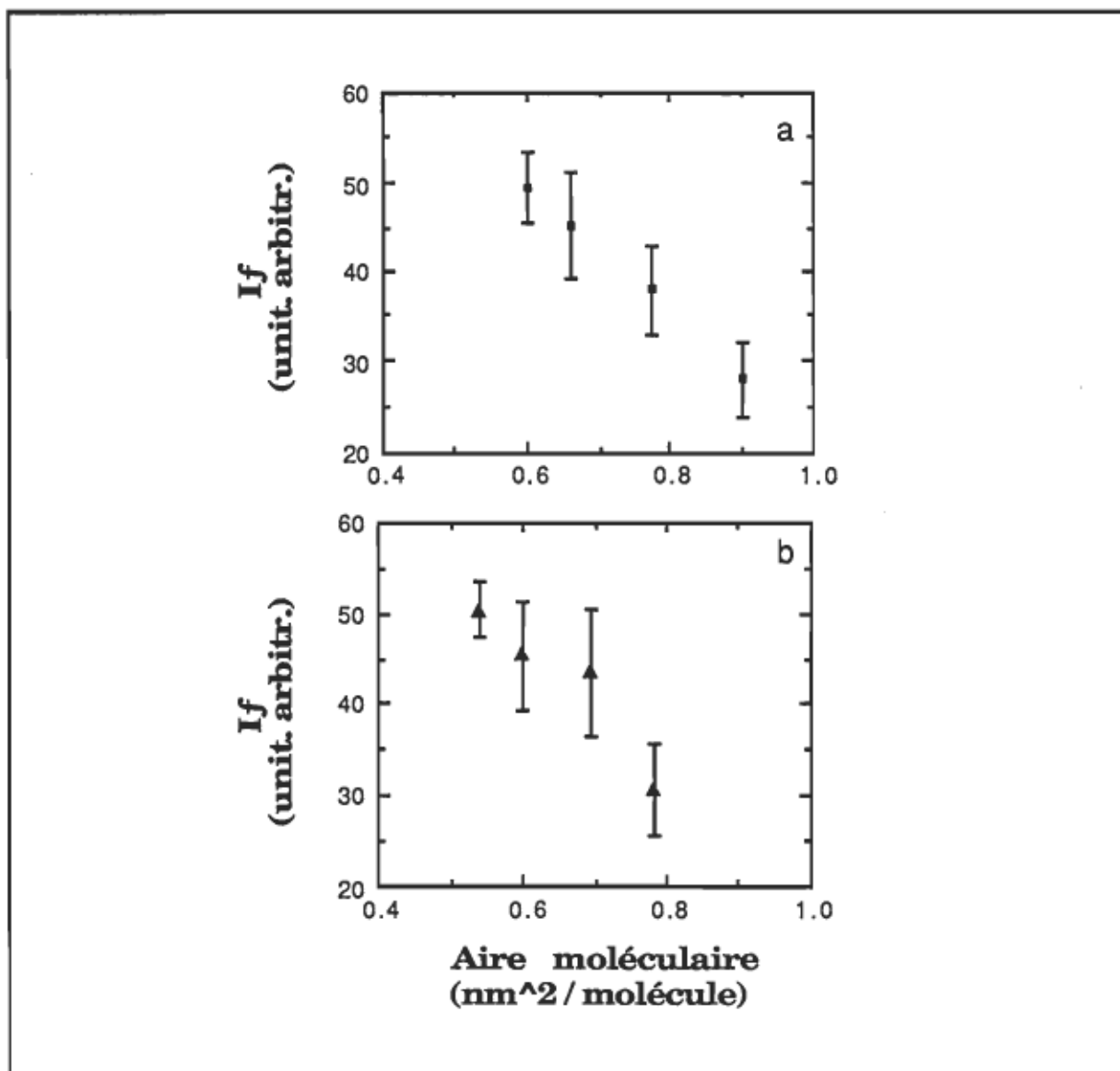


Figure 34 :

Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phases : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21±1°C

che de PS rétinienne. L'environnement de la sonde est donc modifié au cours de la compression du film. La valeur de I_f provenant du film de PS hydrogénée (fig. 35 a) est plus faible et elle n'est pas modifiée lors de la com-

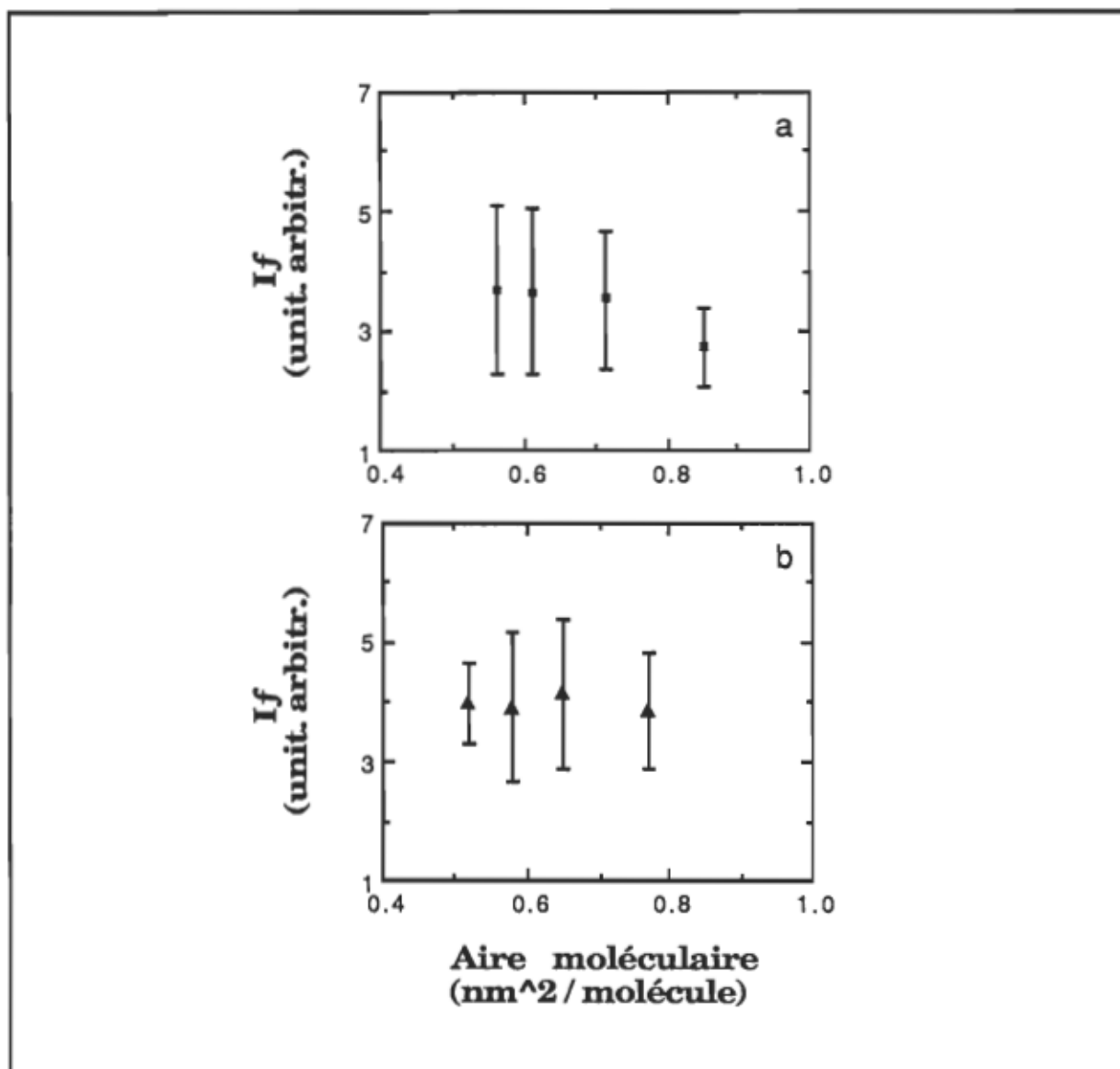


Figure 35 :

Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. $T=21 \pm 1^\circ\text{C}$

pression. Le calcium ne perturbe pas le comportement de fluorescence des

deux types de PS (fig. 34 b et fig. 35 b). Comme pour la PC rétinienne, on conclut qu'un haut degré d'insaturation des acides gras des PS joue un rôle organisateur sur la région hydrophobe de ces lipides et entraîne une augmentation de I_f . On constate cependant que seule une insaturation très importante détermine cet effet.

6.3.2.2 Les constantes de dimérisation de la sonde

Les figures 36 et 37 présentent respectivement le comportement des K_{ds} de la PS rétinienne et de la PS hydrogénée.

On observe qu'une réduction de K_{ds} survient lors de la compression du film monomoléculaire de chacune des phosphatidylsérines. La compression d'un film de PS porte la matrice lipidique dans une configuration moins favorable à la liaison 9-9' et 10-10' des deux sondes en contact. A nouveau, la nature agrégée des molécules de sonde est supportée par la similitude des valeurs de la constante de dimérisation structurale des deux PS avec celles de la PC (S.E.B.) et de la région fluide du DPPC. Aucun effet de la présence d'ions divalents dans la sous-phase n'a été détecté pour la PS rétinienne alors que la K_{ds} est plus faible lorsque la PS hydrogénée est mise en présence de calcium.

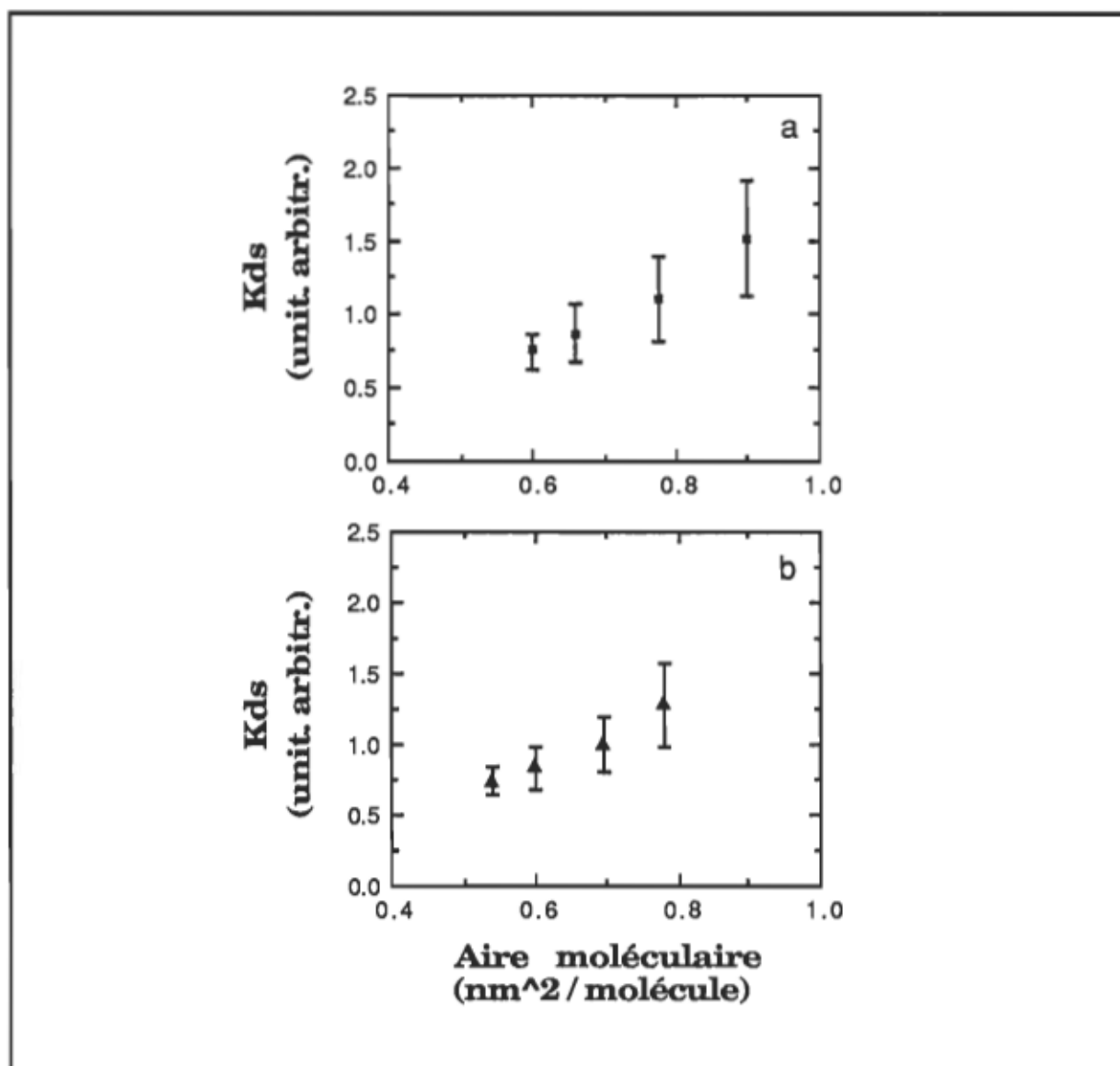


Figure 36 :

