

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

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

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE (Ph.D.)

PAR
FRANÇOIS BELLEMARE

EFFET DES CATIONS SUR LA STABILITÉ DES DISPERSIONS LIPIDIQUES SONIQUÉES.
APPLICATION AUX MEMBRANES DES THYLACOÏDES.

AVRIL 1989

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu, Jocelyne, David et Marie Eve pour leur compréhension et leur appui dans mon projet de doctorat. En second lieu, monsieur Fragata, mon directeur de thèse, il m'a laissé une grande latitude dans la réalisation de ce projet malgré des points de vue divergents dans les hypothèses de départ. Je le remercie pour m'avoir inculqué au cours des années une rigueur scientifique. Je remercie mes confrères: Gaétan et André qui n'ont cessé de m'appuyer: "Viens prendre un p'tit café"! Gaétan qui était mon confident d'interrogations et d'explications! Un merci bien spécial à Michel Trudel qui a modifié le programme de calcul des constantes de réaction afin de l'adapter à mes besoins. Un remerciement bien spécial à René Lesage pour les calculs de simulation qui ont conduit à une solution dans la compréhension des isothermes d'adsorption.

Enfin une reconnaissance bien matérielle aux différents appuis financiers en provenance de: CRSNG, UQTR, Syndicat des chargés de cours, GRTM (Univ. de Montréal). La confiance qu'ils m'ont témoignée a su générer en moi suffisamment d'énergie pour terminer ce projet.

RÉSUMÉ

Les thylacoïdes des chloroplastes végétaux sont des systèmes membranaires qui renferment toutes les molécules, lipides et protéines, nécessaires à la capture de la portion lumineuse de l'énergie solaire, à l'oxydation de l'eau et à la chaîne de transfert des électrons qui sont responsables de la formation de nucléotides réduits. On y distingue une région granaire constituée de membranes empilées et une zone stromatique constituée d'une membrane simple. La section empilée est stable. Toutefois, les espaces entre les feuilletts bilipidiques varient suite aux conditions d'éclairage. On peut se demander quels sont les types d'interactions entre les têtes polaires opposées des lipides qui peuvent maintenir un tel empilement des membranes, malgré des variations de pH et de la concentration cationique à proximité de ces membranes (1). Nous croyons que l'étude des conditions de stabilité des dispersions aqueuses (liposomes) des lipides des membranes des thylacoïdes nous renseignera sur les propriétés colloïdales de ces systèmes.

La méthodologie consiste à isoler ces lipides, les dépigmenter, en faire des liposomes et mesurer leur stabilité en présence de différents cations inorganiques. Cette stabilité est mesurée à l'aide d'un appareil à injection rapide. L'enregistrement de la variation de la turbidité des liposomes en fonction du temps nous permet de calculer les constantes de dimérisation. L'évaluation des constantes de fixation des cations sur

les lipides en traçant les isothermes d'adsorption fait par dialyse de désalage nous permet de relier l'apport ionique sur les constantes de dimérisation.

Les principaux résultats démontrent une forte adsorption de cations sur les phospholipides anioniques tels l'acide phosphatidique (PA) et la phosphatidylsérine (PS) et une constante de dimérisation de $10^7 - 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Nous montrons que certains lipides qui constituent les membranes des thylacoïdes: phosphatidylglycérol (PG), digalactosyldiglycérine (DGDG) et un extrait lipidique partiel (sans monogalactosyldiglycérine, puisqu'il nuit à la formation de bicouche) fixent peu ou pas de cations. Dans ces cas les constantes de dimérisation sont évaluées à $10^5 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Il s'agit donc d'une incidence de la fixation des cations sur les têtes polaires des lipides et sur la stabilité des liposomes. Puisque la présence des cations dans le milieu de dispersion induit tout de même une déstabilisation de ces systèmes, on conclut qu'ils interfèrent au niveau de l'hydratation des têtes polaires de ces lipides. Dans ces cas, la présence des cations brise l'architecture des molécules d'eau qui se bâtit entre les bicouches lipidiques et permet le contact moléculaire. Comme les membranes des thylacoïdes sont constituées en majorité de galactolipides et de PG, molécules fortement hydratées, on propose donc que c'est la stabilité du réseau de molécules d'eau qui s'établit entre les feuillet bilipidiques qui contrôle l'empilement.

¹ Murakami, S., Packer, L. Protonation and chloroplast membrane structure. J. Cell Biol., 1970, 47, 332-351.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION.....	1
A) Relations entre l'efficacité quantique et la structure dans les membranes des thylacoïdes.....	1
B) Mécanismes de contrôle de l'empilement membranaire.....	6
C) Forces impliquées dans les interactions entre deux surfaces.....	10
1) Forces de répulsion.....	11
a) Forces électrostatiques.....	11
b) Forces d'hydratation.....	18
2) Forces d'attraction.....	20
3) Bilan des forces.....	22
D) Lipides des membranes des thylacoïdes.....	26
1) Composition lipidique de la membrane du thylacoïde..	26

	Page
2) Dispersions des lipides des thylacoïdes dans des solutions aqueuses.....	30
E) Définition des buts.....	34
1) Importance des forces interfaciales dans le pro- cessus d'empilement des membranes des thylacoïdes...	34
2) Choix des lipides.....	35
3) Plan du travail.....	36
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	37
A) Modèle utilisé.....	37
B) Fixation des cations.....	39
C) Mesures de cinétique.....	40
D) Extraction des lipides des membranes des thylacoïdes....	42
1) Purification des membranes des thylacoïdes.....	42
2) Extraction des lipides.....	43
3) Purification des lipides.....	43
III. CINÉTIQUE DE LA DIMÉRISATION.....	45
A) Concentration cationique critique de la coagulation.....	46
B) Constante de la dimérisation.....	52
C) Discussion.....	65

	Page
IV. ISOTHERMES D'ADSORPTION DES CATIONS SUR LES VÉSICULES LIPIDIQUES.....	70
A) Résultats.....	71
B) Discussion.....	86
1) Sur les valeurs de n	86
2) Sur les valeurs de K_A	90
C) Retour sur les cinétiques de dimérisation.....	93
V. DISCUSSION ET CONCLUSION.....	98
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	105

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 Structure d'un chloroplaste.....	3
Figure 2 Mécanisme conjugué des deux photosystèmes.....	5
Figure 3A Variation de la longueur de Debye en fonction de la concentration de l'électrolyte.....	16
Figure 3B Diagramme montrant la variation de potentiel lors du rapprochement de deux surfaces chargées.....	16
Figure 4 Schéma représentant les intensités des forces lors du rapprochement de deux surfaces chargées.....	21
Figure 5 Schéma représentant le bilan énergétique des forces lors du rapprochement de deux surfaces.....	25
Figure 6 Structure des lipides des membranes du thylacoïde.....	28
Figure 7 Profil d'élution des liposomes.....	38
Figure 8 Schéma de l'appareil à cinétique rapide.....	41

	Page
Figure 9 Structure des lipides anioniques utilisés.....	47
Figure 10 Courbe de cinétique.....	53
Figure 11A Variation du paramètre de la progression de la réaction $\alpha/(1 - \alpha)$ en fonction du temps.....	57
Figure 11B Schéma représentant l'incidence de la présence des n-mères sur la turbidité.....	57
Figure 12 Variation de l'intensité de la lumière transmise des vésicules en fonction du temps d'incubation avec les cations.....	59
Figure 13 Isothermes d'adsorption des cations sur les lipi- des anioniques.....	76
Figure 14 Courbe des inverses provenant des isothermes d'adsorption.....	78
Figure 15 Courbes des inverses: $P_i/\text{cation} = f(\text{activitécationique})$	79

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 Distribution spatiale des constituants des membranes des thylacoïdes.....	8
Tableau 2 Distribution lipidique des membranes des thylacoïdes..	29
Tableau 3 Composition en chaîne acyle des lipides des membranes des thylacoïdes.....	31
Tableau 4 Comportement des lipides des membranes des thylacoïdes en dispersion aqueuse.....	32
Tableau 5 Seuil de la coagulation des vésicules lipidiques.....	48
Tableau 6 Seuil de la coagulation des vésicules lipidiques (relevé de la littérature).....	51
Tableau 7 Valeurs des constantes de la dimérisation.....	61
Tableau 8 Fixation des cations après dialyse.....	72

Page

Tableau 9	Paramètres n et K_A de fixation des cations divalents sur les phospholipides anioniques.....	82
Tableau 10	Résultats comparés de la littérature.....	83
Tableau 11	Variations du pH lors d'addition de cations divalents sur les lipides anioniques.....	89
Tableau 12	Valeur de n à la concentration cationique critique de la coagulation.....	94

CHAPITRE I

INTRODUCTION

A) RELATIONS ENTRE L'EFFICACITÉ QUANTIQUE ET LA STRUCTURE DANS LES MEMBRANES DES THYLACOÏDES

La photosynthèse est le processus qui permet aux plantes, aux algues et à certains types de bactéries de capter la partie visible de l'énergie électromagnétique émise par le soleil puis de la convertir efficacement dans une forme chimique stable. La photosynthèse peut être divisée en deux étapes. La phase "lumineuse" consiste en la capture puis la migration d'excitons jusqu'à un centre réactionnel qui par suite des séparations de charge est responsable du clivage de molécules d'eau (ou autres, dans le cas de certaines bactéries) en protons puis en oxygène moléculaire. Les électrons produits par l'oxydation de l'eau sont par la suite captés par une filière de molécules oxydo-réductrices. Certaines d'entre elles (les plastoquinones) produiront des protons qui, accumulés avec ceux provenant du clivage des molécules d'eau, activeront une ATP synthétase. De plus, un second système capteur de lumière peut être excité à son tour de façon à permettre la réduction des transporteurs précédents. Ce photosystème sera couplé à une NADP réductase. Les deux nucléotides

