

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE PRESENTE A
UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE

PAR
GAETAN L'HEUREUX

UTILISATION DE SONDES FLUORESCENTES DANS LA
CARACTÉRISATION DES VÉSICULES LIPIDIQUES .
APPLICATION AU TRANSFERT D'ÉNERGIE MEMBRANAIRE.

MAI 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.

RESUME

Afin de mieux caractériser certains processus de transfert énergétique au niveau des membranes, nous avons utilisé diverses sondes fluorescentes incorporées dans des petites vésicules unilamellaires constituées de phosphatidylcholine (PC). Les sondes employées comme donneurs étaient le pyrène, l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque (C₁₆PY) et le 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-L- α -phosphatidylcholine (PY-PC). Deux accepteurs ont été utilisés, soit l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique (2-AS) et l'acide 16-(9-anthroyloxy) palmitique (16-AP). Nous avons analysé le processus de transfert énergétique entre cinq couples donneur-accepteur selon leurs positions relatives dans la bicouche. Préalablement à l'étude de transfert d'énergie, nous avons caractérisé certaines propriétés reliées à la formation d'excimères du pyrène dans les vésicules.

La localisation du pyrène dans la bicouche a été déterminée selon la concentration de sondes incorporées. Nous avons d'abord démontré que le pyrène était préférentiellement incorporé dans la phase lipidique des vésicules. La formation d'excimères de pyrène entre les vésicules a été observée en fonction de la concentration de vésicules en solution, notons que ce phénomène n'est pas observé avec la sonde C₁₆PY, i.e. lorsque le chromophore se situe dans la région des chaînes hydrocarbonées. Le modèle proposé pour la localisation indique que la formation d'excimères du

pyrène suite à une collision entre vésicules nécessite la fusion momentanée des couches d'hydratation externes des vésicules impliquées.

La seconde étape de caractérisation concernait la formation d'excimères du pyrène à l'intérieur de la phase membranaire des vésicules. Les résultats indiquent que la formation d'excimères est contrôlée par la diffusion moléculaire jusqu'à environ 4,0 mol% de pyrène. Il a également été démontré qu'il était possible d'obtenir une émission de type excimère avec des systèmes agrégés, notamment des dispersions aqueuses de C₁₆PY. La formation d'excimères a été étudiée en fonction de la concentration de NaCl dans la phase aqueuse. Les résultats montrent que la formation d'excimères, et conséquemment la diffusion moléculaire des sondes, sont indépendantes de la force ionique en solution entre 0,0 et 0,4 M NaCl.

Pour l'étude du transfert d'énergie, nous avons travaillé avec cinq couples donneur-accepteur : pyrène/2-AS, C₁₆PY/2-AS, PY-PC/2-AS, pyrène/16-AP et PY-PC/16-AP. Ces cinq couples nous ont permis une variation sur la position relative entre donneurs et accepteurs, de la région polaire à la région hydrophobe. Deux types de transfert ont été observés, soit un échange par collision (pyrène/2-AS et PY-PC/16-AP) et un transfert à distance de type Förster (C₁₆PY/2-AS, PY-PC/2-AS et pyrène/16-AP). L'efficacité de chaque couple a été mesurée et discutée en considérant la localisation des fluorophores et le type de transfert concerné.

AVANT-PROPOS

Lorsque j'étais enfant, je vouais une admiration magique pour les grands scientifiques en blouses blanches. Je voulais être comme eux, blindés avec des diplômes, mon armure contre la misère intellectuelle. Aujourd'hui, j'admire les enfants. A force de vouloir être complexe, on finit par aimer la simplicité. L'ignorance naïve sublime peut-être la précieuse prétention de la connaissance. Mais qu'importe, puisque les petits enfants vont tous un jour joindre le grand troupeau aveugle qui broute l'herbe de l'indifférence. C'est toujours du marche ou crève.

C'est en juin 1986 que j'ai décidé de m'inscrire au doctorat. Mais aujourd'hui je ne suis pas convaincu d'avoir vraiment *décidé*, c'était une journée très chaude. Depuis, j'ai beaucoup appris, j'ai même compris certaines choses obscures. Je dois admettre que le doctorat est un bon lieu pour vieillir, je trouve cependant la gestation un peu longue et laborieuse. Ceux qui sont sages doivent rire de ma simplicité ou s'inquiéter de mon manque de rigueur. Ma mère, qui est une personne très sage, m'a toujours dit qu'un jour je rirais moi aussi en pensant à ces années difficiles. Elle a sans doute raison, je crois que je souris déjà.

Au cours des prochaines années, j'oublierai progressivement ce que j'ai fait durant mon doctorat, mais je ne pourrai sans doute jamais ou-

blier les gens qui m'ont entouré. Merci à Mário pour le défi qu'il a entrepris avec moi, ces efforts méritent mon respect. Merci aux nombreuses personnes qui ont travaillé avec moi dans le laboratoire, le climat était tout simplement exceptionnel. Merci aussi à tous mes autres ami(e)s qui ont partagé et supporté mes pitreries quotidiennes, entre un éclat de rire et un café (peut-être une bière une ou deux fois !). Finalement, un remerciement particulier aux membres de ma famille, cette thèse et tout le travail que j'ai effectué leur sont dédiés.

TABLE DES MATIERES.

RESUME.....	ii
AVANT-PROPOS.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS.....	xiii
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION	
1.1 Caractéristiques des membranes biologiques.....	1
1.2 Modèles membranaires.....	5
1.3 Incorporations de sondes fluorescentes dans les membranes	
1.3.1 Généralités.....	9
1.3.2 Choix et caractéristiques des sondes.....	9
1.4 Objectifs.....	12

II. METHODES EXPERIMENTALES ET THEORIQUES

2.1 Méthodes expérimentales	
2.1.1 Matériels.....	15
2.1.2 Préparations des vésicules unilamellaires.....	16
2.1.3 Dosages des lipides.....	19
2.1.4 Méthodes de mesures de la fluorescence.....	20
2.2 Méthodes théoriques	
2.2.1 Diffusion dans les membranes.....	22
2.2.2 Calcul de concentration des sondes :	
surface d'occupation.....	24
2.2.3 Transfert d'énergie : échange lors de collisions....	24
2.2.4 Transfert d'énergie : mécanisme du dipôle induit....	28
DETERMINATION DE LA LOCALISATION DU PYRENE DANS LES VESICULES LIPIDIQUES.	
3.1 Fluorescence du pyrène.....	31
3.2 Démonstration pour l'incorporation du pyrène dans la phase lipidique.....	33
3.3 Modèle proposé.....	38
3.4 Discussion.....	42

IV. FACTEURS AFFECTANT LA FORMATION D'EXCIMERES DE PYRENE ET D'ACIDE (PYRENYL-1)-16 HEXADECANOIQUE DANS LES VESICULES LIPIDIQUES

4.1 Formation d'excimères	
4.1.1 Caractéristiques spectrales des sondes dans les vésicules.....	45
4.1.2 Caractéristiques spectrales du C ₁₆ PY en solution....	48
4.1.3 Discussion.....	54
4.2 Effets de NaCl sur la formation d'excimères	
4.2.1 Conséquence sur l'environnement diélectrique et la fluidité membranaire.....	59
4.2.2 Discussion.....	62
 V. TRANSFERT D'ENERGIE DANS LES VESICULES	
5.1 Généralités.....	68
5.2 <i>Quenching</i> du pyrène par l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique.....	69
5.3 <i>Quenching</i> de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque et de 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-L- α -phosphatidylcholine par l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique.....	75
5.4 <i>Quenching</i> du pyrène et de 3-palmitoyl-2-(1-pyrene-decanoyl)-L- α -phosphatidylcholine par l'acide 16-(9-anthroyloxy) palmitique.....	80
5.5 Discussion.....	86
 VI. CONCLUSION.....	91
 BIBLIOGRAPHIE.....	94

LISTE DES FIGURES

Figures :

1.	Schéma d'une membrane avec transporteurs d'électrons.....	2
2.	Structure chimique de la phosphatidylcholine.....	7
3.	Structures chimiques du pyrène, de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque, de 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-L- α - phosphatidylcholine et de N-(1-pyrenesulfonyl)dipalmitoyl- L- α -phosphatidyléthanolamine.....	11
4.	Structures chimiques de l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique et de l'acide 16-(9-anthroyloxy) palmitique.....	13
5.	Profil d'élution des vésicules.....	18
6.	Vecteurs des moments transition pour le facteur d'orientation..	30
7.	Spectres de fluorescence du pyrène et de l'acide (pyrenyl-1)- 16 hexadécanoïque dans des vésicules.....	32
8.	Spectres de fluorescence du pyrène dans l'eau et dans des vésicules.....	34
9.	Variation de l'intensité du monomère du pyrène dans des vésicules en fonction de la concentration de vésicules.....	37
10.	Schéma moléculaire pour la localisation du pyrène dans des vésicules.....	41

11. Spectre d'absorption du pyrène dans des vésicules à forte concentration.....	46
12. Spectres d'absorption de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque dans des vésicules à forte et faible concentrations.....	49
13. Spectres d'excitation du pyrène dans des vésicules, monomère et excimère.....	50
14. Spectres d'absorption de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque dans l'éthanol et dans un mélange 1:20 éthanol:tampon.....	52
15. Spectres d'émission de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque dans l'éthanol et dans un mélange 1:20 éthanol:tampon.....	53
16. Spectres d'excitation de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque dans l'éthanol et dans un mélange 1:20 éthanol:tampon.....	55
17. Variation du rapport excimère/monomère (I _E /I _M) du pyrène et de N-(1-pyrenesulfonyl)dipalmitoyl-L- α -phosphatidyléthanolamine dans des vésicules en fonction de la concentration de NaCl et de la concentration de vésicules.....	61
18. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre le pyrène et l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique en solution.....	70
19. Spectre d'excitation de l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique et spectre d'émission du pyrène dans des vésicules.....	71
20. Schéma moléculaire pour la localisation du pyrène et de l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique dans des vésicules.....	73
21. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre le pyrène et l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique dans des vésicules.....	74
22. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre a) l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque et b) le 3-palmitoyl-2-(1-pyrene-	

decanoyle)-L- α -phosphatidylcholine et l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique dans des vésicules.....	76
23. Schéma moléculaire pour la localisation de 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyle)-L- α -phosphatidylcholine et l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique dans des vésicules.....	81
24. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre le 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyle)-L- α -phosphatidylcholine et l'acide 16-(9-anthroyloxy) palmitique dans des vésicules.....	82
25. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre le pyrène et l'acide 16-(9-anthroyloxy) palmitique dans des vésicules.....	85
26. Efficacité du transfert d'énergie en fonction de la concentration d'accepteurs pour C ₁₆ PY/2-AS, PY-PC/2-AS et pyrène/16-AP dans des vésicules.....	89

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

Symboles et abréviations :

2-AS : acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique.

16-AP : acide 16-(9-anthroyloxy) palmitique

C₁₆PY : acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque

I_E : intensité de fluorescence de l'excimère

I_M : intensité de fluorescence du monomère

PC : phosphatidylcholine

PY-DPPE : N-(1-pyrenesulfonyl)dipalmitoyl-L- α -phosphatidyléthanolamine

PY-PC : 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-L- α -phosphatidylcholine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Caractéristiques des membranes biologiques.

Les membranes biologiques représentent un élément fondamental des structures cellulaires. Elles forment une barrière sélective entre divers compartiment aqueux et possèdent plusieurs fonctions associées au métabolisme cellulaire. Les membranes sont essentiellement constituées de lipides et de protéines, elles peuvent également être associées à des éléments particuliers tels que les enzymes et les systèmes de transport (voir e.g. Lehninger, 1977).

Dans ce travail nous porterons notre attention sur une des propriétés reliées aux membranes biologiques, soit le transfert d'énergie. Effectivement, plusieurs réaction de transfert d'énergie se produisent au niveau des membranes. Mentionnons, comme exemple particulier, les diverses étapes de transfert d'électrons au cours du processus de la photosynthèse. La figure 1 schématisé une membrane de thylacoïde de chloroplaste comprenant une série de transporteurs. C'est ce système qui capte l'énergie lumineuse destinée à être ensuite transformée en énergie chimique.

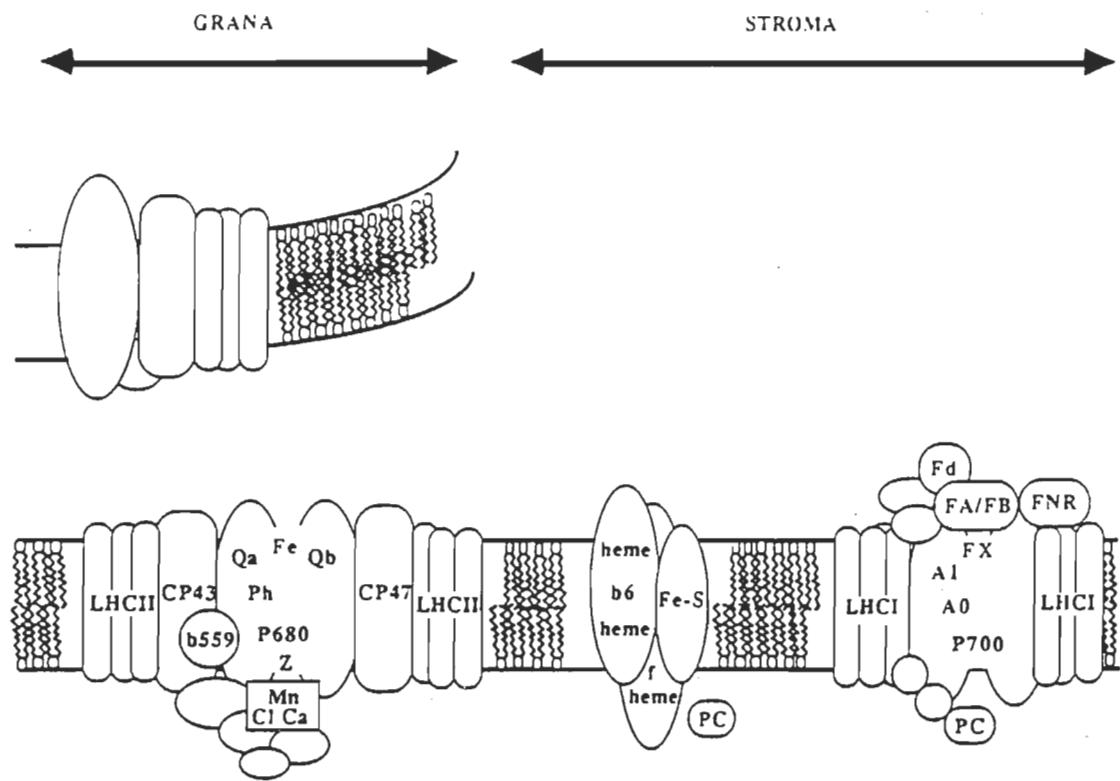


Figure 1. Schéma d'une membrane de chloroplaste avec transporteurs d'électrons. Tiré de : Golbeck, 1987.

que stable. Comme l'indique la figure 1, le transfert d'électrons s'effectue de part et d'autre de la membrane. Il est donc important de bien caractériser les propriétés diélectriques des différentes régions et de connaître le profil d'efficacité de transfert à travers la membrane.

Diverses approches de reconstitutions moléculaires peuvent être employées pour étudier le transfert d'énergie membranaire. L'utilisation de systèmes artificiels, plus simples que les membranes naturelles, permet de focaliser l'attention sur un problème spécifique et en conséquence facilite le travail de recherche. Evidemment, ces systèmes artificiels demeurent souvent incomplets et ils ne représentent qu'une fraction de la réalité.

Dans un article de revue paru en 1982, Grätzel définit trois grandes catégories de systèmes permettant l'étude du transfert d'énergie : i) d'abord les membranes des thylacoïdes, soit l'étude des photosystèmes (PSI et PSII); ii) puis les reconstitutions moléculaires de types biologiques telles que micelles et membranes; iii) finalement les systèmes artificiels n'ayant pas nécessairement une ressemblance avec les systèmes biologiques, par exemple les dispersions de colloïdes. Ce dernier point est abondamment discuté dans l'article de Grätzel.

Pour notre étude, nous avons choisi le modèle des vésicules unilamellaires. Les membranes sont constituées de phosphatidylcholine (PC) par une méthode conventionnelle que nous décrirons ultérieurement. En conséquence, nous allons d'abord examiner quelques travaux typiques sur

le transfert d'énergie effectués avec des vésicules de PC. Il ne s'agit pas ici d'étaler une série de résultats éparses, mais plutôt de dégager les points les plus importants qui nous seront utiles pour cerner les problèmes fondamentaux.

L'incorporation de molécules (sondes) dans un système membranaire a souvent pour effet de créer une concentration locale très élevée, et ce même à faible taux d'incorporation ($\approx 1 \text{ mol\%}$). De plus, comme l'affinité des molécules étrangères entre elles est souvent plus importante que l'affinité sonde-lipide, la formation de micro-domaines (*clusters*) doit être considérée (voir section 1.3).

Ce phénomène de formation de complexes statiques à l'état fondamental a été observé par Vanderkooi *et al.* (1977) ainsi que par Plant (1986) avec des vésicules de PC similaires aux nôtres. Ceci signifie que l'échange énergétique entre donneurs et accepteurs, les molécules-sondes incorporées dans la membrane, n'est pas entièrement contrôlé par le processus de la diffusion (*quenching dynamique*).

Si le transfert ne peut pas s'effectuer lors de collisions entre un donneur et un accepteur, il peut y avoir un transfert à distance; i.e. lorsque le donneur et l'accepteur sont en dehors de leur rayon d'interaction. En solution, ce transfert non-radiatif peut s'exprimer par la théorie de Förster (voir section 2.2.4).

Fung et Stryer (1976) ont étudié l'efficacité du transfert entre un

groupe dansyl et un groupe éosine fixées sur des phosphatidyléthanolamines (PE). En accord avec la théorie de Förster, ils ont obtenu des résultats similaires avec des vésicules de PC et des membranes planes; de plus ils ont démontré que l'efficacité était indépendante de la concentration de donneurs.

Etsep et Thompson (1979) ont également effectué une comparaison entre des résultats expérimentaux et une modification de la théorie de Förster. Les résultats obtenus, effectués avec des vésicule de PC, concordaient avec les équation théoriques.

Le second type de transfert présentant un intérêt marqué est le transfert énergétique par une collision (voir section 2.2.3).

1.2 Modèles membranaires.

Les petites vésicules unilamellaires, telles qu'utilisées lors de cette étude, sont composées d'un feuillet bilipidique formant une structure sphérique dont le rayon est approximativement 100 Å. Le poids moléculaire de ces structures est d'environ 2.0×10^6 g mol⁻¹ (Huang, 1969).

Les vésicules sont formées spontanément lors d'une dispersion aqueuse de lipides à deux chaînes; les lipides à une chaîne hydrocarbonée auront plutôt tendance à former des micelles (Tanford, 1980). Lors de la dispersion les liposomes produits seront multilamellaires et de rayons variables. Une sonication permet d'obtenir des structures unilamellaires

et une filtration sur gel permet de séparer les vésicules selon leur grosseur.

Les vésicules qui ont servi de modèles membranaires pour ce travail étaient constituées de molécules de PC extraites de jaunes d'oeufs par une méthode conventionnelle (voir méthode d'extraction à la section 2.1.1). La structure moléculaire de la PC est représentée à la figure 2 avec la composition des chaînes obtenue par chromatographie en phase gazeuse.

Le tableau 1 présente une compilation des caractéristiques géométrique de vésicules unilamellaires. Ces données nous ont servi pour le calcul de la concentration de sondes en termes de surface d'occupation (voir section 2.2.2).

Un autre facteur important doit être considéré, il s'agit de l'état physique de la bicouche. Dû aux nombreuses insaturations de la lécithine (c.f. figure 2), la température de transition de phase de ces lipides est passablement basse, soit environ -7 °C (Bach & Chapman, 1980). Lors de notre étude les vésicules se retrouvaient donc toujours dans l'état fluide, assez loin de la température de transition. L'importance de ce paramètre ressort lors des considérations de diffusion des molécules-sondes à l'intérieur de la bicouche lipidique.

CHAINES	%
16:0	37,9
16:1	2,1
18:0	9,8
18:1	34,0
18:2	14,0
20:4	2,2

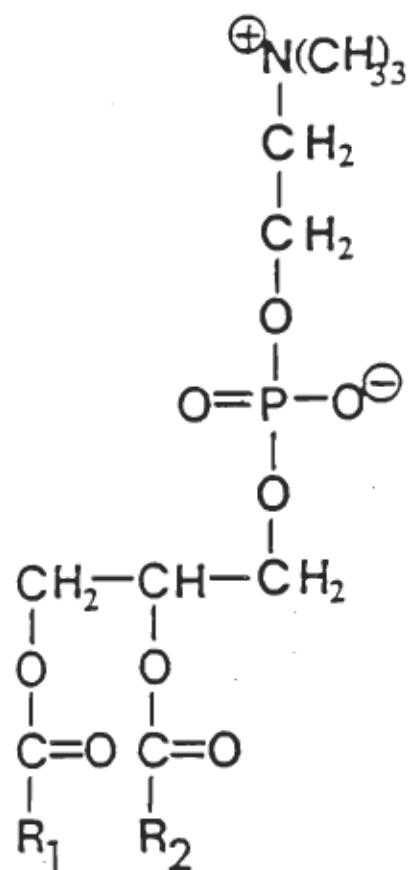


Figure 2. Structure chimique de la phosphatidylcholine avec la composition des chaînes (mesures effectuées par M. J.P. Richard, C.R.P., U.Q.T.R.)

Tableau 1

Caractéristiques géométriques des
vésicules unilamellaires*.

Paramètre	Dimension
Rayon externe	100-125 Å
Rayon interne	60- 70 Å
Nombre total de molécules	2 600
Nombre de molécules, face externe	1 770
Nombre de molécules, face interne	830
Surface d'une molécule, face externe	74 Å ²
Surface d'une molécule, face interne	61 Å ²

*D'après Huang (1969) et Huang & Mason (1978).

1.3 Incorporation de sondes fluorescentes dans les membranes.

1.3.1 Généralités.

L'utilisation de sondes fluorescentes pour caractériser les propriétés dynamiques et structurales des membranes comporte plusieurs aspects que nous examinerons dans cette section. L'incorporation de molécules étrangères dans un système cause évidemment un problème important, c'est-à-dire la création d'un nouveau système membrane:sonde qui peut réagir différemment du système seul. La perturbation induite par l'incorporation des molécules-sondes ne doit pas masquer ou déteriorer les effets de l'environnement sur les transitions électroniques. La première étape qui s'impose est donc la détermination précise de la nature de la sonde employée, et la variation de ces propriétés spectroscopiques en fonction des paramètres étudiés (voir e.g. Radda & Vanderkooi, 1972; Azzi, 1975).

Un des objectifs de ce travail étant d'évaluer l'efficacité du transfert d'énergie en fonction de la position des sondes dans la membrane, nous serons concernés par deux problèmes particuliers. Nous devons d'abord connaître la localisation des fluorophores utilisés, puis les concentrations limites des sondes afin d'éviter les perturbations provoquées par les interactions entre les sondes.

1.3.2 Choix et caractéristiques des sondes.

Au cours de cette étude nous avons utilisé divers couple donneur-ac-

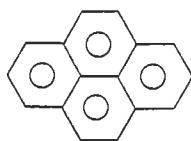
cepteur nous permettant une variation sur la position relative entre le donneur et l'accepteur dans la bicoche lipidique.

Les molécules employées comme donneurs sont les suivantes : le pyrène, l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque (C₁₆PY) et le 3-(palmitoyl)-2-(1-pyrenedecanoyl)-L-a-phosphatidylcholine (PY-PC). Nous avons également utilisé un autre dérivé du pyrène, soit le N-(1-pyrenesulfonyl) dipalmitoyl-1-a-phosphatidyléthanolamine (PY-DPPE) pour caractériser l'interface des têtes polaires de nos vésicules de PC. Les structures de ces sondes sont représentées à la figure 3.

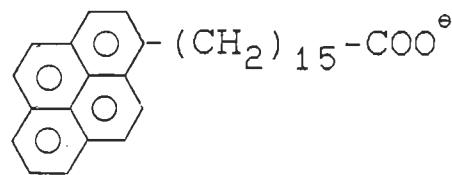
Nos travaux précédents avec le pyrène (L'Heureux, 1987, L'Heureux & Fragata, 1987) nous ont incité à choisir cette sonde comme donneur étant donné les connaissances que nous avons acquises de ces propriétés spectroscopiques et des caractéristiques de son incorporation dans les vésicules de PC. De plus le temps de vie de fluorescence du pyrène incorporé dans des vésicules est relativement long (100-200 ns, Blackwell *et al.*, 1986; Jones & Lentz, 1986; ≈350 ns, Daems *et al.*, 1985). Finalement, une étude comparative nous a permis de déterminer avec plus de précision la position du pyrène libre dans une bicoche lipidique.

Les deux dérivés du pyrène que nous avons choisis (C₁₆PY et PY-PC) nous permettent d'identifier la localisation du chromophore dans la bicoche avec une assez bonne certitude. De plus nous connaissons assez bien les propriétés spectroscopiques du C₁₆PY (L'Heureux & Fragata, 1987) et l'analogique de la lécithine (PY-PC) nous assurait d'une perturbation

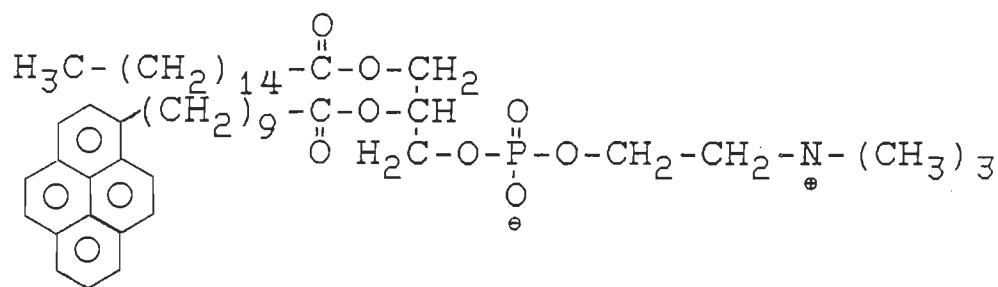
A



B



C



D

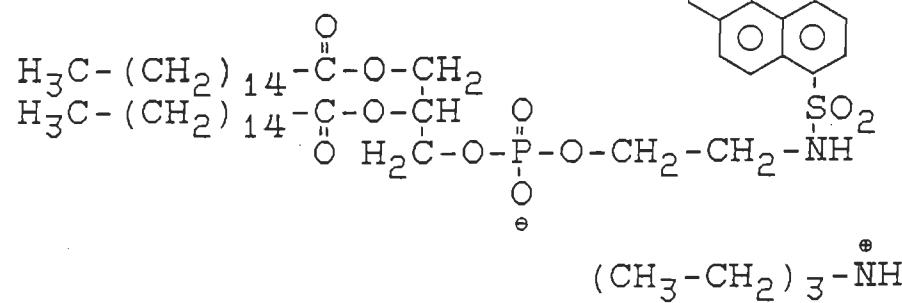


Figure 3. Structures chimiques A : pyrène, B: acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque (C₁₆PY), C : 3-palmitoyl-2-(1-pyrene-decanoyl)-L- α -phosphatidylcholine (PY-PC) et D : N-(1-pyrenesulfonyl)dipalmitoyl-1- α -phosphatidylethanolamine (PY-DPPE).

minimale des vésicules de PC.