Constante de vitesse de dimérisation structurale du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl_2 0,01 M. $T=21\pm 1^\circ\text{C}$

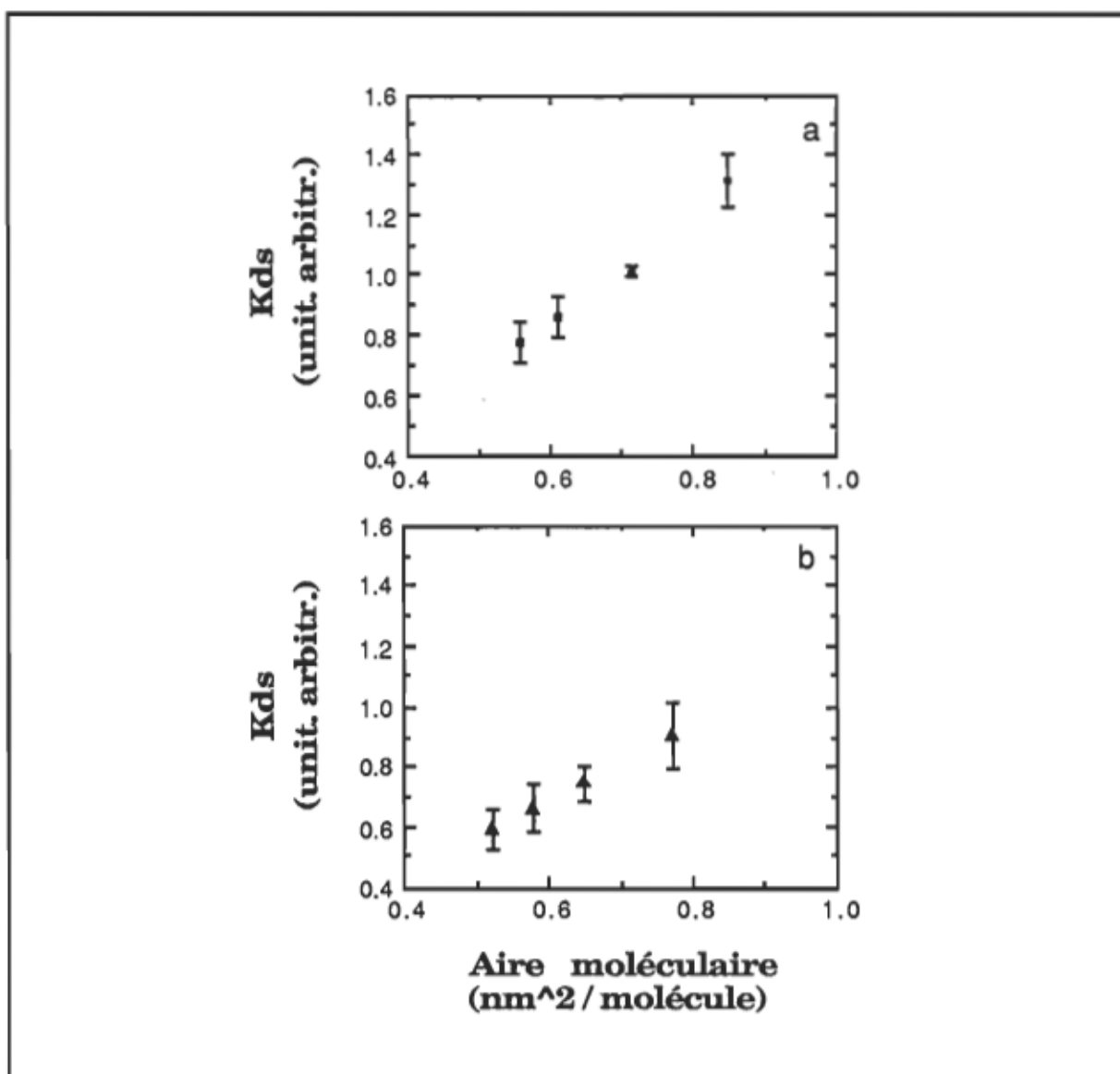


Figure 37 :

Constante de vitesse de dimérisation structurale du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl_2 0,01 M. $T=21 \pm 1^\circ\text{C}$

6.3.3 La diffusion latérale des films de phosphatidylsérines

La figure 38 présente le coefficient de diffusion latérale, D_{lat} , du 12-9-AS incorporé dans un film de PS (S.E.B.). On observe qu'en présence d'ions Ca^{+2} dans la sous-phase, la mobilité latérale du lipide rétinien diminue d'environ cinq fois lorsque celui-ci est davantage comprimé (fig.38 a et b,

tableau IV)).

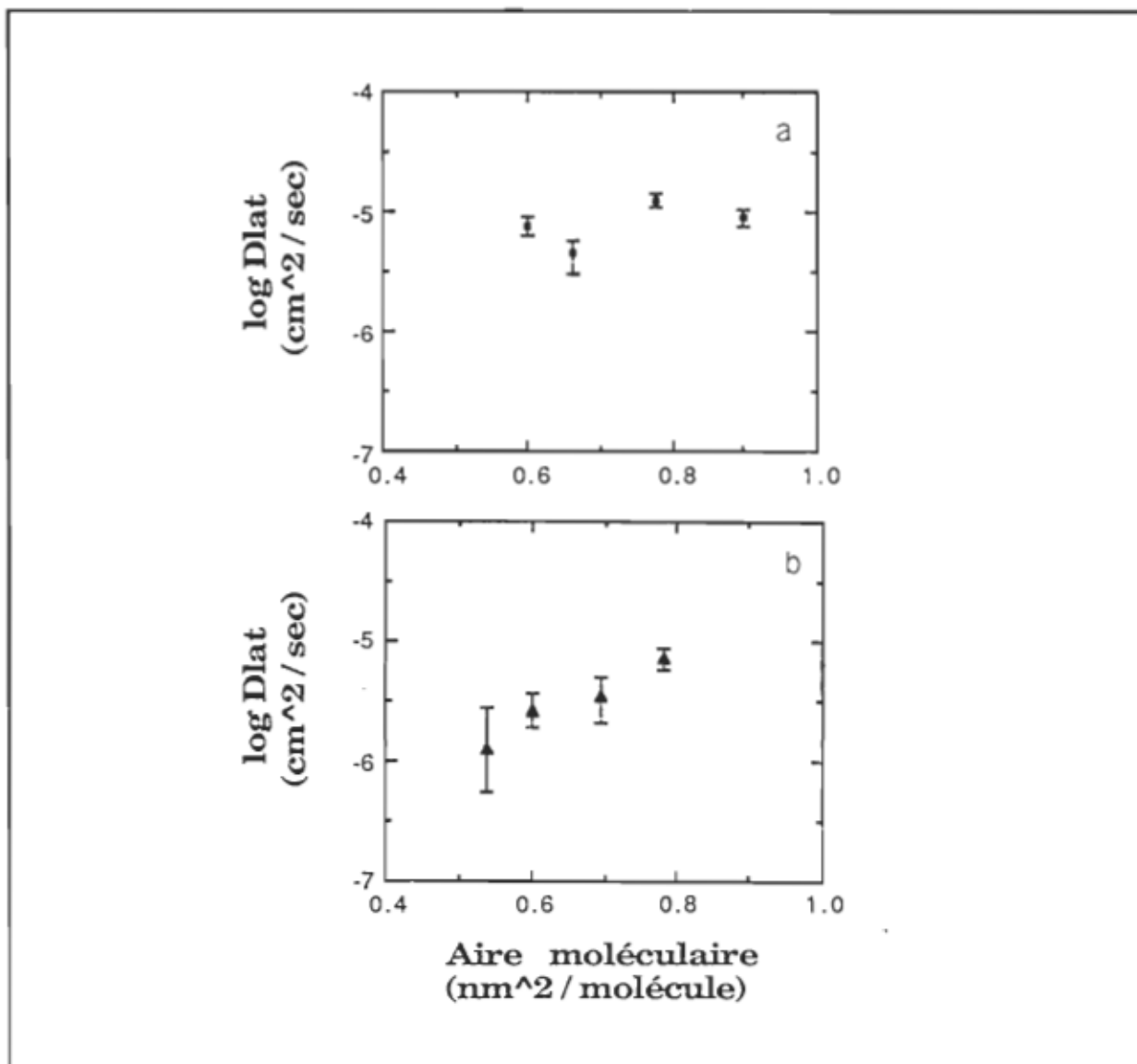


Figure 38 :

Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl_2 0,01 M. $T=21\pm 1^\circ\text{C}$

La figure 39 présente le coefficient de diffusion latérale, D_{lat} , du 12-9-AS incorporé dans un film de PS hydrogénée. Avec ce composé hydrogéné, le comportement diffusionnel demeure constant lors de la compression du

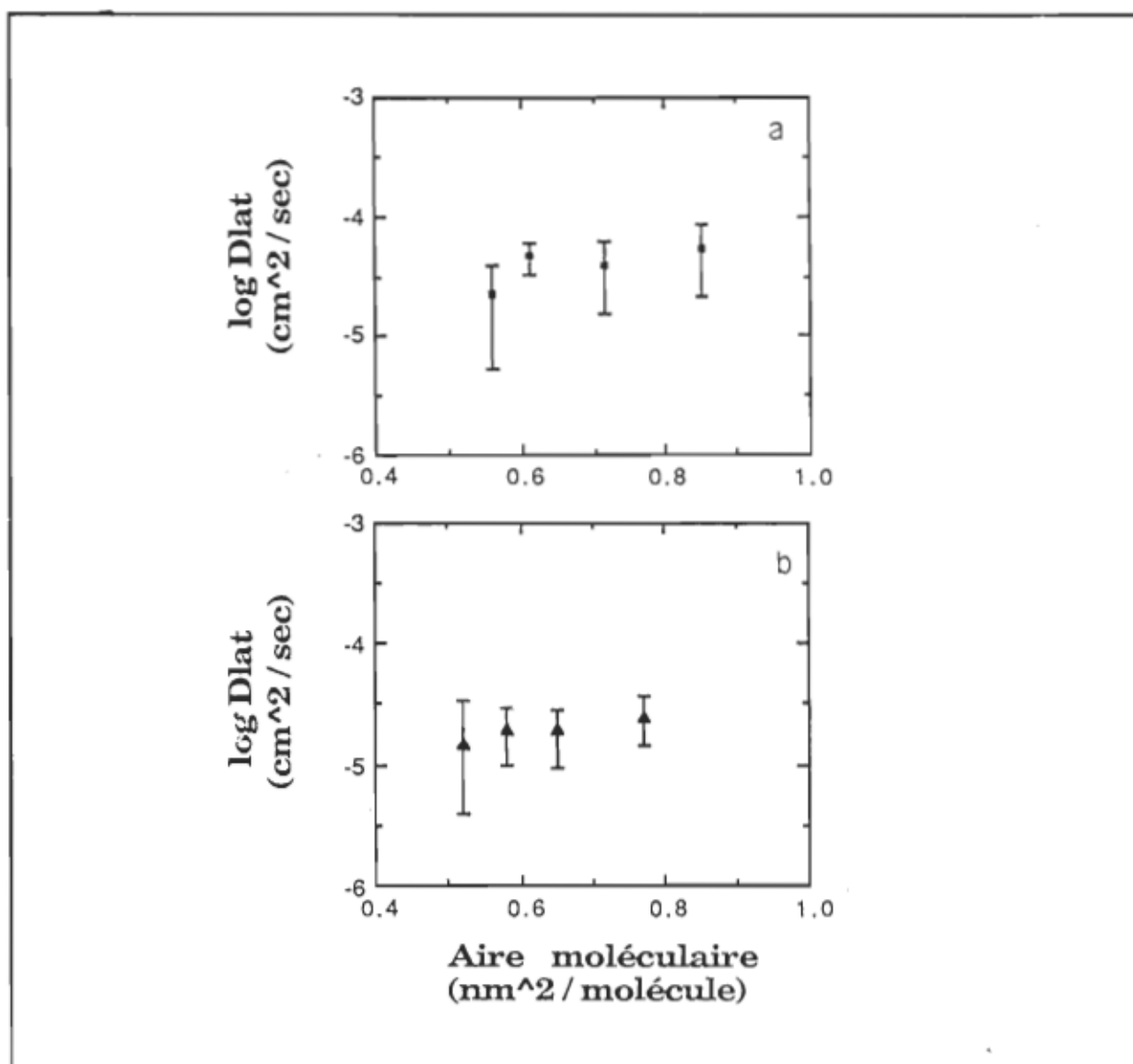


Figure 39 :

Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PS hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21±1°C

film et sa valeur est plus élevée que ce qu'on obtient avec le lipide natif. La valeur du paramètre diffusionnel diminue aussi légèrement (~ 2 fois) quand on est en présence de calcium dans la sous-phase (fig. 39 b et tableau IV). Le pontage des molécules de PS par les ions calcium semble donc être modulable par le degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées des PS.