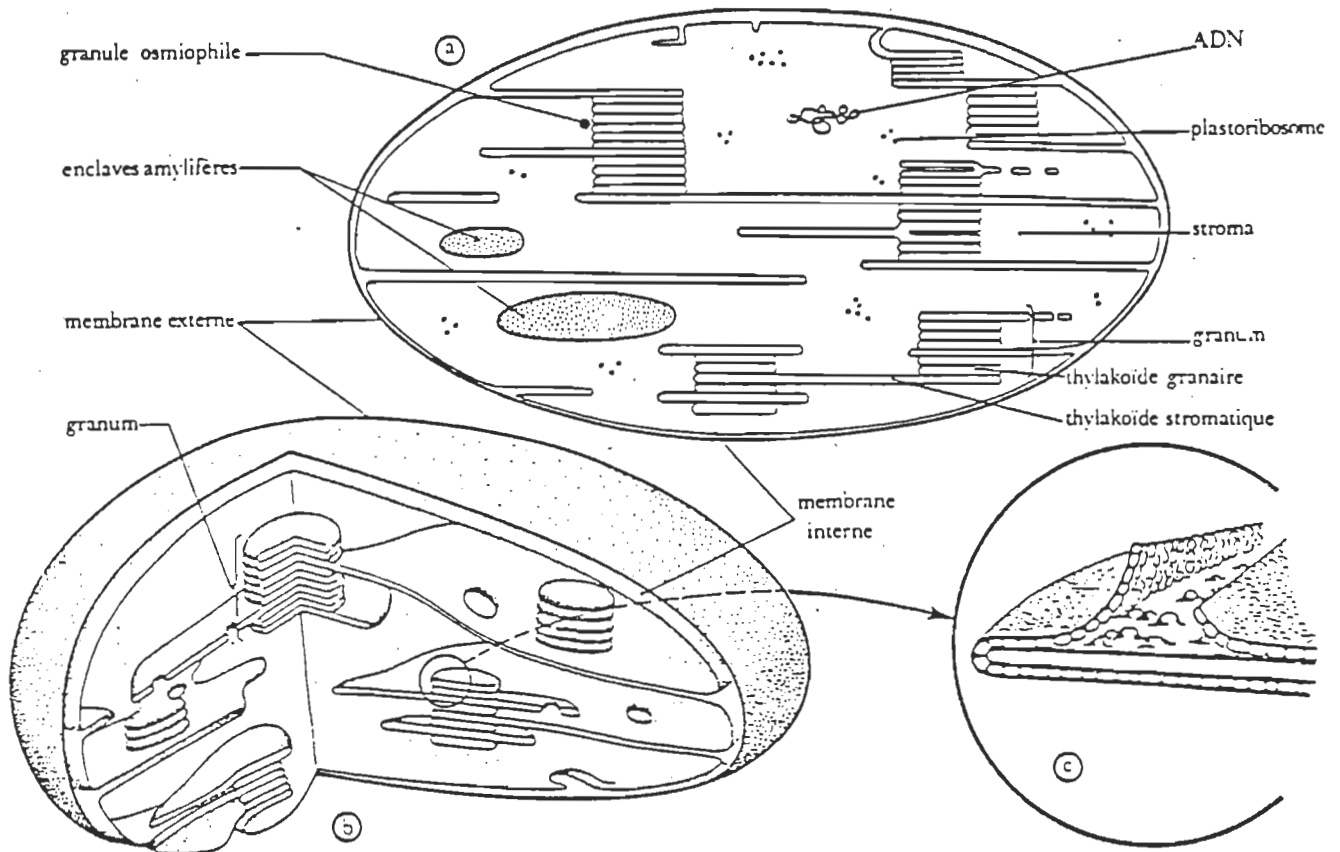
ATP et NADPH sont utilisés par la suite dans la phase "obscur" de la photosynthèse (cycle de Calvin).

Le cycle de Calvin est une suite de réactions biochimiques qui réduisent le bioxyde de carbone par l'entremise des nucléotides ATP et NADPH, afin de produire la forme chimique stable, l'hydrate de carbone.

Chez les plantes, la photosynthèse a lieu dans des organelles spécialisés, les chloroplastes (figure 1)¹. La phase lumineuse est intimement reliée aux structures membranaires, les thylacoïdes, tandis que les enzymes de la phase obscure sont dispersés dans le stroma.

Les chloroplastes sont entourés d'une membrane externe et continue. Le système membranaire interne est lui aussi continu mais il est replié et renferme un compartiment matriciel. La membrane forme des structures aplaties appelées disques thylacoïdes. Ils contiennent tous les pigments et tous les enzymes nécessaires aux réactions primaires dépendantes de la lumière.

On y distingue une zone empilée, le thylacoïde granaire puis une portion constituée de deux bicouches qui sont en contact avec la partie stromatique du chloroplaste. Des méthodes spectroscopiques ont permis de révéler que les cellules photosynthétiques contiennent des arrangements de pigments dont les maximums d'absorption se situent à 680 et à 700 nm. Ces complexes pigmentés se décolorent sous l'action de la lumière.



Organisation d'un chloroplaste.

a. Coupe.

b. Représentation schématique en trois dimensions.

c. Membrane d'un thylakoïde granaire montrant ses particules constitutives.

Figure 1: Structure d'un chloroplaste. (d'après la réf. 1).

Emerson² a été parmi les premiers à élucider le rôle complémentaire des deux complexes pigmentés. L'efficacité de la photosynthèse est uniforme dans la plus grande partie du spectre solaire mais elle diminue significativement dans la partie rouge ($\lambda > 680$ nm) du spectre lumineux. Par contre, il a démontré que si la lumière incidente rouge ($\lambda = 710$ nm) est complétée par une lumière de plus courte longueur d'onde ($\lambda < 670$ nm), l'efficacité quantique de la photosynthèse redevient normale. Ces réactions suggèrent que deux photosystèmes sont nécessaires afin d'avoir une efficacité photochimique maximale.

La description des rôles de chacun des photosystèmes nous renseignera sur l'utilité de chacun.

L'énergie lumineuse est captée au sein de la membrane des thylacoïdes par des complexes capteurs de lumière appartenant chacun à l'un des deux photosystèmes: le PSII (P-680) et le PSI (P-700). A chaque photosystème est associé un accepteur et un donneur d'électron; ce dernier permet à la chlorophylle oxydée de retrouver son niveau énergétique initial. Au niveau du PSII, le donneur d'électron est l'eau. La plastocyanine, une protéine métallisée, est le donneur d'électron du PSI. Ces deux photosystèmes sont connectés par une chaîne de transporteurs (figure 2)³ où la plastoquinone semble jouer un rôle prépondérant de coordination entre les deux photosystèmes.