Comme accepteurs pour le transfert d'énergie nous avons opté pour l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique (2-AS) et l'acide 16-(9-anthroyloxy) palmitique (16-AP). Le groupe chromophore de ces deux sondes se retrouve aux deux positions extrêmes de la membrane, soit la région de la tête polaire pour le 2-AS et le cœur de la région hydrophobe pour le 16-AS (voir figure 4 pour les structures moléculaires). Evidemment les spectres d'absorption de ces sondes recouvrent partiellement le spectre d'émission du pyrène. De plus leurs caractéristiques lipidiques permettent une orientation convenable dans la bicouche. Mentionnons finalement que ces sondes ont été largement utilisées dans des systèmes membranaires pour diverses études de transfert d'énergie, elles sont donc bien caractérisées (e.g. Morand *et al.*, 1982; Blatt *et al.*, 1984; Chatelier *et al.*, 1984; Oyashiki *et al.*, 1986).

1.4 Objectifs.

Avant d'entreprendre l'étude systématique sur le transfert d'énergie membranaire, nous avons caractérisé diverses propriétés des sondes et des vésicules. Un des points importants concernait la position du pyrène libre incorporée dans les vésicules de PC. Une étude comparative du pyrène et du C₁₆PY a permis d'élaborer un modèle pour la localisation du fluorophore en fonction de la concentration de sondes incorporées (L'Heureux & Fragata, 1988). Ce modèle est discuté au chapitre 3.

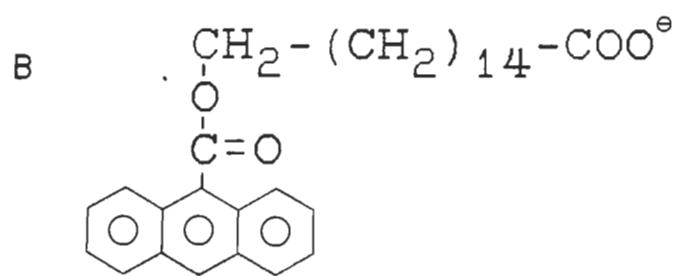
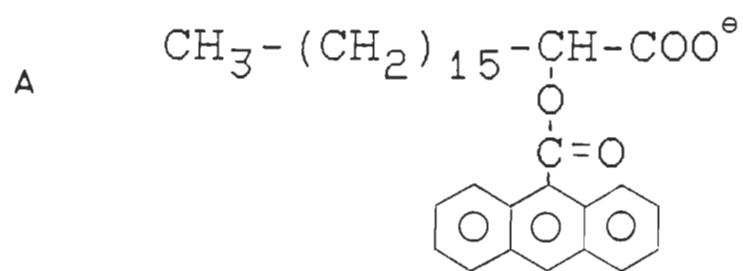


Figure 4. Structures chimiques A : acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique (2-AS) et B : 16-(9-anthroyloxy) palmitique (16-AP).

Notre seconde préoccupation était d'étudier le processus de la formation d'excimères du pyrène libre incorporée dans les vésicules de PC. Nous voulions ainsi démontrer que ce processus d'*auto-quenching* était contrôlé par la dynamique moléculaire du pyrène et non par la formation d'agrégats à l'état fondamental (L'Heureux & Fragata, 1989a). Ce point nous apparaissait comme une étape de caractérisation primordiale pour étudier le transfert d'énergie par voie de diffusion des molécules (théorie de Stern-Volmer, voir section 2.2.3). Nous allons traité ce problème au chapître 4.

Dans le chapître 4, nous discutons également de la diffusion au niveau des membranes, mais en fonction de la concentration de NaCl dans la phase aqueuse. Comme il avait été préalablement démontré que la présence des ions monovalents pouvait affecter la polarité (constante diélectrique, ϵ) de l'interface eau-tête polaire (Lessard et Fragata, 1986), nous étions concernés par le problème des propriétés diélectrique de cette région, ainsi que de l'effet du NaCl sur la constante de diffusion (D) du pyrène et du PY-DPPE (L'Heureux & Fragata, 1989b).

Finalement, le chapitre 5 traite du transfert d'énergie en considérant chaque couple donneur-accepteur en fonction de leur position relative, des propriétés physico-chimiques de la bicouche et des théories applicables aux données expérimentales obtenues.

CHAPITRE II

METHODES EXPERIMENTALES ET THEORIQUES

2.1 Méthodes exérimentales.

2.1.1 Matériel.

Le pyrène utilisé au cours de cette étude était un produit de Sigma Chemical Co. et il a été purifié par chromatographie sur une colonne de gel de silice (100- 200 mesh) par une méthode conventionnelle (Grätzel & Thomas, 1973; Kano *et al.*, 1980). Le solvant d'élution était du cyclohexane (grade A.C.S.). Le point de fusion du pyrène purifié est 151 °C, ce qui se situe très près des valeurs de la littérature (Birks *et al.*, 1966; Handbook of Chemistry and Physics, 61^o éd., 1980-81, p. C-465.).

Toutes les autres sondes (C₁₆PY, PY-DPPE, PY-PC, 2-AS et 16-AP) provenaient de Molecular Probes Inc. et ont été utilisé sans purification additionnelle.

Le NaCl fut purifié selon la méthode décrite par Lessard & Fragata (1986).

La phosphatidylcholine ayant servi à la préparation des vésicules a été extraite de jaunes d'oeufs selon la méthode de Singleton et al. (1965). La première étape de l'extraction consiste à faire précipiter la lécithine avec de l'acétone froide pour éliminer le maximum de pigments, les phospholipides sont ensuite solubilisés dans l'éthanol, concentrés, puis redissous dans de l'éther de pétrole. Par la suite, les phospholipides sont purifiés par une précipitation à l'acétone froide suivi d'une solubilisation dans l'éther de pétrole; cette étape peut être répétée à quelques reprises. La purification finale consiste en une chromatographie sur alumine (80-200 mesh). La lécithine est injectée dissoute dans le chloroforme , et éluée avec un mélange chloroforme:méthanol 9:1.

La pureté des fractions est vérifiée par chromatographie sur couche mince sur gel de silice en utilisant le mélange chloroforme:méthanol:eau 65:25:4 comme éluant.

2.1.2 Préparation des vésicules unilamellaires.

La méthode de préparation utilisée est celle décrite par Huang (1969) avec quelques modifications. Deux techniques de purification ont été employées selon la quantité de lipides utilisés pour la formation des vésicules. La première méthode était appliquée lorsque le poids de PC excédait 20 mg.

Les phospholipides, conservés à -20 °C sous une couche d'acétone, sont dilués dans du chloroforme contenant la quantité désirée de

sondes. La solution est séchée sous un jet d'azote, puis dispersée dans un tampon tris-HCl 0,01M, pH : 8,0, 0,1M NaCl. La concentration de lipides se situe à 10 mg/ml. La suspension aqueuse est alors constituée de vésicules multilamellaires de dimensions diverses. La sonication qui suit permet de briser les multilamelles pour conserver des vésicules unilamellaires; elle s'effectue dans une cellule réfrigérée (4-10 °C) pendant 15-20 minutes sous un jet d'azote afin d'éviter l'oxydation des lipides. L'appareil (Heat System-Ultrasonics) est alors réglé à 30 W à la sortie. Si le poids initial de PC est inférieur à 20 mg, la sonication s'effectue dans un système "cornet" qui évite tout contact de la dispersion avec la sonde de sonication, l'appareil doit alors être réglé à 150 W à la sortie.

Si la solution est contaminée par la sonde de sonication, le mélange doit être centrifugé pour éliminer les particules de titane (100 000 g pendant 1 heure). Si le volume de solution excède 2 ml, les vésicules sont concentrées jusqu'à un volume de 1-2 ml dans une cellule Amicon. La dernière étape de la purification consiste toujours en une séparation sur un gel de Sépharose 4B (Pharmacia Fine Chemical). Le volume de la colonne est de 250 ml (rayon = 13 mm), le débit de la pompe est à 15 ml/heure.

La figure 5 représente un profil d'élution typique des vésicules élues sur la colonne de Sépharose 4B. La fraction I, indiquée sur la figure 5, est constituée de grosses vésicules, la fraction III est homogène en petites vésicules; la fraction II est un mélange des types I et III. Uniquement les vésicules de la classe III sont conservées pour les

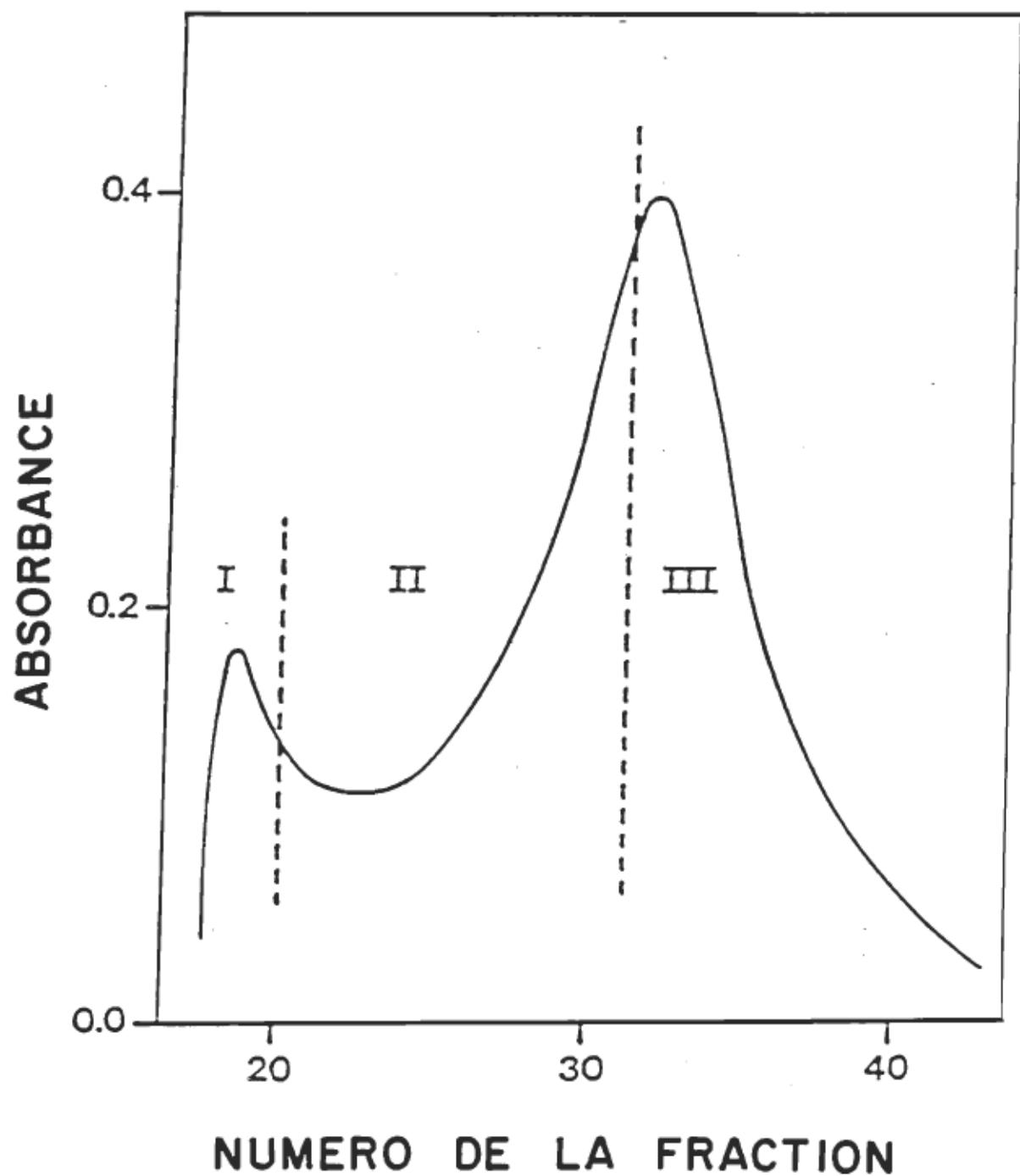


Figure 5. Profil d'élution des vésicules unilamellaires sur gel de Sépharose 4B. L'absorbance est mesurée à 330 nm.

mesures.

Afin de contrôler la concentration de NaCl dans les suspensions, les vésicules homogènes sont d'abord dialysées contre un tampon tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, sans sel durant 20 heures. La quantité de sel appropriée est ensuite ajoutée pour obtenir la concentration désirée.

Pour les mesures de transfert d'énergie avec les couples donneur-accepteur une quantité de 120 à 150 mg de PC est initialement pesée, puis le donneur (pyrène, C₁₆PY ou PY-PC) est ajoutée à une fraction molaire initiale de 0,25 mol%. La solution chloroformée est alors séparée en 8 aliquots et l'accepteur (2-AS ou 16-AP), diluée dans le chloroforme, est ajoutée pour obtenir des concentrations molaires variant de 0 à 3,5 mol%.

2.1.3 Dosage des lipides.

Le contenu en PC des vésicules est exprimé en fonction de la teneur en phosphates, dosés selon la méthode de Bartlett (1959) légèrement modifiée. Les lipides subissent d'abord une digestion acide (H₂SO₄) pour libérer les phosphates; les carbones, qui forment un dépôt noir, sont oxydés en chauffant en présence de peroxyde d'hydrogène à 30 %. La réaction colorimétrique a lieu entre les phosphates et une solution de molybdate d'ammonium 5 % pour former du (NH₄)₃P(Mo₃O₁₀)₄. Ce complexe est alors réduit par le sulfate de p-méthyl aminophénol (élon) 1 %; du bisulfite de sodium 3 % est également ajouté à la solution pour éviter la formation d'une coloration verte due à l'élimination incomplète du peroxyde d'hy-

drogène. La réaction prend une dizaine de minutes et une coloration bleue se développe. L'absorbance des échantillons est mesurée à 660 nm et comparée avec une courbe standard de KH₂PO₄, la pente de cette droite est 0,625 ml µmol⁻¹.

2.1.4 Méthodes de mesure de la fluorescence.

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

Tous les spectres d'émission ont été corrigés à l'aide d'une courbe de correction qui compense pour les variations de sensibilité du tube photomultiplicateur selon les longueurs d'onde. Cette courbe a été obtenue par deux méthodes différentes : i) la méthode de la lampe standard et ii) la méthode du détecteur standard. La première technique consiste à prendre le spectre d'émission d'une lampe standard ayant un profil d'irradiation connu (spectre d'émission réel), qui est divisé par le spectre d'émission enregistré par l'appareil. La courbe résultante est normalisée au point minimum, c'est-à-dire la longueur d'onde où le tube photomultiplicateur est le plus sensible. Les spectres d'émission enregistrés par la suite sont multipliés par cette courbe (voir Roberts, 1981).

La seconde méthode utilise une lampe de tungstène placée à l'entrée du monochromateur d'excitation et un radiomètre calibré placé à la sortie

(voir Picard *et al.*, 1986).

Les spectres d'excitation ont été corrigés à l'aide d'un standard interne de rhodamine B.

Les spectres d'émission ont été enregistrés entre 360-500 nm par incrément de 0,5 nm, ou entre 360-400 nm par incrément de 0,2 nm. La bande passante de l'excitation se situait entre 2,5 et 5 nm. La longueur d'onde d'excitation du pyrène était à 335 nm. Pour le C₁₆PY et le PY-PC l'excitation s'effectuait à 345 nm. Les spectres d'excitation ont été enregistré entre 250-360 nm par incrément de 0,5 nm, les bandes passantes (excitation et émission) étaient fixées à 2,5 nm. Pour détecter le monomère du pyrène le monochromateur à l'émission était à 373 nm, pour l'excimère il se situait à 480 nm. Certaines conditions particulières sont spécifiées sur les figures concernées.

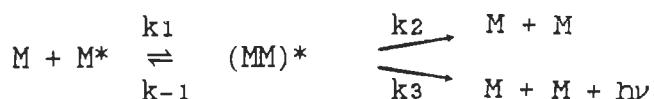
Les spectres d'absorption ont été effectués à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer, modèle 553. Une série de spectres des vésicules sans sonde a été enregistré à diverses concentrations pour soustraire la contribution de la turbidité.

2.2 Méthodes théoriques.

2.2.1 Diffusion du pyrène dans les membranes.

Le pyrène possède une propriété spectroscopique fort intéressante qui a été étudié autant en solution que dans divers modèles de membranes; il s'agit de la formation d'excimères. L'excimère résulte de la formation d'un complexe entre une molécule se trouvant dans l'état fondamental et une molécule similaire dans l'état excité. L'appellation excimère provient de la contraction des mots *excited dimer*. L'excimère n'existe que dans l'état excité et se dissocie en monomères après une émission fluorescente, une désactivation thermique ou une dissociation. L'émission de l'excimère se produit à des fréquences plus basses (environ 5 000 - 6 000 cm⁻¹) relativement à l'émission du monomère.

L'ensemble des processus spectroscopiques reliés à la formation d'excimères peuvent être représenté de la façon suivante :



ou :

M : monomère

M* : monomère excité

(MM)* : excimère

k₁ : constante de formation de l'excimère

k₋₁ : constante de dissociation de l'excimère

k_2 : constante de désactivation thermique de l'excimère

k_3 : constante d'émission de l'excimère

En solution, Birks *et al.* (1963) ont démontré que le processus de formation de l'excimère du pyrène était contrôlé par la diffusion moléculaires. Depuis, cette propriété a été étendue aux membranes biologiques et a été employée pour évaluer des paramètres de diffusion latérale (Galla & Sackmann, 1974; Vanderkooi & Callis, 1974; Vanderkooi *et al.*, 1975; Schmidt *et al.*, 1976; Yamauchi & Matsushita, 1979; Somerharju *et al.*, 1985). En 1980, Galla & Hartmann ont démontré que les analogues lipidiques du pyrène (PY-PC) obéissaient également au processus de la diffusion pour la formation d'excimères. Plus récemment, Viani *et al.* (1988) ont associé la quantité relative d'excimères à la fréquence des collisions du pyrenyl-dodecanoyl sulfatide incorporé dans des vésicules multilamellaires. La quantité relative d'excimères est évalué à l'aide du rapport I_E/I_M où I_E et I_M représentent respectivement l'intensité de fluorescence de l'excimère et du monomère. Dembo *et al.* (1979) et Macdonald *et al.* (1988) ont mentionné que I_E/I_M reflétait directement la fluidité membrinaire.

Ces dernières observations sont cependant contestées pour diverses raisons. Le point majeur concerne la formation de dimères à l'état fondamental, pouvant être directement excités et conduire à une émission de type excimère (voir e.g. Kaneda *et al.*, 1985; Blackwell *et al.*, 1986; Yamazaki *et al.*, 1986 et section 4.1.3).

2.2.2 Calcul de concentrations des sondes : surface d'occupation.

Afin de mieux expliquer les résultats concernant le transfert d'énergie au niveau des membranes, nous avons exprimé la concentration des accepteurs en nombre de molécules par \AA^2 de surface membranaire. Cette concentration, C_s , est obtenue avec l'équation suivante :

$$C_s = F_{\text{mol}} / (X_e \text{Se} + X_i \text{Si}) \quad (2.1)$$

ou F_{mol} correspond à la fraction molaire d'accepteur, X_e et X_i représentent les fractions molaires de molécules de PC sur les monocouches externe (e) et interne (i); Se et Si désignent les surfaces d'occupation d'un lipide des monocouches externe (e) et interne (i). Cette équation est une dérivation de celle proposée par Galla & Sackmann (1974); nous avons négligé ici la fraction correspondante à la surface d'occupation des donneurs. Les valeurs pour X_e , X_i , Se et Si proviennent du travail de Huang & Mason (1978). A titre d'exemple, mentionnons qu'une concentration molaire de 1 mol% en accepteur correspond à $1,43 \times 10^{-4}$ molécule/ \AA^2 .

2.2.3 Transfert d'énergie :échange lors de collisions.

Nous examinerons dans cette section le transfert d'énergie se produisant suite à un double échange électronique entre deux particules en collision, soit un donneur excité (D^*) et un accepteur (A). Nous serons particulièrement concernés par le rôle de la diffusion moléculaire

lors du transfert en solution, pour examiner par la suite quelques exemples plus spécifiques. Le but de cette section n'est pas de résumer l'ensemble des processus de transfert énergétique via collision, mais de faire ressortir les informations pertinentes pour l'analyse des résultats obtenus avec nos systèmes (pour une discussion détaillée voir Lamola, 1969; Wagner, 1971; Wayne, 1971; Turro, 1978; Lakowicz, 1983).

Mentionnons d'abord que le terme *collision* signifie un recouvrement partiel des orbitales électroniques des particules concernées. Ce type de transfert se produit donc à courte distance, contrairement au transfert par dipôles induits discuté à la section 2.2.4.

En solution, le transfert d'énergie contrôlé par la diffusion des molécules s'exprime par la théorie de Stern-Volmer (voir, e.g., Lakowicz, 1983) :

$$\Phi_0/\Phi = F_0/F = 1 + k_q\tau[Q] \quad (2.2)$$

où Φ_0 et Φ représentent respectivement les rendements quantiques en absence et en présence d'accepteur; F_0 et F correspondent respectivement aux intensités de fluorescence sans et avec accepteur; k_q est la constante de *quenching* bimoléculaire ($M^{-1} s^{-1}$); τ est le temps de vie du donneur en absence d'accepteur (s) et $[Q]$ désigne la concentration d'accepteur. Ce type de transfert est connu sous l'appellation de *quenching* dynamique, et K_D est la constante de *quenching* de Stern-Volmer ($K_D = k_q\tau$).

La constante de *quenching* bimoléculaire k_q est directement reliée à la constante de vitesse de diffusion k_0 par le facteur d'efficacité de transfert, σ ($k_q = \sigma k_0$), cette dernière constante, k_0 , peut être calculée avec l'équation de Smoluchowski (voir e.g. Lakowicz, 1983) :

$$k_0 = 4\pi R D N \quad (2.3)$$

ou R représente le rayon de collision (cm), D correspond à la somme des coefficients de diffusion du donneur et de l'accepteur ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) et N est le nombre d'Avogadro. Le coefficient de diffusion, D , est relié à la viscosité du milieu par l'équation de Stokes-Einstein :

$$D = kT/6\pi nR \quad (2.4)$$

ici k est la constante de Boltzmann (joule $^\circ\text{K}^{-1}$), T est la température en $^\circ\text{K}$ et n est la viscosité du milieu (poise).

Dans certains cas le *quenching* dynamique ne peut pas s'appliquer en solution dû à certaines contraintes environnementales. L'organisation structurale des membranes impose de nombreuses restrictions pour le *quenching* dynamique et l'analogie directe avec une solution ne peut pas être implicitement considérée (voir section 1.1).

En ce qui concerne le pyrène et le 2-AS incorporés dans des membranes, nous avons répertorié les principales déviations le plus souvent mentionnées dans la littérature. Le premier cas concerne la présence

d'agrégats à l'état fondamental ou le *quenching* statique. Si une contribution de *quenching* statique se produit lors d'un transfert énergétique l'équation de Stern-Volmer peut être modifiée de la façon suivante :

$$I_0/I = 1 + (K_D + K_S) [Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (2.5)$$

ou K_S est la constante pour le *quenching* statique (voir e.g. Keizer, 1983; Lakowicz, 1983 et pour le cas particulier des membranes : Kano *et al.*, 1980; Blackwell *et al.*, 1987).

La contribution de transfert immédiat, ne nécessitant pas la diffusion des sondes doit aussi être prise en considération. Il s'agit du modèle de la "sphère active" élaboré par Perrin (*sphere of effective quenching*; voir e.g. Birks, 1970; Turro, 1978). Si la contribution de ce type de transfert est significative avec présence de *quenching* dynamique, la relation de Stern-Volmer s'exprime de la façon suivante :

$$I_0/I = (1 + K_D) [Q] \exp([Q]VN) \quad (2.6)$$

ou V représente le volume de la sphère où le *quenching* peut s'effectuer sans diffusion et N est le nombre d'Avogadro (pour l'application aux systèmes membranaires voir Waka *et al.*, 1978; Lemmetyien *et al.*, 1989).

Mentionnons également que l'accès au donneur peut-être limité, tel que décrit initialement par Lehrer (1971) (voir aussi Almgren, 1981; Oh-yashiki *et al.*, 1985, 1986). Dans le cas des membranes, la partition des

sondes entre les phases aqueuse et lipidique a déjà été observé (Sikaris et al., 1981; Blatt et al., 1981; Lemmetyien et al., 1989) et doit conséquemment être considéré (voir chapitre 5 pour les applications).

2.2.4 Transfert d'énergie : Mécanisme du dipôle induit.

Un échange énergétique entre un donneur (D) et un accepteur (A) peut également s'effectuer en absence de contact entre D et A, il s'agit alors d'un transfert résonnant coulombien ou mécanisme du dipôle induit (l'expression "couplage dipôle-dipôle" est également employée régulièrement dans la littérature; voir e.g. Turro, 1978; Stryer, 1978; Lakowicz, 1983).