Les hautes insaturations peuvent ainsi empêcher le pontage des PS par le calcium en maintenant de grandes distances intermoléculaires des molécules de PS à la surface, telles que l'indiquent les grandes aires moléculaires des films de PS rétinienne (tableau V). Ainsi, lorsqu'on comprime la PS (S.E.B.), l'effet du calcium se manifeste et le coefficient diffusionnel chute d'environ cinq fois.

Le modèle des structures géométriques pour représenter les lipides est ici utilisé pour interpréter les comportements diffusionnels des PS (voir tableau III). D'après ce modèle, l'ordre dans l'entassement moléculaire global des phosphatidylsérines vient de la rencontre des régions polaires de ces lipides (forme de cône tronqué). La région hydrocarbonée des PS semble cependant jouer un rôle important sur la mobilité latérale de ce lipide. En effet, la PS (S.E.B.) montre une mobilité latérale plus faible que la PS hydrogénée. Cet effet peut provenir des interactions plus importantes de la région hydrocarbonée de la PS (S.E.B.) tel que le comportement tensio-actif (π plus élevée) et celui de l'intensité de fluorescence (plus élevée) l'indiquent.

La réduction de l'interaction de la tête polaire avec la sous-phase aqueuse contenant les ions divalents (réduction de la charge électrique et de l'hydratation) devrait cependant entraîner une réduction du coefficient de frottement (f) et ainsi une augmentation de la dynamique latérale (Vaz et coll., (1985)). Le même phénomène peut aussi entraîner une réduction du volume libre, suite à une augmentation de T_m (température de la transition solide (gel) / liquide) et de la déshydratation. Nos résultats expérimentaux indiquent que la valeur du coefficient de diffusion latérale est réduite et ce,

même aux grandes aires moléculaires, malgré la réduction du coefficient de frottement (forces d'ancrage du lipide dans la sous-phase). La réduction du volume libre est donc importante.

6.4 Les propriétés des films de phosphatidyléthanolamines insaturées

6.4.1 Les isothermes de pression de surface

On observe au tableau V que le film de PE (S.E.B.) comporte des aires moléculaires supérieures à celles qu'on observe pour le dérivé moins insaturé. Tel qu'attendu, le matériel tensio-actif dont les chaînes sont les plus insaturées détermine une expansion des aires moléculaires aux mêmes pressions de surface. On observe aussi au tableau V que la présence d'ions divalents ne perturbe pas le comportement tensio-actif des PE.

6.4.2 Les propriétés de fluorescence de la sonde dans les films de PE

6.4.2.1 L'intensité de fluorescence réduite

On observe sur les figures 40 a et 41 a que la fluorescence réduite du 12-9-AS est beaucoup plus élevée dans le film du lipide hautement insaturé que dans le film du lipide moins insaturé. De plus, la fluorescence réduite du 12-9-AS augmente quand la monocouche hôte de PE (S.E.B.) est comprimée (fig. 40 a). Ces comportements sont identiques à ceux qui ont été observés pour les deux autres types de lipides extraits (S.E.B.). Encore une fois, on conclut qu'un haut degré d'insaturation des acides gras joue un rôle organisateur sur la région hydrophobe de ces lipides et entraîne une augmentation de la valeur de I_f . Ce comportement est aussi en accord avec le modèle des formes moléculaires associées qui reconnaît que l'ordre (à lon-

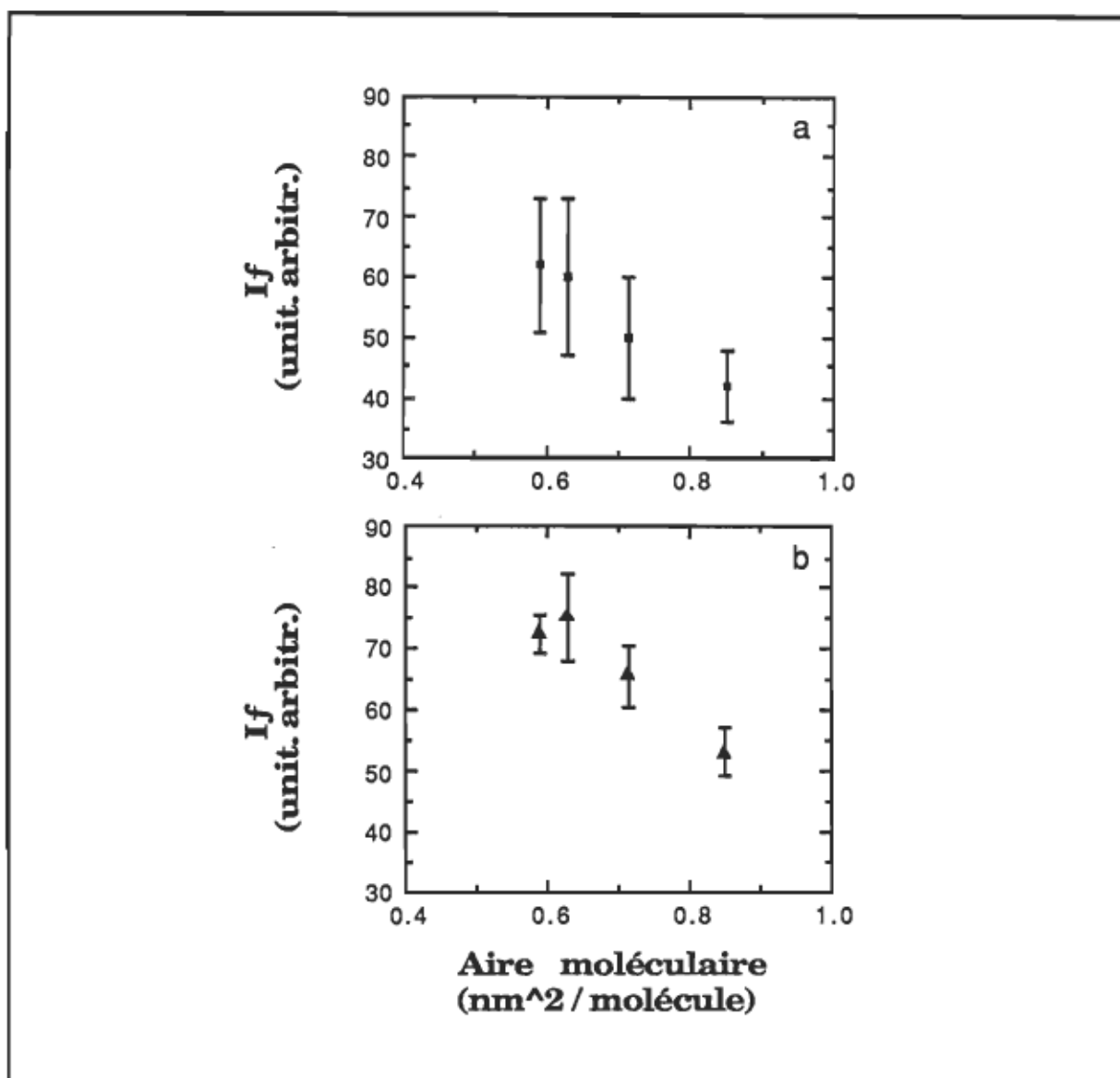


Figure 40 :

Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21 \pm 1°C

gue portée) des PE hautement insaturées provient de la région non polaire des lipides (forme: cône tronqué inversé).

En présence de calcium, la fluorescence réduite du 12-9-AS est cependant plus élevée de 10 % pour la PE (S.E.B.) (fig. 40 b) et elle est

inférieure de 15% pour la PE (H) (fig. 41 b) par rapport à leurs analogues sans calcium.

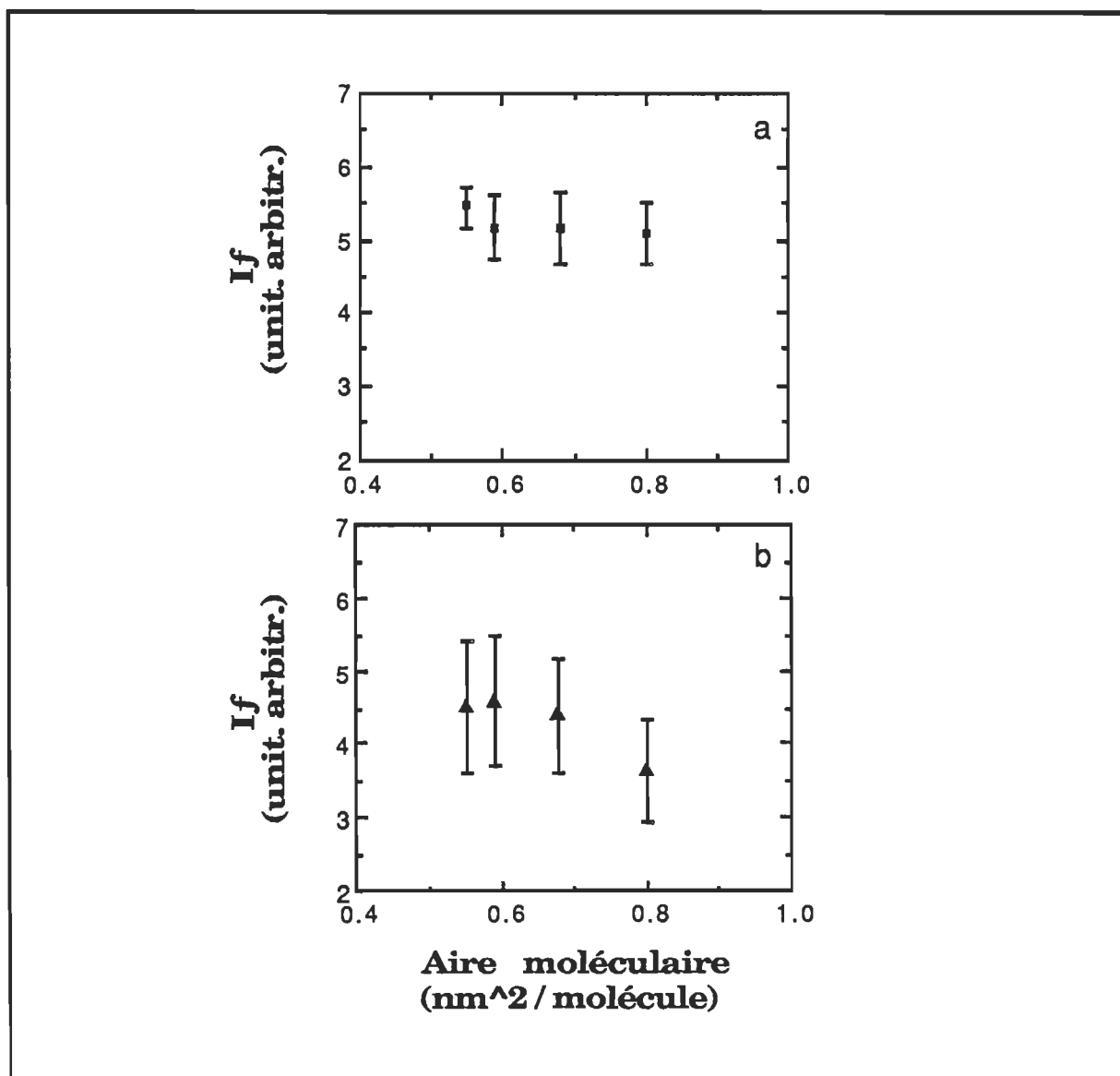


Figure 41 :

Intensité de fluorescence réduite du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21 \pm 1°C

L'environnement de la sonde est ainsi perturbé à la fois par la compression du film lipidique des PE (S.E.B.) très insaturées et la présence

de calcium qui déterminent une augmentation d'intensité d'émission. Comme nous l'avons souligné, l'augmentation de l'intensité d'émission de fluorescence par molécule de sonde est un effet spectroscopique lié à la nature progressivement plus hydrophobe du milieu hydrocarboné dans le film de PE (S.E.B.). L'augmentation de la valeur de I_f , en présence d'ions calcium, indique que la contrainte de l'environnement est élevée par rapport à ce qui advient dans les conditions où les ions calcium sont absents. En présence des ions divalents, le milieu hydrocarboné de la PE (S.E.B.) apparaît donc plus hydrophobe sans entraîner de condensation des films. Un rôle déshydratant des ions divalents sur la PE (S.E.B.) peut expliquer ce résultat. Le film de PE (H) montre un comportement très différent. En effet, I_f est réduite de 15% lorsque le calcium est présent dans la sous-phase. En présence des ions divalents, le milieu hydrocarboné de la PE (H) apparaît donc comme moins hydrophobe. Le calcium a donc un rôle important sur les films de PE. Nous verrons à la prochaine section son action sur la structure des films de PE.