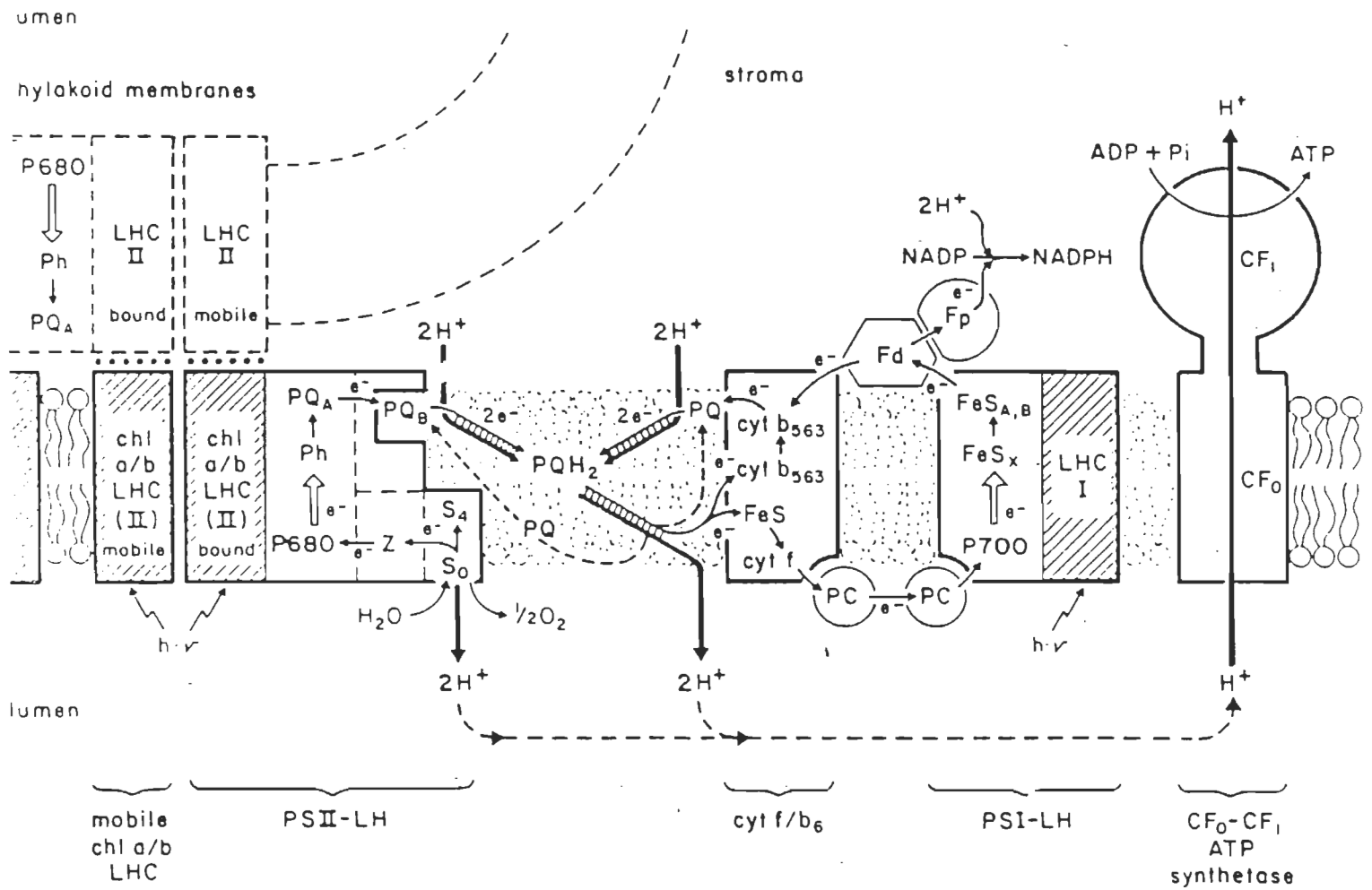


Figure 2: Mécanisme conjugué des deux photosystèmes.
(d'après la réf. 3).

Le but de la photosynthèse étant de produire de l'ATP et du NADPH à la demande du métabolisme chloroplastique, il se trouve que le PSI par l'entremise du cycle de phosphorylation cyclique peut à lui seul, effectuer cette double synthèse. La nécessité du PSII dans la photosynthèse peut résider dans un rôle d'activateur puisqu'il contribue à réduire le P-700 par l'entremise des plastoquinones et les protons produits par cette molécule servent à activer l'ATP synthétase. Il est important aussi de noter que l'eau est le donneur d'électron qui réduit la chlorophylle du P-700.

Un examen attentif de la structure du chloroplaste permet de distinguer deux architectures enchevêtrées, le thylacoïde granaire et le thylacoïde stromatique (figure 1). De récentes études démontrent que ces diverses structures ont une composition enzymatique différente.

Or, comment est maintenue cette hétérogénéité et quelle relation s'établit entre les deux structures?

B) MÉCANISMES DE CONTROLE DE L'EMPILEMENT MEMBRANAIRE

La structure des membranes du thylacoïde pose une difficulté dans la compréhension du fonctionnement coordonné des deux photosystèmes d'autant plus que l'hétérogénéité latérale est à l'origine d'une hétérogénéité

fonctionnelle⁴. On retrouve les enzymes responsables de la synthèse de l'ATP⁵ et de la réduction du NADP⁺⁶ dans la portion stromatique du thylacoïde. La partie granaire⁷ est riche en PSII, tandis que le PSI occupe la portion stromatique (tableau 1)³.

Expérimentalement, il est possible de faire varier le degré d'empilement des membranes du chloroplaste en faisant varier la concentration des espèces cationiques⁸, des protons⁹ et voire même l'illumination⁹ puisque Murakami et Packer ont démontré une contraction réversible des chloroplastes lorsqu'ils étaient illuminés.

Lors de ces changements structuraux, Staehelin¹⁰ rapporte une perte de la différenciation fonctionnelle observée dans les membranes intactes. Le retour aux concentrations cationiques habituelles ($\text{NaCl} > 150 \text{ mM}$ et $\text{Mg Cl}_2 > 3 \text{ mM}$) permet de retrouver les taux normaux de membranes granaires et de ce fait leur hétérogénéité fonctionnelle¹⁰.

Murakami et Packer⁹ proposèrent un modèle qui explique ces changements structuraux. Ils les relient à la déshydratation de l'interface dû à la protonation des groupements acido-basiques des lipides et des protéines, soit par acidification ou par les effets des réactions de la phase lumineuse, i.e. la libération de protons. La protonation des charges négatives mènerait à l'expulsion des molécules d'eau localisées au voisinage des groupements négatifs. Il se produit donc une augmentation des forces

Tableau 1

Distribution spatiale des constituants des membranes des thylacoïdes
(d'après la réf. 3).

Constituant	Membrane granaire (%)	Membrane stromatique (%)
Photosystème II	85	15
Photosystème I	< 15	> 85
Cyt F/B ₆	50	50
Chl a/b (complexe transporteur de lumière)	> 70-90	< 10-30*
Synthétase de l'ATP	0	100

* Influencé par le taux de phosphate

attractives entre les molécules des membranes opposées, ce qui a pour effet de réduire la distance entre les membranes.

La simulation de la variation du potentiel de surface des membranes de thylacoïdes en présence des cations amena Barber et al.¹¹ aux mêmes conclusions que Murakami et Packer⁹. Les charges de la surface des membranes doivent être soit annulées ou déplacées afin que la structure empilée des membranes des thylacoïdes soit préservée. Il s'agit d'un équilibre qui doit s'établir entre les forces répulsives électrostatiques dues à la présence de charges sur la surface des membranes (ionisation des lipides et des protéines) et les forces attractives de van der Waals (attractions dipôle-dipôle). La présence des cations près des sites chargés de la membrane fait écran aux répulsions électrostatiques et un nouvel équilibre doit s'établir entre les surfaces. La répulsion étant diminuée, le nouvel équilibre s'établit donc à plus faible séparation entre les surfaces. Comme la répulsion électrostatique est diminuée par la présence des cations, comment se fait-il qu'il n'y ait pas de contact "apparent" entre les surfaces? Comment se fait-il que le processus soit réversible? Qu'est-ce qui empêche le contact moléculaire entre les deux membranes?

Un élément de réponse peut venir d'un modèle plus récent qui fait état des forces d'hydratation pouvant exister entre deux surfaces^{12,13}. Dans des travaux provenant d'un groupe dirigé par Ninham¹⁴, on

conclut que les perturbations dues à l'arrangement des molécules de solvant près de l'interface peuvent s'étendre jusqu'à 5 ou 10 diamètres moléculaires d'épaisseur et que l'addition de ces perturbations mènent à une force, qui à faible distance, est très grande comparée à celle de van der Waals et spécialement lorsque la constante de Hamaker (voir définition dans réf. 88) est faible, comme dans les systèmes lipides-eau. Ces forces d'hydratation peuvent provenir soit de l'hydratation des ions¹⁶ fixés sur les charges de la surface et/ou à la présence des molécules d'eau en interaction avec les têtes polaires des lipides¹⁷.

C) FORCES IMPLIQUÉES DANS LES INTERACTIONS ENTRE DEUX SURFACES

Le critère de stabilité colloïdale dépend de plusieurs facteurs tel que les interactions hydrodynamiques, la cinétique des collisions browniennes, la stabilité thermodynamique des surfaces ainsi que de la nature des interactions surface-surface. C'est ce dernier item qui est le facteur déterminant de la stabilité des systèmes lamellaires comme en sont les membranes des thylacoïdes.

1) Forces de répulsion

a) Forces électrostatiques

Les membranes lipo-protéiques sont des colloïdes hydrophiles puisqu'elles baignent dans un milieu aqueux ce qui provoque l'hydrolyse des groupements dissociables: $-COOH$, $-SO_3H$, $-POH$, $-NH_2$, etc. présents dans ces molécules. Les charges négatives et positives portées par ces groupements ionisés sont responsables des forces électrostatiques des biocolloïdes. Lorsqu'un électrolyte est ajouté à la dispersion colloïdale, les ions et contre ions présents sont attirés par les groupements chargés et forment une couche ionique diffuse autour de ces colloïdes.

L'intensité et la distribution de l'énergie autour de ces surfaces chargées ont été établies par Debye et Hückel¹⁹. C'est une théorie maintenant devenue classique et qui s'applique aux bicouches lipidiques. McLaughlin²⁰ et son groupe, à l'aide d'expériences de mesure de conductance puis de mobilité électrophorétique, ont démontré que le comportement des bicouches lipidiques chargées correspondait à celui décrit par la théorie de Debye-Hückel. Elle permet de prédire le comportement des ions en solution en présence d'une surface chargée. Les postulats de départ permettent de simplifier l'expression de la

distribution d'un électrolyte près d'une surface chargée. La distribution des charges sur la surface infinie doit être uniforme et le milieu dans lequel ces charges agissent doit avoir une constante diélectrique uniforme. Les ions sont considérés comme charges ponctuelles.

En premier lieu, les ions présents dans la solution formeront une couche diffuse près de la surface chargée, de telle sorte que le nombre de charges électriques dans la couche diffuse égalera le nombre de charges sur la surface.

$$\sigma = - \int_{x=0}^{x=\infty} \rho_x dx \quad (1)$$

où σ représente la densité de charge de la surface et ρ_x , la densité de charges portées par les ions dans la couche diffuse à une distance x de la surface chargée. L'évaluation de ρ_x se faisant selon la sommation des espèces chargées dans la solution.

$$\rho_x = \sum_i Z_i F C_{ix} \quad (2)$$

où Z est la charge de l'ion, F , la constante de Faraday et C_{ix} , la concentration de l'espèce ionique à une distance x de la surface chargée.