En accord avec la théorie de Förster (1965), l'efficacité de transfert (E) et la constante de vitesse pour le transfert (k_T) sont données par les expressions suivantes :

$$E = r^{-6}/(r^{-6} + R_0^{-6}) = 1 - (I/I_0) \quad (2.7)$$

$$k_T = r^{-6} \kappa^2 J n^{-4} k_F \times 8,71 \times 10^{-23} \text{ s}^{-1} \quad (2.8)$$

où r est la distance séparant D et A, κ^2 est le facteur d'orientation, n représente l'indice de réfraction, k_F est la constante de vitesse d'émission du donneur ($k_F = \Phi_0/\tau$), R_0 désigne la distance correspondante à une efficacité de 50% et J est l'intégrale de recouvrement spectrale donnée par l'expression suivante :

$$J = \int_0^{\infty} \epsilon_a(\nu) F_D(\nu) \nu^{-4} d\nu \quad (2.9)$$

ou ϵ_a est le coefficient d'extinction de l'accepteur, F_D correspond à l'intensité relative d'émission du donneur et ν est la fréquence.

Comme l'indique la théorie de Förster l'efficacité du transfert d'énergie via l'interaction dipôle-dipôle est inversement proportionnelle à la sixième puissance de la distance, r , séparant le donneur et l'accepteur; de plus la constante pour le transfert, k_T , est dépendante de l'orientation relative des molécules (facteur d'orientation κ^2). Ce facteur est exprimé par l'équation suivante :

$$\kappa^2 = (\cos\alpha - 3\cos\beta\cos\gamma)^2 \quad (2.10)$$

La figure 6 présente les vecteurs d'orientation correspondants aux dipôles de l'accepteur et du donneur avec les angles concernés. Le facteur d'orientation peut prendre des valeurs comprises entre 0-4 selon l'alignement des dipôles. Pour une distribution aléatoire des particules, système isotropique, $\kappa^2 = 2/3$ (Haas *et al.*, 1978; Dale & Eisinger, 1979; Gryczynski *et al.*, 1988).

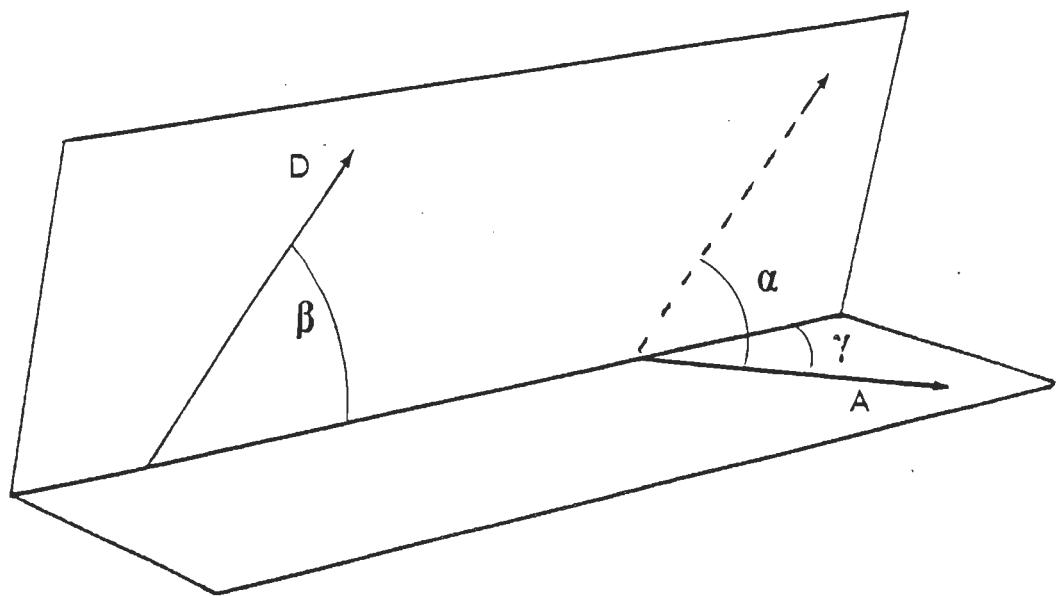


Figure 6. Représentation des moments de transition entre donneur (D) et accepteur (A) avec les angles utilisés pour évaluer le facteur d'orientation k^2 (voir section 2.2.4).

CHAPITRE III

DETERMINATION DE LA LOCALISATION DU PYRENE DANS LES VESICULES.

3.1 Fluorescence du pyrène.

La figure 7 montre les spectres de fluorescence du pyrène et du C₁₆PY incorporés dans des vésicules de PC. Sur la figure 7a, nous avons indiqué les cinq bandes vibrationnelles caractéristiques de la fluorescence du pyrène (Kalyanasundaram & Thomas, 1977). L'intensité de la transition 0-0 du pyrène (pic I) étant très sensible à la polarité de son environnement, et l'intensité de la transition 0-2 (pic III) étant peu sensible, le rapport I/III est souvent utilisé pour évaluer la constante diélectrique (ϵ) de divers milieux (Lianos *et al.*, 1980; Dong & Winnik, 1982; Turro *et al.*, 1986; L'Heureux & Fragata, 1987).

Pour souligner l'importance du phénomène, mentionnons que le rapport I/III du pyrène est de 0,60 pour l'hexane ($\epsilon = 1,88$), 1,40 pour le méthanol ($\epsilon = 32,6$) et 2,02 pour l'eau ($\epsilon = 79$).

La présence de l'excimère du pyrène et du C₁₆PY est détectée aux plus fortes concentrations molaires sur la figure 7, soit 3,7 mol% pour

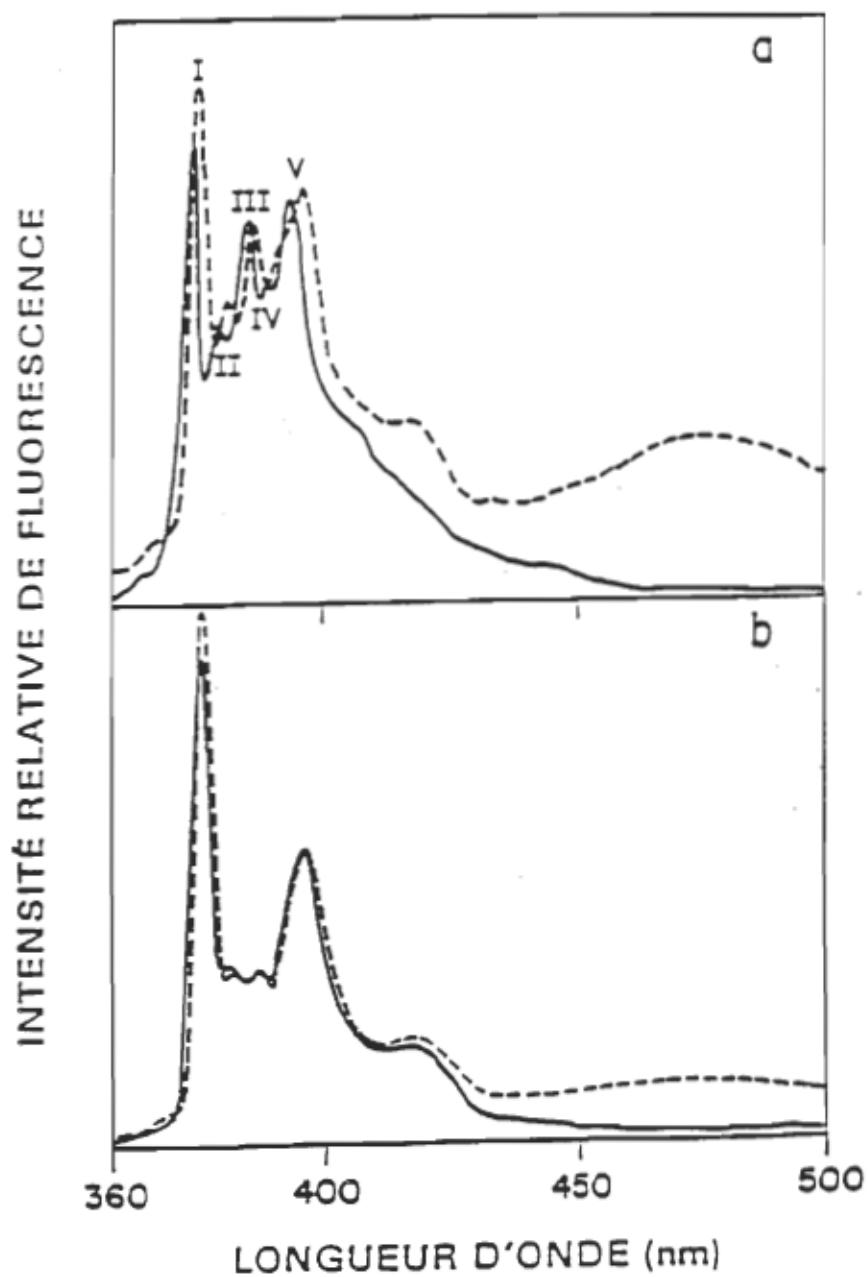


Figure 7. Spectres de fluorescence du pyrène et du C₁₆PY incorporés dans des vésicules de PC. (a) Rapports molaires de pyrène (—) 0,1, (---) 3,7 mol%. (b) Rapports molaires de C₁₆PY (—) 0,25, (---) 3,0 mol%. Les spectres sont normalisés au pic III.

le pyrène et 3,0 mol% pour le C₁₆PY. La concentration molaire critique pour la formation d'excimères du pyrène dans des vésicules de PC se situe à environ 1 mol% (L'Heureux & Fragata, 1987). Le rapport d'intensité de l'excimère (I_E/I_M) s'évalue à 480 nm (I_E) et 395 nm (I_M, pic V) (Surewicz, 1983).

3.2 Démonstration pour l'incorporation du pyrène dans la phase lipidique.

La position précise du pyrène incorporé dans un système membranaire varie d'une étude à l'autre et s'étend ainsi sur 10-15 Å, soit de la région glycéryl jusqu'au chaînes hydrocarbonées. De plus, le travail de Jones & Lee (1985) suggère que le pyrène pourrait se diviser entre les phases aqueuse et membranaire des dispersions lipidiques. Mentionnons également que le coefficient de partition du pyrène pour les phases membrane/eau a été évalué à 7×10^4 par Dembo *et al.* (1979) indiquant ainsi que le pyrène a une affinité beaucoup plus importante pour la phase membranaire.

Néanmoins, ces résultats doivent être considérés avec prudence, leur justesse étant reliée au type spécifique de systèmes membranaires utilisés.

En regard de ces considérations, nous avons entrepris l'étude concernant la localisation du pyrène dans des vésicules de PC.

La figure 8 présente les spectres de fluorescence du pyrène solubi-

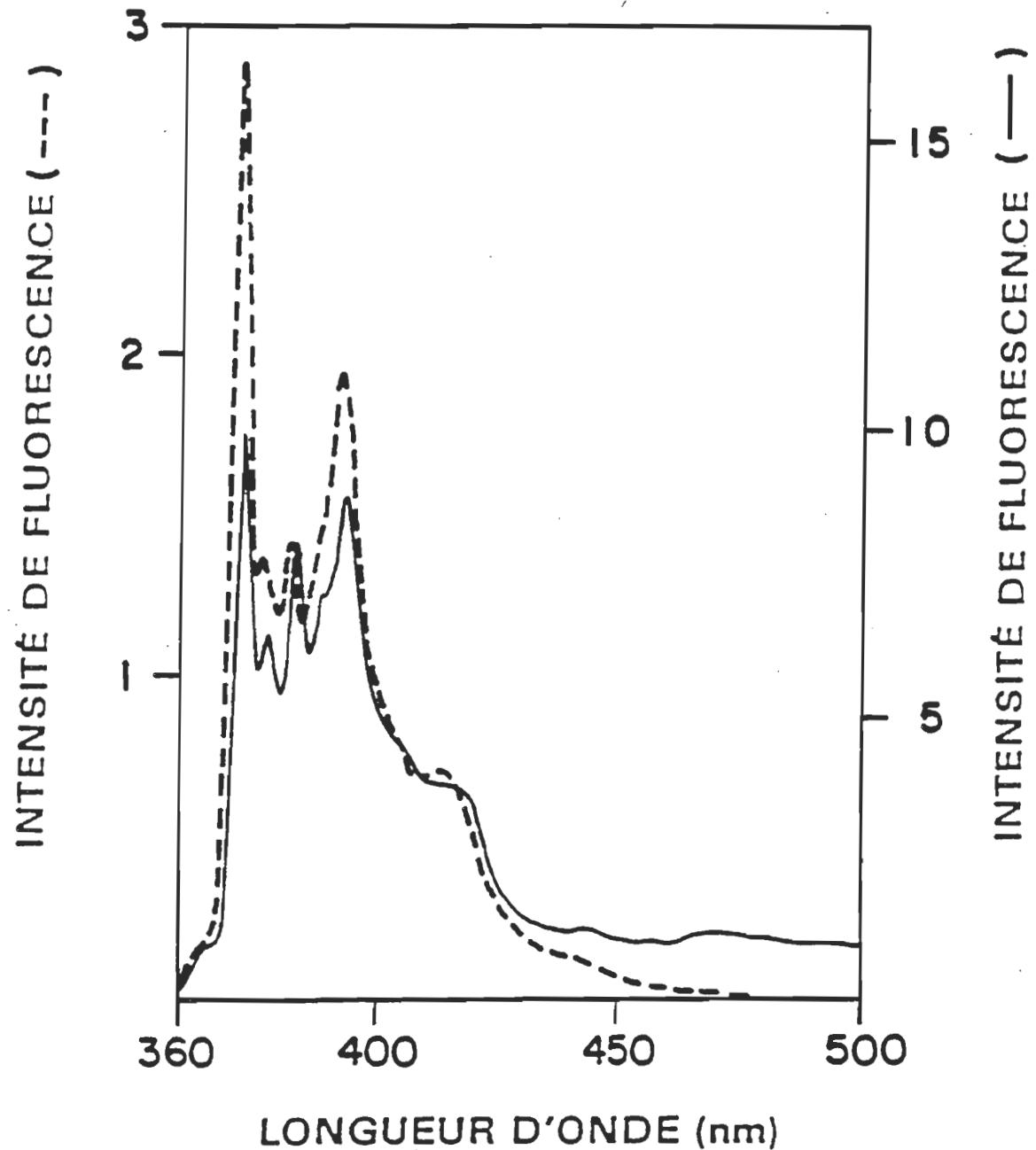


Figure 8. Spectres de fluorescence du pyrène dans l'eau à 0,5 μM (----) et dans les vésicules de PC 0,5 mol%, [lipide] = 100 μM (—).

lisé dans l'eau ($0,5 \mu\text{M}$) et, pour fin de comparaison, incorporé dans des vésicules de PC (0,5 mol%, [lipide] = $100 \mu\text{M}$). Dans les deux cas la concentration totale de pyrène est identique ($0,5 \mu\text{M}$). Les échelles respectives ont été ajustées au pic III pour permettre une meilleure comparaison des rapports I/III.

Les deux spectres de la figure 8 diffèrent par plusieurs aspects. Premièrement, l'intensité absolue de fluorescence est quatre fois plus importante dans les membranes que dans l'eau (voir également Jones & Lee, 1985). En second lieu, la sensibilité du pyrène pour la polarité de son environnement est marquante, les rapports I/III sont 1,22 et 2,02 pour les membranes et l'eau respectivement.

Le tableau 2 montre les rapports I/III du pyrène incorporé dans des vésicules de PC (0,5 mol%) en fonction de la concentration de vésicules exprimée en terme de lipides (voir section 2.4). La valeur du rapport I/III demeure stable à $1,22 \pm 0,02$ entre $15-150 \mu\text{M}$ en lipide. Ceci indique clairement que le pyrène demeure dans la phase lipidique au cours du processus de dilution. Effectivement, si le pyrène délaissait la phase membranaire pour la phase aqueuse le rapport I/III, évalué à 1,22, augmenterait significativement vers la valeur obtenue dans l'eau (I/III = 2,02, c.f. figure 8).

Cette conclusion est renforcée par le résultat obtenu en suivant la variation de l'intensité du monomère (IM) en fonction de la concentration de vésicules en terme de lipides. Ce résultat est présenté à la fi-

Tableau 2

Variation du rapport I/III du pyrène incorporé dans des vésicules de PC^a en fonction de la concentration de lipides.

[lipide] (μ M) ^b	I/III
150	1,19
100	1,22
77	1,21
51	1,22
38	1,20
26	1,25
15	1,23
moyenne : 1,22 ± 0,02	

a: concentration molaire de pyrène : 0,5 mol%.

b: l'écart de concentration de lipides (15-150 μ M) correspond à un écart de concentration de pyrène de 0,075-0,75 μ M.

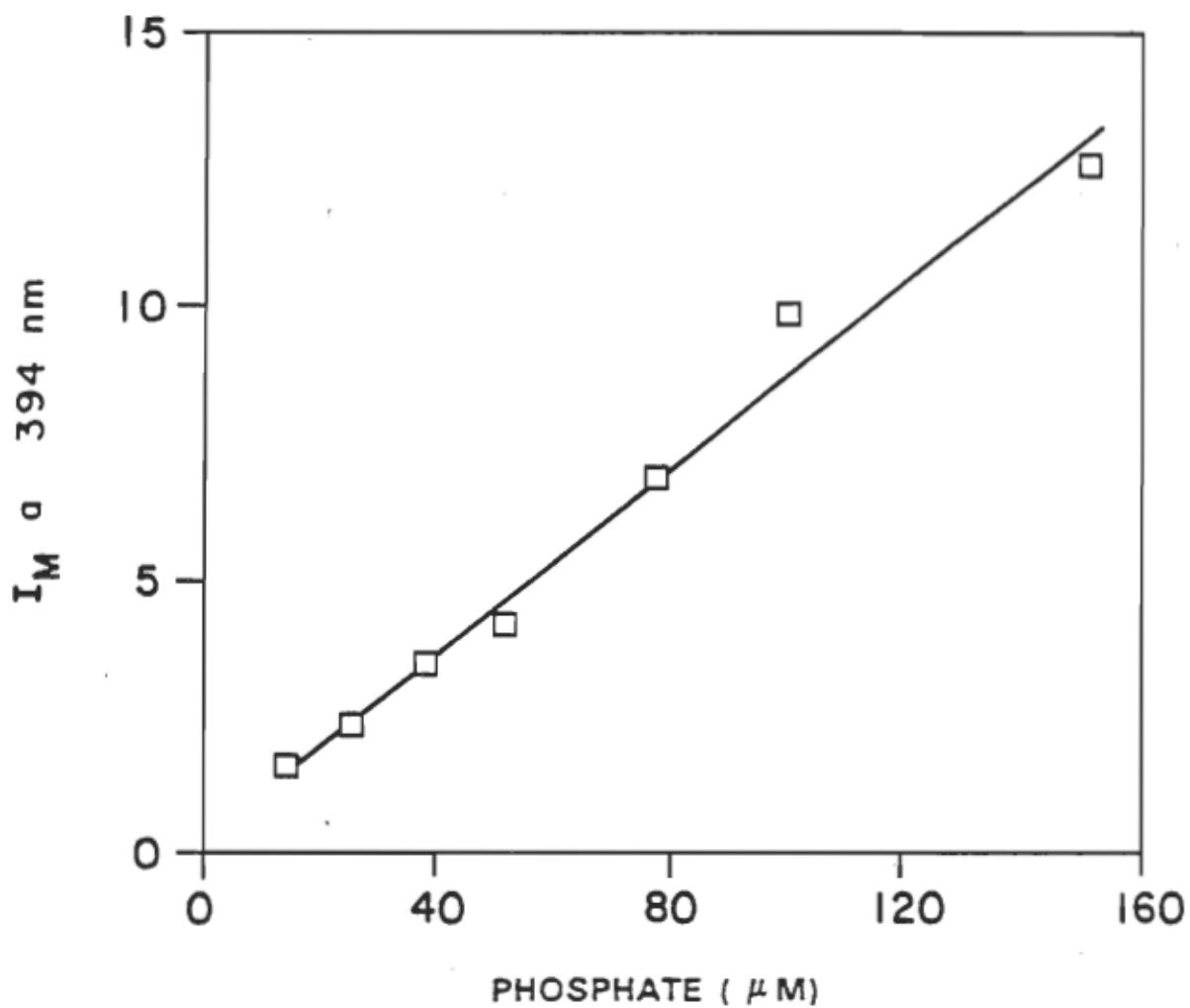


Figure 9. Variation de l'intensité de fluorescence du monomère du pyrène (I_M) en fonction de la concentration de vésicules (voir section 2.1.3). Le rapport molaire de pyrène est à 0,5 mol%.

gure 9 pour une concentration de pyrène de 0,5 mol%. La droite obtenue (coefficients de corrélation, $r > 0,99$) indique une fois de plus que l'environnement du pyrène demeure inchangée lorsque la concentration de lipides varie de 15-150 μM . Comme précédemment mentionné, l'intensité absolue de fluorescence du pyrène diffère entre le milieu membranaire et le milieu aqueux. Conséquemment, la relation I_M vs [lipide] ne serait pas linéaire si la concentration de pyrène dans la phase aqueuse augmentait lors de la dilution des vésicules.

Les observations précédentes nous permettent donc de conclure que la concentration de pyrène aqueux n'est pas significative et n'affecte pas les résultats lorsque cette sonde est incorporée dans des vésicules de PC. Une conclusion similaire a été obtenue par Blackwell *et al.* (1986) avec le pyrène incorporé dans des vésicules de PC uni- et multilamellaires.

3.3 Modèle proposé.

Le dernier résultat que nous désirons discuter avant de proposer un modèle pour la position du pyrène libre dans une bicoche concerne la formation d'excimères entre vésicules. Effectivement, nous avons antérieurement démontré que le rapport I_E/I_M s'accroît progressivement avec la concentration de lipides dans la dispersion lorsque la concentration de pyrène est supérieur à 1,0 mol% (L'Heureux & Fragata, 1987; voir également figure 17). Pour des vésicules contenant 3,7 mol% de pyrène le rapport I_E/I_M chute de 0,42 à 0,14 pour des concentrations de lipide de

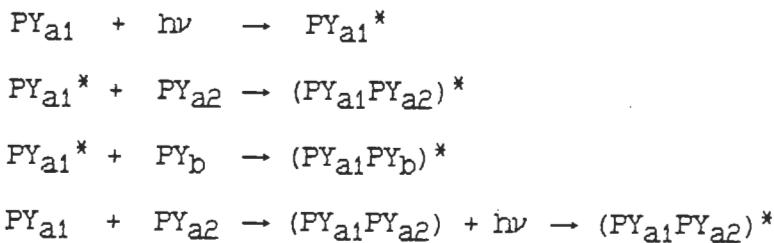
50 et 2 μM respectivement. Contrairement ce comportement n'est pas observé avec le C₁₆PY quelque soit la concentration initiale de sonde, ou avec le pyrène à faible taux d'incorporation (c.f. figure 5 de L'Heureux & Fragata, 1988). Les valeurs de I_E/I_M obtenues avec le pyrène libre à fort taux d'incorporation sont beaucoup plus élevés que les valeurs mesurées avec le C₁₆PY pour un taux d'incorporation identique. Mentionnons, comme exemple, que le rapport I_E/I_M du C₁₆PY à 3,0 mol% est fixe à 0,19 \pm 0,01 entre 5-40 μM en lipide.

Ces dernières observations suggèrent que l'excimère du pyrène peut se former par deux processus différents : i) à l'intérieur d'une vésicule lors de la collision de PY et PY* où PY et PY* représentent respectivement le monomère à l'état fondamental et à l'état excité; ii) lorsque PY et PY* se rencontrent suite à une collision entre deux vésicules. Ce dernier processus explique l'augmentation de I_E/I_M avec la concentration de vésicules en solution.

Une dernière hypothèse doit être considérée pour la formation d'excimères du pyrène dans les membranes, il s'agit de l'excitation directe d'un dimère dans l'état fondamental. Ce phénomène a été observé par Kaneda *et al.* (1985) avec le PY-DPPE incorporé dans des membranes plasmatiques de cellules. Blackwell *et al.* (1986) ont également observé la présence d'agrégats de pyrène pouvant conduire à la formation d'excimères, et ce avec diverses dispersion lipidiques. Une conclusion similaire a été obtenue par Yamazaki *et al.* (1986), cette fois avec le C₁₆PY en film monomoléculaire avec l'acide stéarique. Cette question, reliée à la diffu-

sion moléculaire, est discutée au chapitre 4.

L'ensemble des processus est représenté par le schéma suivant :



Ici les indices alphabétiques (a et b) désignent deux vésicules différentes. Ainsi PY_{a1} et PY_{a2} désignent deux monomères présents dans la même vésicule et PY_b représente un monomère appartenant à une autre vésicule. Il est évident qu'un dimère ne peut pas être formé entre deux vésicules; donc dans ce cas, seul le processus dynamique peut être valide.