6.4.2.2 Les constantes de dimérisation de la sonde

Les figures 42 et 43 présentent la constante structurale de la vitesse de dimérisation de la sonde incorporée dans un film de PE (S.E.B.) et de PE hydrogénée d'origine bovine respectivement.

On observe que la valeur de K_{ds} diminue lors de la compression des monocouches de la PE (S.E.B.) en présence et en absence de calcium dans la sous-phase (fig. 42). L'effet des ions divalents n'apparaît pas significatif.

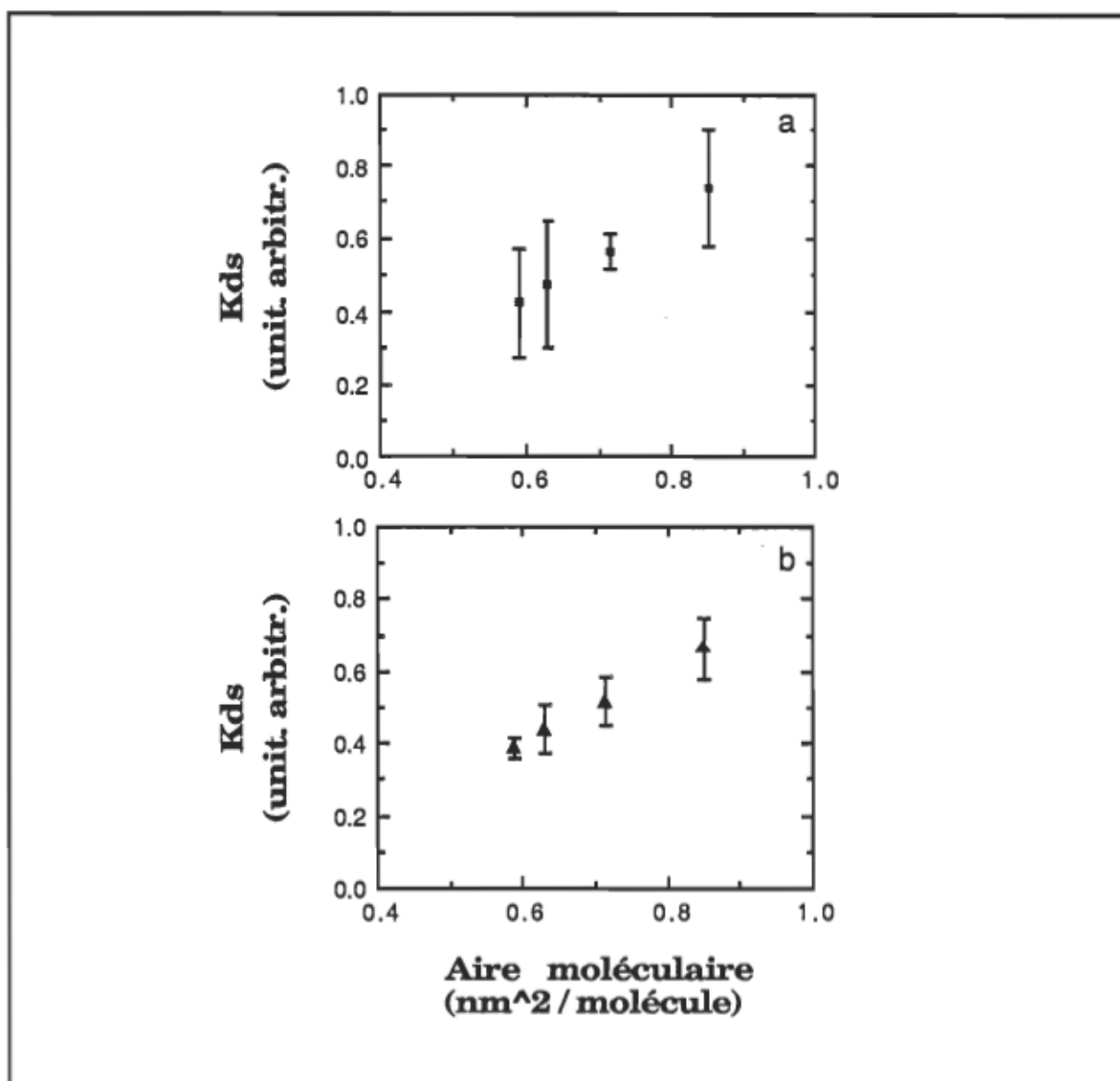


Figure 42 :

Constante de vitesse de dimérisation structurale du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21 \pm 1°C

La figure 43 présente le paramètre K_{ds} pour le film de PE hydrogénée en présence et en absence de calcium dans la sous-phase.

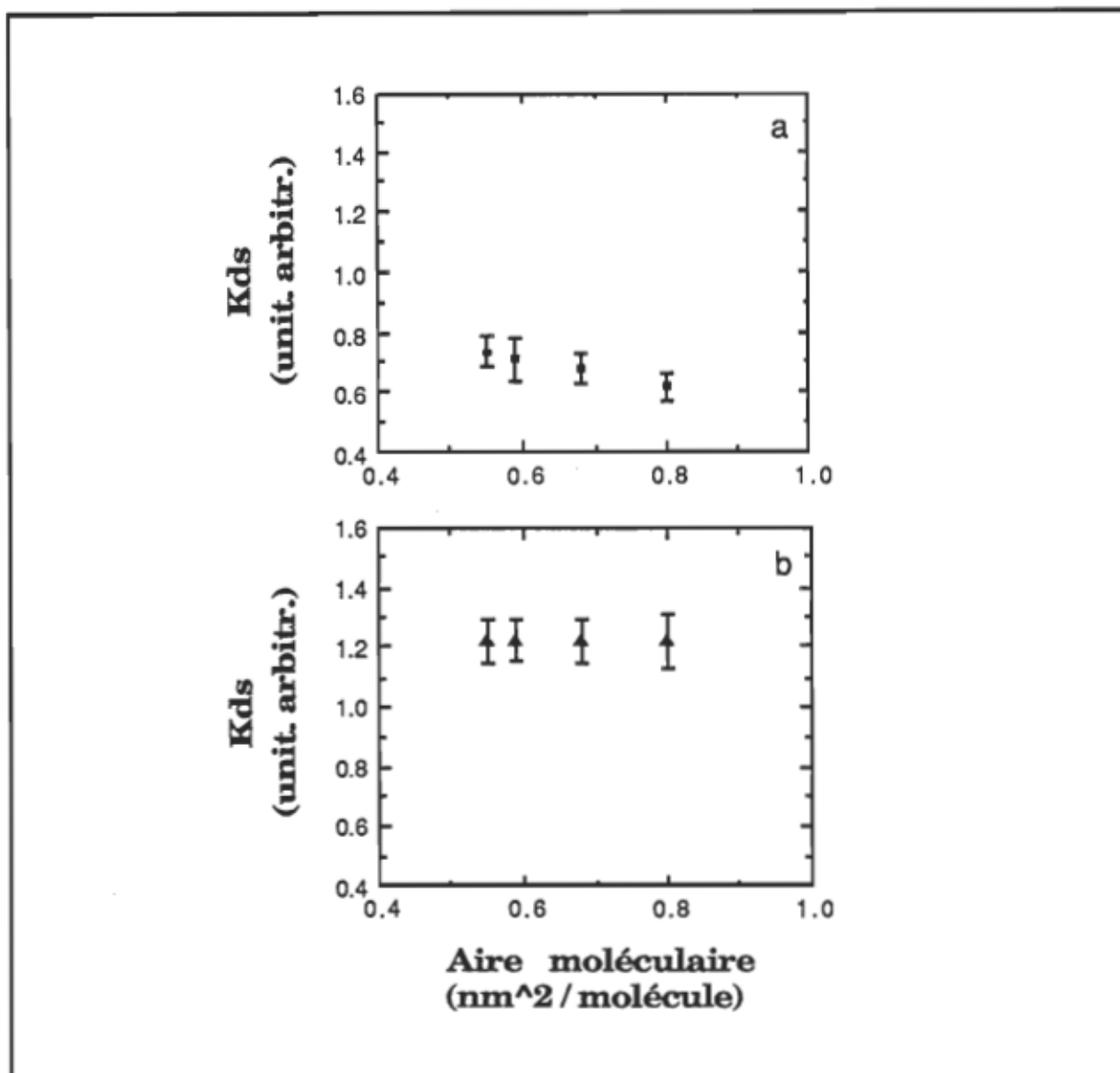


Figure 43 :

Constante de vitesse de dimérisation structurale du 12-9-AS tracée en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE (H). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21 \pm 1°C

Bien que la valeur de K_{ds} ne change pas lors de la compression du lipide, la présence d'ions divalents dans la sous-phase, augmente de façon importante (30%) la valeur de K_{ds} . La structure du film de PE (H) en présence d'ions calcium est donc favorable à la photoréaction.

6.4.3 Les propriétés de diffusion latérale

Les figures 44 a et 45 a montrent le coefficient diffusionnel, D_{lat} , du 12-9-AS inséré dans les films de PE.

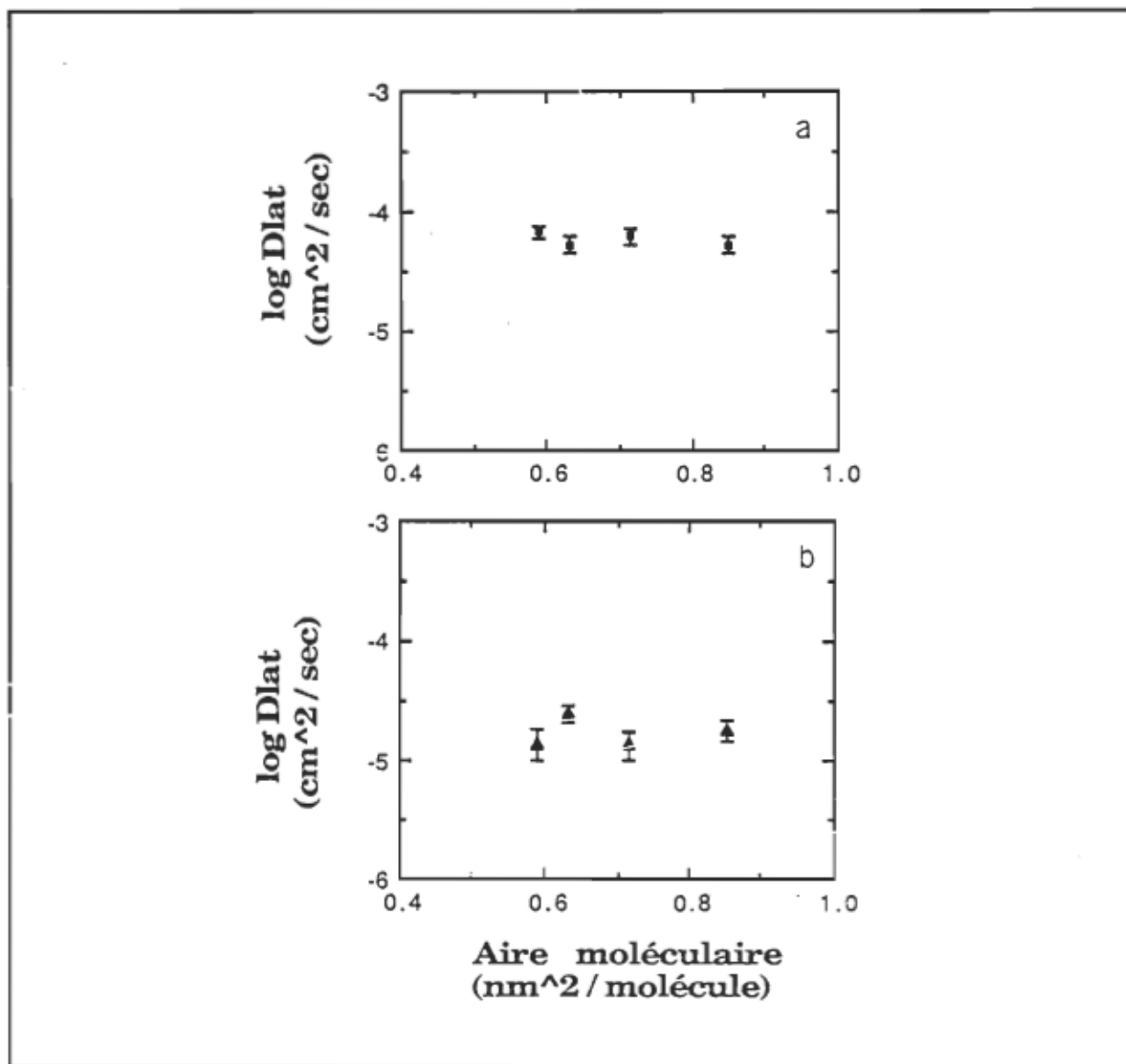


Figure 44 :

Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE (S.E.B.). (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. $T=21 \pm 1^\circ\text{C}$

On observe que la dynamique latérale n'est pas perturbée par la

compression de la PE (S.E.B.) (fig. 44 a). Mais la valeur de D_{lat} est d'environ cinq fois inférieure lorsque ce film est mis en présence de calcium (fig. 44 b et tableau IV).