Pour une surface chargée planaire, l'équation de Poisson permet de relier le potentiel électrique, ψ à une distance x et la quantité d'ions retrouvés à cette distance x de la surface chargée:

$$\frac{d^2 \psi_x}{dx^2} = - \frac{1}{\epsilon_r \epsilon_0} \rho_x \quad (3)$$

ϵ_r et ϵ_0 sont les permittivités relatives de la solution et du vide, respectivement.

Comme les espèces ioniques sont localisées dans la solution à certaines distances x variables, de la surface chargée, l'équilibre thermodynamique nécessite l'équivalence des potentiels chimiques et électrochimiques:

$$\bar{\mu}_{ix} = \bar{\mu}_{i\infty}$$

La relation de Boltzmann permet d'établir la répartition des ions au voisinage d'une surface chargée:

$$C_{ix} = C_{i\infty} \exp(-Z_i F \psi_x / RT) \quad (4)$$

Combinant les équations 2, 3 et 4, nous obtenons la relation de Poisson-Boltzmann:

$$\frac{d^2 \psi_x}{dx^2} = - \frac{1}{\epsilon_r \epsilon_0} \sum_i Z_i F C_i \exp \left(- \frac{Z_i \psi_x}{RT} \right)$$

Utilisant l'artifice mathématique:

$$\frac{d^2 \psi}{dx^2} = \frac{1}{2} \frac{d}{d\psi} \left(\frac{d\psi}{dx} \right)^2$$

et posant les frontières d'intégration tel que

$$d\psi/dx \rightarrow 0 \quad \text{lorsque} \quad x \rightarrow \infty \quad \text{et} \quad \psi \rightarrow 0$$

On a alors:

$$\left(\frac{d\psi_x}{dx} \right)^2 = \frac{2RT}{\epsilon_r \epsilon_0} \left[\sum_i C_{i\infty} \left[\exp \left(- \frac{Z_i F \psi_x}{RT} \right) - 1 \right] \right]$$

ou

$$\frac{d\psi_x}{dx} = \pm \left(\frac{2RT}{\epsilon_r \epsilon_0} \right)^{\frac{1}{2}} \left[\sum_i C_{i\infty} \left[\exp \left(- \frac{Z_i F \psi_x}{RT} \right) - 1 \right] \right]^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

Or la force du champ électrique $d\psi_x/dx$ est aussi définie par la relation de Gauss:

$$\left(\frac{d\psi_x}{dx} \right)_{x \rightarrow \sigma} = - \frac{1}{\epsilon_r \epsilon_0} \sigma \quad (6)$$

où σ représente la densité de charges à la surface. Combinant les équations 5 et 6, on trouve:

$$\sigma = \pm [2 \epsilon_r \epsilon_0 R T \sum_i C_i \left(\exp \left(- \frac{Z_i F \psi_0}{RT} \right) - 1 \right)]^{\frac{1}{2}} \quad (7)$$

à la surface de la membrane.

Dans un cas où le sel dissout dans le milieu est un électrolyte binaire i.e. $Z = Z$, l'équation (7) devient:

$$\sigma = (8 R T \epsilon_r \epsilon_0 C_{i\infty})^{\frac{1}{2}} \sinh \left(\frac{Z F \psi_0}{2RT} \right)$$

De plus, il est possible d'intégrer l'équation 5, afin d'établir le gradient de la variation du potentiel, ψ en fonction de la distance, x de la surface. Pour un électrolyte de type $Z = Z$: on retrouve finalement

$$\kappa \cdot x = \ln \left[\tanh \left(\frac{Z F \psi_0}{4RT} \right) \right] - \ln \left[\tanh \left(\frac{Z F \psi_x}{4RT} \right) \right]$$

considérant que $\kappa^2 = \frac{2Z^2 F^2 C_{i\infty}}{RT \epsilon_0 \epsilon_r}$

Dans le cas des espèces ioniques représentées par des charges ponctuelles la valeur $1/\kappa$ se nomme longueur de Debye. L'application aux surfaces chargées est permise et définit la distance de la surface où le potentiel ψ_x vaut $1/e$ de sa valeur à ψ_0 . On retrouve en figure 3 A¹⁸ une courbe représentant la variation

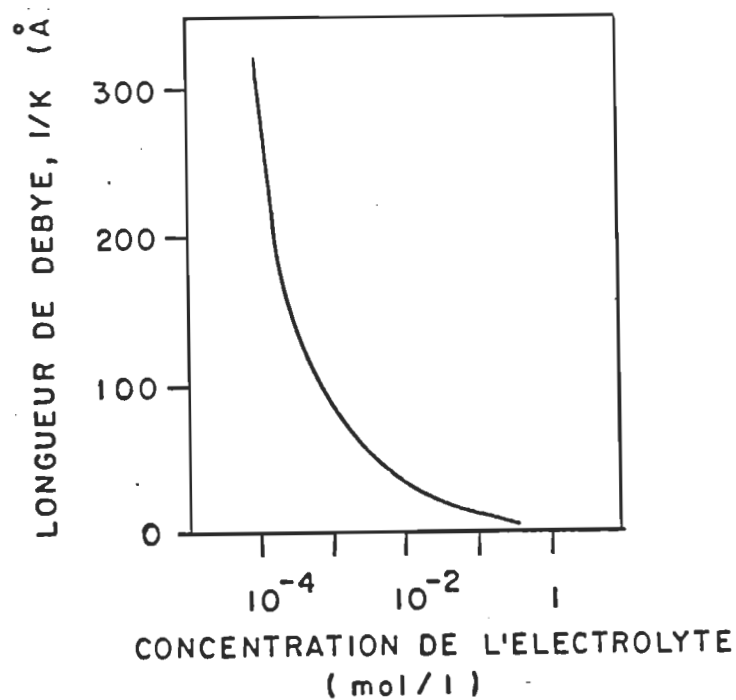


Figure 3A: Variation de la longueur de Debye en fonction de la concentration de l'électrolyte. (d'après la réf. 18).

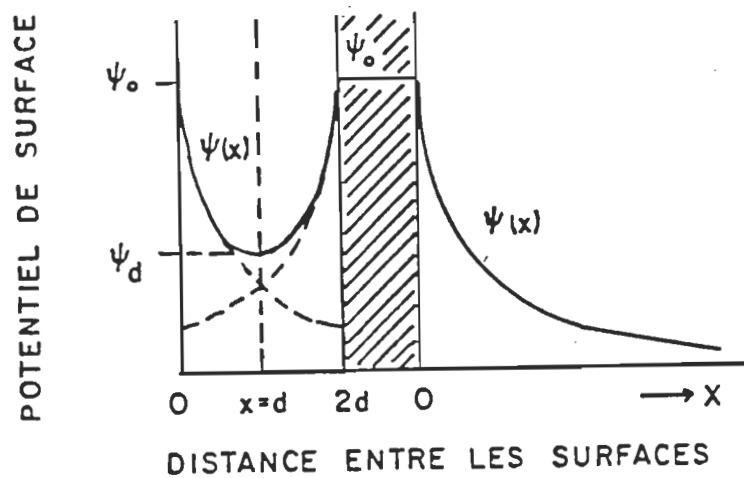


Figure 3B: Diagramme montrant la variation de potentiel lors du rapprochement de deux surfaces chargées. (d'après la réf. 19).

de $1/\kappa$ en fonction de la concentration de l'électrolyte. L'on observe un effet très net de la concentration ionique sur la longueur de Debye. Lorsque la concentration de l'électrolyte est de l'ordre de $10^{-4}M$ elle est de 300 Ångströms alors que lorsque la concentration ionique s'approche de $10^{-1}M$, elle ne mesure qu'une dizaine d'angströms.

De cette notion de longueur de Debye, on peut obtenir d'importants renseignements sur le comportement des membranes des thylacoïdes. En effet, l'épaisseur de la couche ionique qui pourra neutraliser presque entièrement le potentiel de la surface généré par la présence des charges, représentera la demi-distance x de rapprochement entre deux surfaces similaires. A cet endroit, le potentiel sera au minimum et croîtra exponentiellement de part et d'autre pour atteindre la valeur maximale aux surfaces. La figure 3B, à droite,¹⁹ montre la variation du potentiel de la solution en fonction de la distance x de la surface chargée tel que le décrit l'équation 5. Un schéma représente le comportement du potentiel lorsque deux surfaces chargées se rapprochent. La partie gauche de la figure 3B¹⁹ montre la variation du potentiel selon la distance x . En pointillés on a la décroissance exponentielle correspondant à la description de l'équation 5 et en trait plein, la variation de ce potentiel lorsque les deux plans s'approchent.

Il a été établi par Verwey et Overbeek¹⁹ que l'énergie potentielle due à l'interaction répulsive entre les deux surfaces est donnée par:

$$V_R = 2 \pi a \epsilon_r \epsilon_p \psi_0^2 \ln [1 + \exp (- \kappa d)]$$

d représentant la distance entre les deux surfaces. Les autres paramètres ont déjà été définis.

b) Forces d'hydratation

Encore mal comprises, les forces d'hydratation correspondent à la quantité d'énergie qu'il faut déployer pour briser l'architecture de molécules d'eau sur les surfaces hydrophiles afin que les deux surfaces viennent en contact. Depuis une douzaine d'années deux équipes de recherche^{15,21,23}, par des techniques différentes, ont pu quantifier et peut-être dans un cas qualifier davantage ces forces répulsives d'hydratation. Que ce soit en absence ou en présence de répulsion électrostatique, ces forces sont présentes et empêchent, à la limite les deux surfaces d'adhérer. Succinctement, décrivons les techniques qui ont pu déceler ces interactions.