Si nous prenons en considération le fait que le rayon d'interaction pour la formation de l'excimère du pyrène est compris entre 3-10 Å (Vanderkooi & Callis, 1974; Galla & Sackmann, 1974; Dembo *et al.*, 1979; Blackwell *et al.*, 1986), l'hypothèse pour la formation d'excimères via collisions entre vésicules doit comporter une brève inter-pénétration de la région des têtes polaires des vésicules en collision, et ce pour permettre une rencontre efficace. Le schéma représentant ces conditions est représenté à la figure 10. Pour des raisons pratiques, nous avons représenté seulement les deux monocouches externes des vésicules en collision. La valeur pour la distance d'approche minimale (D) avant le contact des

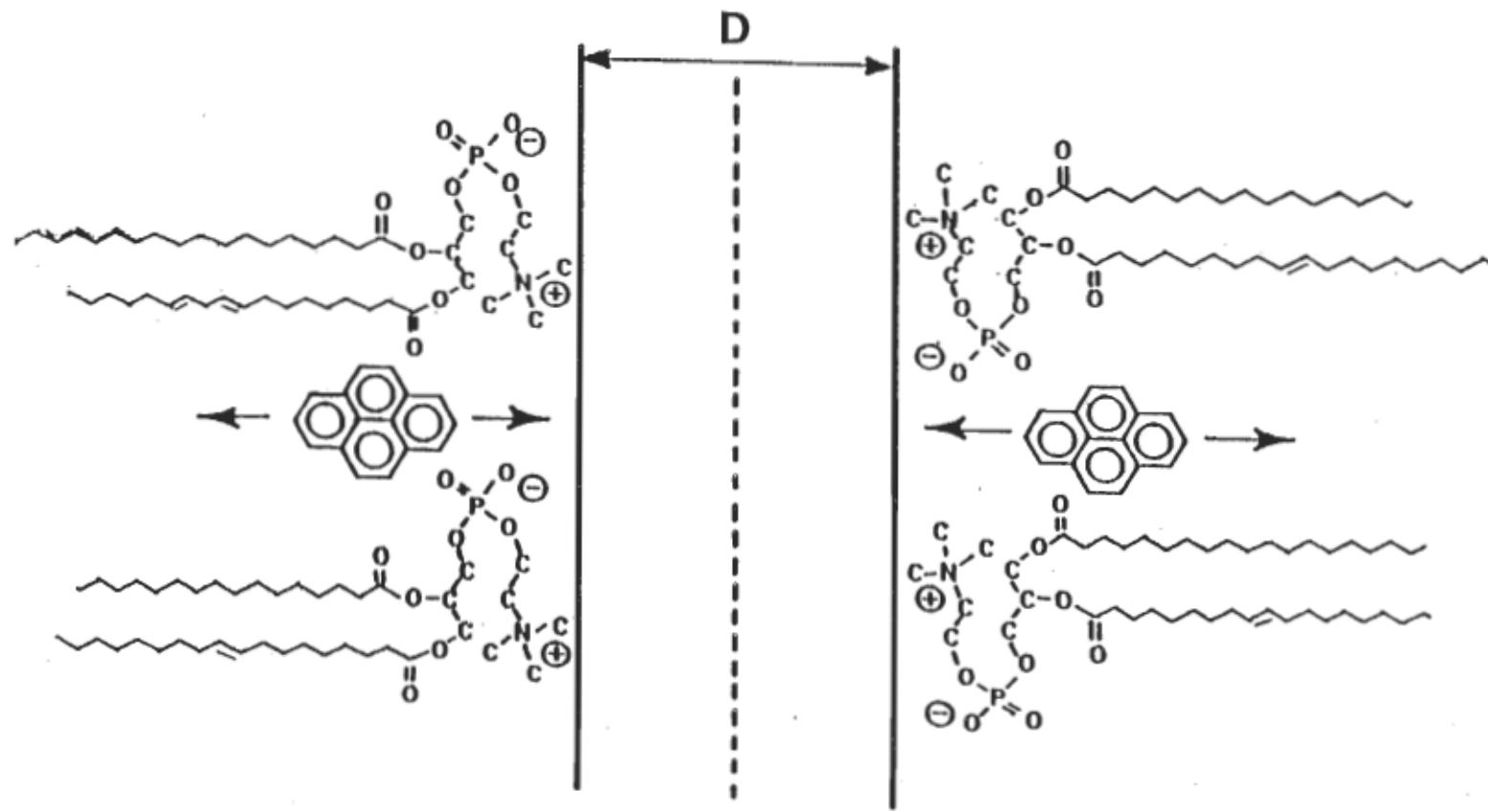


Figure 10. Schéma moléculaire représentant l'interaction entre deux vésicules de PC incorporant des molécules de pyrène. L'épaisseur de la couche d'hydratation a été fixée à 6 Å, D = 12 Å (voir texte). Le grand axe moléculaire du pyrène mesure environ 10 Å. La géométrie des têtes polaires de la PC est suggérée par Chrzeszczyk *et al.* (1981).

deux couches d'hydratation a été fixé à 12 Å, soit deux fois l'épaisseur pour une couche d'hydratation déterminée par Huang & Mason (1978). Une valeur de 10 Å serait également valable pour la couche d'hydratation (Lessard & Fragata, 1986), mais ceci rendrait les contraintes encore plus difficiles ($D = 20$ Å, voir discussion).

3.4 Discussion.

La figure 10 montre que la formation d'excimères entre vésicules, impliquant deux molécules de pyrène situées à proximité des couches d'hydratation externes des têtes polaires, est essentiellement gouvernée par la théorie classique des collisions et par des considérations géométriques élémentaires. Le modèle proposé indique en effet que l'approche minimale pour la formation d'excimères du pyrène (rayon d'interaction = 3-10 Å) ne peut être atteint, et ce même si les conditions géométriques sont favorables, i.e. avec les deux molécules face-à-face.

Conséquemment, la première étape pour la formation d'excimères lors d'une collision consiste en une fusion partielle ou totale des deux couches d'hydratation externes des vésicules impliquées. Cette fusion pourrait provoquer l'exclusion de molécules d' H_2O de la région interfaciale, et ainsi induire une baisse de la polarité (ϵ) qui faciliterait le rapprochement des molécules de pyrène au caractère relativement hydrophobe.

Les vésicules n'étant pas des sphères rigides, mais des particules élastiques, il est raisonnable de croire à une brève inter-pénétration de

la région assez fluide des têtes polaires (la viscosité de surface de bi-couches de PC a été évalué à $\approx 0,36$ poise, voir Fragata *et al.*, 1984).

Un autre facteur qui peut favoriser le processus de formation d'excimères via collisions est le temps de vie du pyrène excité dans une membrane de PC. Comme précédemment mentionné, ce temps est relativement élevé (100-200 ns, Blackwell *et al.*, 1986; Jones & Lentz, 1986; ≈ 350 ns, Daems *et al.*, 1985). Cette condition augmente la probabilité d'une rencontre efficace entre PY et PY*.

Finalement, soulignons un aspect non-négligeable lorsque deux vésicules s'approchent l'une de l'autre; il s'agit des charges de surfaces pouvant créer des répulsions de nature électrostatique entre les particules. Comme nous avons effectué notre étude avec la PC, une molécule zwitterionique, ce paramètre ne joue peut-être pas un rôle primordial. Il serait cependant fort intéressant d'examiner la variation du rapport I_E/I_M en fonction de la concentration de vésicules, formées avec des lipides chargées, et de comparer l'efficacité de formation d'excimères avec les vésicules de PC. Nous serions alors concernés par le problème de l'hydratation en relation avec la charge et la nature de la tête polaire. L'hydratation en fonction de la force ionique de la solution, neutralisation des charges de surfaces, pourrait alors être étudiée avec cette technique. Le problème spécifique de l'efficacité du rapport I_E/I_M du pyrène dans des vésicules de PC en fonction de la force ionique est largement discuté au chapitre 6.

En regard des considérations précédemment discutées, l'hypothèse que le pyrène incorporé dans des vésicules de PC pourrait se situer à diverses positions dans la bicouche peut être rationalisée en terme de concentration de sondes incorporées. A faible taux d'incorporation (< 1 mol%), la sonde se retrouverait dans la région supérieure des chaînes hydrocarbonées. Rappelons-nous que dans ces conditions l'indice de polarité (ϵ), le rapport I/III, se situe à 1,22, ce qui correspond à une valeur de $\epsilon \approx 20$ (voir L'Heureux & Fragata, 1987; Dong & Winnik, 1982). La région des têtes polaires est caractérisée par une constante diélectrique de l'ordre de 30 (Lessard & Fragata, 1986). Lorsque le taux d'incorporation du pyrène excède ≈ 1 mol% la sonde aurait tendance à diffuser vers la région des têtes polaires (augmentation du rapport I/III) et à devenir accessible à la formation d'excimères entre deux vésicules en collision.

Récemment, Vekshin (1987) concluait également que le pyrène incorporé dans des membranes biologiques pouvait diffuser selon l'axe des chaînes hydrocarbonées.

CHAPITRE IV

FACTEURS AFFECTANT LA FORMATION D'EXCIMÈRES DU PYRENE ET DE L'ACIDE (PYRENYL-1) HEXADECANOIQUE DANS LES VÉSICULES LIPIDIQUES.

4.1 Formation d'excimères.

4.1.1 Caractéristiques spectrales des sondes dans les vésicules.

La figure 11 présente le spectre d'absorption du pyrène incorporé dans des vésicules de PC à 3,0 mol%, une concentration qui nous assure la présence d'excimères. La concentration de vésicules est à $1,2 \times 10^{-4}$ M en lipide. Les maxima d'absorption sont à 263, 274, 308, 322 et 337 nm avec des intensités normalisées à 1:1,83:0,44:1,05:1,66 respectivement (voir tableau 3). Les spectres obtenus avec des concentrations de vésicules de $4,0 \times 10^{-4}$ M et $6,0 \times 10^{-5}$ M en lipide sont absolument similaire au spectre de la figure 11 avec des intensités normalisées équivalentes.

De plus, les spectres d'absorption obtenues à faible taux d'incorporation de pyrène dans les vésicules, i.e lorsque le taux d'excimères est à l'état de trace, possèdent également les mêmes caractéristiques spec-

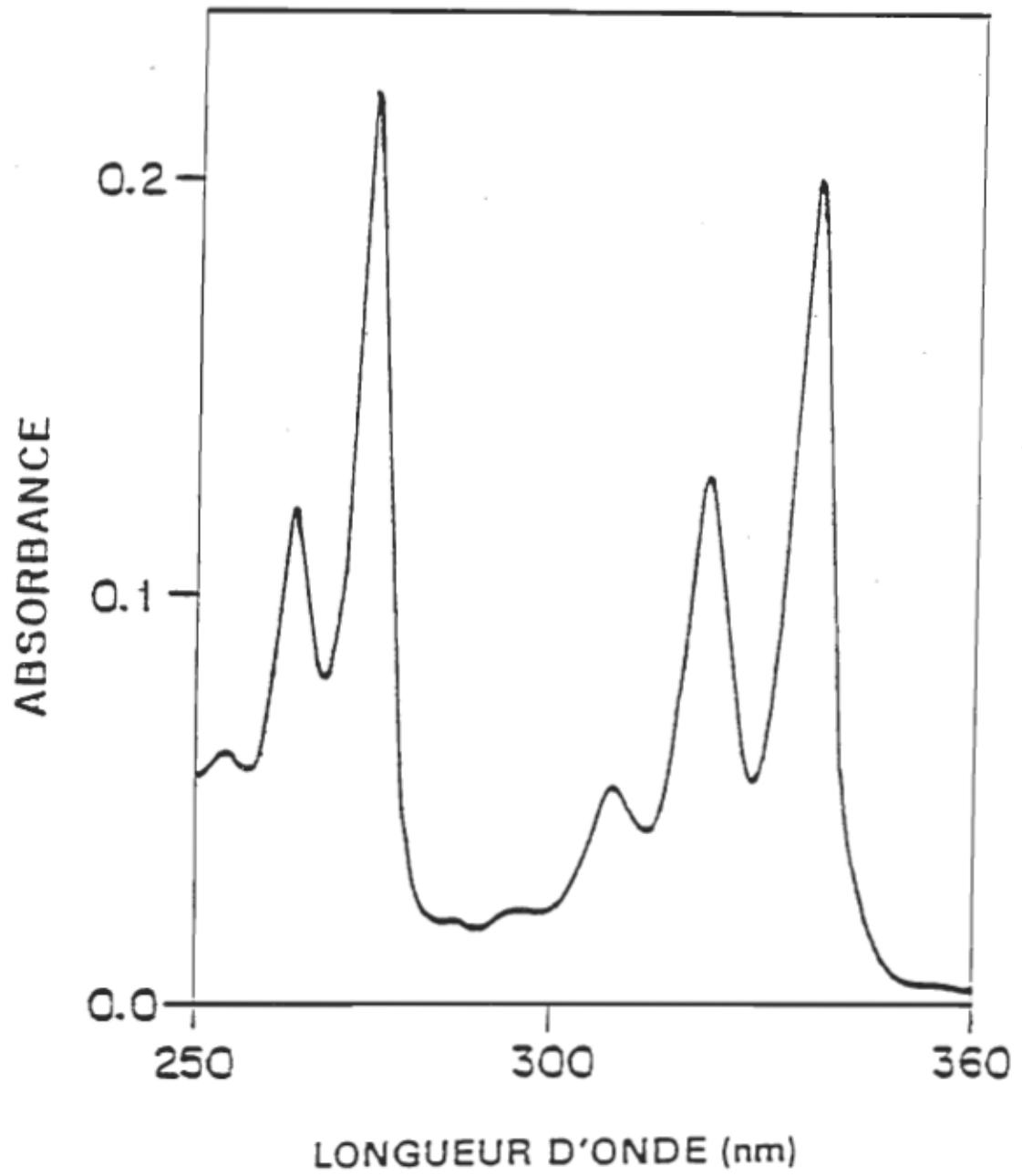


Figure 11. Spectre d'absorption du pyrène incorporé dans des vésicules de PC, 3,0 mol%, [lipide] = $1,2 \times 10^{-4}$ M.

Tableau 3

Caractéristiques des spectres d'absorption du pyrène et du C₁₆PY dans les vésicules de PC et en solution.

Système lipidique ou solvant	[lipide] (M)	Sonde Type	Mol%	Longueurs d'onde maximales et Ara ^a (en parenthèse).				
Vésicules PC	1,2 X 10 ⁻⁴	Pyrène	≤ 1,0-3,0	263 (1,00)	274 (1,83)	308 (0,44)	322 (1,05)	337 (1,66)
Vésicules PC	2,0 X 10 ⁻⁴	C ₁₆ PY	3,0	266 (1,00)	278 (1,88)	315 (0,43)	328 (1,07)	345 (1,60)
Vésicules PC	1,0 X 10 ⁻³	C ₁₆ PY	0,5	266 (1,00)	278 (1,92)	315 (0,38)	328 (0,99)	345 (1,51)
Ethanol	---	C ₁₆ PY	15 μM ^b	264 (1,00)	275 (1,98)	312 (0,46)	325 (1,10)	342 (1,67)

a: Intensité relative normalisée au premier pic à environ 265 nm.

b: Concentration molaire de C₁₆PY en solution dans l'éthanol.

trales que les spectres obtenus à 3,0 mol% en pyrène. Ceci indique que, dans nos conditions expérimentales, ni la concentration de sondes incorporés, ni la concentration de vésicules affectent les caractéristiques d'absorption du pyrène.

Ce comportement a également été observé avec la sonde C₁₆PY incorporée dans des vésicules de PC (voir figure 12). Effectivement, aucune différence n'est détectée dans les spectres d'absorption lorsque la concentration de C₁₆PY est à 0,5 ou 3,0 mol%, i.e. en absence et en présence d'excimères respectivement.

La figure 13 présente les spectres d'excitation du pyrène incorporé dans des vésicules de PC à 3,0 mol%. Cette figure démontre clairement que les spectres d'excitation correspondant au monomère (longueur d'onde d'émission = 373 nm) et à l'excimère (longueur d'onde d'émission = 480 nm) sont parfaitement similaires à l'exception de l'intensité absolue.

4.1.2 Caractéristiques spectrales du C₁₆PY en solution.

Le spectre d'absorption du C₁₆PY dissout dans l'éthanol à une concentration de 15 µM est présenté à la figure 14. Les maxima sont situés à 264, 275, 312, 325 et 342 nm. Ces valeurs sont comparables avec celles du C₁₆PY incorporé dans les vésicules de PC, un déplacement hypsochromique de 3 nm est observé dans l'éthanol par rapport aux vésicules de PC. Ce déplacement ne peut pas être attribué à un effet classique de polarité; nous supposons que les interactions avec les niveaux électroniques du

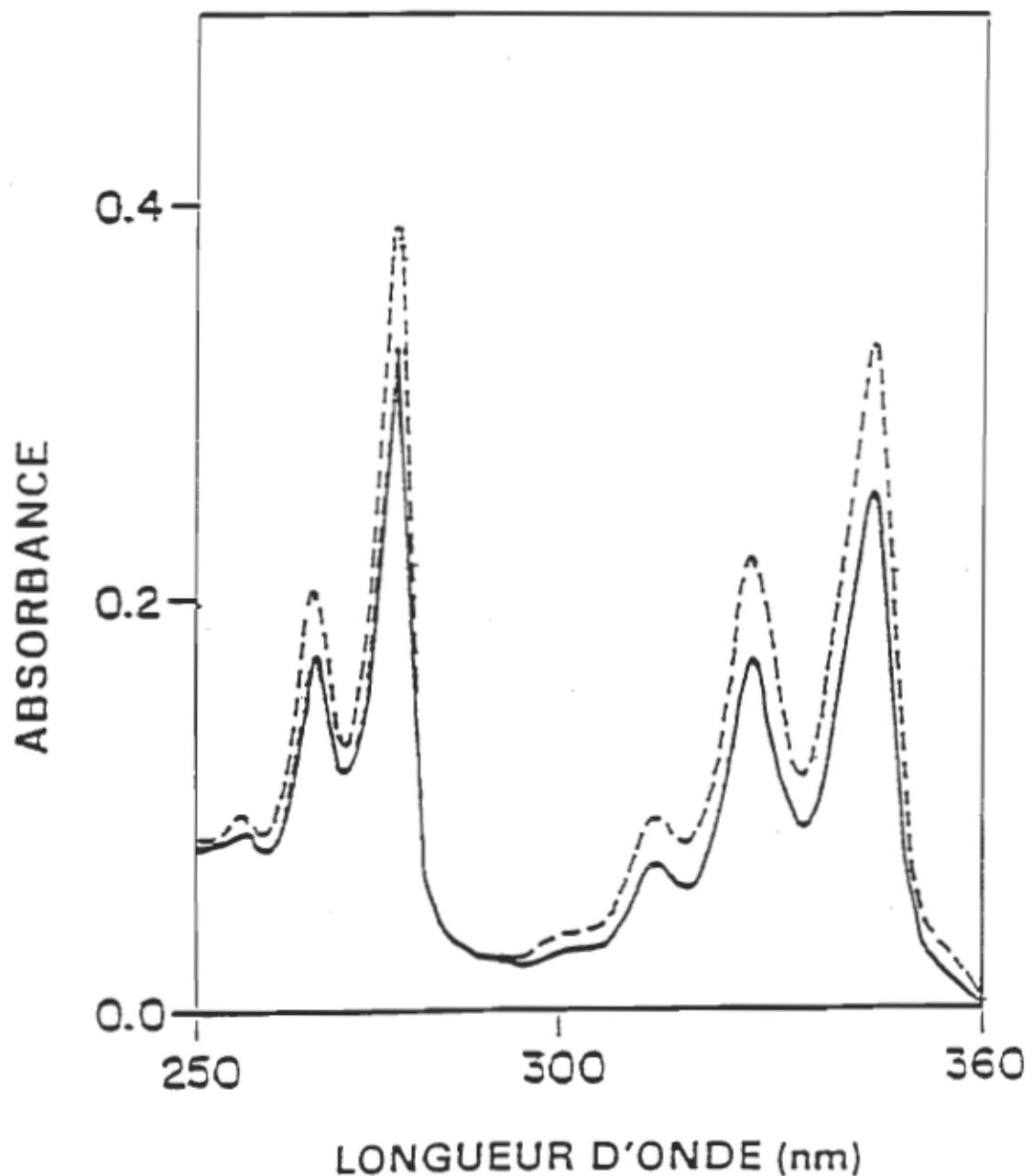


Figure 12. Spectres d'absorption du C₁₆PY incorporé dans des vésicules de PC à 0,5 mol%, [lipide] = 10⁻³ M (—) et 3,0 mol%, [lipide] = 2 X 10⁻⁴ M (----).

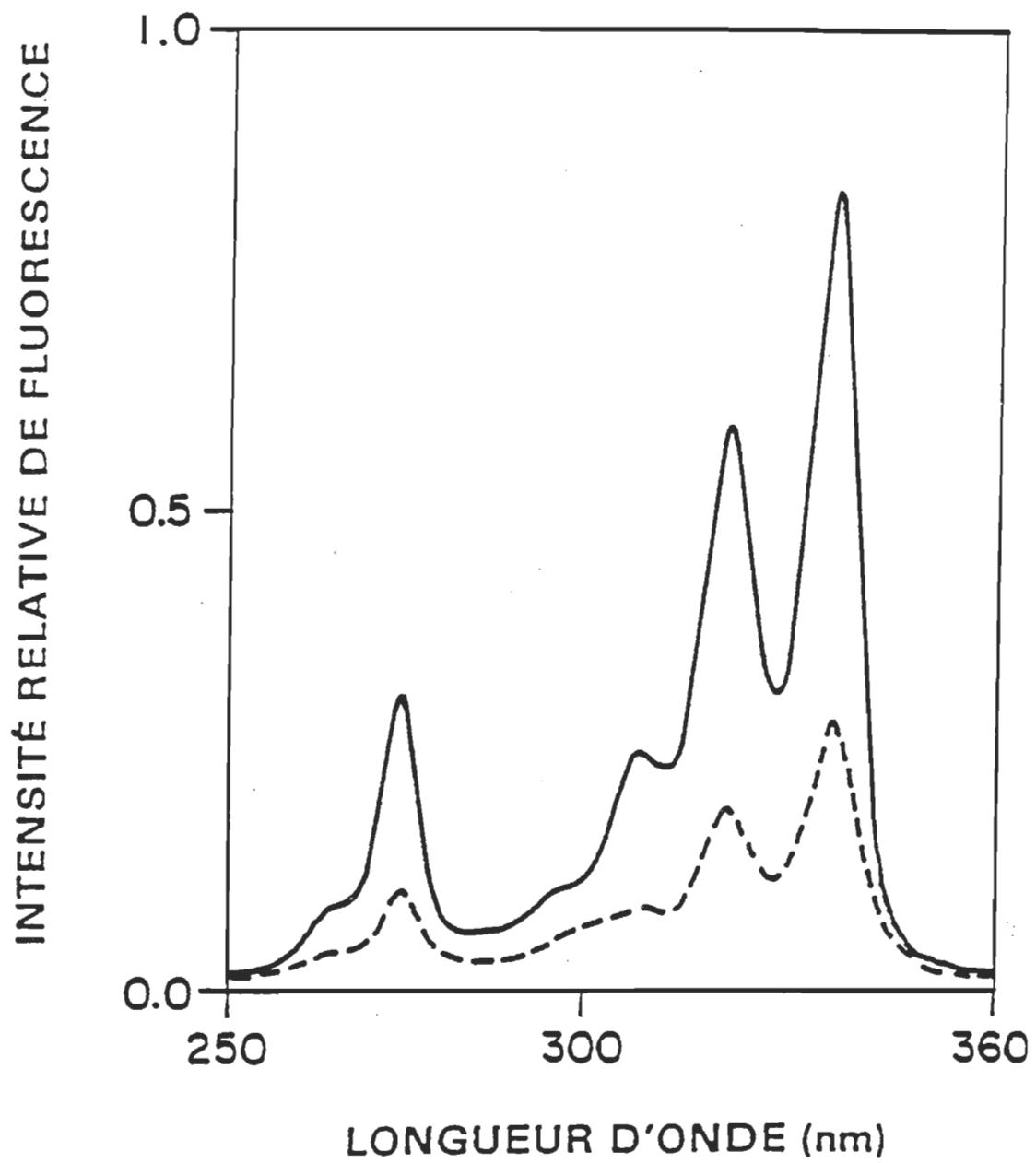


Figure 13. Spectres d'excitation du pyrène incorporé dans des vésicules de PC à 3,0 mol%. Longueurs d'onde à l'émission : monomère, 373 nm (—) et excimère, 480 nm (----).

C₁₆PY et les chaînes hydrocarbonées sont plus fortes que celles présentes en solution, conséquemment la séparation énergétique de la transition π-π* est plus faible dans les bicouches.

Les intensités d'absorbance normalisées du C₁₆PY en solution dans l'éthanol (1,00:1,98:0,46:1,10:1,67) sont également similaires aux valeurs mesurées dans les vésicules de PC (voir tableau 3).

La figure 14 présente aussi le spectre d'absorption d'une dispersion de C₁₆PY (15 µM) dans un mélange 1:20 éthanol:tampon (1 ml d'une solution de 315 µM de C₁₆PY dans l'éthanol est injecté dans 20 ml de tampon tris-HCl 0,01 M, pH 8,0, 0,1 M NaCl). Ce dernier spectre est assez différent de son celui en solution éthanolique; on peut d'abord observer un élargissement significatif des bandes, en plus d'une perte de la structure fine dans la région de 300-350 nm. L'intensité des bandes est diminuée et le maximum situé à 275 nm dans l'éthanol subit un déplacement bathochromique jusqu'à 284 nm. Ce comportement a déjà été observé avec une dispersion aqueuse de perylene (voir figure 3 de Etsep & Thompson, 1979). Notons également que la forme du spectre d'absorption du perylene incorporé dans des vésicules de PC ne diffère pas significativement des spectres du pyrène et du C₁₆PY dans le même système (voir figures 11 et 12).

La figure 15 présente les spectres d'émission de fluorescence des solutions de 15 µM de C₁₆PY dans l'éthanol et dans le mélange 1:20 éthanol:tampon. Le spectre du C₁₆PY dans l'éthanol présente la structure

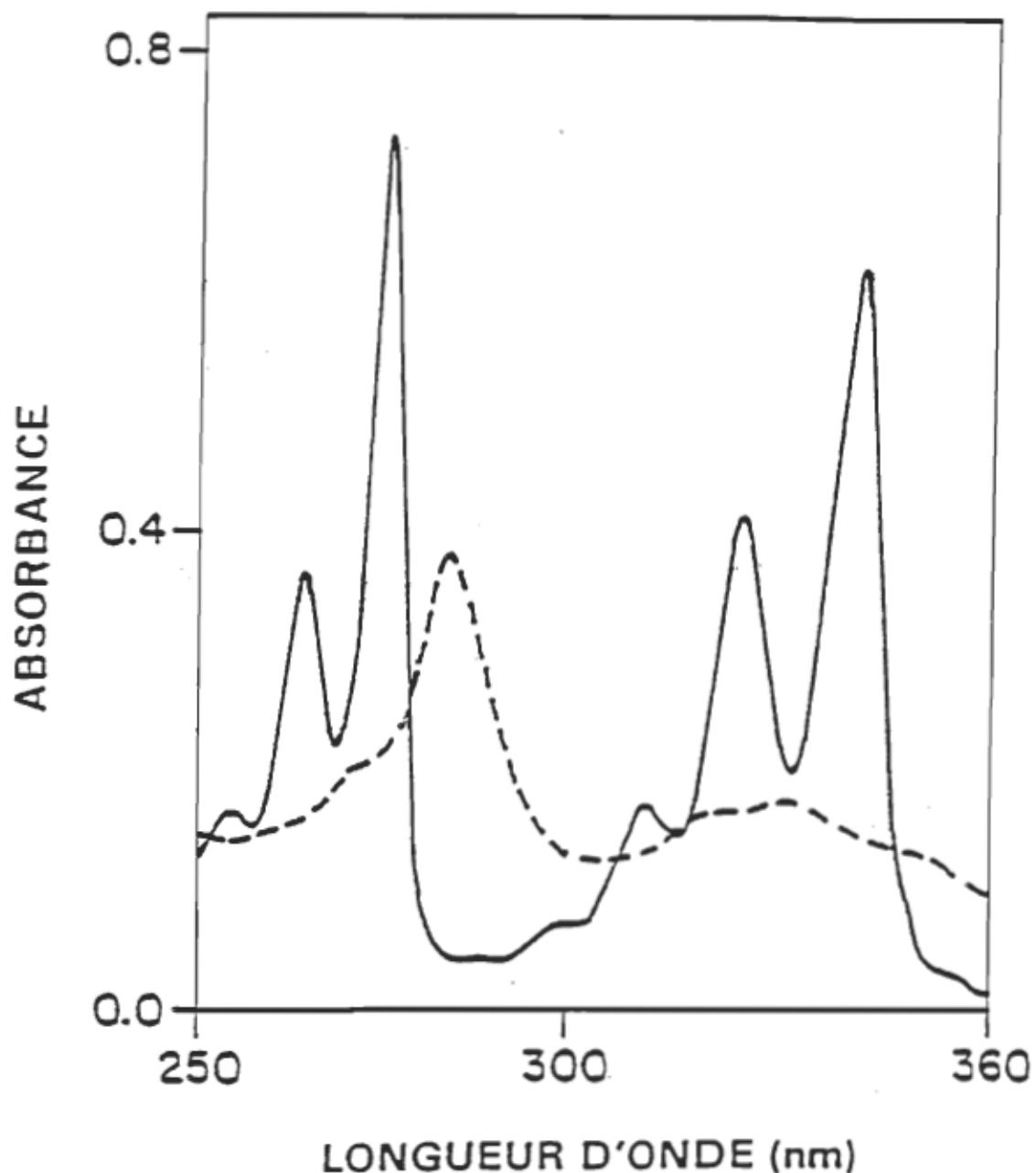


Figure 14. Spectres d'absorption du C16PY dans l'éthanol à 15 μM (—) et dans un mélange 1:20 éthanol:tampon à 15 μM (----).