Une réduction du paramètre diffusionnel est observée lorsque le composé hydrogéné (PE hydrogénée) atteint un certain degré de compression isotherme (fig. 45 a). Lorsque la sous-phase de ce film comporte du calcium, la valeur de D_{lat} du 12-9-AS est réduite d'un facteur 9 (à $\pi = 35\text{mN/m}$), et la mobilité latérale du film est aussi perturbée par le degré de compression de la matrice hôte (fig. 45 b et tableau IV).

Les figures 44 et 45 montrent que la diffusion latérale est plus faible pour le lipide le moins insaturé, soit la PE hydrogénée. Contrairement à l'effet de frein qu'induit l'insaturation des chaînes sur la mobilité latérale des PS, l'insaturation des PE entraîne une plus grande liberté diffusionnelle de ces lipides. La plus faible insaturation des régions hydrocarbonées de la PE hydrogénée déterminent ainsi une réduction de la mobilité latérale de la PE.

L'action du calcium peut provenir d'un pontage ionique entre les régions polaires, mais la nature zwitterionique de la PE incite à réfuter cet argument. La déshydratation de la région polaire peut être soulevée.

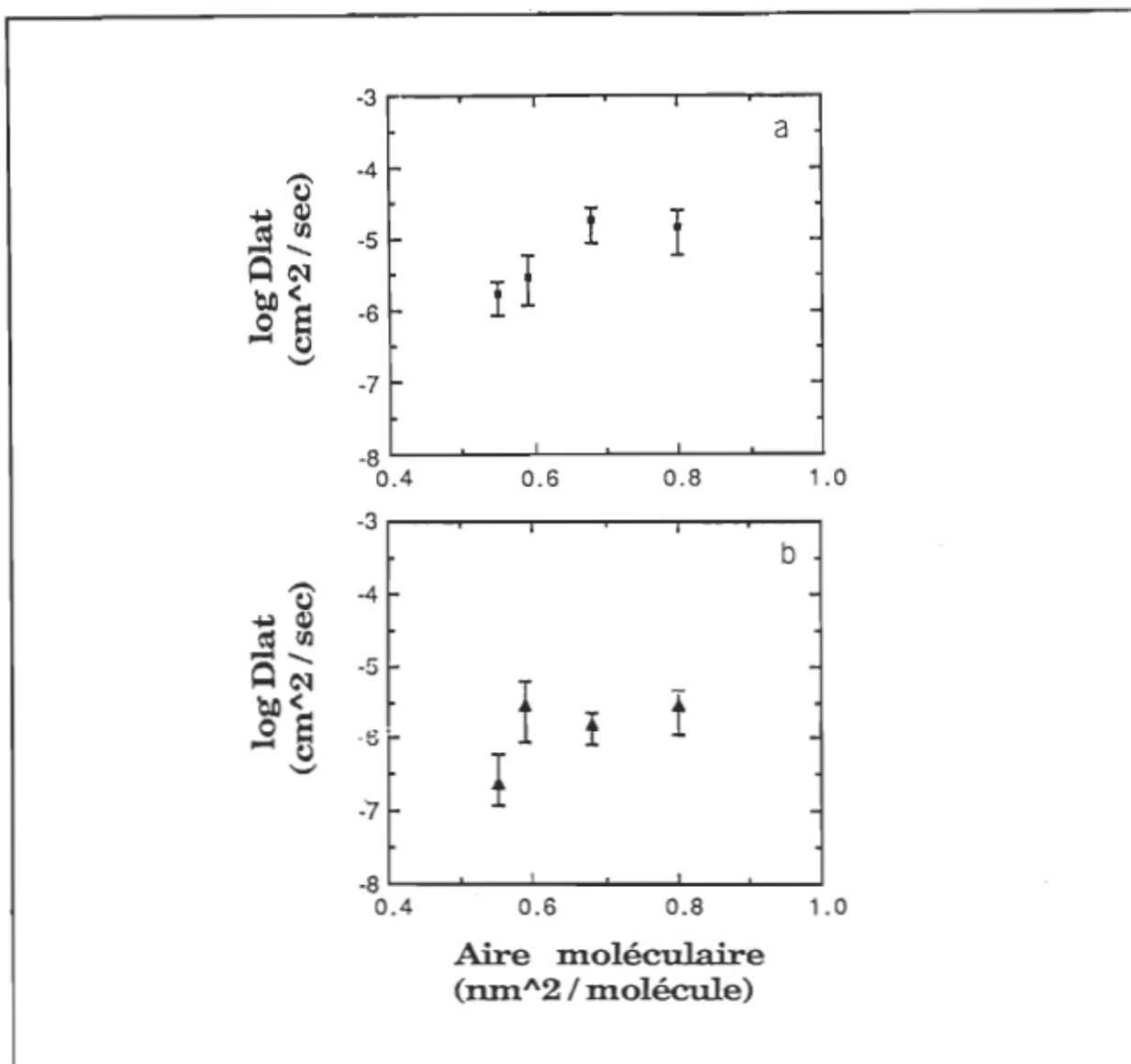


Figure 45 :

Coefficient de diffusion latérale du 12-9-AS tracé en fonction de l'aire moléculaire du lipide hôte, la PE hydrogénée. (a) Sous-phase : NaCl 0,1 M. (b) Sous-phase : NaCl 0,1 M + CaCl₂ 0,01 M. T=21 \pm 1°C

6.5 Conclusion

Les interactions des molécules d'un lipide étalé en monocouche à l'interface air / eau se produisent à deux niveaux: entre les régions polaires et entre les chaînes hydrocarbonées. On ne connaît cependant pas le rôle de chacune de ces régions du film de phospholipide sur ses propriétés

diffusionnelles.

Nous avons vu que lorsque la tête polaire de deux tensio-actifs est de même nature (ex., phosphatidylcholine), l'isotherme de pression de surface montre une expansion pour le film comportant des lipides plus insaturés. Les interactions des régions hydrocarbonées (principalement originant des forces de dispersion) du lipide insaturé se manifestent en effet à de plus grandes aires moléculaires que pour le lipide moins insaturé et elles déterminent aussi la réduction plus importante de la tension de surface de la sous-phase. Les régions hydrocarbonées du matériel insaturé sont donc impliquées dans des interactions intermoléculaires plus importantes.

Nous avons montré que les propriétés de fluorescence (I_f et K_d) des lipides rétiniens appuient cette conclusion. En effet, la présence d'une structuration du milieu hydrocarboné plus importante pour les lipides très insaturés d'origine rétinienne provient de la relaxation de la cage de chaînes grasses hautement insaturées dans l'environnement immédiat du chromophore. La relaxation est altérée par les contraintes des interactions intermoléculaires des chaînes du lipide (principalement les forces de dispersion) et le rendement quantique du chromophore augmente, d'où l'augmentation de I_f . Nous avons montré aussi que cette hydrophobicité du milieu hydrocarboné augmente aussi au cours de la compression des lipides insaturés d'origine rétinienne. Ce comportement est en accord avec le modèle des formes moléculaires associées qui reconnaît qu'avec le degré d'insaturation de la région hydrocarbonée des phospholipides, la portée de la région conique représentant la zone hydrophobe du lipide tend à "s'ouvrir",

c.-à-d. à prendre une surface de projection plus élevée.

Le comportement diffusionnel comparatif des PC indique que les insaturations plus importantes des PC rétiniennes n'entraînent pas de changement des propriétés diffusionnelles de la sonde par rapport aux zones fluides du lipide complètement saturé (diffusion de $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$).

Les films de PS sont condensés lorsque les ions calcium sont présents dans la sous-phase saline. La nature chargée de la région polaire de la phosphatidylsérine rend ce comportement peu étonnant puisqu'elle permet le pontage des ions calcium par la PS. La présence des ions calcium entraîne cependant une réduction importante du coefficient diffusionnel des PS les plus insaturées lors de la compression, sans entraîner d'effet notable sur ce lipide lorsqu'il est moins insaturé. Le pontage des molécules de PS par les ions calcium semble donc être modulable par le degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées des PS. Les hautes insaturations peuvent ainsi empêcher le pontage des PS par le calcium en maintenant de grandes distances intermoléculaires à la surface, telles que l'indiquent les grandes aires moléculaires des films de PS rétiniennes. Ainsi, lorsqu'on comprime la PS (S.E.B.), l'effet du calcium a lieu et le coefficient diffusionnel chute d'environ sept fois.

En présence de calcium, les valeurs d'émission de fluorescence des PE (S.E.B.) augmentent de 10 % alors qu'elles sont réduites de 30% lorsqu'il s'agit de la PE (H). Ce comportement nous indique que le calcium perturbe fortement les interactions de la région hydrophobe des deux PE et ce, dans

un sens opposé. Pour les deux systèmes, la présence du calcium entraîne cependant une baisse du coefficient diffusionnel et n'a aucun effet sur l'isotherme de pression de surface. La nature zwitterionique de la PE incite à réfuter le rôle d'un pontage ionique par les ions divalents, mais la déshydratation de la région polaire des PE peut être soulevée.

CHAPITRE VII

CONCLUSION GÉNÉRALE

La transition de phase et la dynamique moléculaire du dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), ainsi que l'organisation structurale et la dynamique moléculaire des phosphatidylcholines (PC), phosphatidylsérines (PS) et phosphatidyléthanolamines (PE) insaturées en couche monomoléculaire à l'interface air / solution furent investiguées à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ par la technique de recouvrement de fluorescence après photodimérisation du 12-9-AS. Les propriétés des films de surface en fonction de l'aire moléculaire lipidique furent investiguées au moyen de quatre paramètres : i) la pression de surface du lipide; ii) l'intensité d'émission de fluorescence de la sonde; iii) la constante de dimérisation de la photoréaction de la sonde et iv) le coefficient de diffusion latérale.

Dans les monocouches de DPPC, les caractéristiques de fluorescence de la sonde suggèrent que les sondes sont associées en microdomaines dans

le film monomoléculaire. Les résultats montrent aussi que le coefficient de diffusion latérale de la sonde diminue abruptement de trois ordres de grandeur dans l'espace de la phase liquide-condensé, soit la région de phase située entre la fin de la transition LE / LC et le début de la phase solide-condensé. De plus, ce travail montre que les coefficients de diffusion latérale des monocouches à l'interface air / solution sont systématiquement plus élevés que ceux obtenus pour les modèles bimoléculaires dans des états comparables. L'analyse de nos résultats nous permet de conclure que cet effet est caractéristique des monocouches et qu'il n'est pas associé aux phénomènes de convection de surface, comme le suggère la littérature. Plutôt, il reflète la plus grande liberté rotationnelle et translationnelle qui prévaut dans les monocouches, comparé aux bicouches lipidiques où un effet de frottement entre les deux monocouches constitutives peut se produire.

L'effet du mode de compression du lipide (c.-à-d., compression continue ou dépôt successif du lipide sur une surface d'aire fixe) fut ensuite étudié sur le lipide déposé à l'interface air / NaCl 0,1 M. On a aussi regardé l'effet de la force ionique de la sous-phase (NaCl 0,1 ou 1,0 M) lors de la compression continue du lipide. Les résultats de photoaveuglement montrent que le coefficient de diffusion latérale de la sonde diminue abruptement de plusieurs ordres de grandeur dans la phase liquide-condensé c.-à-d., de la fin de la transition de phase LE / LC jusqu'au début de la phase solide-condensé. Les aires moléculaires auxquelles se présentent le début de la transition diffusionnelle suivant les diverses conditions expérimentales liées à une analyse parallèle des états d'hydratation et à leurs aires moléculaires pour des molécules de DPPC en multicouche

suggèrent fortement que l'encombrement stérique associé à l'eau d'hydratation des têtes polaires des molécules de DPPC dans la monocouche est responsable de la chute abrupte du coefficient de diffusion dans la phase liquide-condensé. De plus, les caractéristiques de fluorescence des sondes indiquent, de façon corrélative à la réorganisation des têtes polaires mentionnée, qu'une réorganisation structurale des chaînes d'acides gras du lipide se produit aussi dans la phase LC. La phase liquide-condensé LC est donc une région de transition de la phase liquide à la phase solide où les molécules du lipide montrent une réduction significative de leur diffusion latérale associée à une réorganisation structurale à la fois de leur région polaire et aliphatique.