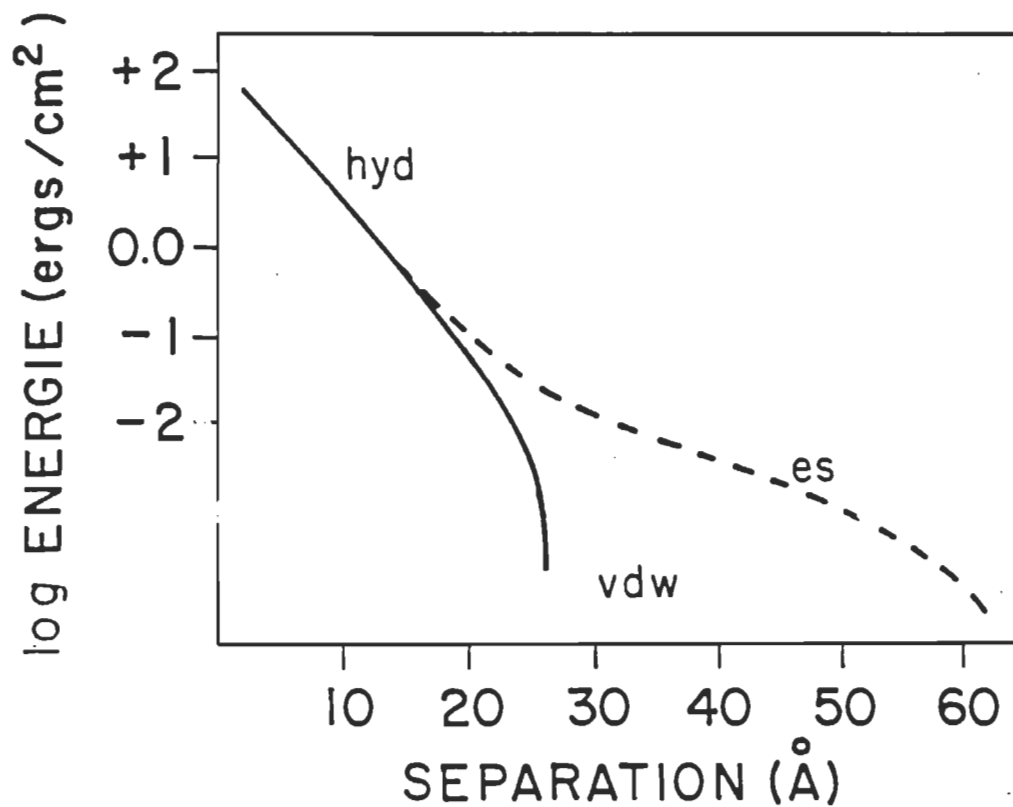
Le groupe de Rand¹⁵ détermine la quantité d'eau résiduelle entre des feuillets lipidiques qu'ils déshydratent en pressant la multicouche contre une membrane semi-perméable, dans ce cas la mesure de la pression appliquée est proportionnelle à l'énergie nécessaire pour enlever les molécules d'eau des feuillets lipidiques. Une autre méthode consiste à mettre les lipides hydratés en présence de molécules de dextran qui les déshydratent, alors la mesure de la pression osmotique de la solution de dextran permet d'évaluer la quantité d'énergie nécessaire pour retirer l'eau des feuillets bilipidiques. La mesure de la distance entre les feuillets lipidiques par l'utilisation de la technique des rayons-X permet de suivre les changements structuraux qui se produisent dans les systèmes lipidiques, suite à la déshydratation.

Un autre groupe dirigé par Israelachvili^{21,23} utilise le déplacement d'une monocouche de lipides déposée sur une feuille de mica fixée à un ressort. Une autre monocouche de lipides déposée sur une feuille de mica est superposée à la première. Elle est fixée à un mécanisme mobile permettant le contrôle du rapprochement des deux surfaces. Le système (2 feuilles de mica + ressort) baigne dans la solution de solvatation. L'énergie d'hydratation est alors évaluée à partir de la force de rappel du ressort et de la variation entre la distance induite entre les

surfaces lipidiques et la distance réelle mesurée par interférométrie. Le ressort très sensible, permettant d'obéir à une répulsion ou à une attraction entre les surfaces. Qualitativement, les deux techniques donnent les mêmes résultats. Quantitativement les auteurs ne s'entendent pas sur la signification de chacune des mesures⁷⁹. Néanmoins, un schéma issu du groupe de Rand¹³ (Fig. 4) donne un aperçu de l'énergie et de la distance à laquelle ces forces dominent. Nous reviendrons dans la section suivante sur la question de la quantité d'énergie nécessaire pour libérer une section de la surface des molécules du solvant.

2) Forces d'attraction

Comme les systèmes colloïdaux coagulent lorsque, à la limite, les concentrations ioniques permettent aux surfaces de se rapprocher, des forces attractives doivent exister pour maintenir les surfaces ensemble dans un état agrégé. Ces forces attractives sont de type van der Waals et plus spécifiquement, les forces de dispersion de London. Elles sont dues au déphasage entre les moments dipolaires oscillants de deux atomes adjacents. Il se produit donc une fluctuation des charges de l'atome ce qui permet l'expression d'une faible force d'attraction entre les atomes. Il a été démontré par



HYD : ENERGIE D'HYDRATATION

ES : ENERGIE ELECTROSTATIQUE

VDW : ENERGIE DE VAN DER WAALS

Figure 4: Schéma représentant les intensités des forces lors du rapprochement de deux surfaces chargées. (d'après la réf. 13).

Verwey et Overbeek¹⁹ que l'énergie d'attraction entre deux colloïdes peut être représentée approximativement par

$$V_A = - \frac{A}{12\pi d^2}$$

où A représente la constante de Hamaker qui s'exprime par $\frac{2}{3}\pi^2 q^2 h \bar{\nu} \alpha^2$

où q est la charge de l'électron

h la constante de Planck

$\bar{\nu}$ la fréquence et

α la polarisabilité de l'atome.

d représente la distance qui sépare les plans colloïdaux.

3) Bilan des forces

La théorie DLVO (Derjichian, Landau, Verwey, Overbeek)¹⁹ qui fait état d'un équilibre entre les forces de répulsion électrostatique et les forces attractives de van der Waals nécessite des modifications pour y inclure les forces répulsives de solvation retrouvées à faible distance. Dans certains cas les forces d'hydratation surpassent les forces de van der Waals et empêchent la coagulation¹⁶.

Bien qu'elles n'aient pas encore été théoriquement définies, Parsegian¹³ en fait une description quantitative appliquée aux phospholipides. Comparées aux énergies de van der Waals (0.01 à 0.1 ergs/cm²), il s'avère qu'il faille fournir entre 10 et 100 ergs/cm² pour enlever l'eau qui intervient dans le réseau d'hydratation. Une forte énergie doit être fournie au système hydraté afin que les bicouches puissent se toucher et entrer en interaction hydrophobe.

Les changements structuraux qui se produisent lorsque les surfaces lipidiques se touchent, i.e. dans la zone de contact sont déterminants dans les propriétés adhésives ou fusogéniques des membranes. Une description qualitative de ces changements nous renseignera davantage sur la stabilité des vésicules lipidiques.

Ainsi au-delà d'un écartement de 30 Å, la répulsion entre les bicouches est dominée par les forces électrostatiques¹³ (Fig. 4). Même si les répulsions électrostatiques sont faibles, dues à une faible densité de charges de surface ou à la présence d'ions qui neutralisent partiellement les charges de surface, la coagulation ne peut se produire puisque les forces de van der Waals sont trop faibles. Dans les cas où les membranes sont neutres, ou chargées mais en présence de fortes concentrations ioniques qui annulent les charges de surface, les répulsions électrostatiques sont annulées et les

bicouches peuvent s'agréger même lorsque la distance qui sépare les surfaces est de 65 \AA . Par ailleurs, certaines membranes neutres peuvent adsorber des cations et ainsi demeurer séparées indéfiniment en suspension. Lorsque ces membranes se rapprochent, dans certains cas les cations peuvent désorber et permettre un contact moléculaire.

A très courte distance, moins de $20\text{-}30 \text{ \AA}$, une forte répulsion due à l'hydratation se produit. Si la pression de rapprochement exercée est suffisante, un réarrangement structural se produit. Souvent le bilan est un nouvel agencement des molécules qui se manifeste après une augmentation de la pression latérale intralamellaire due à une cristallisation des chaînes hydrocarbonées. Ces effets sont à l'origine des changements de phase des lipides anioniques en présence des cations⁴¹.

Un cas est illustré à la figure 5¹⁷ montrant le bilan comparé des interactions totales entre des vésicules de PC et des vésicules de PE. La fusion des vésicules de PE est plus favorable énergétiquement que celle des vésicules de PC. Nous savons que la PE peut former des formes hexagonales. De telles modifications structurales sont induites par la présence des cations. La PC n'a pas la possibilité de tels changements structuraux; aussi est-il difficile de faire fusionner des systèmes constitués uniquement de PC.