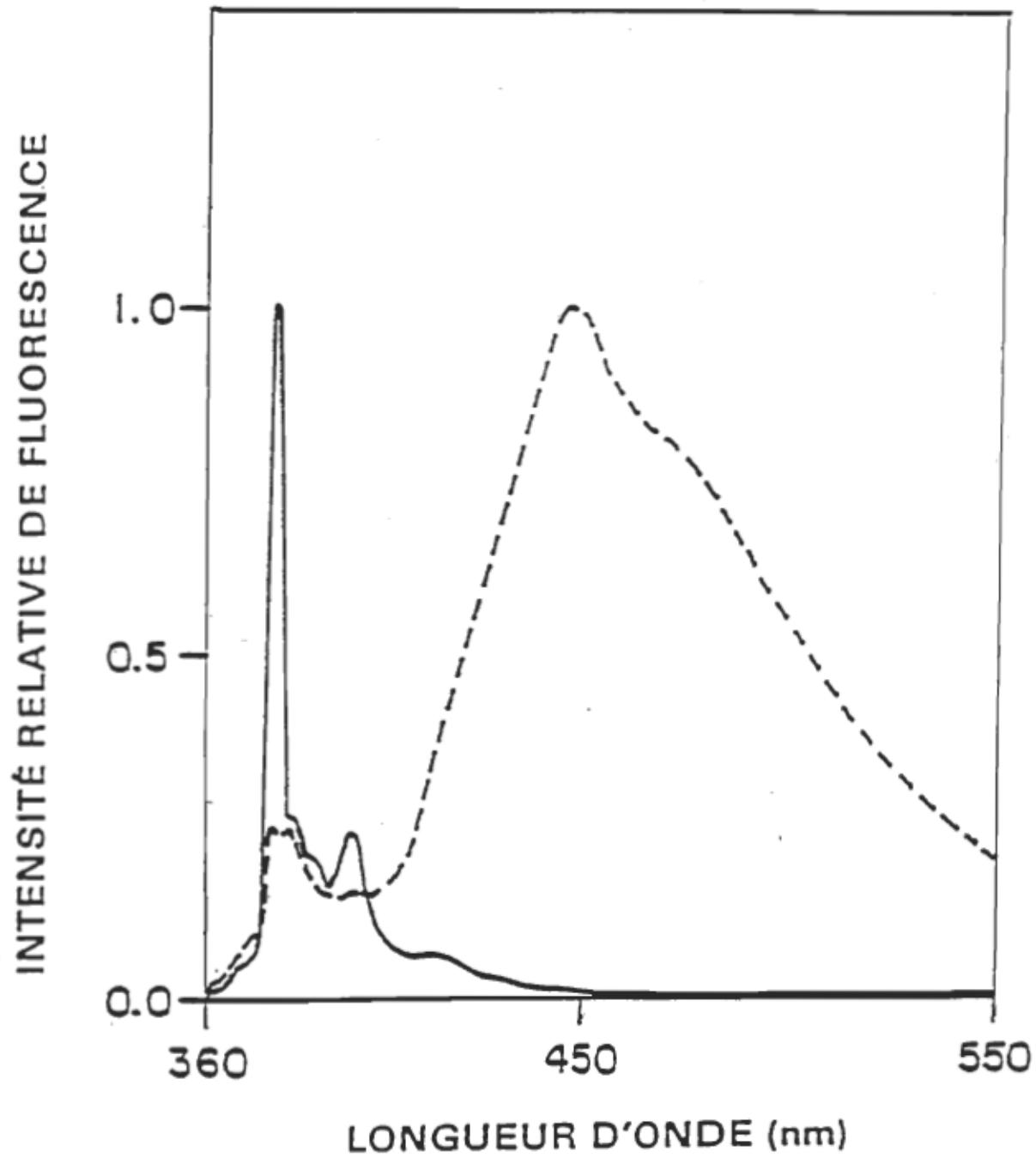


Figure 15. Spectres d'émission du C16PY dans l'éthanol à 15 μM (—) et dans un mélange 1:20 éthanol:tampon à 15 μM (---). Les longueurs d'onde d'excitation sont à 345 nm (—) et 330 nm (---). Les spectres sont normalisés à l'intensité maximale.

fine caractéristique des spectres en solution (monomère) ou de ceux obtenus à faible concentration de sondes dans des vésicules de PC (voir figure 6 de L'Heureux et Fragata, 1987). Par contre le spectre d'émission du C₁₆PY dans le mélange 1:20 éthanol:tampon est typique de sondes avec un fort niveau d'agrégation. La bande de l'excimère possède un maximum à 448 nm avec un épaulement à 473 nm, ce qui diffère considérablement de la bande caractéristique de l'excimère du C₁₆PY dont le maximum d'émission se retrouve à 480 nm (voir figure 7b et Pfister, 1973). Pour expliquer ces distinctions, nous proposons une distribution non-uniforme des groupes pyrenyl agrégés dans la partie centrale des structures formées (voir discussion).

Finalement, les spectres d'excitation du C₁₆PY en solution dans l'éthanol et dans le mélange 1:20 éthanol:tampon présentent eux-aussi des différences spectrales importantes (voir figure 16). Par contre les spectres d'excitation du pyrène dans les vésicules de PC (monomère et excimère, figure 13) ressemblent fortement au spectre d'excitation du C₁₆PY en solution dans l'éthanol (figure 16).

4.1.3 Discussion.

Les principales caractéristiques d'absorption du pyrène et du C₁₆PY sont compilées dans le tableau 3. Une première interprétation qui se dégage des résultats est reliée à l'absence de changement des spectres d'absorption des sondes incorporées dans les vésicules de PC en fonction de leur taux d'incorporation initiale (figures 11 et 12). Ceci nous in-

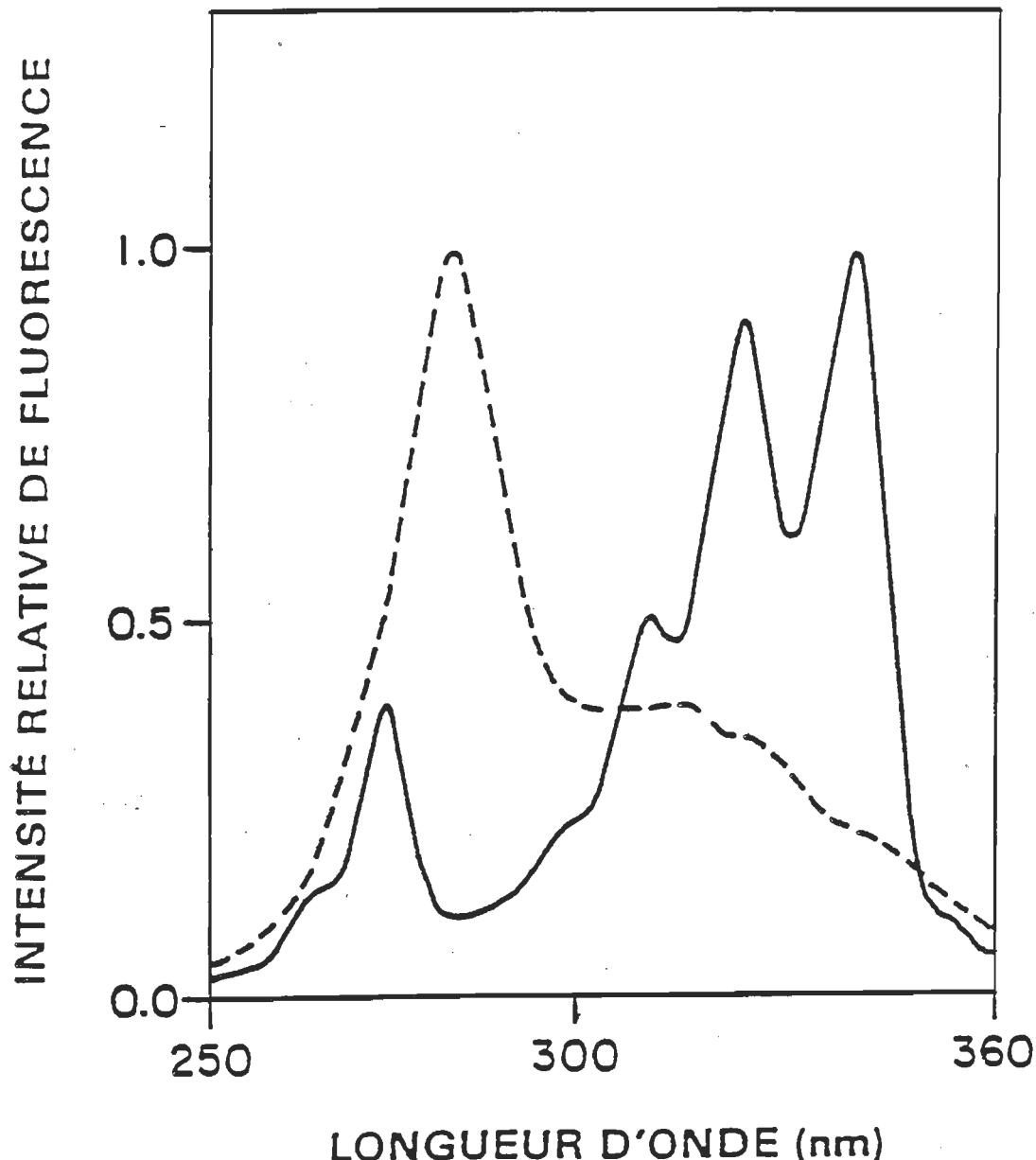


Figure 16. Spectres d'excitation du C16PY dans l'éthanol à 15 μM (—) et dans un mélange 1:20 éthanol:tampon à 15 μM (---). Les longueurs d'onde d'émission sont à 373 nm (—) et 450 nm (---). Les spectres sont normalisés à l'intensité maximale.

dique que, dans nos conditions expérimentales, aucun agrégat à l'état fondamental ne peut être détecté jusqu'à environ 4 mol% de sondes. En effet les spectres sont caractéristiques d'une espèce unique, en l'occurrence le monomère. Cette conclusion est validée par l'allure des spectres d'excitation du pyrène dans les vésicules de PC lorsque le monochromateur d'émission est placé aux longueurs d'onde du monomère et de l'excimère (figure 13). Ce résultat démontre que l'excimère détecté ne provient pas d'agrégats spécifiques pouvant être directement excités à l'état fondamental pour produire une émission de type excimère.

D'un autre côté, les variations spectrales observées avec le C₁₆PY dispersé dans le mélange éthanol:tampon (figures 14-16) sont associées à un effet d'agrégation de la sonde dans le milieu aqueux (voir structure du C₁₆PY, figure 3 et Tanford, 1980). Il est effectivement raisonnable de suggérer un mécanisme d'agrégation du type micelle pour le C₁₆PY dispersé dans une phase aqueuse. Aucune précipitation des structures moléculaires formées par la dispersion de C₁₆PY n'a été observé, et ce même après plusieurs jours. La bande très intense de l'excimère de la figure 15 indique clairement une association des groupes pyrenyl (en deça du rayon d'interaction pour la formation d'excimères) probablement regroupées dans la partie internes des structures moléculaires. Néanmoins, le type spécifique d'association n'a pas été déterminé, il pourrait s'agir d'un modèle *face-à-face* tel que proposé par Stegemeyer *et al.* (1987).

L'absence d'agrégat de pyrène et de groupes pyrenyl du C₁₆PY lorsque ces sondes sont incorporées dans des vésicules de PC est une indica-

tion que la formation d'excimères dans ces systèmes est gouvernée par la diffusion moléculaires des sondes. Cette diffusion dépend bien entendu de la distribution des sondes-pyrène dans la membrane; différents modèles ne nécessitant pas la présence d'agrégats ont été récemment proposés (Sommerharju, 1985; Hresko *et al.*, 1986, 1987; Binder & Dittes, 1987).

Les divergences observées dans la littérature concernant la formation d'excimères du pyrène ou de ces dérivés par excitation d'agrégats pré-formés à l'état fondamental peuvent s'expliquer en terme de structure membranaire et de concentration de sondes incorporées. Les expériences de Kaneda *et al.* (1985) effectuées avec le PY-DPPE incorporé dans des membranes cellulaires constituent en ce sens un exemple typique. Il est fort possible que l'hétérogénéité de ces membranes cellulaires favorise l'agrégation des molécules de PY-DPPE en micro-domaines; de plus, il a été noté que le pyrène pouvait se lier à certaines protéines (Jones & Lee, 1985; Vekshin, 1987).

Les résultats de Yamazaki *et al.* (1986) avec le C₁₆PY et l'acide stéarique incorporés dans des films monomoléculaires de Langmuir-Blodgett peuvent s'expliquer en termes de concentration locale de sondes. Ces auteurs ont travaillé avec une concentration de 13,9 mol% en C₁₆PY, et n'ont observé que des variations minimes dans les spectres d'excitation (monomère et excimère), pourtant le rapport I_E/I_M était élevé, soit environ 1,3 (c.f. figure 4 de Yamazaki *et al.*, 1986). Il semble évident qu'une concentration si forte, ajoutée aux contraintes de la technique des films monomoléculaires, soit capable d'induire l'agrégation de la

sonde C₁₆PY.

La présence d'agrégats de pyrène à l'état fondamental a été aussi observée par Blackwell *et al.* (1986) avec des liposomes de lipides du chloroplaste. La technique du temps de vie de fluorescence leur a permis de discerner deux temps de vie associés à autant d'espèces. Une composante lente (100-200 ns) fut attribuée au pyrène monomérique, alors que la composante rapide (25-50 ns) fut associée à des agrégats de pyrène. Les auteurs ont également observé que la composante rapide variait selon le lipide formant la membrane, et, pour la même espèce lipidique, d'une expérience à l'autre. Cette variabilité dans les résultats peut être associé à l'hétérogénéité des préparations de liposomes constitués de vésicules uni- et multilamellaires de rayons variables. La possibilité d'une agrégation induite par une interaction bicouche-bicouche doit aussi être prise en considération avec les vésicules multilamellaires.

En conclusion, nous avons démontré que l'utilisation de vésicules unilamellaires et homogènes ne favorisait pas la formation d'agrégats à l'état fondamental jusqu'à environ 4 mol% de pyrène ou de C₁₆PY. Conséquemment, sous ces conditions, la formation d'excimères des sondes concernées s'effectue par un processus purement dynamique, contrôlé par la diffusion moléculaire des sondes. L'utilisation de la technique de l'excimère du pyrène et du C₁₆PY avec des vésicules de PC unilamellaires est donc adéquate pour étudier les propriétés dynamiques des membranes, telles la diffusion, la microviscosité et le transfert d'énergie dépendant de la diffusion. Cependant, la concentration de sondes incor-

porées doit demeurer à un faible niveau pour éviter la formation de micro-domaines (voir section 1.1).

Ces considérations font également ressortir l'importance de distinguer entre la formation réelle d'excimères, telle que décrite à la section 2.2.1; et l'émission de type excimère suite à l'excitation d'agrégats à l'état fondamental (voir également Hara *et al.*, 1980; Suib & Kostapapas, 1984; Avnir *et al.*, 1985).

4.2 Effets de NaCl sur la formation d'excimères.

4.2.1 Conséquences sur l'environnement diélectrique et la fluidité membranaire.

Le mécanisme d'action des sels sur l'interface eau-têtes polaires des membranes a été étudié en suivant la formation d'excimères du pyrène et du PY-DPPE en fonction de la force ionique (NaCl) de la dispersion aqueuse. Le rôle des ions sur l'interface est primordial, notamment en relation avec le phénomène hydratation-déhydratation qui contrôle l'adhésion des membranes (voir e.g. Rand, 1981; Wilschut & Hoekstra, 1986).

Il a été préalablement démontré (Lessard & Fragata, 1986) que des cations monovalents (Li^+ , Na^+ , K^+) affectent l'état d'hydratation de la région des têtes polaires de vésicules de PC. Söderman *et al.* (1983) ont aussi observé des modifications conformationnelles de la région des têtes polaires de bicouches de PC en fonction de la force ionique. Afzal *et*

al. (1984) ont proposé une explication concernant de tels changements, il s'agirait d'un affaiblissement des forces d'hydratation interfaciales selon l'association des cations monovalents avec le phosphate et des anions avec le groupe choline des molécules de PC.

La sensibilité du pyrène à la polarité de son environnement (L'Heureux & Fragata, 1987), sa position dans la bicouche (voir chapitre 3) et la formation d'excimères du pyrène par des collisions entre vésicules (voir section 4.1) conféraient à cette sonde de nombreux avantages pour l'étude proposée des propriétés interfaciales en fonction de la force ionique. De plus, l'utilisation d'un dérivé lipidique du pyrène portant le chromophore dans la région des têtes polaires (PY-DPPE, voir structure à la figure 3) nous a permis de consolider les observations effectuées avec le pyrène libre.

La figure 17 présente la variation du rapport I_E/I_M du pyrène incorporé dans des vésicules de PC en fonction de la concentration de NaCl de la solution. La concentration molaire du pyrène se situe à 3,0 mol%, i.e. au-dessus de la concentration critique pour la formation d'excimères. La figure 17 indique que le rapport I_E/I_M du pyrène est insensible à la force ionique entre 0-0,4 M NaCl. Contrairement, le rapport I_E/I_M varie considérablement selon la concentration de vésicules. La moyenne des rapports I_E/I_M ont été calculé à 0,24, 0,32 et $0,38 \pm 0,02$ pour des concentrations de lipides de 23 (), 47 () et $70 \mu\text{M}$ () respectivement. Ces résultats sont comparables à ceux observés avec le pyrène incorporé à 3,7 et 3,0 mol% dans des vésicules de PC (voir figure 17, en-

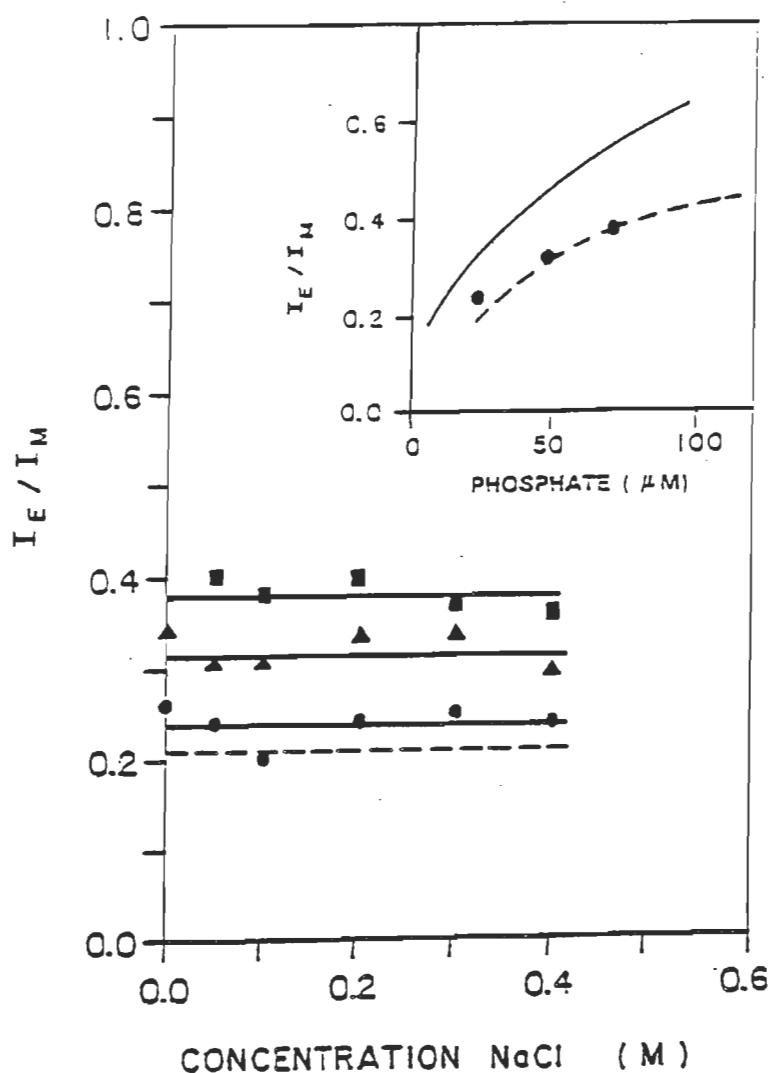


Figure 17. Variation du rapport I_E/I_M du pyrène et du PY-DPPE incorporés dans des vésicules de PC en fonction de la concentration de NaCl. Le rapport molaire de pyrène est à 3,0 mol% avec des concentrations de vésicules (lipide) de 23 (●), 47 (▲) et 70 μM (■). Le rapport molaire de PY-DPPE est à 14 mol%, [lipide] = 42 μM (---). Encadré: Variation du rapport I_E/I_M du pyrène en fonction de la concentration de vésicules (lipide). Les concentrations de pyrène sont à 3,7 mol% (—) et 3,0 mol% (---), cette courbe a été tracée avec 8 valeurs de I_E/I_M entre 20 et 110 μM en lipide, les points (●) représentent les moyennes obtenues à 23, 47 et 70 μM en lipide.

cadré).

Les résultats de la figure 17 diffèrent légèrement de ceux obtenus par Ohyashiki & Mohri (1983). Ces auteurs ont étudié le rapport I_E/I_M du pyrène incorporé dans des membranes intestinales, ils ont observé une augmentation du rapport I_E/I_M entre 0-0,1 M NaCl suivi d'un plateau jusqu'à 0,2 M NaCl. Nous croyons que la grande différence entre les membranes naturelles utilisées par Ohyashiki & Mohri et nos vésicules unilamellaires est à l'origine des variations observées. La présence de protéines peut être à l'origine d'interactions ioniques spéciques pouvant perturber la formation d'excimères du pyrène.

La figure 17 présente également les résultats obtenus avec le PY-DPPE incorporé dans des vésicules de PC (----). Encore une fois le rapport I_E/I_M ne varie pas en fonction de la force ionique ($I_E/I_M = 0,21 \pm 0,01$). La concentration de PY-DPPE est à 14,0 mol% et la concentration de vésicules est de 42 μM en lipide. La nécessité d'utiliser une concentration molaire de sonde plus élevée est discutée à la section suivante (4.2.1).

4.2.2 Discussion.

Pour expliquer la différence relative de concentrations molaires de sondes incorporées dans les vésicules de PC et étant à l'origine d'un rapport I_E/I_M de l'ordre de 0,2, soit 3,0 et 14,0 mol% pour le pyrène et le PY-DPPE respectivement, nous proposons une différence significative

dans la diffusion moléculaire des sondes. Le coefficient de diffusion latéral, D, du pyrène dans un système membranaire est évalué à environ $10^{-7} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (Galla et al., 1979; Dembo et al., 1979, Yamauchi & Matsushita, 1979), alors que celui du PY-DPPE est environ deux fois plus petit. Par exemple, des études de diffusion effectuées avec un dérivé du pyrène de type lécithine donnaient des valeurs de $D = 5,3 \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (Galla et al., 1979) et $5,8 \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (Jones & Lentz, 1986). Ces valeurs sont en accord avec les résultats obtenus par la méthode d'émission de lumière après photodécoloration (ELAP ou *fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP) avec la sonde N-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) phosphatidyléthanolamine incorporée dans des bicouches de PC, les valeurs de D se situent alors entre $3,5-4,4 \times 10^{-8} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ (Wu et al., 1977; Rubenstein et al., 1979; Derzko & Jacobson, 1980; Fragata et al., 1984).

Soulignons également que la formation d'excimères du pyrène est favorisé par le temps de vie (τ) élevé de cette sonde, soit 100-200 ns (Blackwell et al., 1986; Jones & Lentz, 1986) ou même 350 ns (Daems et al., 1985) comparativement à $\tau = 13$ ns pour le PY-DPPE dans un système membranaire (Kaneda et al., 1985). Conséquemment, si nous estimons le déplacement moyen des sondes, $\langle r \rangle$ (voir e.g. Saffman & Delbrück, 1975), à l'aide de l'expression suivante :

$$\langle r^2 \rangle = 4D\tau$$

nous obtenons, pour le pyrène et le PY-DPPE, des valeurs de $r = 20-28 \text{ \AA}$ et 5 \AA respectivement. De plus, le pyrène pouvant diffuser non pas

seulement latéralement, mais aussi selon l'axe trans-membranaire (voir chapitre 3 et Vekshin, 1987); le déplacement moyen (r) est certainement supérieur à 20- 28 Å pour le pyrène. Dans de telles conditions, il n'est pas étonnant d'observer des différences significatives pour la formation d'excimères entre le pyrène et le PY-DPPE incorporés dans des vésicules de PC.