Nous avons donc entrepris l'investigation des propriétés d'orientation de la sonde dans la monocouche de DPPC à l'interface air / NaCl 0,1 M en fonction de l'aire moléculaire lors de la compression continue du film par un paramètre additionnel : v) le rapport des deux constantes de dimérisation obtenue par polarisation croisée de la lumière d'excitation. Les résultats permettent de décrire plus finement la réorganisation structurale de la sonde dans l'espace de la phase LC.

Le rapport K_{dx} / K_{dyz} lié aux configurations orientationnelles des microdomaines de sonde nous indiquent la présence de trois régions particulières de configuration orientationnelle des microdomaines de la sonde dans les diverses phases du DPPC en monocouche. En effet, l'orientation des sondes varie progressivement à l'intérieur de la phase LC et le long de la transition LE / LC. Les transitions orientationnelles, qui sont

très abruptes, se produisent aux aires moléculaires précisément liées aux changements de phase du film lipidique, soit à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ où se produit la transition LC / SC et à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ à la fin de la transition LE / LC. La première survint lors de la transformation liquide-condensé / solide-condensé (à $0,48 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) et elle appuie l'hypothèse qu'une transformation de second ordre se produit dans cette région (Albrecht et coll., (1978)). La seconde brisure de la symétrie rotationnelle (à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$) se produit à l'entrée de la phase LC pure, soit à la fin de la transition liquide-expansé / liquide-condensé du DPPC en monocouche. Cette seconde brisure de la symétrie rotationnelle peut résulter d'une transformation d'ordre deux ou d'un ordre supérieur à deux.

Pour élucider davantage les mécanismes qui se produisent, nous avons déterminé plus précisément quelles sont les phases qui sont impliquées dans la transition dite LE / LC linéaire et non horizontale et le changement de symétrie rotationnelle du système à l'entrée de la phase LC. Nous avons montré à partir de la courbe du degré de cristallisation en fonction de l'aire moléculaire que la transition dite LE / LC du DPPC semble plutôt impliquer le passage des molécules de l'état moléculaire d'aire A_{LE} (phase LE) à l'état moléculaire d'aire A_{SC} (phase SC) avec la formation d'un état moléculaire intermédiaire caractérisé par une aire A_{LC} (phase LC). La présence de cet état moléculaire d'aire A_{LC} peut expliquer la miscibilité apparente des deux autres phases, et par là, la non horizontalité de la transition. Ainsi, la présence de domaines solides macroscopiques ($\sim 10 \text{ }\mu\text{m}$) observés en microscopie de fluorescence lors de la transition LE / LC peut être attribuée au fait que la sonde est exclue à la fois des domaines

hautement condensés d'aire A_{SC} et des régions de lipides interfaciaux qui les encerclent, d'aire A_{LC} , qui sont positionnées entre ces domaines lipidiques solides et les lipides de la phase fluide d'aire A_{LE} .

La coalescence des constituants d'un système lors de la transition liquide / solide augmente l'énergie potentielle d'un système en utilisant l'énergie cinétique de ses constituants de sorte qu'un état de transition (état activé) est atteint (Hendrickson et coll., (1970)). L'état LC caractérise cet état de transition et la chute diffusionnelle du DPPC reflète précisément l'utilisation de l'énergie cinétique microscopique du système pour atteindre la phase LC et accomplir la transition liquide / solide du DPPC en monocouche.

À $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ le film présente réellement un double aspect de phase unique et d'aire moyenne d'un changement du comportement de la présence simultanée des trois phases LE, LC et SC. Nous avons admis que le système fluctue entre une très grande disparité de ses états moléculaires et un état moléculaire unique à l'aire moyenne de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$. De telles fluctuations, très grandes, se produisent habituellement près d'un point critique. Nous avons montré que ces fluctuations critiques de l'entassement latéral des lipides du film facilitent l'incorporation dans le film de divers matériaux provenant de la sous-phase. Ainsi, de façon similaire aux observations réalisées dans les systèmes multibilipidiques (Sackmann, (1983)), des défauts résultant de l'entassement moléculaire se produisent à cette aire moléculaire moyenne et sont responsables des effets d'incorporation maximale de produits présents dans la sous-phase. Pour

expliquer ce phénomène, une fluctuation critique de la densité dans la région de l'interface a été proposée (Nagle et Scott, (1978)).

On a pu retrouver l'existence d'une phase réelle ayant un état moléculaire unique à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ en examinant deux comportements différents des isothermes de pression de surface du DPPC réalisées à diverses températures. Nous avons d'abord suivi l'évolution de l'aire moléculaire au début de la transition LE / LC, A_t , suivant la température et rencontré un changement de phase à $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ et à une température de 29°C . L'expansivité de la phase prétransitionnelle (phase LE) à partir de cette température nous indique que les lipides se comportent comme un état de vapeur-expansée (VE). Au point critique, à 29°C , $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ et $18 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, les phases LC, LE et VE sont présentes.

Nous avons ensuite analysé le comportement des isothermes de pression de surface du DPPC au moment où apparaît la phase LE aux très basses températures. L'aire de $0,58 \text{ nm}^2 \cdot \text{molécule}^{-1}$ apparaît alors comme un point critique où un équilibre à trois phases existe, soit un équilibre entre les phases LE, LC et la vapeur-condensée.

L'organisation structurale et la dynamique moléculaire des phosphatidylcholines (PC), phosphatidylsérines (PS) et phosphatidyléthanolamines (PE) insaturées en couche monomoléculaire à l'interface air / solution furent obtenues de l'investigation par le F.R.A.P. Les effets de la nature des régions hydrocarbonées et des régions polaires des

phospholipides furent étudiés sur les lipides déposés à l'interface air / NaCl 0,1 M. On a aussi regardé l'effet de la présence additionnelle d'ions divalents (calcium) dans la sous-phase (NaCl 0,1 M + ions divalents 10 mM) lors de la compression continue des lipides. Les caractéristiques d'émission de fluorescence et de dimérisation de la sonde indiquent que les sondes sont regroupées en microdomaines dans les films monomoléculaires. Elles sont aussi utilisées pour obtenir un autre paramètre : vi) la constante de dimérisation structurale de la sonde. Les résultats montrent que le coefficient de diffusion latérale de la sonde diminue lorsque les ions divalents sont présents dans la sous-phase des PS et des PE alors qu'ils n'ont pas d'effet sur les PC. La mobilité latérale des PC insaturées est identique à la mobilité de la PC saturée (DPPC) en régions fluides (phase LE et la transition LE / LC).

Nous avons vu que lorsque la tête polaire de deux tensio-actifs est de même nature (ex., phosphatidylcholine), l'isotherme de pression de surface montre une expansion pour le film comportant des lipides plus insaturés. Les interactions des régions hydrocarbonées (principalement originant des forces de dispersion) du lipide insaturé se manifestent en effet à de plus grandes aires moléculaires que pour le lipide moins insaturé et elles déterminent aussi la réduction plus importante de la tension de surface de la sous-phase. Les régions hydrocarbonées du matériel insaturé sont donc impliquées dans des interactions intermoléculaires plus importantes.

Nous avons montré que les propriétés de fluorescence (I_f et K_d) des lipides rétinien appuient cette conclusion. En effet, la présence d'une

structuration du milieu hydrocarboné plus importante pour les lipides très insaturés d'origine rétinienne provient de la relaxation de la cage de chaînes grasses hautement insaturées dans l'environnement immédiat du chromophore. La relaxation est altérée par les contraintes des interactions intermoléculaires des chaînes du lipide (principalement les forces de dispersion) et le rendement quantique du chromophore augmente, d'où l'augmentation de I_f . Nous avons montré aussi que cette hydrophobicité du milieu hydrocarboné augmente aussi au cours de la compression des lipides insaturés d'origine rétinienne. Ce comportement est en accord avec le modèle des formes moléculaires associées qui reconnaît qu'avec le degré d'insaturation de la région hydrocarbonée des phospholipides, la portée de la région conique représentant la zone hydrophobe du lipide tend à s'ouvrir, c.-à-d. à prendre une surface de projection plus élevée.

Les films de PS sont condensés lorsque les ions calcium sont présents dans la sous-phase saline. La nature chargée de la région polaire de la phosphatidylsérine rend ce comportement peu étonnant puisqu'elle permet le pontage des ions calcium par la PS. La présence des ions calcium entraîne cependant une réduction importante du coefficient diffusionnel des PS plus insaturées lors de la compression, sans entraîner d'effet notoire sur ce même lipide lorsqu'il est moins insaturé. Le pontage des molécules de PS par les ions calcium semble donc être modulable par le degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées des PS. Les hautes insaturations peuvent ainsi empêcher le pontage des PS par le calcium en maintenant de grandes distances intermoléculaires des PS à la surface, tel que l'indique les grandes aires moléculaires des films de PS rétinienne.

En présence de calcium, les valeurs d'émission de fluorescence des PE (S.E.B.) augmentent de 10 % alors qu'elles sont réduites de 30% lorsqu'il s'agit de la PE (H). Ce comportement nous indique que le calcium perturbe fortement les interactions de la région hydrophobe des deux PE et ce, dans un sens opposé. Pour les deux systèmes, la présence du calcium entraîne cependant une baisse du coefficient diffusionnel et aucun effet sur l'isotherme de pression de surface. La nature zwitterionique de la PE incite à réfuter le rôle d'un pontage ionique par les ions divalents, mais la déshydratation de la région polaire des PE peut être soulevée.

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, G., et M. Delbruck. (1968). *Reduction of dimensionality in biological diffusion processes. In: Structural Chemistry and Molecular Biology.* Rich, A. and N. Davidson, eds. W.H. Freeman and Co., San Francisco and London.
- Adam, N.K. (1926). *The structure of thin films: part VIII. Expanded films.* Proc. R. Soc. London. Ser. A. 112 : 362-375.
- Adam, N.K. (1941). *The Physics and Chemistry of Surfaces.* London : Oxford Univ. Press. 3^{ième} ed. 436p.
- Adam, N.K. (1968). *The Physics and Chemistry of Surfaces.* Dover, New-York. Chap. 2
- Adam, N.K., et G. Jessop. (1926). *The Structure and function of thin films: part VII. Critical evaporation phenomena at low compression.* Proc. R. Soc. London. Ser. A. 110 : 423-443.
- Adelman, W.J. Jr., et J. Adams. (1959). *Effects of calcium lack on action potential of motor axons of the lobster limb.* J. Gen. Physiol. 42 : 655-664.

- Adelman, W.J. Jr., et J.C. Dalton. (1960). *Interactions of calcium with sodium and potassium in membrane potentials of the lobster giant axon.* J. Gen. Physiol. 43 : 609-619.
- Adelman, W.J. Jr., et J.W. Moore. (1961). *Action of external divalent ion reduction on sodium movement in the Squid giant axon.* J. Gen. Physiol. 45 : 93-103.
- Albon, N. (1985). *Transitions and molecular packing in highly purified 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine-water phases. 3. Structures of phases with high water content.* J. Phys. Chem. 89 : 3147-3151.
- Albrecht, O., H. Gruler, et E. Sackmann. (1978). *Polymorphism of phospholipid monolayers.* J. Phys. 79 : 301-313.
- Auger, M., C. Salesse, et P. Tancrede. (1988). *The effect of pH on the interactions in mixed monolayers between phosphatidylserine and all-trans retinal.* J. Colloid Interface Sci. 123 : 1-7.
- Axelrod, D., D.E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, et W.W. Webb. (1976). *Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics.* Biophys. J. 16 : 1055-1069.
- Baret, J.F., A.G. Bois, J.J. Dupin, et J.L. Firpo. (1982). *The liquid-expanded and the liquid-condensed phases in amphiphile monolayers are separated by a second order phase transition.* J. Colloid Interface Sci. 86 : 370-376.
- Beck, K., et R. Peters. (1982). *Translational diffusion on lipid monolayers at the air / water interface.* Hoppe-Seylers, Z. Physiol. Chem. 363 : 894.