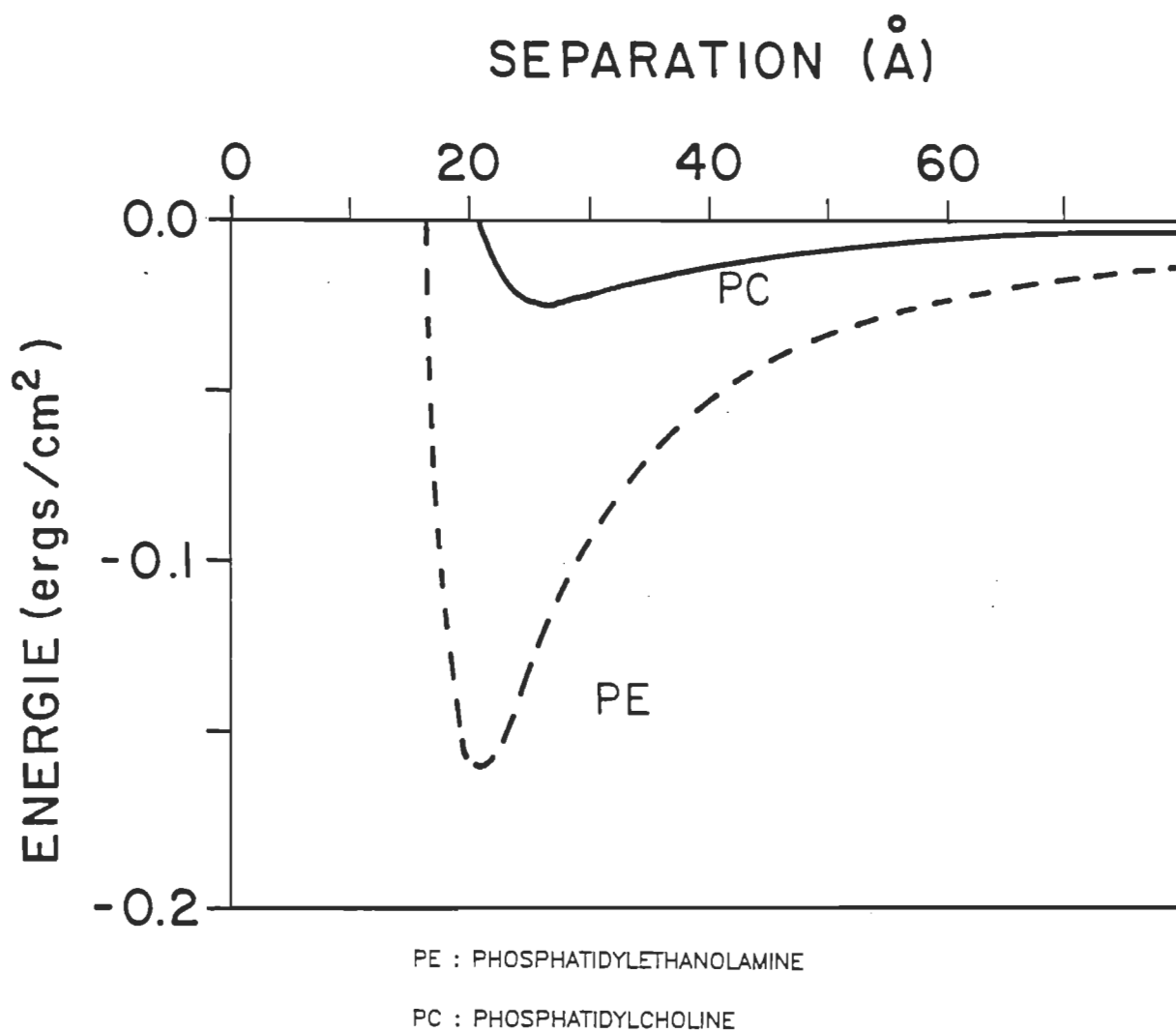


Figure 5: Schéma représentant le bilan énergétique des forces lors du rapprochement de deux surfaces. (d'après la réf. 17).

Nous croyons qu'un mécanisme similaire peut s'appliquer dans le cas des membranes des thylacoïdes. La distance entre les membranes est contrôlée par la présence des ions dans le milieu et la réversibilité du phénomène provient de l'insuffisance des forces de van der Waals pour faire coaguler les membranes. A notre avis, la concentration ionique présente n'est jamais suffisante pour enrayer la force électrostatique et la force d'hydratation. L'addition de ces dernières surpassant les forces de van der Waals.

Connaître la nature des lipides constituant ces membranes devient alors très important et il devient primordial de savoir s'ils peuvent interférer avec les cations susceptibles d'être présents dans le cytoplasme des chloroplastes.

D) LIPIDES DES MEMBRANES DES THYLACOÏDES

1) Composition lipidique de la membrane thylacoïdienne

L'aspect structural particulier des membranes thylacoïdiennes nous amène tout de suite à considérer la nature des molécules qui constituent cette architecture. Ces membranes photosynthétiques sont constituées de lipides et de protéines en proportions (p/p) équivalentes. Malgré le fait que le rôle structural des protéines ne soit

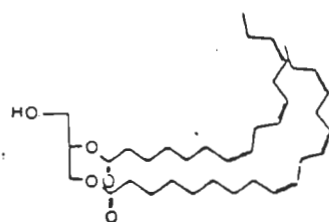
pas à négliger, la spécificité de ces lipides nous porte à croire qu'ils pourraient jouer un rôle majeur dans l'organisation de ces membranes. N'oublions pas que les lipides constituent la matrice dans laquelle baignent les protéines membranaires.

Ces groupements fonctionnels particuliers des lipides du thylacoïde, les glycérides glycosylés, sont représentés en figure 6.

Les principales classes de lipides glycosilés retrouvées³⁹ sont les monogalactosyldiacylglycérols (MGDG), les digalactosyldiacylglycérols (DGDG), les phosphatidylglycérols (PG) et les sulfoquinovosyldiacylglycérols (SQDG).

La distribution des lipides dans les membranes des thylacoïdes suivra aussi l'architecture hétérogène des protéines²⁶ (Tableau 2). Les lipides neutres, MGDG et DGDG constituent au moins 65% des lipides du thylacoïde. Ensuite viennent les lipides chargés avec principalement la PG (15%) et la SQDG (12%), la phosphatidylcholine (PC) que l'on retrouve à peu près dans la majorité des membranes est présent à seulement 4% dans ce type de membrane. On retrouve une distribution hétérogène de ces lipides. Toutefois les parties granaires et stromatiques conservent le ratio 2:1 galactolipides:lipides chargés. Plus spécifiquement, la membrane granaire possède plus de MGDG et de PG que la membrane stromatique tandis que le DGDG est en plus forte proportion dans la partie stromatique de la membrane des thylacoïdes.

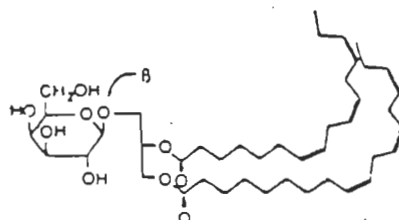
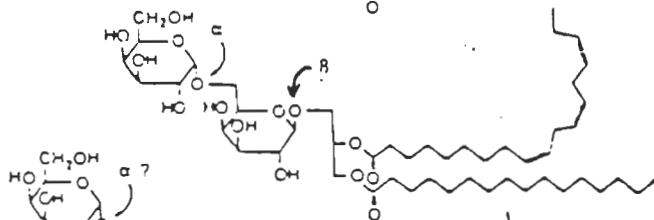
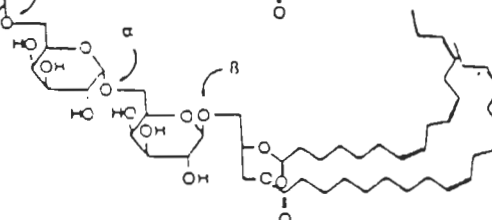
LIPIDES NEUTRES



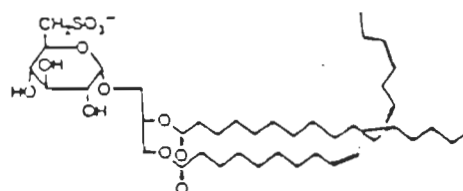
DIGLYCERIDE (DG)

GLYCOLIPIDES

GALACTOLIPIDES

MONOGALACTOSYLDIGLYCERIDE
(MGDG)DIGALACTOSYLDIGLYCERIDE
(DGDG)TRIGALACTOSYLDIGLYCERIDE
(TGDG)

SULFOLIPIDES

SULFOQUINOVOSYLDIGLYCERIDE
(SL)

PHOSPHOLIPIDES

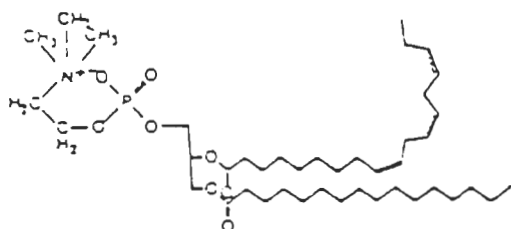
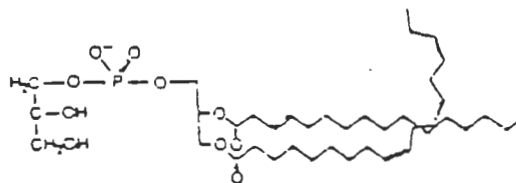
PHOSPHATIDYLCHOLINE
(PC)PHOSPHATIDYLGLYCEROL
(PG)

Figure 6: Structure des lipides des membranes du thylacoïde.