La première conclusion se dégageant des précédentes observations indique que la mobilité des sondes (pyrène et PY-DPPE) incorporés dans des vésicules de PC n'est pas affecté par la présence de NaCl jusqu'à 0,4 M (c.f. figure 17). Conséquemment, la fluidité de l'interface eau-tête polaire demeure inchangée par la présence des ions monovalents Na^+ et Cl^- .

Des variations dans le degré d'hydratation de l'interface eau-tête polaire de vésicules de PC en fonction de la force ionique du milieu ont été observée lors d'une étude sur la polarité de l'interface (Lessard & Fragata, 1986). Pour cette étude nous avons employé la sensibilité du pyrène pour la polarité de son environnement (voir chapitre 3), soit le rapport I/III, pour évaluer les variations possibles dans l'état d'hydratation à proximité de l'interface eau-tête polaire. Rappelons qu'au dessus de 1 mol% de pyrène dans les vésicules, la sonde se situe dans cette région (voir chapitre 3 et figure 10). La sonde PY-DPPE n'a pas été utilisée pour évaluer la polarité parce que la liaison covalente entre les groupes pyrenyl et SO₂ (voir figure 3) réduit la symétrie moléculaire du chromophore qui est responsable de l'augmentation d'intensité de la tran-

sition 0-0 avec la polarité (Lianos & Georghiou, 1979).

Le tableau 4 présente la variation du rapport I/III du pyrène incorporé dans des vésicules de PC en fonction de la concentration de NaCl. La concentration molaire de pyrène est à 3 mol% alors que la concentration de vésicules se situe à 47 μM en lipide. Le tableau 4 indique que l'environnement diélectrique du pyrène n'est pas affecté par la présence de NaCl de 0-0,4 M, ceci signifie que le contenu et/ou l'organisation moléculaire des molécules d'eau près de la sonde ne sont pas altérés par la présence des ions Na^+ et Cl^- . Des résultats similaires ont été obtenu à des concentrations de vésicules de 23 et 70 μM en lipide.

L'ensemble des observations précédentes indique que le mécanisme de fusion momentanée des couches d'hydratation permettant la formation d'ex-cimères entre deux vésicules (voir discussion à la section 3.4) n'est pas modifié par la présence d'ions monovalents dans la région interfaciale concernée. Cette conclusion constitue certe un point d'intérêt important en relation avec la fonction des forces d'hydratation répulsives dans les interactions membrane-membrane (Rand, 1981).

Le concept de répulsion entre deux couches d'hydratation créant une barrière pour un contact moléculaire est associé à l'organisation des molécules d' H_2O dans la régions des têtes polaires en couches spécifiques (voir e.g. Chernomordik *et al.*, 1987). Les forces d'hydratation seraient conséquemment reliées au travail nécessaire pour enlever les molécules d' H_2O de ces couches spécifiques. L'augmentation de la concentration

Tableau 4

Variation du rapport I/III du pyrène incorporé dans des vésicules de PC^a en fonction de la concentration de NaCl.

[NaCl] (M)	I/III
0	1,32
0,05	1,31
0,10	1,30
0,20	1,31
0,30	1,31
0,40	1,29

a: La concentration de pyrène est de 3,0 mol% et la concentration de vésicules se situe à 47 µM en lipide.

d'ions dans la dispersion de vésicules devrait logiquement perturber la barrière d'hydratation. Nous devrions alors observer une augmentation du rapport I_E/I_M avec la concentration de NaCl, le mécanisme de fusion momentanée des couches d'hydratation étant facilité par l'affaiblissement progressif des forces répulsives. Cependant, ce phénomène n'a pas été observé (c.f. figure 17); le seul processus responsable d'une augmentation de I_E/I_M étant la concentration de vésicules en solution (c.f. figure 17 encadré). Pour expliquer cette apparente contradiction, nous proposons une distribution hétérogène de micro-domaines déshydratés formant des aires de contact privilégiées sur les surfaces externes des vésicules en collision. Ceci permettrait au mécanisme suggéré de se produire avec une efficacité constante sans être significativement affecté par les forces d'hydratation répulsives.

Mentionnons finalement que cette dernière conclusion indique que les ions monovalents n'ont pas nécessairement un rôle important dans la déstabilisation des forces répulsives d'hydratation agissant sur les vésicules.

CHAPITRE V

TRANSFERT D'ENERGIE DANS LES VESICULES

5.1 Généralités.

Plusieurs aspects du transfert d'énergie dans des systèmes membranaires artificielles (micelle, monocouche, bicouche et vésicule) ont été étudiés avec une grande variété de couples donneur-accepteur ou avec des systèmes pour le transfert d'électrons dans le but d'éclaircir les processus énergétiques de la photosynthèse (voir les articles de revues de Fendler, 1981; Grätzel, 1982; Calvin, 1983). L'approche que nous avons privilégiée nécessite sans doute une brève justification pour soutenir son originalité. Le choix d'étudier l'efficacité de transfert énergétique en fonction de la position des couples donneur-accepteur prend son origine dans les travaux préliminaires sur les propriétés diélectriques des diverses régions des bicouches. La facilité d'obtenir des sondes pouvant se positionner à **tous** les endroits désirés constitue également un avantage important. Finalement, l'orientation imposée aux sondes par le système anisotropique des vésicules ajoute un aspect trop souvent négligé lors de telles études.

5.2 Quenching du pyrène par l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique.

La figure 18 présente des graphiques de type Stern-Volmer (voir section 2.2.3) pour l'atténuation de fluorescence du pyrène par le 2-AS dans deux solvants organiques, soit le méthanol et le n-hexane. Le quenching a été mesuré à la transition vibrationnelle 0-0 située à 375 nm pour le méthanol et à 373 nm pour le n-hexane. Les relations linéaires présentées à la figure 18 indiquent que le processus de transfert obéit à la théorie de Stern-Volmer. A 25 °C, la constante K_D est 8520 M⁻¹ dans le méthanol et 9550 M⁻¹ dans l'hexane.

Comme nous l'avons démontré précédemment, la formation d'excimères du pyrène dans les vésicules de PC (*auto-quenching*) est également contrôlée par un processus purement dynamique jusqu'à une concentration de 4 mol% (voir section 4.1). Conséquemment, pour éviter la formation de complexes dans l'état fondamental, nous avons toujours travaillé avec une concentration totale de sondes inférieure à 4 mol%. Rappelons que la formation d'agrégats de pyrène et de dérivés du pyrène à l'état fondamental a déjà été observé dans plusieurs systèmes, notamment des liposomes multilamellaires (Blackwell *et al.*, 1986), des membranes naturelles (Kaneda *et al.*, 1985) et des films monomoléculaires Langmuir-Blodgett (Yamazaki *et al.*, 1986).

La figure 19 présente un spectre d'absorption du 2-AS avec un spectre d'émission du pyrène incorporés dans des vésicules de PC. Les spectres sont représentés sur une échelle de nombre d'onde pour une meilleure

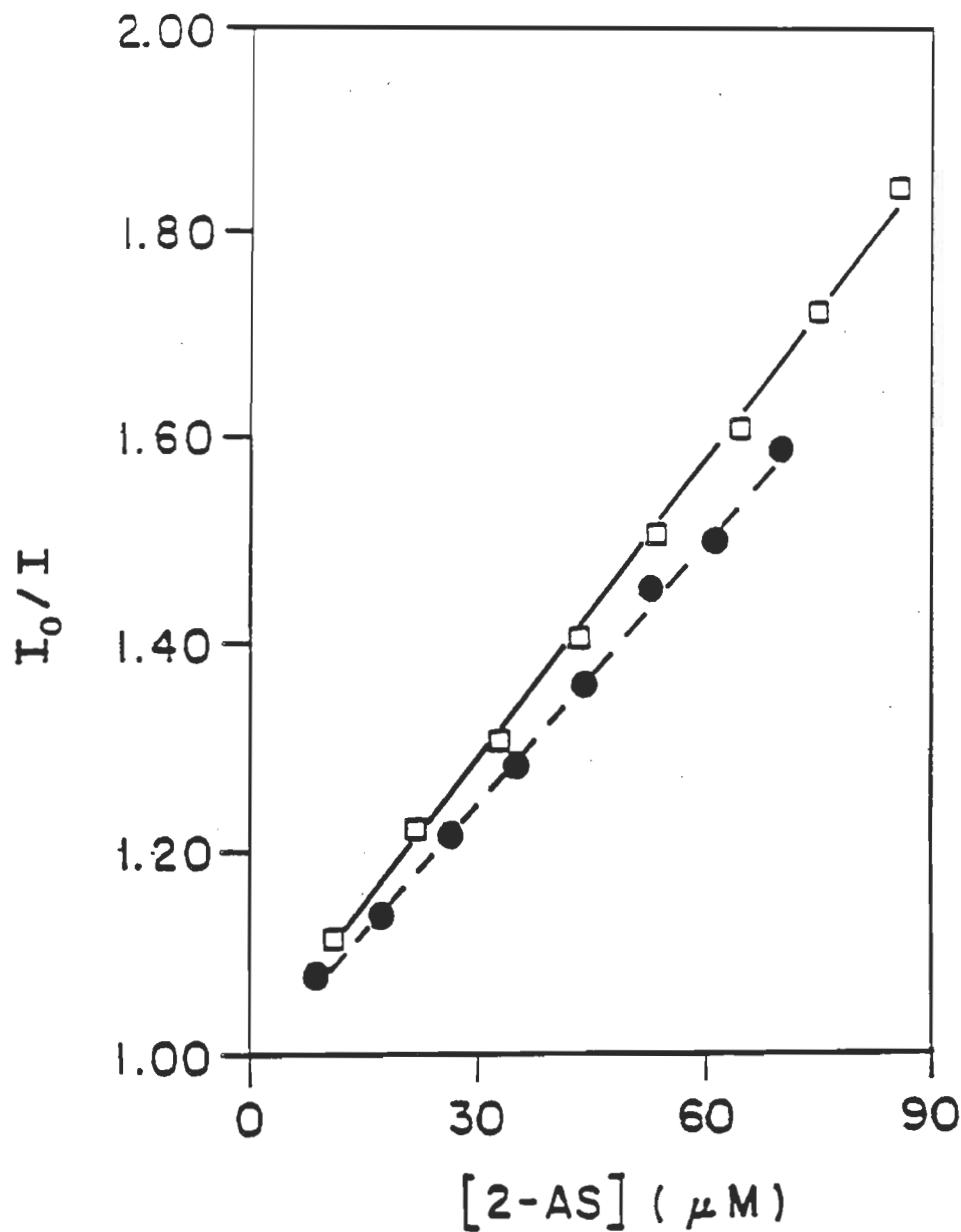


Figure 18. Graphiques Stern-Volmer pour le transfert entre le pyrène et l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique (2-AS) dans l'hexane (---) et le méthanol (—). La concentration de pyrène est de 6 μM .

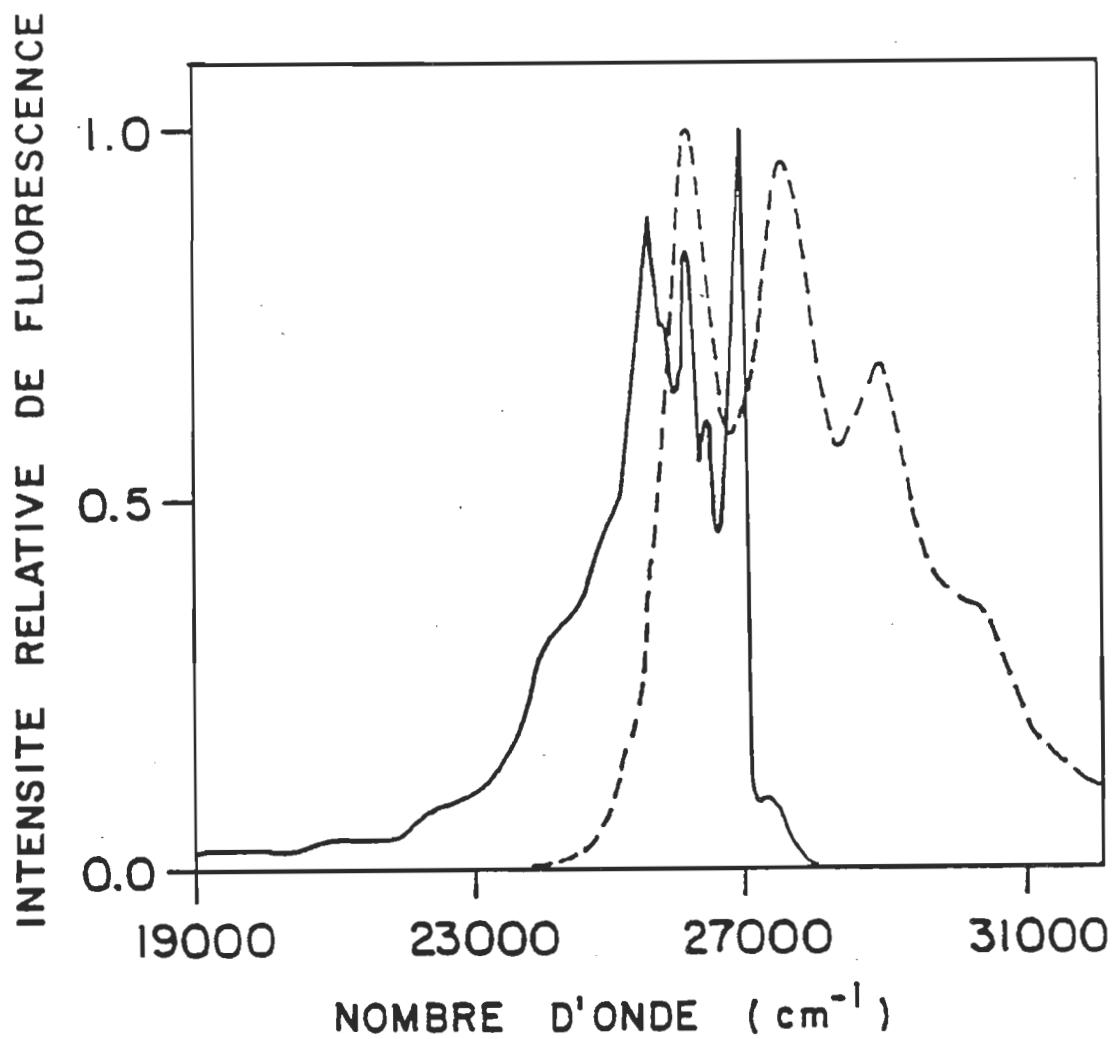


Figure 19. Spectres d'excitation de l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique (2-AS) (---) et spectre d'émission du pyrène (—) incorporés dans des vésicules de phosphatidylcholine.

comparaison des valeurs énergétiques. La figure 19 montre que, dans les vésicules de PC, il existe un recouvrement spectral important dans la région de 23 800-27 800 cm^{-1} , indiquant ainsi que le transfert énergétique entre les deux molécules peut s'effectuer avec une bonne efficacité. Le valeur de l'intégrale de recouvrement spectrale (J) peut être calculée à l'aide de l'équation 2.9.

Avant de présenter les résultats concernant le transfert dans les vésicules il apparaît important d'examiner la position relative des sondes impliquées dans le processus de transfert. La figure 20 présente le premier cas concerné, soit la localisation du 2-AS et du pyrène dans une bicouche de PC. La position du pyrène provient des conclusions des résultats discutés au chapitre 3 (voir figure 10); la position du 2-AS est déduite de considérations thermodynamiques (affinités hydrophobe-hydrophobe et hydrophile-hydrophile) et géométriques. Cette figure indique clairement que le donneur et l'accepteur partagent le même environnement membranaire et peuvent conséquemment permettre un échange énergétique par collision.

La figure 21 présente un graphique de type Stern-Volmer pour le quenching du pyrène par le 2-AS dans des vésicules de PC. La concentration d'accepteurs est exprimée en molécules de 2-AS par \AA^2 de surface membranaire (voir section 2.2.2). La relation linéaire suggère que le transfert obéit à un processus dynamique et que les molécules sont libres de diffuser sans contraintes. La constante K_D a été évalué à $1,04 \times 10^4$ $\text{\AA}^2/\text{molécules}$. La figure 21 indique également que l'efficacité du trans-

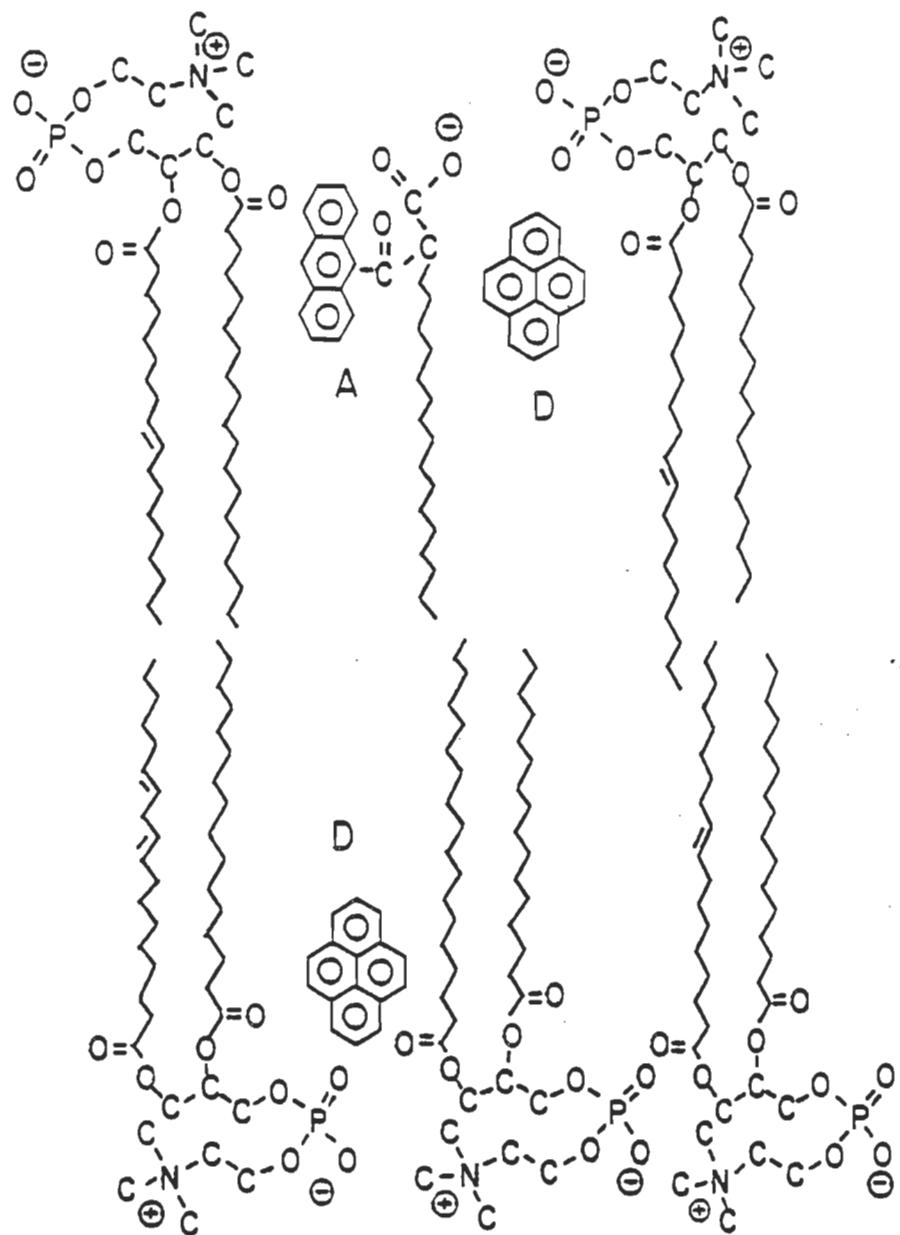


Figure 20. Schéma moléculaire représentant la position du pyrène (donneur, D) et de l'acide 2-(9-anthroxyloxy) stéarique (2-AS) (accepteur, A) dans une bicouche de phosphatidylcholine.

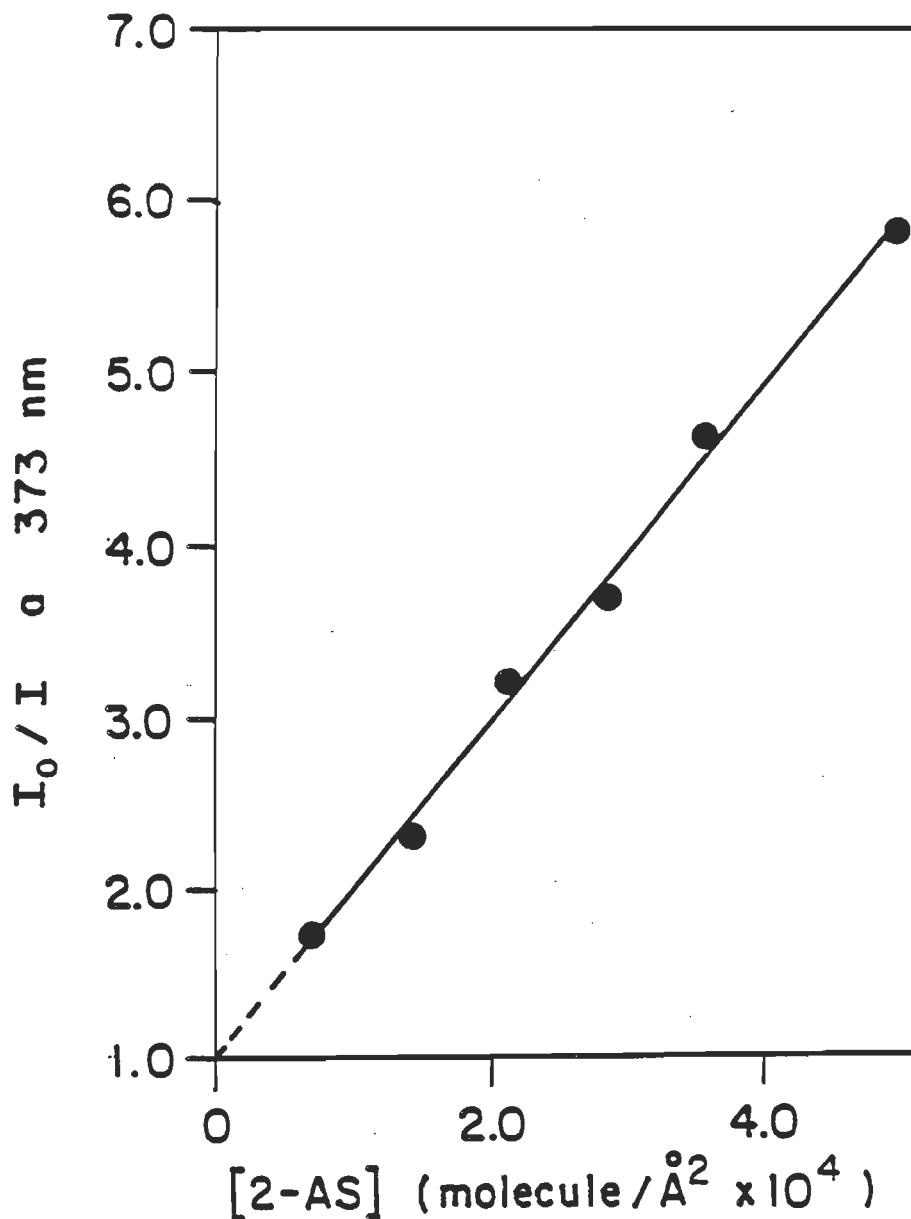


Figure 21. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre le pyrène et l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique (2-AS) incorporés dans des vésicules de phosphatidylcholine. La concentration de pyrène est de 0,25 mol%.

fert est relativement élevée dans ce système. Cette observation n'est pas étonnante si on considère la localisation relative des deux sondes (c.f. figure 20) et le temps de vie du pyrène dans les membranes (Daems *et al.*, 1985; Blackwell *et al.*, 1986; Jones & Lentz, 1986).

5.3 Quenching de l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque et du 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-L-a-phosphatidylcholine par l'acide 2-(9-anthrooyloxy) stéarique.

La figure 22 présente les graphiques de Stern-Volmer pour le *quenching* du C₁₆PY par le 2-AS (figure 22a) et du PY-PC par le 2-AS (figure 22b) dans des vésicules de PC. Les deux graphiques de la figure 22 indiquent une déviation positive évidente. L'explication la plus commune pour une telle déviation est reliée au *quenching* statique, i.e. la formation de complexes à l'état fondamental (voir Keizer, 1983; Lakowicz, 1983 et section 2.2.3).

Kano *et al.* (1980) ont observé la présence de *quenching* statique entre le pyrène, l'acide (pyrenyl-1) décanoïque et le N,N-dicetylaniline dans des liposomes de dipalmitoylphosphatidylcholine. Blackwell *et al.* (1987) ont étudié le transfert entre le pyrene et une plastoquinone et une plastoquinol incorporés dans des liposomes de PC, la non-linéarité de leur graphique Stern-Volmer a été attribuée à une contribution de *quenching* statique et/ou transitoire dynamique (*transient quenching*, voir e.g. Birks, 1970 et modèle de la "sphère active", section 2.2.3).