- Beurer, G., et H.-J. Galla. (1987). *Anaesthetic - phospholipid interaction. The effect of chlorpromazine on phospholipid monolayers.* Eur. Biophys. J. 14: 403-408.
- Block, M.C., E.C.M. van der Neut-Kok, L.L.M. van Deenen, et J. Degier. (1975). *The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes.* Biochim. Biophys. Acta. 406: 187-196.
- Bois, A.G., I.I. Panaïtov, et J.P. Baret. (1984). *Relaxation in LE-LC transition of fatty acid monolayers.* Chem. Phys. Lipids. 34: 265-277.
- Cadenhead, D.A. (1977). *Structure of Biological Membranes.* I. Pascher et S. Abrahamson eds. Plenum, New York. p.79.
- Cadenhead, D.A. (1985). *Monomolecular films as biomembrane model, in: Structure and Properties of Cell Membranes.* G. Benga ed. CRC Press, New-York. pp. 21-62.
- Cadenhead, D.A., R.J. Demchak, et M.C. Phillips. (1967). *Monolayer characteristics of 1,2-dimyristin, 1,2-dimyristoyl-3-cephalin and 1,2-dimyristoyl-3-lecithin at the air-water interface.* Kolloid Z.Z. Polym. 220: 59-64.
- Cadenhead, D.A., B.M.J. Kellner, K. Jacobson, et D. Papahadjopoulos. (1977). *Fluorescent probes in model membranes. I: Anthroyl fatty acid derivatives in monolayers and liposomes of dipalmitoylphosphatidylcholine.* Biochemistry. 16: 5386-5392.

- Cadenhead, D.A., F. Müller-Landau, et B.M.J. Kellner. (1980). *Phase transitions in insoluble one and two-component films at the air / water interface*, in: *Ordering in Two Dimensions*. S.K. Sinha, Eds. Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp.73-81.
- Chapman, D., R.M. Williams, et B.D. Ladbroke. (1967). *Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins)*. Chem. Phys. Lipids. 1 : 445-475.
- Clegg, R.M., et W. L. C. Vaz. (1985). *Transitional diffusion of proteins and lipids in artificial liquid bilayer membranes. A comparison of experiment with theory*. In: *Progress in Protein-Lipid Interaction Vol. 1*. Watts, A., et Dupont, J.J. eds. Elsevier, Amsterdam/New York, pp. 173-229.
- Cohen, M.H., et D.J. Turnbull. (1959). *Molecular transport in liquids and glasses*. J. Chem. Phys. 31 : 1164-1169.
- Cole, K.S. (1949). *Dynamic electrical characteristics of the squid axon membrane*. Arch. Sci. Physiol. 3 : 253-258.
- Cuatrecasas, P. (1974). *Membrane receptors*. Ann. Rev. Biochem. 43 : 169-214.
- Defay, R., L. Prigogine, A. Bellemans, et D.H. Everett. (1966). *Surface Tension and Adsorption*. New-York : Wiley Interscience. pp.1-14.

- Denicourt, N., P. Tancrede, J. Trotard, et J. Teissie. (1987). *Photodimerization and lateral diffusion of 12-(9-anthroyloxy) stearic acid in dipalmitoylphosphoglycerocholine monolayers*. J. Colloid Interface Sci. 116 : 532-540.
- Denicourt, N., P. Tancrede, M. Brullemans, et J. Teissie. (1989). *The liquid-condensed diffusional transition of dipalmitoylphosphoglycerocholine in monolayers*. Biophys. Chem. 33 : 63-70.
- Dervichian, D.G. (1939). *Changes of phase and transformations of higher order in monolayers*. J. Phys. Chem. 7 : 931-948.
- Dervichian, D.G. (1952). *Changements de Phases*. Soc. Chim. Phys. Compte Rendue de Réunion Annuelle, Paris, p.443.
- Dervichian, D.G. (1982). *A comparative analysis of phase transitions in hydrotropic liquid crystal and in monolayers of long-chain substances*. J. Colloid Interface Sci. 90 : 71-85.
- Devaux, H. (1913). *Oil films on water and on mercury*. Smithson. Inst. Ann. Rep. 1913 : 261-273.
- Devaux, P, et H. M. McConnell. (1972). *Lateral diffusion in spin-labelled phosphatidylcholine multilayers*. J. Am. Chem. Soc. 94 : 4475-4481.
- Drenthe E.H.S., A. Klompmakers, S.L. Bonting, et F.J.M. Daemen. (1981). *Transbilayer distribution of phospholipid fatty acid chains in photoreceptor membrane*. Biochim. Biophys. Acta. 641 : 377-385.

- Ducharme D., J.-J. Max, C. Salesse, et R.M. Leblanc. (1990). *Ellipsometric study of the physical states of phosphatidylcholines at the air-water interface*. J. Phys. Chem. 94 : 1925-1932.
- Edidin, M. (1987). *Rotational and lateral diffusion of membrane proteins and lipids: phenomena and function*. Current Topics in Membranes and Transport Vol. 29. R.D. Klausner, C. Kempf, et J. van P. Renswoude eds. Academic Press, New-York. pp. 91-127.
- Fahey, P.F., et W.W. Webb. (1978). *Lateral diffusion in phospholipid bilayer membranes and multilamellar liquid crystals*. Biochemistry. 17 : 3046-3053.
- Faucon, J.F., et Lussan, C. (1973). *Aliphatic chain transitions of phospholipid vesicles and phospholipid dispersions determined by polarization of fluorescence*. Biochim. Biophys. Acta. 307 : 459-466.
- Feix, J.B., C.A. Popp, S.D. Venkataramu, A.H. Beth, J.H. Park, et J.S. Hyde. (1984). *An electron-electron double-resonance study of interactions between [¹⁴N]- and [¹⁵N]-stearic acid spin-label pairs: lateral diffusion and vertical fluctuations in dimyristoyl-phosphatidylcholine*. Biochemistry. 23 : 2293-2299.
- Frye, L., et M. Edidin. (1970). *The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of Mouse Human heterokaryons*. J. Cell. Sci. 7 : 319-335.
- Gaines, G.L. (1966). *Insoluble Monolayers at Liquid-gas Interfaces*. Wiley Intersciences, New-York.

- Gaines, G.L. (1984). *Interface curvature corrections for film balance measurements.* J. Colloid Interface Sci. 98 : 272-273.
- Galla, H.-J., W. Hartmann, U. Theilen, et E. Sackmann. (1979). *On two-dimensional passive random walk in lipid bilayers and fluid pathways in biomembranes.* J. Membrane Biol. 48 : 215-236.
- Galla, H.J., et E. Sackmann. (1974). *Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes : use of pyrene excimers as optical probes.* Biochim. Biophys. Acta. 339 : 103-115.
- Georgallas, A., D.L. Hunter, T. Lookman, M.J. Zuckermann, et D.A. Pink. (1984). *Interactions between two sheets of a bilayer membrane and its internal lateral pressure.* Eur. Biophys. J. 11 : 79 -86.
- Gershfeld, N.L. (1970). *Intermolecular energies in condensed lipid monolayers on water.* J. Colloid Interface Sci. 32 : 167-172.
- Gershfeld, N.L. (1982). *The liquid-condensed / liquid-expanded transition in lipid films: A critical analysis of the film balance experiment.* J. Colloid Interface Sci. 85 : 28-40.
- Gershfeld, N.L. (1976). *Physical chemistry of lipid films at fluid interface.* Ann. Rev. Phys. Chem. 27 : 349-368.
- Gershfeld N.L., et R.E. Pagano. (1972). *Physical chemistry of lipid films at the air-water interface. III. The condensing effect of cholesterol. A critical examination of mixed-film studies.* J. Phys. Chem. 76 : 1244-1250.

- Gibbs, J.W. (1961). *Collected Works*, Vol. 1. Dover, New-York. 219 p.
- Gorter, E., et F. Grendel. (1925). *On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood*. J. Exp. Med. 41 : 439-443.
- Gruen, D.W.R., et S. Marcelja. (1983). *Spatially varying polarization in water. A model for the electric double layer and the hydration force*. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 79 : 225-242.
- Hackenbrock, C.R. (1981). *Lateral diffusion and electron transfer in the mitochondrial inner membrane*. Tr. Biochem. Sci. 6 : 151-154.
- Hanski, E., G. Rimon, et A. Levitzki. (1979). *Adenylate cyclase activation by the β -adrenergic receptors as a diffusion-controlled process*. Biochemistry. 18 : 846-853.
- Hard, S., et R. Neumann. (1981). *Laser light-scattering measurements of viscoelastic monomolecular films*. J. Colloid Interface Sci. 83 : 315-334.
- Harkins, W.D. (1952). *The Physical Chemistry of Surface Films*. Rheinhold, New-York. 413 p.
- Hauser, H., E.G. Finer, et A. Darke. (1977). *Crystalline anhydrous Ca-phosphatidylserine bilayers*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76 : 267-274.
- Hauser, H., et G.G. Shipley. (1981). *Crystallization of phosphatidylserine bilayers induced by lithium*. J. Biol. Chem. 256 : 11377-11380.

- Heckl, W.M., B.N. Zaba, et H. Möhwald. (1987). *Interactions of cytochromes b_5 and c with phospholipid monolayers*. Biochim. Biophys. Acta. 903: 166-176.
- Hendrickson, H.S., P.C. Fan, D.K. Haufman, et D.E. Kleiner. (1983). *The effect of a phase transition on penetration of phospholipid monolayers by melittin and glucagon*. Arch. Biochim. Biophys. 227: 242-247.
- Hendrickson, J., D.J. Cram, et G.S. Hammond. (1970). *Organic Chemistry*. Mc Graw-Hill Book Co. 3rd ed. p.357.
- Horn, L.W., et N. Gershfeld. (1977). *Equilibrium and metastable state in lecithin films*. Biophys. J. 18: 301-310.
- Houslay, M.D., et K.K. Stanley. (1982). *Mobility of the lipid and protein components of biological membranes*. In: *Dynamic of Biological Membranes*. Eds. Wiley-Interscience Publication.
- Huï, S.W., M. Cowden, D. Papahadjopoulos, et D.F. Parson. (1975). *Electron diffraction study of hydrated phospholipid single bilayers. Effects of temperature, hydration and surface pressure of the "precursor" monolayer*. Biochim. Biophys. Acta. 382: 265-275.
- Israëlachvilli, J.V., S. Marcelja, et R.G. Horn. (1980). *Physical principles of membrane organization*. Q. Rev. Biophys. 13: 121-200.
- Ivkov, V.G. (1986). *Determination of the area of the hydrated polar head of a phospholipid molecule from the π -A isotherms of monolayers at a water-air boundary*. Biophysics. 31: 854-858.

- Jatal, I., et G. Zografi. (1979). *On the lack of a true thermodynamic transition between "liquid-expanded" and "liquid-condensed" fatty acid monolayer states.* J. Colloid Interface Sci. 68 : 196-197.
- Jensen, J.W., et J.S. Schutzback. (1984). *Activation of mannosyltransferase II by non-bilayer phospholipids.* Biochemistry. 23 :1115-1119.
- Joly, M. (1950). *General theory of the structure, transformations and mechanical properties of monolayers.* J. Colloid Sci. 5 : 49-70.
- Kellner, B.M.J. (1977). *Pure and mixed monomolecular films of fluorescent probes of cell membranes.* Thèse de Doctorat, State University of New-York., Buffalo.
- Kellner, B.M.J., F. Müller-Landau, D.A. Cadenhead. (1977). *The temperature-dependance characterization of insoluble films at the air/water interface.* J. Colloid interface Sci. 66 : 597-.
- Koppel, D.E., D. Axelrod, J. Schlessinger, E. Elson, et W.W. Webb. (1976). *Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility.* Biophys. J. 16 : 1315-1329.
- Kotyk, A., et K. Janacek. (1975). *Cell Membrane Transport.* Plenum Press, New-York.
- Langmuir, I. (1917). *The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. liquids.* J. Am. Chem. Soc. 39 : 1848-1906.
- Langmuir, I. (1933). *Oil lenses on water and the nature of monomolecular expanded films.* J. Chem. Phys. 1 : 756-776.

- Liebman, P.A., et G. Entine. (1974). *Lateral diffusion of visual pigment in photoreceptor disk membranes*. Science. 195 : 457-459.
- Lindblom, G. N. Person, B Lindman, et G. Arvidson. (1974). *The binding of water and sodium ions in model membrane systems studied by N.M.R.* Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 78 : 955-961.
- Lindblom, G., H. Wennerström, G. Arvidson, et B. Lindman. (1976). *Lecithin translational diffusion studied by pulsed nuclear magnetic resonance*. Biophys. J. 16 : 1287-1295.
- Lipicky, R.J., et S.H. Bryant. (1963). *Potassium efflux of squid giant axons in ion external bivalent cation solutions*. Am. J. Physiol. 204 : 480-482.
- Lopez, A., L. Dupou, J. Trottard, et J.-F. Tocanne. (1988). *Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments under conditions of uniform disk illumination*. Biophys. J. 53 : 963-970.
- Lösche, M., et H. Möhwald. (1984). *Fluorescence microscope to observe dynamical processes in monomolecular layers at the air / water interface*. Rev. Sci. Instrum. 55 : 1968-1972.
- Lösche. M., E. Sackmann, et H. Möhwald. (1983). *A fluorescence microscopic study concerning the phase diagram of phospholipids*. Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 87 : 848-852.