Tableau 2

Distribution lipidique des membranes des thylacoïdes

Classe de lipides	Thylacoïdes	Membrane granaire	Membrane stromatique
MGDG	38	44	33
DGDG	29	18	30
PG	14	33	14
SQDG	12	9	15
PC	5	2	7

(D'après la réf. 26).

L'analyse de la composition en chaînes acyle de ces lipides révèle leur grand état de fluidité²¹ (Tableau 3). Ainsi, les galactolipides neutres sont constitués presque exclusivement de chaînes linolénoïques (C_{18:3}). Les lipides chargés, PG et SQDG, renferment surtout le mélange de chaînes linolénoïque:palmitoïque ou linoléique:palmitoïque.

L'état fluide dans lequel se trouve cette matrice doit faciliter énormément la diffusion des molécules.

2) Dispersions des lipides des thylacoïdes dans des solutions aqueuses

L'analyse des lipides des membranes du chloroplaste révèle que la majorité (65%) sont neutres (non ioniques), le MGDG et le DGDG. De ces deux lipides, seul le DGDG peut former des bicouches fermées en solution aqueuse^{28,29}. Le MGDG forme des structures du type hexagonales ou des particules (micelles inverses) lorsque leur taux de présence est supérieur à 30-40% (p/p) dans des dispersions mixtes avec le DGDG (Tableau 4).

Les autres lipides présents (PG, SQDG et PC) sont ionisables et peuvent former en solution aqueuse, des bicouches voire même des liposomes unilamellaires.

Tableau 3

Composition en chaîne acyle des lipides des membranes du thylacoïdes

Espèce moléculaire	Chaîne acyle (mole %)			
	MGDG	DGDG	SQDG	PG
18:3/18:3	92	70		
18:3/16:0	4	24	62	2
18:2/16:0			33	5
18:1/16:0				7
18:0/16:1 ^{3T}				45
16:0/16:1 ^{3T}				37
Acide palmitique (16:0)				
Acide hexadécénoïque (16:1)				
Acide stéarique (18:0)				
Acide oléïque (18:1)				
Acide linoléïque (18:2)				
Acide linolénique (18:3)				

(D'après la réf. 20).

Tableau 4

Comportement des lipides des membranes
des thylacoïdes en dispersion aqueuse

Extrait lipidique	Méthode	Structures observées
Lipides totaux	Dispersion	- Vésicules - Arrangements tubulaires - Particules lipidiques
Lipides totaux dépigmentés	Phase inverse	- Vésicules - Particules lipidiques
MGDG	Dispersion	- Agrégats amorphes
	Phase inverse	- Réseaux tubulaires - Arrangements de particules
DGDG	Dispersion	- Vésicules
	Phase inverse	- Vésicules
PG	Dispersion	- Vésicules
MGDG:DGDG (P:P)		
< 30-40%	Phase inverse	- Vésicules
50-50%	Phase inverse	- Vésicules - Arrangements tubulaires
> 70%	Phase inverse	- Agrégats cristallins

(D'après les réfs. 28 et 29).

On peut d'ores et déjà penser à un modèle de membranes de thylacoïdes constituée d'une matrice de DGDG, PG, PC ou SQDG, parsemée de MGDG. Le haut ratio de MGDG dans les membranes artificielles oblige ce dernier à se solubiliser sous une forme hexagonale créant ainsi des particules à l'intérieur de la bicouche.

A date il n'y a aucune évidence expérimentale de la présence des micelles inverses dans les membranes des thylacoïdes³⁰.

Considérant le fait qu'une plus grande proportion de MGDG se retrouve dans la région empilée des thylacoïdes, certains auteurs suggèrent²⁵ que sa facilité à former des phases inverses dans une bicouche lipidique doit lui servir afin de stabiliser les protéines intrinsèques des thylacoïdes.

Les membranes du thylacoïde sont donc constituées de lipides qui, mélangés ensemble puis dispersés dans l'eau, ne forment pas uniquement des liposomes mais tout un ensemble de structures mixtes allant de la vésicule unilamellaire au liposome ayant des structures hexagonales ou inverses dans leur bicouche.

E) DÉFINITION DES BUTS

1) Importance des forces interfaciales dans le processus d'empilement des membranes des thylacoïdes

Le but du travail consiste à déterminer les conditions cationiques nécessaires pour déstabiliser des vésicules formées à partir d'un extrait lipidique partiel des membranes de thylacoïdes. La comparaison entre les valeurs obtenues pour les lipides des thylacoïdes et des lipides purs nous servira afin de caractériser davantage le rôle des cations dans la stabilisation de l'architecture de ces structures membranaires.

L'approche expérimentale choisie sera de former des liposomes à partir des lipides extraits ou synthétiques et de mesurer la concentration cationique nécessaire afin de les faire coaguler. Puisqu'il doit y avoir contact entre les vésicules unilamellaires afin que la coagulation ait lieu, la mesure de la cinétique de la dimérisation nous renseignera sur l'efficacité des collisions entre les vésicules et sur le rôle potentiel des cations dans le processus initial de la coagulation. Afin de préciser ce dernier les isothermes d'adsorption des cations sur les lipides utilisés seront mesurés. Le but de ces mesures est de faire le rapprochement entre la quantité d'ions fixés

sur les vésicules et la concentration cationique au seuil de la coagulation. On verra par la nature des lipides utilisés, si la structure de la tête polaire influence le processus de la coagulation.

On ne doit pas perdre de vue le but ultime de ces expériences qui est de caractériser davantage le rôle que peuvent prendre les lipides: DGDG et PG dans le processus de régulation de la distribution quantitative entre les deux photosystèmes. On est conscient que ce mécanisme peut impliquer des protéines²⁵. Néanmoins, vue la spécificité des lipides trouvés dans les membranes des thylacoïdes²⁶, et que ce "jeu" des membranes impliqué dans le processus de régulation de l'efficacité des deux photosystèmes²⁷ est unique, nous croyons à un rôle important sinon essentiel des galactolipides qui constituent la majeure partie des lipides de ces membranes.

2) Choix des lipides

Comme la vésicule unilamellaire est le modèle choisi pour discerner les effets des cations sur les lipides, la dispersion aqueuse de ces derniers doit donc présenter les caractéristiques d'une bicouche régulière.

La majorité des lipides des thylacoïdes est représentée par le MGDG, le DGDG et la PG. Le SQDG est présent presque au même taux que la PG dans ces membranes, mais les difficultés d'approvisionnement et de purification à partir des lipides des thylacoïdes nous obligent à

nous orienter vers d'autres lipides qui croyons-nous pourront le remplacer. L'utilisation des lipides chargés tels la phosphatidylsérine (PS) et l'acide phosphatidique (PA) nous permettra de mimer le SQDG. Comme le MGDG ne forme pas de bicouche en solution aqueuse, nous l'excluons du mélange des lipides extraits des membranes des thylacoïdes. Alors, en résumé, les lipides suivants seront utilisés: PA, PS, PG, DGDG et l'extrait partiel des lipides des thylacoïdes.

3) Plan du travail

Tel que mentionné à la section 1, nous analyserons en premier lieu les conditions de concentrations cationiques nécessaires afin de provoquer la coagulation des dispersions aqueuses des vésicules. Les cations utilisés sont le Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , H^+ , tous des cations susceptibles d'être trouvés dans le stroma près des membranes des thylacoïdes.

L'analyse des résultats nous permettra de comparer le comportement des lipides chargés à celui des lipides neutres. Ce fait sera amplifié lors de l'analyse des constantes de la dimérisation obtenues pour les divers types de vésicules. Et, enfin la détermination des paramètres de la fixation des cations sur les divers lipides nous renseignera sur les interactions cations-lipides, sur l'effet stérique des têtes polaires puis sur les forces mises en jeu lors du rapprochement de deux vésicules (surfaces) et du rôle éventuel des cations.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODE

A) MODÈLE UTILISÉ

Les vésicules que nous utilisons comme modèles membranaires sont obtenues lors de la sonication d'une dispersion aqueuse de phospholipides ou de galactolipides. Le sonicateur utilisé provient de la compagnie Heat-Systems et correspond au modèle W-225 R. Il est équipé d'une sonde large pouvant supporter un contenant. Cet équipement fut utilisé afin d'éviter le contact entre la dispersion de vésicules et des particules métalliques (surtout du titane) provenant de la sonde.

Les vésicules ainsi obtenues ne furent pas purifiées davantage. Une chromatographie sur gel de sépharose 4B (tamis moléculaire) nous montre les profils d'élution (Fig. 7) obtenus des vésicules de diverses natures. Dans tous les cas, le tampon de dispersion est le tris 10 mM, NaCl, 100 mM à pH 8.0. Les lipides utilisés proviennent des compagnies Sigma et Serdary.