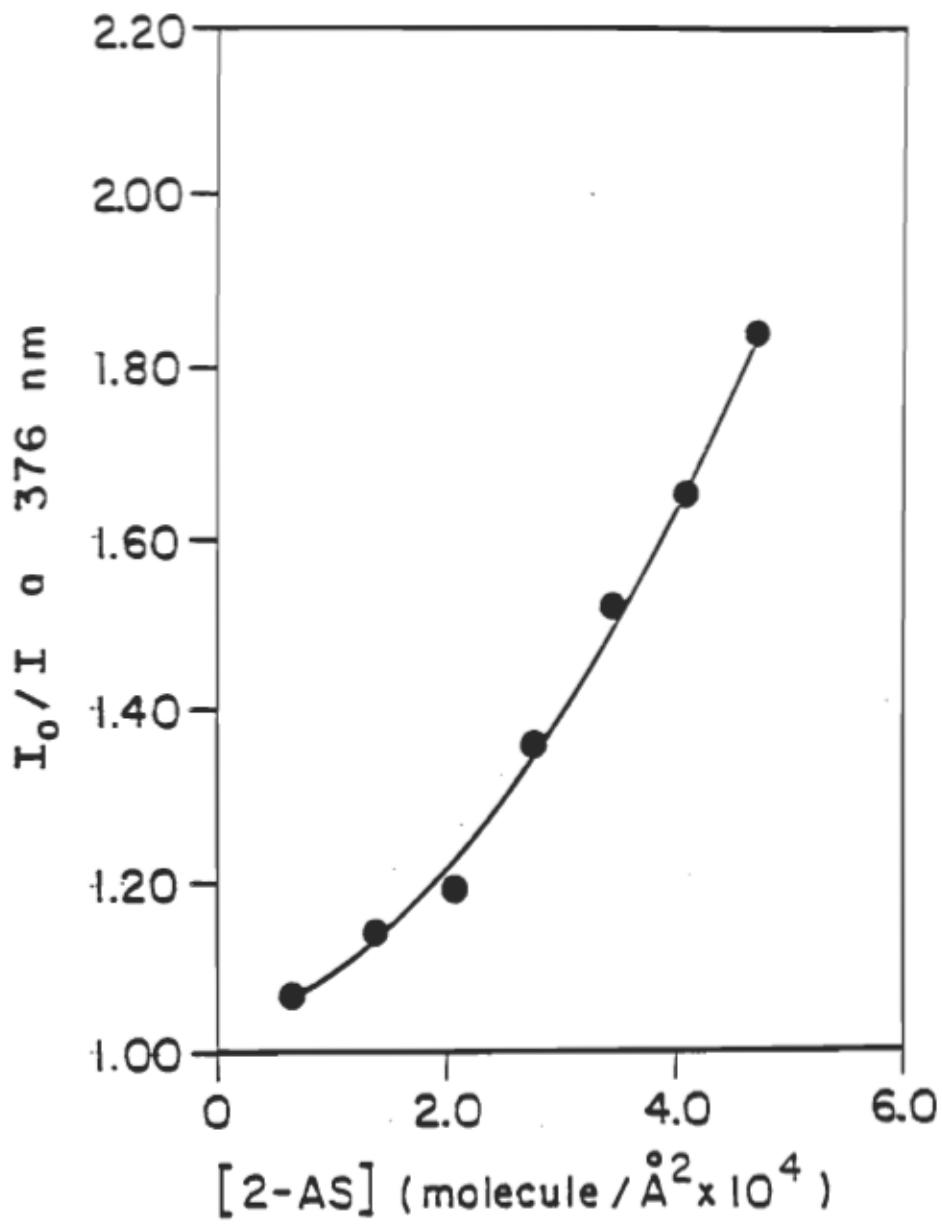


Figure 22a. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre l'acide (pyrenyl-1)-16 hexadécanoïque (C₁₆PY) et l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique (2-AS) incorporés dans des vésicules de phosphatidylcholine. La concentration de C₁₆PY est de 0,25 mol%.

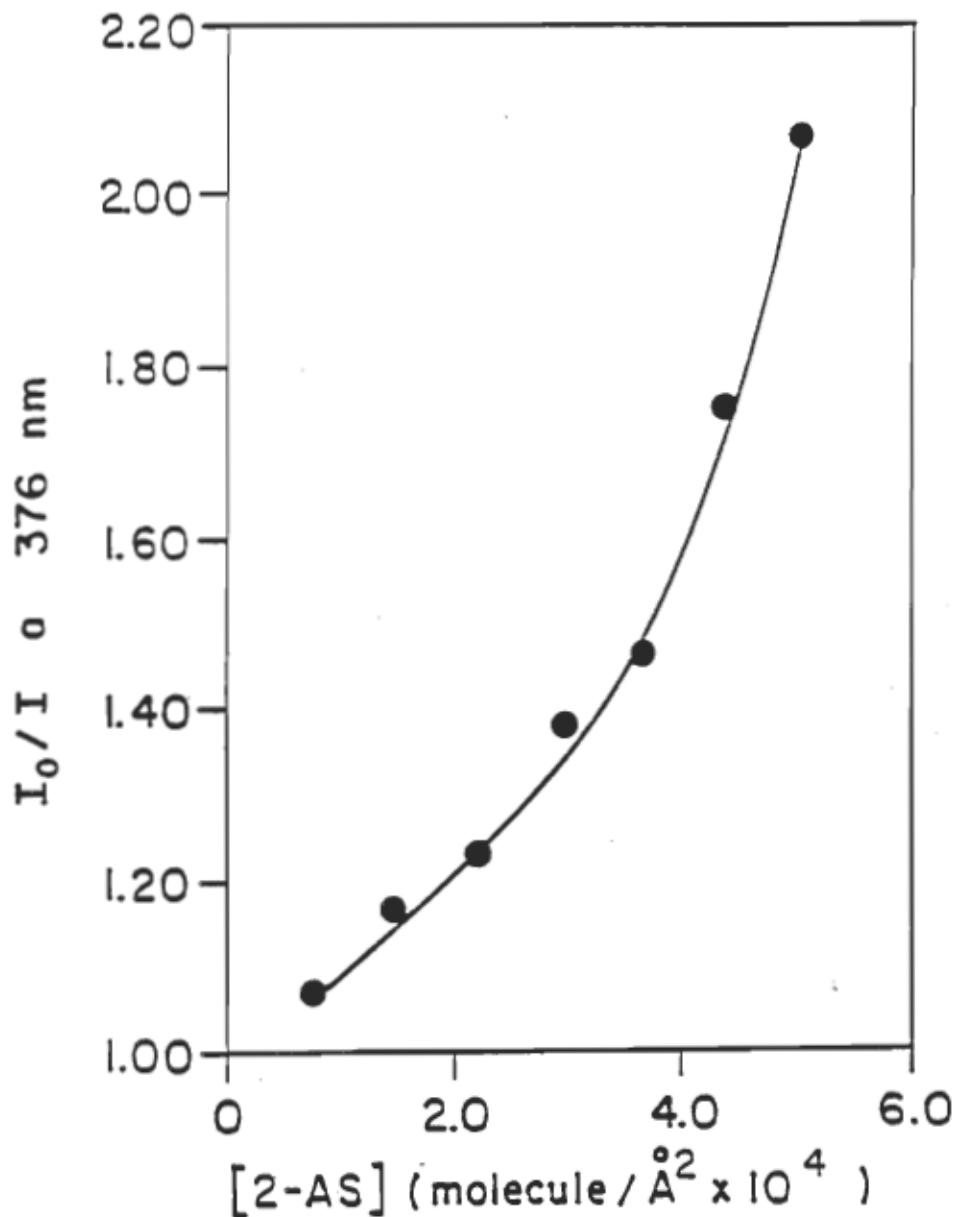


Figure 22b. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre le 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-L- α -phosphatidylcholine (PY-PC) et l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique (2-AS) incorporés dans des vésicules de phosphatidylcholine. La concentration de PY-PC est de 0,25 mol%.

Dans notre cas, l'application de la correction pour le *quenching* statique (voir équation 2.5) ne conduit pas à des graphiques Stern-Volmer linéaires et ne nous permet pas de conclure à une contribution significative de ce type de transfert. Cette observation corrobore les résultats obtenus avec le pyrène et le C₁₆PY (section 4.1) qui n'indiquaient pas la présence d'agrégats à l'état fondamental lorsque la concentration molaire de sondes n'excédait pas 4 mol%.

Le second cas que nous devons considérer concerne le transfert immédiat ne nécessitant pas de diffusion. Dans ce processus, les sondes ne sont pas agrégées mais la distance moyenne qui les séparent permet un échange instantané d'une fraction significative de la population totale. Il s'agit du modèle de la "sphère active" discuté à la section 2.2.3. Waka *et al.* (1978) ont observé ce phénomène pour le transfert entre le pyrène et divers dérivés de l'aniline incorporés dans des micelles. Plus récemment, Lemmetyien *et al.* (1989) ont également appliqué cette théorie pour le *quenching* d'un groupe pyrenyl greffé sur une lécithine par le tetracyanoquinodimethane (TCNQ) incorporés dans des liposomes de PC; les auteurs ont également considéré le phénomène de partition de l'accepteur (TCNQ) entre la phase aqueuse et la phase lipidique.

L'application de l'équation 2.6 sur les résultats obtenus avec le C₁₆PY et le PY-PC incorporés dans des vésicules de PC avec le 2-AS ne nous a pas permis de conclure à une contribution significative de *quenching* immédiat, sans diffusion.

Un autre processus pouvant causer des déviations dans l'équation de Stern-Volmer concerne l'accessibilité des donneurs aux accepteurs, cette modification, établie par Lehrer (1971), considère que seulement une fraction de la fluorescence initiale (F_0) est accessible aux accepteurs. Ce traitement a été employé avec succès pour le transfert dans des vésicules avec le pyrène (Ohyashiki *et al.*, 1985, 1986) et l'acide (pyrenyl-1) butyrique (Almgren, 1981). L'utilisation de vésicules unilamellaires homogènes ne nous permettait pas de croire que l'accès au 2-AS pouvait être restreint; mentionnons que la modification de Lehrer est basée sur une population inhomogène de fluorophores avec différents rendements quantique (Φ_0). L'application de ce traitement ne nous permet pas non plus d'expliquer convenablement nos résultats.

D'une façon similaire, nous pouvons considérer la possibilité de partition des sondes entre les phases aqueuse et lipidique. Ce phénomène a été préalablement observé avec des sondes ayant un caractère relativement hydrophile tel que le N,N-dimethylaniline (Sikaris *et al.*, 1981), le n-doxyl et n-nitroxide stéarates (Blatt *et al.*, 1984) et le TCNQ (Lemmettyinen *et al.*, 1989). Considérant le caractère hautement hydrophobe de la sonde 2-AS (c.f. figure 4), il est raisonnable de croire que ce fluorophore est entièrement solubilisé dans la phase lipidique des vésicules de PC. Mentionnons de plus que les spectres de fluorescence du 2-AS dans les vésicules de PC (émission et excitation) sont caractéristiques d'une population unique.

Les résultats obtenus avec le C₁₆PY et le PY-PC étant presque iden-

tiques (c.f. figure 22) nous utiliserons le même traitement pour le transfert entre ces sondes. Le point fondamental concerne la position relative des sondes dans les vésicules de PC. La figure 23 représente une partie d'une bicouche de PC avec les sondes 2-AS et PY-PC, soulignons que la position du groupe pyrenyl du C₁₆PY est à peu près la même que celle correspondant au PY-PC.

La figure 23 indique que la distance minimale séparant donneurs et accepteurs est d'environ 10-15 Å. Dans ce cas, le transfert par collision n'est pas assuré et nous devons considérer une forme de transfert énergétique alternative. Notons également que l'efficacité de transfert avec les systèmes 2-AS/C₁₆PY et 2-AS/PY-PC est beaucoup plus faible que celle observé avec le système 2-AS/pyrène (comparer figures 21 et 22). Ces considérations sont discutées à la section 5.5.

5.4 Quenching du pyrène et du 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-L-α-phosphatidylcholine par l'acide 16-(9-anthroyloxy) palmitique.

L'utilisation de la sonde 16-AP nous a permis d'évaluer l'efficacité du transfert lorsque le groupe accepteur (anthroyloxy) se retrouvait dans la zone hydrophobe des bicouches lipidiques (voir structure chimique à la figure 4). Pour comparer avec les résultats précédents, nous avons employé le pyrène et le PY-PC comme donneur, le chromophore se situant à deux positions distinctes dans la bicouche (voir figures 20 et 23).

La figure 24 présente le graphique de Stern-Volmer pour le *quenching*

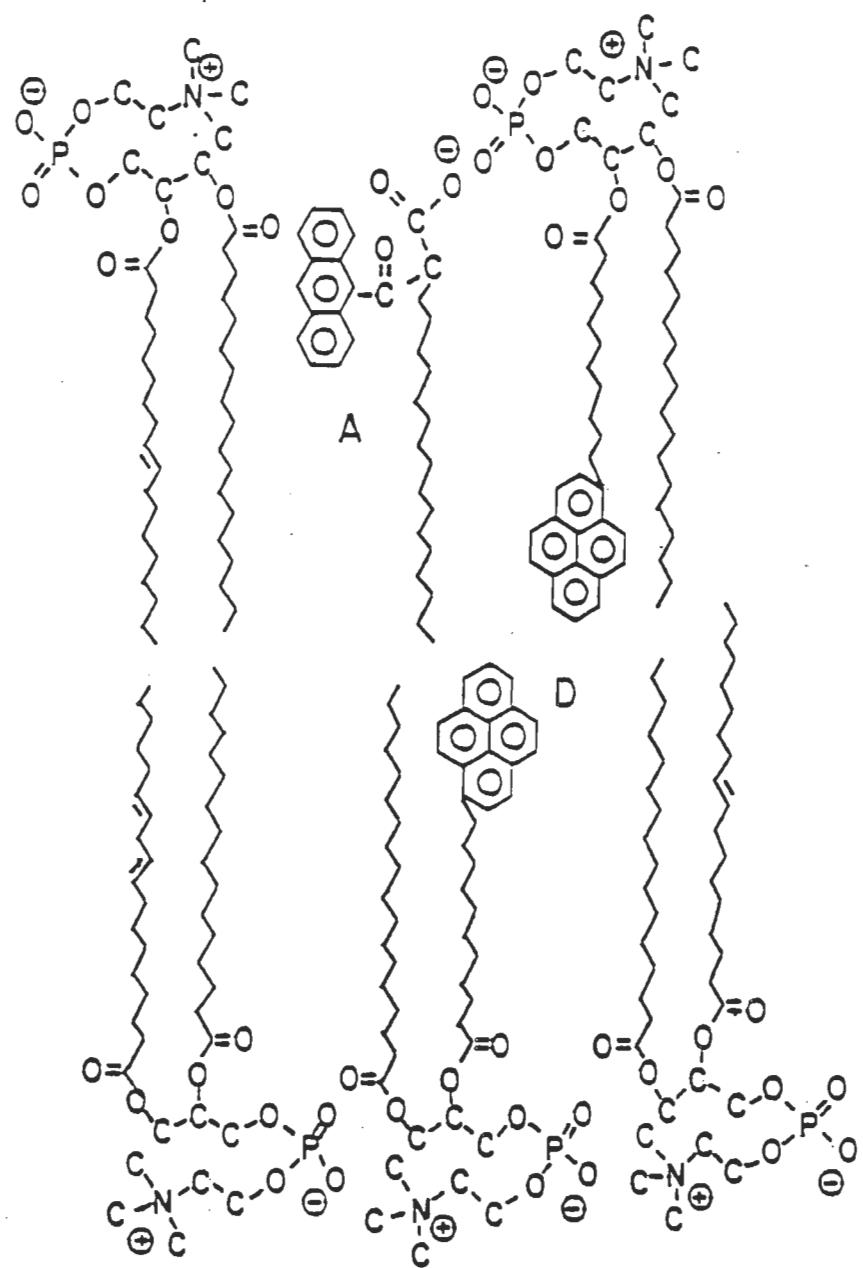


Figure 23. Schéma moléculaire représentant la position du 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-L- α -phosphatidylcholine (PY-PC) (donneur, D) et de l'acide 2-(9-anthroyloxy) stéarique (2-AS) (accepteur, A) dans une bicouche de phosphatidylcholine.

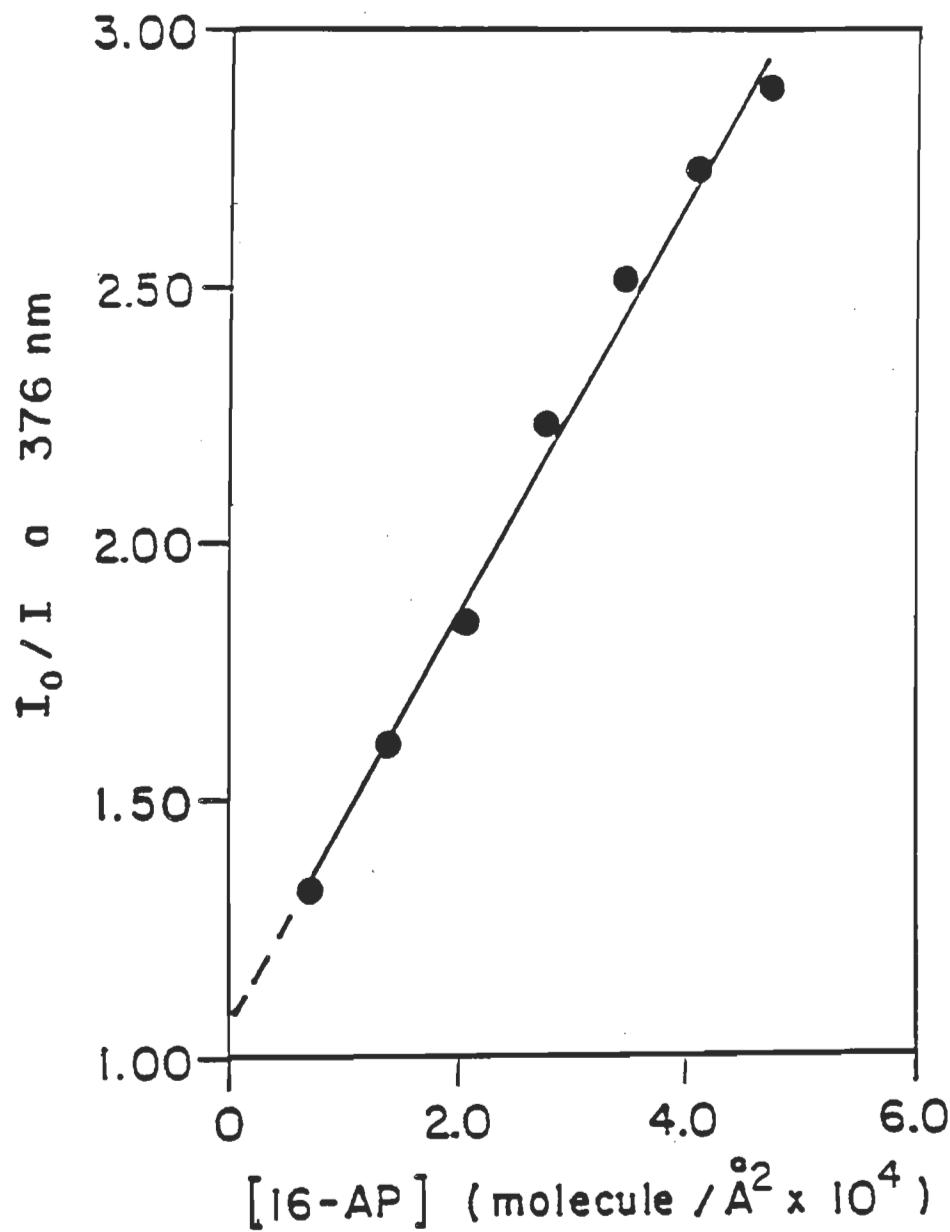


Figure 24. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre le 3-palmitoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-L- α -phosphatidylcholine (PY-PC) et le 16-(9-anthroyloxy) palmitique (16-AP) incorporés dans des vésicules de phosphatidylcholine. La concentration de PY-PC est de 0,25 mol%.

du PY-PC par le 16-AP incorporés dans des vésicules de PC. Rappelons que dans ce cas le donneur (PY-PC) et l'accepteur (16-AP) se situent dans la région hydrophobe. La relation de la figure 24 est linéaire et la constante K_D est évaluée à $4.08 \times 10^3 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$. Ce type de transfert semble donc obéir au processus de la diffusion moléculaire et l'échange énergétique s'effectue par collision entre un donneur excité et un accepteur. Notons cependant que l'efficacité du transfert est plus faible qu'avec le système pyrène/2-AS (comparer les figures 21 et 24 et voir le tableau 5). Avec l'autre système étudié (pyrène/16-AP) nous retrouvons la déviation positive préalablement observée avec les systèmes C₁₆PY/2-AS et PY-PC/2-AS; ce résultat est présenté à la figure 25.

Encore une fois, les tentatives pour corriger la déviation avec des théories existantes se sont avérées vaines (voir section 5.3). La distance séparant donneur et accepteur est donc trop importante pour l'interaction directe entre les deux groupes, le transfert s'effectue donc par interaction à *distance*.

Le tableau 5 résume les résultats pour les cinq couples donneur-accepteur étudiés en donnant le pourcentage d'atténuation de la fluorescence initiale pour une concentration fixe d'accepteur. Les différences observées sont expliquées en fonction de variations dans la diffusion et du type de transfert en cause.

Tableau 5

Pourcentage d'atténuation de la fluorescence pour divers couples donneur-accepteur dans des vésicules de PC.

Donneur	Accepteur	% atténuation*
pyrène	2-AS	81
C ₁₆ PY	2-AS	39
PY-PC	2-AS	39
pyrène	16-AP	23
PY-PC	16-AP	62

* Le pourcentage d'atténuation est évalué pour une concentration d'accepteur de $4,0 \times 10^{-4}$ molécule/ \AA^2 , la concentration de donneur est de $3,6 \times 10^{-5}$ molécule/ \AA^2 . % atténuation : $((I_0 - I)/I_0) \times 100$.

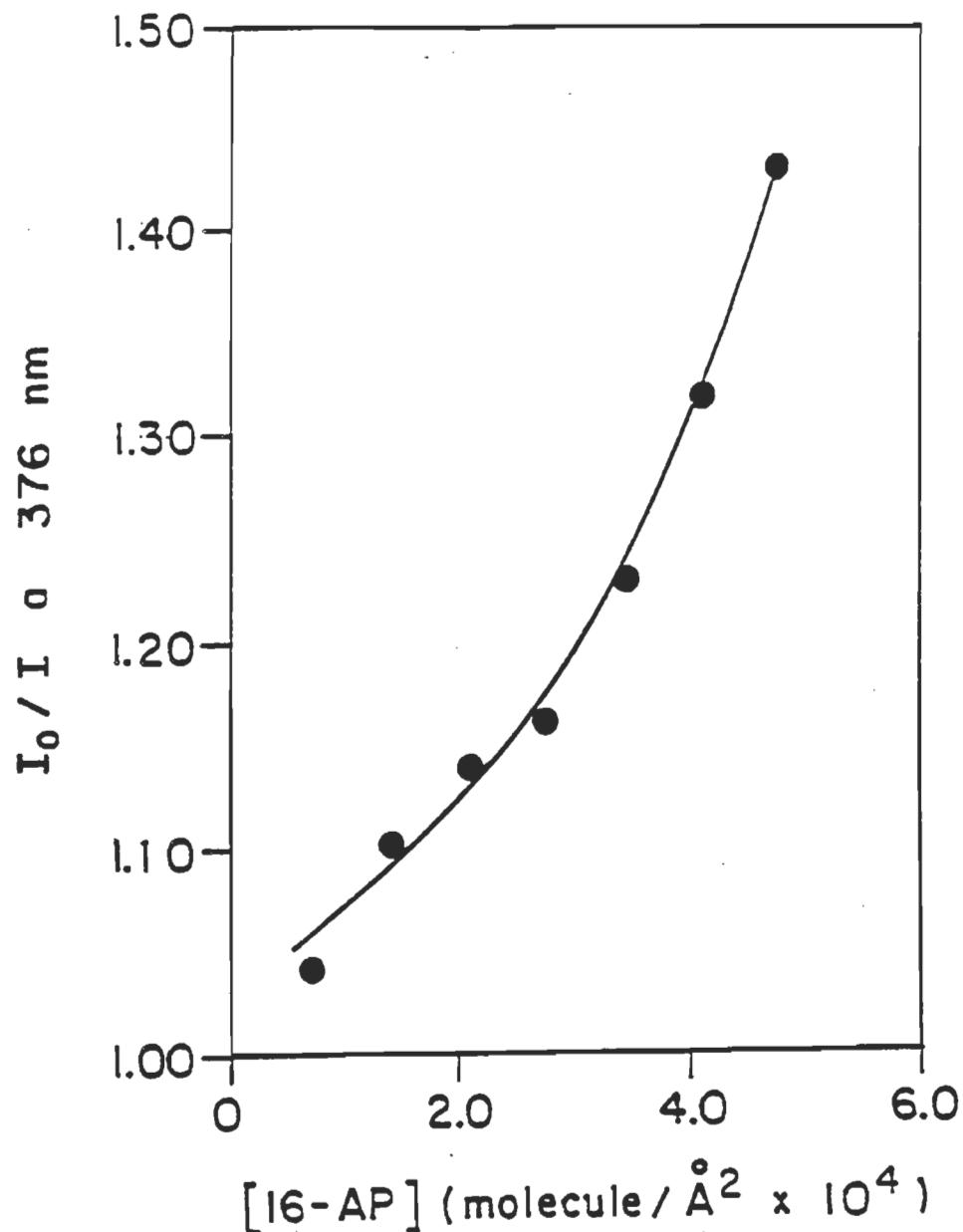


Figure 25. Graphique Stern-Volmer pour le transfert entre le pyrène et le 16-(9-anthroyloxy) palmitique (16-AP) incorporés dans des vésicules de phosphatidylcholine. La concentration de pyrène est de 0,25 mol%.

5.5 Discussion

Nous allons d'abord examiner les deux couples de transfert obéissant à la théorie de Stern-Volmer; i.e. pyrène/2-AS et PY-PC/16-AP. Dans le premier cas donneurs et accepteurs se situent dans la partie supérieure de chaque monocouche assez près des têtes polaires; dans le second, les deux sondes sont incorporées dans la région des chaînes hydrocarbonnées. Considérant la structure des sondes et leur emplacement respectif, il est raisonnable de croire que l'échange d'énergie puisse s'effectuer suite à une collision efficace, collision contrôlée par la diffusion des sondes. Conséquemment l'efficacité du transfert est dépendante de la viscosité du milieu et du temps de vie du donneur excité. Les résultats nous indiquent que la constante de Stern-Volmer (K_D) du couple pyrène/2-AS est environ 2,5 fois plus grande que la constante du couple PY-PC/16-AP démontrant que ce premier système est beaucoup plus efficace (voir aussi tableau 5). Cette observation peut paraître étonnante si on considère que dans le cas du couple PY-PC/16-AP l'échange peut s'effectuer par deux voies différentes, soit à l'intérieur d'une même monocouche, soit entre les monocouches interne et externe. Dans le cas du couple pyrène/2-AS l'échange ne peut pas s'effectuer entre les deux monocouches mais seulement à l'intérieur d'une même monocouche (voir figure 20).

La différence observée s'explique dans un premier temps par la diffusion plus rapide du pyrène par rapport à celle de son dérivé PY-PC et par un temps de vie plus long pour le pyrène libre comparé à son homologue (voir section 4.2.2).