- Loughran, T., M.D. Hatlee, L.K. Patterson, et J.J. Kozak. (1980). *Monomer-excimer dynamics in spread monolayer. I. Lateral diffusion of pyrene dodecanoic acid at the air-water interface.* J. Chem. Phys. 72 : 5791-5797.
- Luxnat, M., et H.J. Galla. (1986). *Partition of chlorpromazine into lipid bilayer membranes : The effect of membrane structure and composition.* Biochim. Biophys. Acta. 856 : 274-282.
- Marcelja, S. (1974). *Chain ordering in liquid crystals. II. Structure of bilayer membranes.* Biochim. Biophys. Acta. 367 : 165-176.
- Marsh, D., A. Watts, et P.F. Knowles. (1976). *Evidence for phase boundary lipid permeability of tempo-choline into Dimyristoyl Phosphatidylcholine vesicles at the phase transition.* Biochemistry. 15 : 3570-3578.
- McCown, J.T., E. Evans, S. Diehl, et C. Wiles. (1981). *Degree of hydration and lateral diffusion in phospholipid multibilayers.* Biochemistry. 20 : 3134-3138.
- McGrath, A.E., C.G. Morgan, et G.K. Radda. (1976). *Photobleaching. A novel fluorescence method for diffusion studies in lipid systems.* Biochim. Biophys. Acta. 426 : 173-185.
- Mc Murray, W.C. (1973). *Lecithin biosynthesis in liver mitochondrial fractions.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 58 : 467-474.

- Miljanich, G.P., A. Sklar, D.L. White, et E.A. Dratz. (1979). *Disaturated and dipolyunsaturated phospholipids in the bovine retinal rod outer segment disk membrane*. Biochim. Biophys. Acta. 552 : 294-300.
- Mitchell, M.L., et R.A. Dluhy. (1988). *In situ FT-IR investigation of phospholipid monolayer phase transition at the air-water interface*. J Am. Chem. Soc. 110 : 712-718.
- Moore B., C.M. Knobler, D. Broseta et F. Rondelez. (1986). *Studies of phase transitions in Langmuir monolayers by fluorescence microscopy*. Chem. Soc. Faraday Trans. 2. 82 : 1753-1761
- Nagle, J.F. (1980). *Theory of the main lipid bilayer phase transition*. Ann. Rev. Phys. Chem. 31 : 157-195.
- Nagle, J.F., et H.L. Scott. (1978). *Biomembrane phase transitions*. Physics Today. 31 : 38-45.
- Navarro, J., M. Toivio-Kinnucan, et E. Racker. (1984). *Effect of lipid composition on the calcium / adenosine 5'-triphosphate coupling ratio of the Ca^{+2} -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum*. Biochemistry. 23 : 130-135.
- Neuman, R.D., S. Fereshtekhou, et R. Ovalle. (1984). *Electron microscopic observation of the LE / LC phase transition in dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayers*. J. Colloid Interface Sci. 101 : 309-313.

- Newton, C., W. Panborn, S. Nir, et D. Papahadjopoulos. (1978). *Specificity of Ca^{+2} and Mg^{+2} binding to phosphatidylserine vesicles and resultant phase changes of bilayer membrane structure.* Biochim. Biophys. Acta. 506 : 281-287.
- Ohnishi, S., et T. Ito. (1974). *Calcium-induced phases separations in phosphatidylserine-phosphatidylcholine membranes.* Biochemistry. 13 : 881-887.
- Op den Kamp, J.A.F. (1979). *Lipid asymmetry in membranes.* Ann. Rev. Biochem. 48 : 47-71.
- Op den Kamp, J.A.F., J. De Gier, et L.L.M. Van Deenen. (1974). *Hydrolysis of phosphatidylcholine liposomes by pancreatic phospholipase A2 at the transition temperature.* Biochim. Biophys. Acta. 245 : 253-256.
- Op den Kamp, J.A.F., M. TH. Kauerz, et L.L.M. Van Deenen. (1975). *Action of pancreatic phospholipase A2 on phosphatidylcholine bilayers in different physical states.* Biochim. Biophys. Acta. 406 : 169-177.
- Pallas, N.R., et B.A Pethica. (1985). *Liquid-expanded to liquid-condensed transitions in lipid monolayers at the air / water interface.* Langmuir. 1 : 509-513.
- Papahadjopoulos, D. (1968). *Surface properties of acidic phospholipids : interactions of monolayers and hydrated liquid crystal with uni- and bi-valent metal ions.* Biochim. Biophys. Acta. 163 : 240-254.

- Papahadjopoulos, D., K. Jacobson, S. Nir, et T. Isaac. (1973). *Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol.* Biochim. Biophys. Acta. 311 : 330-348.
- Peinel, G., H. Frischieder, et H. Hinder. (1983). *Quantum-chemical and empirical calculations on phospholipids. VIII. The electrostatic potential from isolated molecules up to layer systems.* Chem. Phys. Lipids. 33 : 95-205.
- Peters, R. et K. Beck. (1983). *Translational diffusion in phospholipid monolayers measured by fluorescence microphotolysis.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 : 7183-7187.
- Phillips, M.C., et D. Chapman. (1968). *Monolayer characteristics of saturated 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins) and phosphatidylethanolamines at the air-water interface.* Biochim. Biophys. Acta. 163 : 301-313.
- Pockels, A. (1891). *Surface tension.* Nature (Letter to the editor). 43 : 437-439.
- Poo, M., et R.A. Cone. (1974). *Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane.* Nature (London). 247 : 438-441.
- Prats, M., J.F. Tocanne, et J. Teissié. (1985). *Lateral proton conduction at the lipid / water interface. Its modulation by physical parameters. Experimental and mathematical approaches.* Eur. J. Biochem. 149 : 663-668.

- Rasing, Th., H. Hsiung, Y.R. Shen, et M.W. Kim.. (1988). *Ellipsometry study of two-dimensional phase transition*. Physical Rev. A. 37 : 2732:2735.
- Rice, D.K., D.A. Cadenhead, R.N.A.H. Lewis, et R.N. McElhaney, (1987). *A comparative monomolecular film study of a straight-chain phosphatidylcholine (dipalmitoylphosphatidylcholine) with three isobranched-chain phosphatidylcholines, (diisoheptadecanoylphosphatidylcholine, diisooctadecanoylphosphatidylcholine, and diiso-eicosanoylphosphatidylcholine)* . Biochemistry. 26 : 3205-3210.
- Rideal E.K. (1930). *An Introduction to Surface Chemistry*. Cambridge Univ. Press, London, 2nd ed. 459 p.
- Rideal E.K. (1951). *On reactions in monolayers*. Proc. R. Soc. London. Ser. A. 209 : 431-446.
- Robert, S., P. Tancrede, C. Salesse, et R.M. Leblanc. (1983). *Interactions in mixed monolayers between distearoyl-l-phosphatidylethanolamine, rod outer segment phosphatidylethanolamine and all-trans retinal*. Biochim. Biophys. Acta. 730 : 217-225.
- Robertson, R.N. (1983). *The Lively Membranes*. Cambridge : New-York. Cambridge University Press. 206 p.
- Rojas, E., et J.M. Tobias. (1965). *Membrane model : association of inorganic cations with phospholipid monolayers*. Biochim. Biophys. Acta. 94 : 394-404.

- Sackmann, E. (1983). Biophysics, eds. W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl et H. Ziegler, Springer, New-York. p.425.
- Salesse, C., F. Boucher, et R.M. Leblanc. (1983). *Propriétés interfaciales des phospholipides de la membrane des bâtonnets rétiens*. Rev. Can. Biol. Exptl. 42 : 123-130.
- Scott, H.L. Jr. (1975). *A theoretical model for lipid monolayer phase transitions*. Biochim. Biophys. Acta. 406 : 329-346.
- Singer, M. (1981). *Permeability of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers*. Chem. Phys. Lipids. 28 : 253-267.
- Singer S.J., et G.L. Nicholson. (1972). *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science. 175 : 720-731.
- Skulachev, V.P. (1980). *Integrating fonction of biomembranes. Problems of lateral transport of energy, metabolites and electrons*. Biochim. Biophys. Acta. 604 : 297-320.
- Snik, A.D. (1983). *Study of physical properties of monolayers, applications to physiology*. Thèse de Doctorat. Technische Hogeschool Eindhoven. 72 p.
- Stroeve, P., et J. Miller. (1975). *Lateral diffusion of cholesterol in monolayers*. Biochim. Biophys. Acta. 401 : 157-167.

- Tancrède, P., L. Parent, et R.M. Leblanc. (1982). *Interactions in mixed monolayers between dioleoyl-l-phosphatidylcholine and 11-cis retinal. A comparaison with all-trans retinal.* J. Colloid Interface Sci. 89 : 117-123.
- Teissié, J. (1979). *A fluorescence study with polarized incident light of the compression of phospholipid monolayers spread at the air / water interface: orientation processes in the glycerol region.* Chem. Phys. Lipids. 25 : 357-368.
- Teissié, J., J.F. Tocanne, et A. Baudras. (1978). *A fluorescence approach of the determination of translational diffusion coefficients of lipids on phospholipid monolayer at the air-water interface.* Eur. J. Biochem. 83 : 77-85.
- Teorell, T. (1956). *Transport Phenomena in Membranes. Eighth Spiers memorial lecture, In: Membrane Phenomena.* Discuss. Farad. Soc. 21 : 9-26.
- Theretz, A., J.L. Ranck, et J.F. Tocanne. (1983). *Polymyxin B-induced phase separation and acyl chain interdigitation in phosphatidylcholine / phosphatidylglycerol mixtures.* Biochim. Biophys. Acta. 732 : 499-508.
- Theretz, A., J. Teissié, et J.F. Tocanne. (1984). *A study of the structure and dynamics of complexes between polymyxin B and phosphatidylglycerol in monolayers by fluorescence.* Eur. J. Biochem. 14 : 113-119.

- Thulborn,, K.R. (1981). *The use of N-(9-anthroyloxy) fatty acids as fluorescent probes for biomembranes. In : Fluorescent Probes..* Eds. G.S. Beddard et M.A. West. Academic Press, New-York. p.95.
- Trauble, H., et H. Eibl. (1974). *Electrostatic effects on lipid phase transition: membrane structure and ionic environment.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 : 214-219.
- Tsong, T.Y. (1975). *Effect of phase transition on the kinetics of dye transport in phospholipid bilayer structures..* Biochemistry. 14 : 5409-5414.
- Upreti, G.C., et M.K. Jain. (1980). *Action of phospholipase A₂ on unmodified phosphatidylcholine bilayers: organizational defects are preferred sites of action.* J. Membrane Biol. 55 : 113-121.
- Van Dijck, P.W. M., B. de Kruijff, A.J. Verkleij, L.L.M. Van Deenen, et J. de Gier. (1978). *Comparative studies on the effects of pH and Ca⁺² on bilayers of various negatively charged phospholipids and their mixtures with phosphatidylcholine.* Biochim. Biophys. Acta. 512 : 84-96.
- Vaz, W.L.C., R.N. Clegg, et D. Halmann. (1985). *Translational Diffusion of lipids in liquid crystalline phase phosphatidylcholine multibilayers. A comparaison of experiment with theory.* Biochemistry. 24 : 781-786.

- Vaz, W.L.C., et D. Halmann. (1983). *Experimental evidence against the applicability of the Saffmann-Delbruck model to the translational diffusion of lipids in phosphatidylcholine bilayer membranes*. FEBS Lett. 152: 287-290.
- Verkleij, A.J. (1984). *Lipidic intramembranous particles*. Biochim. Biophys. Acta. 779: 43-63.
- Vilallonga, F. (1968). *Surface chemistry of L-dipalmitoyl lecithin at the air-water interface*. Biochim. Biophys. Acta. 163: 290-300.
- Von Tscharner, V., et H.M. McConnell. (1981a). *An alternative view of phospholipid phase behavior at the air-water interface. Microscope and film balance studies*. Biophys. J. 36: 409-419.
- Von Tscharner, V., et H.M. McConnell. (1981b). *Physical properties of lipid monolayers on alkylated planar glass surfaces*. Biophys. J. 36: 421-427.
- White, D.A. (1973). *Phospholipid composition of mammalian tissues*. Biochim. Biophys. Acta. Libr. 3: 441-482.
- White, S.H., et G.I. King. (1985). *Molecular packing and area compressibility of lipid bilayers*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 6532-6536.
- Yeagle, P.L. (1978). *Phospholipid headgroup behavior in biological Assemblies*. Accounts of Chem. Res. 11: 321-327.