Les considérations pour les couples C₁₆PY/2-AS, PY-PC/2-AS et pyrène/16-AP sont d'une toute autre nature puisqu'il faut considérer ici une autre forme de transfert, décrite sous sa forme générale par la théorie de Förster (voir section 2.2.4). Effectivement, comme le transfert ne peut pas s'effectuer par interaction directe entre les orbitales moléculaires (collision) il doit se produire par induction entre les dipôles i.e à distance. Notons cependant que la distance est relativement petite pour ce type de phénomène, soit environ 10-15 Å, le transfert à distance pouvant atteindre des distances de 60-70 Å (Stryer, 1978). Mentionnons cependant que la distance pourrait être réduite si on considère la possibilité de la formation de boucles dans les chaînes portant le groupe pyrenyl, ainsi ce dernier pourrait se retrouver relativement près de l'accepteur (pour les couples C₁₆PY/2-AS et PY-PC/2-AS). Ce phénomène a été observé avec un groupe nitro-benzoxadiazol (NBD) fixé sur une chaîne de lécithine en position 6 ou 12 (Chattopadhyay & London, 1987). Néanmoins, le caractère hautement hydrophile du groupe NBD est probablement à l'origine de ce type de comportement; le caractère relativement hydrophobe du groupe pyrenyl ne nous permet pas de croire à la formation de boucles. Soulignons également que la polarité (constante diélectrique, ϵ) évaluée avec la sonde C₁₆PY incorporé dans des vésicules de PC est de $\epsilon = 4-10$ (L'Heureux & Fragata, 1987), ce qui est trop faibles pour la région concernée s'il y avait formation de boucles ramenant le fluorophore vers les têtes polaires (voir aussi Lessard & Fragata, 1986).

Dans un premier temps, nous avons exprimé l'efficacité de transfert en fonction de la concentration d'accepteur pour les trois couples con-

cernés (voir équation 2.7). Ces résultats sont présentés à la figure 26. Dans les trois cas ($C_{16}PY/2-AS$, $PY-PC/2-AS$ et pyrène/16-AP) les relations obtenues sont linéaires (coefficients de corrélation, $r > 0,99$). Comme l'indique l'équation 2.7, l'efficacité peut également être exprimée en fonction de la distance, r , séparant donneurs et accepteurs; cette même distance est incorporée dans la constante de vitesse pour le transfert de type Förster (k_F , équation 2.8). L'augmentation de l'efficacité du transfert en fonction de la concentration d'accepteur peut conséquemment être associée à deux facteurs distincts ou à une combinaison des deux. L'accroissement de la concentration peut causer des variations dans la distance moyenne séparant donneurs et accepteurs (r), ainsi cette distance diminuerait avec l'augmentation de la concentration, permettant ainsi une plus grande efficacité de transfert.

La seconde hypothèse présente un intérêt particulier, elle est reliée au facteur d'orientation k^2 (voir équations 3.8 et 3.10). Les vésicules représentent un exemple typique d'un système anisotrope; les sondes incorporées dans les bicouches possèdent une orientation spécifique reliée à leurs structures chimique et géométrique. La mobilité des sondes est également restreinte et le facteur d'orientation, k^2 , ne peut pas être négligé même s'il peut difficilement être évalué (voir e.g. Haas *et al.*, 1978; Dale & Eisinger, 1979; Garab *et al.*, 1981).

Comme cela fut mentionné à la section 2.2.4, la valeur du facteur d'orientation pour un système isotrope est $k^2 = 2/3$. Dans les cas des deux accepteurs que nous avons incorporés dans des vésicules de PC (2-AS

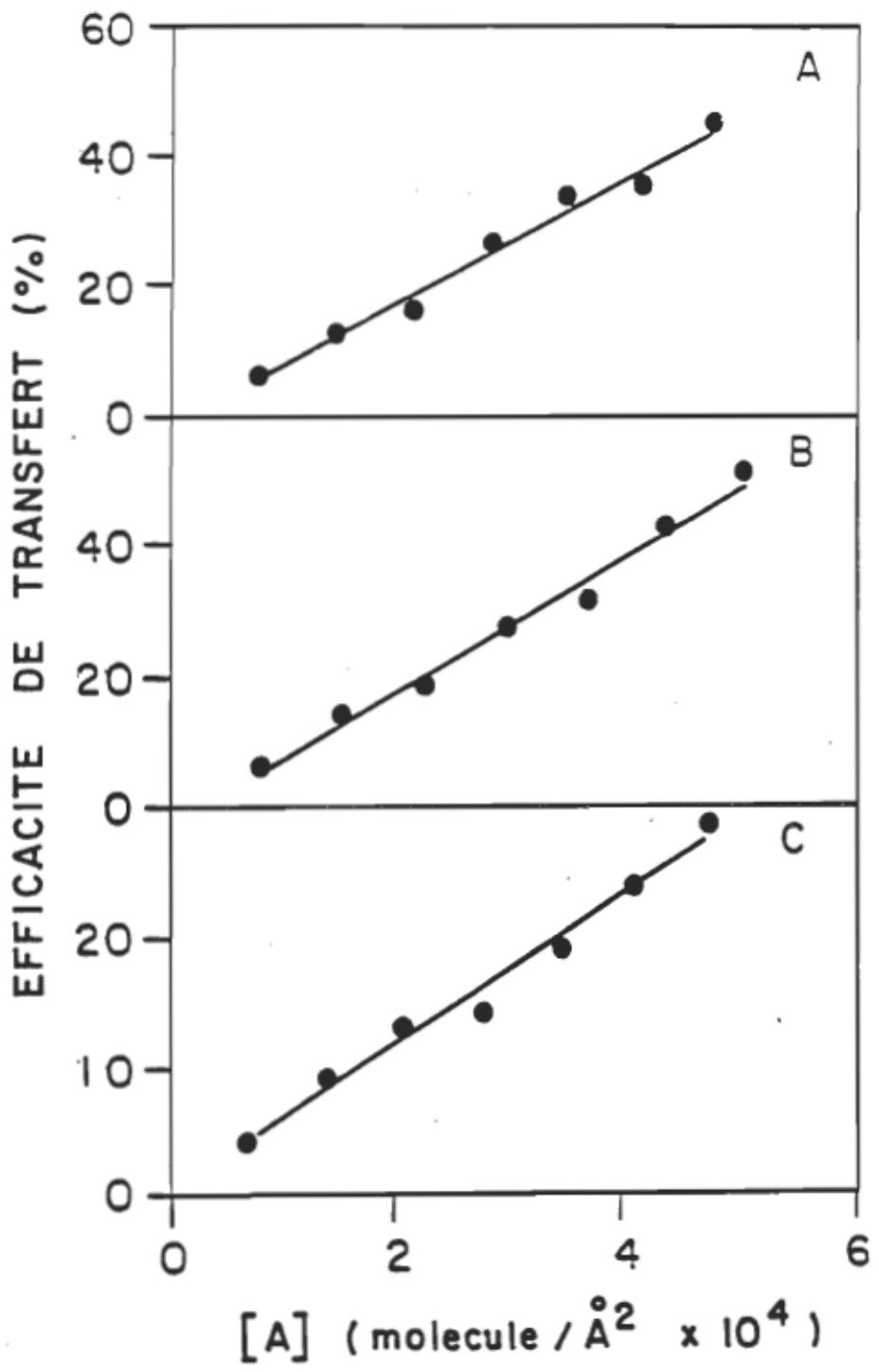


Figure 26. Efficacité de transfert en fonction de la concentration d'accepteur (A). A : C₁₆PY/2-AS, B : PY-PC/2-AS et C : pyrène/16-AP.

et 16-AP) la rotation du groupe anthroyloxy autour de l'axe des chaînes est relativement rapide pour un système membranaire à l'état fluide. Le taux de rotation (R) est une mesure de la mobilité moléculaire utilisée en fluorescence polarisée (voir e.g. Lakowicz, 1983). Les valeurs obtenus avec le 2-AS et le 16-AP incorporés dans des vésicules multilamellaires de PC d'oeufs à 25 °C sont $R = 0,07$ et $0,17 \text{ ns}^{-1}$ (Kutchai *et al.*, 1983). Mentionnons que le dipôle d'absorption pour les sondes est dans le plan du groupe anthroyloxy, perpendiculaire à l'axe majeur de ce groupe, donc perpendiculaire à l'axe des chaînes hydrocarbonées (Badley *et al.*, 1973).

Ces considérations indiquent que la valeur du facteur d'orientation k^2 doit correspondre à celle d'un système isotrope pour nos vésicules. Le travail théorique de Kleinfeld (1985) pour le transfert de type Förster entre des résidus de tryptophane et des acides gras avec groupes anthroyloxy incorporés dans des membranes considérait également un facteur d'orientation $k^2 = 2/3$ (pour la rotation rapide du groupe anthroyloxy autour de l'axe des chaînes; voir aussi Vincent *et al.*, 1982).

Conséquemment, la seconde hypothèse reliée au facteur d'orientation apparaît peu probable avec nos systèmes. Il demeure cependant important de considérer le facteur d'orientation lors d'études de transfert d'énergie de type Förster dans des systèmes anisotropes.

CHAPITRE VI

CONCLUSION

Les premières conclusions concernent la position du pyrène libre dans les vésicules de PC et la formation d'excimères via collisions entre vésicules. Nous avons vu que la formation d'excimères entre vésicules se produisait seulement au plus fortes concentrations de sondes incorporées, i.e. au-dessus de 1 mol%. Ceci nous indiquait que la position du pyrène libre dans les vésicules pouvait varier selon la concentration de sondes. Les résultats indiquent également que la formation d'excimères entre vésicules nécessite la fusion momentanée des couches d'hydratation externes des vésicules. Nous avons aussi considéré l'aspect du temps de vie de la sonde et des charges de surface des lipides.

La formation d'excimères du pyrène à l'intérieur des vésicules a également été étudié pour vérifier la présence éventuel d'agrégats. Dans nos conditions expérimentales, aucun dimère à l'état fondamental ou autre type d'agrégat moléculaire n'a été détecté jusqu'à environ 4 mol% de pyrène incorporé dans des vésicules unilamellaires de PC. Ce résultat nous a permis de conclure que la formation d'excimères du pyrène dans nos vésicules de PC s'effectuait par un processus purement dynamique, contrôlé

par la diffusion moléculaire des sondes. Nous avons également démontré qu'il était possible d'obtenir une émission de type excimère avec des sondes agrégées dans l'état fondamental. Cette observation a été effectué avec le C₁₆PY dispersé dans un mélange 1:20 éthanol:tampon.

L'étude de la formation d'excimères entre vésicules a aussi été suivie en faisant varier la concentration de NaCl dans la solution de vésicules de PC. Le taux de formation d'excimères, rapport I_E/I_M , est apparu insensible aux variations de la force ionique, et ce pour le pyrène libre et le PY-DPPE. L'indice de polarité du pyrène, rapport I/III, demeure lui aussi insensible aux variations de force ionique de la solution. Ceci nous indiquait que la fluidité de la région occupée par les sondes demeurait constante pour des concentrations de NaCl comprises entre 0 et 0,5 M. Les différences dans le rapport I_E/I_M observés entre les deux sondes (pyrène et PY-DPPE) ont été rationalisées en terme de différences dans le coefficient de diffusion et le temps de vie de l'état excité des sondes respectives.

En ce qui concerne le transfert d'énergie, nous avons vu que la distance séparant donneurs et accepteurs représentait le facteur déterminant pour le type de transfert. Les couples donneur-accepteur ayant la possibilité d'échanger par contact direct étaient les plus efficaces et répondait à la théorie de Stern-Volmer. Il s'agit des couples pyrène/2-AS et PY-PC/16-AP. Lorsque la distance entre donneurs et accepteurs excédait la somme des rayons d'interactions, le transfert s'effectuait avec une moindre efficacité via le mécanisme de dipôles induits. Ce comportement

a été observé avec les couples suivants : C₁₆PY/2-AS, PY-PC/2-AS et pyrène/16-AP. Les variations dans l'efficacité du transfert par le processus de type Förster est associé à une variation de la distance moyenne séparant donneurs et accepteurs (r).

BIBLIOGRAPHIE

- Afzal, S., Tesler, W.J., Blessing, S.K., Collins, J.M. & Lis L.J. Hydration force between phosphatidylcholine surfaces in aqueous electrolyte solution. *J. Colloid Interface Sci.*, 1984, **97**, 303-307.
- Almgren, M. Static and time-resolved fluorescence quenching for the study of solubilization and transmembrane transport in vesicles. *J. Phys. Chem.*, 1981, **85**, 3599-3603.
- Avnir, D., Busse, R., Ottolenghi, M., Wellner E., & Zachariasse K.A. Fluorescent probes for silica and reversed-phase silica surfaces : 1,3-di-1-pyrenylpropane and pyrene. *J. Phys. Chem.*, 1985, **89**, 3521-3526.
- Azzi, A. The application of fluorescent probes in membrane studies. *Q. Rev. Biophys.*, 1975, **8**, 237-316.
- Bach, D. & Chapman, D. Calorimetric studies of biomembranes and their molecular components. In A.E. Beezer (Ed.), Biological Microcalorimetry, London : Academic Press, 1980, pp. 275-309.
- Badley, R.A., Martin, W.G. & Schneider, H. Dynamic behavior of fluores-

cent probes in lipid bilayer model membranes. *Biochemistry*, 1973, 12, 268-275.

Bartlett, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 466-484.

Binder, H. & Dittes, K. Investigations on the pyrene fluorescence in phospholipid membranes. *Studia Biophys.*, 1987, 120, 59-71.

Birks, J.B., Dyson, D.J. & Munro I.H. "Excimer" fluorescence II. Lifetime studies of pyrene solutions. *Proc. Roy. Soc. A*, 1963, 275, 575-578.

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

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

Blackwell, M.F., Gounaris, R., Zara, S.J. & Barber, J. A method for estimating lateral diffusion coefficient in membranes from steady-state fluorescence quenching studies. *Biophys. J.*, 1987, 51, 735-744.

Blatt, E. Chatelier, R.C. & Sawyer, W.H. The transverse location of fluorophores in lipid bilayers and micelles as determined by fluorescence quenching techniques. *Photochem. Photobiol.*, 1984, 39, 477-483.

Calvin, M. Artificial photosynthesis : quantum capture and energy storage. *Photochem. Photobiol.*, 1983, **37**, 349-360.

Chatelier, R.C., Rogers, P.J., Ghiggino, K.P. & Sawyer W.H. The transverse location of tryptophan residues in the purple membranes of *halobacterium halobium* studied by fluorescence quenching and energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, **776**, 75-82.

Chattopadhyay, A. & London E. Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry*, 1987, **26**, 39-45.

Chernomordik, L.V., Melikyan, G.B. & Chizmadzhev, Y.A. Biomembrane fusion : a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **906**, 309-352.

Chrzeszczyk, A., Wishnia, A. & Springer, C.S.Jr. Evidence for cooperative effects in the binding of polyvalent metal ions to pure phosphatidylcholine bilayers vesicle surfaces. *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, **648**, 28-48.

Daems, D., Van den Zegel, M., Boens, N. & De Schryver F.C. Fluorescence decay of pyrene in small and large unilamellar L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles above and below the phase transition temperature. *Eur. Biophys. J.*, 1985, **12**, 97-105.

Dale, R.E., Eisinger, J. & Blumberg, W.E. The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer. *Biophys. J.*, 1979, **26**, 161-194.

Dembo, M., Glushko, V., Aberlin, M.E. & Sonenberg, M. A method for measuring membrane microviscosity using pyrene excimer formation. Application to human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, **522**, 201-211.

Derzko, Z. & Jacobson K. Comparative lateral diffusion of fluorescent lipid analogues in phospholipid multibilayers. *Biochemistry*, 1980, **19**, 6050-6057.

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

Etsep, T.N. & Thompson T.E. Energy transfer in lipid bilayers. *Biophys. J.*, 1979, **26**, 195-208.

Fendler, J.H. Aspect of artificial photosynthesis in surfactant vesicles. *J. Photochem.*, 1981, **17**, 303-310.

Förster, Th. Light and organic crystals 1. Delocalized excitation and excitation transfer. In O. Sinanoglu (Ed.), Modern quantum chemistry.

Part III : Action of light and organic crystals New York : Academic Press, 1965, pp. 93-137.

Fragata, M., Ohnishi, S., Asada, K., Ito, T. & Takahashi M. Lateral diffusion of plastocyanin in multilamellar mixed-lipid bilayers studied by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry*, 1984, 23, 4044-4051.

Fung, B. K.-K. & Stryer, L. Surface density determination in membranes by fluorescence energy transfer. *Biochemistry*, 1978, 17, 5241-5248.

Galla, H.-J. & Hartmann, W. Excimer-forming lipids in membrane research. *Chem. Phys. Lipids*, 1980, 27, 199-219.

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

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

Garab, G.I., Kiss, J.G., Mustárdy, L.A. & Michel-Villaz M. Orientation of emitting dipoles of chlorophyll *a* in thylakoids. Considerations on the orientation factor in vivo. *Biophys. J.*, 1981, 34, 423-437.

Golbeck, J.H. Structure, function and organization of the Photosystem I reaction center complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **895**, 167-204.

Grätzel, M. Artificial photosynthesis, energy-and light-driven electron transfer in organized molecular assemblies and colloidal semiconductors. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, **683**, 221-244.

Gryczynski, I., Wiczk, W., Johnson, M.L., Cheung, H.C., Wang, C.K. & Lakowicz J.R. Resolution of end-to-end distance distributions of flexibles molecules using quenching-induced variations of the Förster distance for fluorescence energy transfer. *Biophys. J.*, 1988, **54**, 577-586.

Haas, I., Katchlaski-Katzir E. & Steinberg, I.Z. Effect of the orientation of donor and acceptor on the probability of energy transfer involving electronic transitions of mixed polarization. *Biochemistry*, 1978, **17**, 5064-5070.

Hara, K., De Mayo, P., Ware, W.R., Weedon, A.C., Wong, G.S.K. & Wu, K.C. Biphasic photochemistry : time-resolved spectra of adsorbed hydrocarbons. *Chem. Phys. Lett.*, 1980, **69**, 105-108.

Hresko R.C., Sugár, I.P., Barenholz, Y. & Thompson, T.E. Lateral distribution of a pyrene-labeled phosphatidylcholine in phosphatidylcholine bilayers : fluorescence phase and modulation study. *Biochemistry*, 1986, **25**, 3813-3823.

Hresko R.C., Sugár, I.P., Barenholz, Y. & Thompson, T.E. The lateral distribution of pyrene-labeled sphingomyelin and glucosylceramide in phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.*, 1987, **51**, 725-733.

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

Huang, C. & Mason, J.T. Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, **75**, 308-310.

Jones M.E. & Lentz B.R. Phospholipid lateral organization in synthetic membranes as monitored by pyrene-labeled phospholipids : effect of temperature and prothrombin fragment 1 binding. *Biochemistry*, 1986, **25**, 567-574.

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

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

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

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

Keizer, J. Nonlinear fluorescence quenching and the origin of positive curvature in Stern-Volmer plots. *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 1494-1498.

Kleinfeld, A.M. Tryptophan imaging of membrane proteins. *Biochemistry*, 1985, **24**, 1874-1882.

Kutchai, H., Chandler L.H. & Zavoico G.B. Effects of cholesterol on acyl chain dynamics in multilamellar vesicles of various phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, **736**, 137-149.

Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York : Plenum Press, 1983.

Lamola, A.A. Electronic Energy Transfer in solution : Theory and Application. In P.A. Leermakers & A. Weissberger (Eds.), Technique of Organic Chemistry (vol. 14). Energy Transfer and Organic Photochemistry, New York : Interscience, 1969, pp. 17-132.

Lehninger, A.L. Biochimie (2nd ed.). Worth Publishers, 1977.

Lehrer, S.S. Solute perturbation of protein fluorescence . The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry*, 1971, 10, 3254-3263.

Lemmityinen, H., Ylipertula, M., Mikkola, J. & Kinnunen, P. Quenching of fluorescence of pyrenesubstituted lecithin by tetracyanoquinodimethane in liposomes. *Biophys. J.*, 1989, 55, 885-895.

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

L'Heureux, G. Utilisation de sondes fluorescentes dans la détermination de la constante diélectrique de la région hydrocarbonée de vésicules lipidiques. Mémoire, UQTR, 1987.

L'Heureux, G.P. & Fragata, M. Micropolarities of lipid bilayers and micelles. 4. Dielectric constant determinations of unilamellar phosphatidylcholine vesicles with the probes pyrene and 16-(1-pyrenyl)hexadecanoic acid. *J. Colloid Interface Sci.*, 1987, 117, 513-522.

L'Heureux, G.P. & Fragata, M. Micropolarities of lipid bilayers and micelles. 5. Localization of pyrene in small unilamellar phosphatidylcholine vesicles. *Biophys. Chem.*, 1988, 30, 293-301.

L'Heureux, G.P. & Fragata, M. Monomeric and aggregated pyrene and 16-(1-pyrenyl)hexadecanoic acid in small, unilamellar phosphatidylcholine vesicles and ethanol-buffer solutions. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1989, 3, 53-63. (a).

L'Heureux, G.P. & Fragata, M. Fluorescence characteristics of pyrene and phosphatidylethanolamine-bound pyrene incorporated into lipid vesicles solubilized in media of differing NaCl concentrations. *Biophys. Chem.*, 1989, (sous presse). (b).

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

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

Macdonald, A.G., Wahle, K.W.J., Cossins, A.R. & Behan, M.K. Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity; a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 938, 231-242.

Morand, O., Fibach, E., Dagan, A. & Gatt, S. Transport of fluorescent derivatives of fatty acids into cultured human leukemic myeloid cells

and their subsequent metabolic utilization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 711, 539-550.

Ohyashiki, T. & Mohri, T. Effect of ionic strength on the membrane fluidity of rabbit intestinal brush-border membranes. A fluorescence probe study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 731, 312-317.

Ohyashiki, T., Ohtsuka, T. & Mohri, T. A change in the lipid fluidity of the porcine intestinal brush-border membranes by lipid peroxidation. Studies using pyrene and fluorescent stearic acid derivatives. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 861, 311-318.

Ohyashiki, T., Taka, M. & Mohri, T. The effects of ionic strength on the protein conformation and the fluidity of porcine intestinal brush border membranes. Fluorometric studies using *N*-[7-dimethylamino-4-methylcoumarinyl]maleide and pyrene. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 6857-6861.

Pfister, C. Solid solutions of aromatics in n-parafins (the Schpolskii effect). I. Isolated molecules in fast frozen samples. *Chem. Phys.*, 1973, 2, 171-180.

Picard, G., Munger, G., Leblanc, R.M., Lesage R., Sharma, D., Siemianczuk, A. & Bolton, J.R. Fluorescence lifetime of chlorophyll a in pure and mixed Langmuir-Blodgett films. *Chem. Phys. Lett.*, 1986, 129, 41-47.

Plant, A.L. Mechanism of concentration quenching of a xanthene dye encapsulated in phospholipid vesicles. *Photochem. Photobiol.*, 1986, **44**, 453-459.

Radda, G.K. & Vanderkooi, J. Can fluorescent probes tell us anything about membranes ? *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **265**, 509-549.

Rand, R.P. Interacting phospholipid bilayers : measured forces and induced structural changes. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1981, **10**, 277-314.

Roberts, G.C.K. In J.N. Miller (Ed.), Standards in fluorescence spectrometry. New York : Chapman and Hall, 1981, pp. 49-57.

Rubenstein, J.L.K., Smith, B.A. & McConnell H.M. Lateral diffusion in binary mixtures of cholesterol and phosphatidylcholines. *Proc. Natl. Sci. USA*, 1979, **76**, 15-18.

Saffman, P.G. & Delbrück, M. Brownian motion in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. USA*, 1975, **72**, 3111-3113.

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

Sikaris, K.A., Thulborn, K.R. & Sawyer W.H. Resolution of partition coef-

ficients in the transverse plane of the lipid bilayer. *Chem. Phys. Lipids*, 1981, **29**, 23-36.

Singleton, W.S., Gray, M. Brown, M.L. & White, J.L. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1965, **42**, 53-56.

Söderman, O., Arvidson G., Lindblom, G. & Fontell, K. The interactions between monovalent ions and phosphatidyl cholines in aqueous bilayers. *Eur. J. Biochem.*, 1983, **134**, 309-314.

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

Stegemeyer, H., Hasse, J. & Laarhoven, W. Polarization of the monomer and excimer fluorescence of pyrene derivatives in liquid crystalline host. *Chem. Phys. Lett.*, 1987, **137**, 516-520.

Stryer, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Ann. Rev. Biochem.*, 1978, **47**, 819-846.

Suib, S.L. & Kostapapas, A. Intermolecular pyrene excimer formation in zeolites. Decay parameter and ground-state association. *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 7705-7710.

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

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

Turro, N.J. Modern molecular photochemistry, Menlo Park : Benjamin/Cummings, 1978.

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

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

Vanderkooi, J.M., Ierokomas, A., Nakamura, H. & Martonisi, A. Fluorescence energy transfer between Ca^{+2} transport ATPase molecules in artificial membranes. *Biochemistry*, 1977, **16**, 1262-1267.

Vekshin, N.L. On measuring biomembrane microviscosity using pyrene luminescence in aerobic conditions. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1987, **15**, 97-104.

Viani, P., Galimberti, C., Marchesini, S., Cervato, G. & Cestaro, B. *N*-py-

rene dodecanoyl sulfatide as membrane probe : a study of glycolipid dynamic behavior in model membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 1988, **46**, 89-97.

Vincent, M., de Foresta, B., Gallay, J. & Alfsen A. Nanosecond fluorescence anisotropy decay of n-(9-anthroyloxy) fatty acids in dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles with regard to isotropic solvents. *Biochemistry*, 1982, **21**, 708-716.

Wagner, P.J. Energy transfer kinetics in solution. In A.A. Lamola (Ed.), Creation and Detection of the Excited State (Vol. 1). New York : Marcel Dekker, 1971, pp. 173-212.

Waka, Y., Hamamoto, K. & Mataga, N. Pyrene-N,N-dimethylaniline heteroexcimer systems in aqueous micellar solutions. *Chem. Phys. Lett.*, 1978, **53**, 242-246.

Wayne, R.P. Photochemistry. Londres : Butterworth, 1971.

Wilschut, J. & Hoekstra, D. Membrane fusion : lipid vesicles as a model system. *Chem. Phys. Lipids*, 1986, **40**, 145-166.

Wu, E.-S., Jacobson, K. & Papahadjopoulos D. Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry*, 1977, **16**, 3936-3941.

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

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