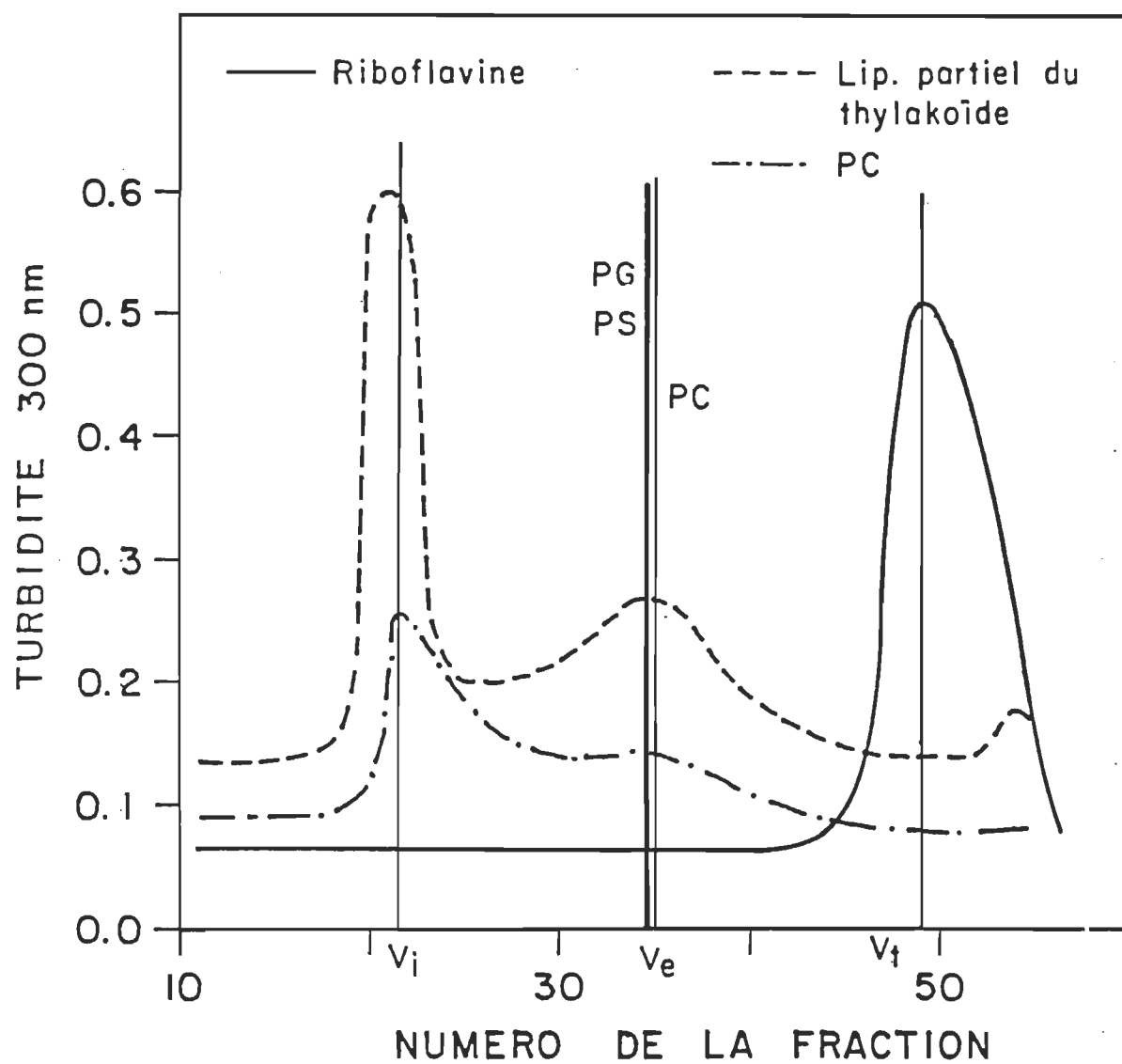


Figure 7: Profil d'élution des liposomes.

B) FIXATION DES CATIONS

L'incubation des vésicules en présence des diverses concentrations de chlorures cationiques a été effectuée dans des sacs à dialyse à la température de la pièce, i.e. 20-22°C. Le désalage des sacs à dialyse provoqué par des changements de tampons (ne contenant pas de sel inorganique) prend 4 jours à la fréquence de 3 changements par jour. Les ratio des volumes du sac et de l'erlenmeyer sont de 1:50. Des échantillons à diverses concentrations cationiques ne contenant pas de vésicules furent dialysés afin d'établir les conditions de désalage.

Les membranes à dialyse étaient de la marque Spectra-Por no. 1. Avant d'être utilisées elles étaient trempées dans une solution d'EDTA 1 mM et rincées plusieurs fois à l'eau distillée.

A la fin de la période de dialyse, le contenu en lipides et en cations fut évalué.

Le concentration lipidique a été déterminée en effectuant le dosage des phosphates, groupement fonctionnel des phospholipides. La méthode conventionnelle de Fiske-Subarow suivant une digestion acide fut utilisée³¹.

Les cations furent dosés par la méthode de la spectroscopie d'absorption atomique. L'appareil utilisé en fut un de la compagnie Perkin-Elmer, modèle AA-1278. Les courbes standards furent déterminées à partir des sels utilisés pour les réactions avec les phospholipides.

Les chlorures utilisés provenaient de la compagnie Fisher et les sels servant au tampon, de la compagnie Sigma.

C) MESURES DE CINÉTIQUE

Un appareil à cinétique rapide à écoulement arrêté provenant de la compagnie Tri-Tech Dynamic Instruments, Winnipeg, fut utilisé pour les mesures de la cinétique et de la variation de l'intensité de lumière blanche transmise. Les effets d'interférence dues aux dimensions des vésicules sont ignorés puisque l'on mesure l'intensité de la lumière transmise à 180°. On utilise une lumière blanche, après avoir vérifié que les valeurs des constantes de dimérisation obtenues lorsque la longueur d'onde du filtre interférentiel employé était ajusté à 350 nm étaient les mêmes.

Succintement, le fonctionnement (Figure 8) consiste à injecter à l'aide des seringues (A et B) les réactifs (vésicules et cations) dans la cuvette (C) où ils sont mélangés en moins de 10 ms. Cette dernière ayant des fenêtres de quartz laisse le passage à un faisceau lumineux (D) qui

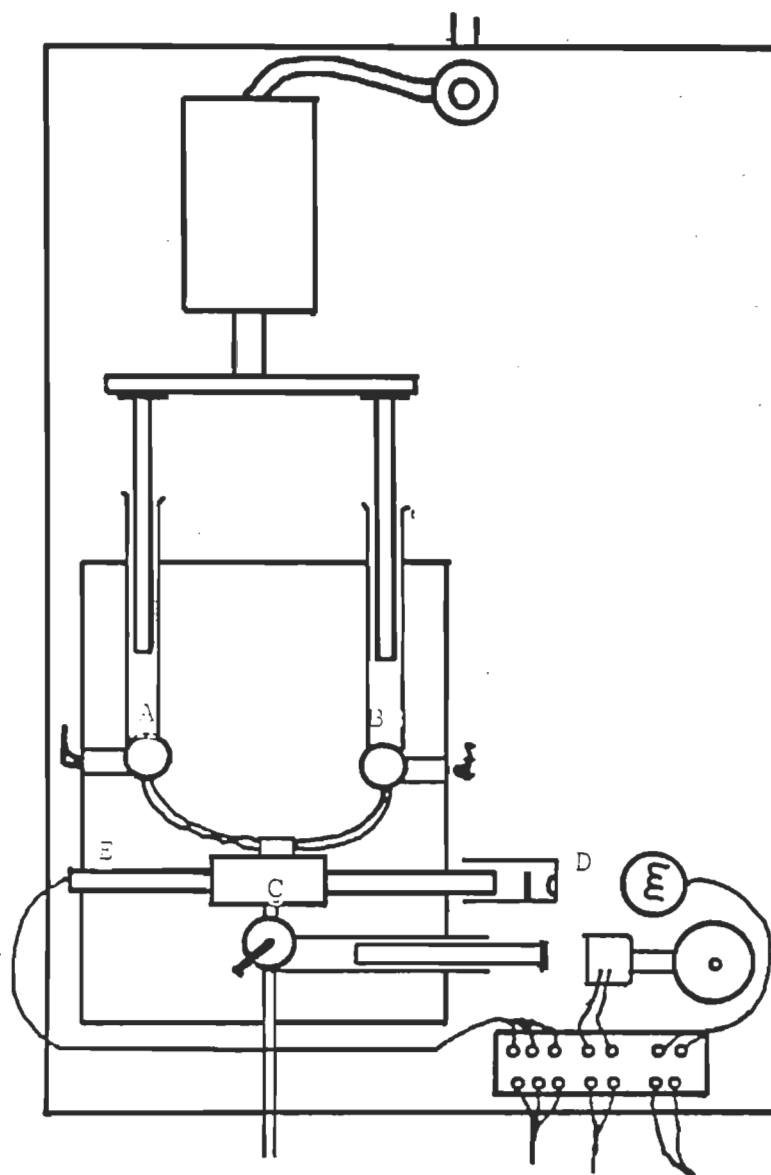


Figure 8: Schéma de l'appareil à cinétique rapide.

frappe un tube photomultiplicateur (E) à sa sortie. Le signal est alors mémorisé dans un enregistreur temporaire à une fréquence sélectionnée puis retransmis par la suite à un ordinateur ou à un oscilloscope. Les données digitalisées sont alors conservées afin d'être analysées.

D) EXTRACTION DES LIPIDES DES MEMBRANES DES THYLACOÏDES

1) Purification des membranes de thylacoïdes

Les membranes sont préparées à partir des feuilles d'épinards provenant de l'épicerie. Le procédé d'extraction est basé sur la méthode dite de YUSN³². Succintement, nous broyons 100 g de feuilles d'épinards défibrées dans une solution tampon (MES, 10 mM; $MgCl_2$, 4 mM; ascorbate de sodium, 2 mM et du sorbitol 0.33 M) à un pH de 6.5. Rapidement nous filtrons la dispersion à travers 8 couches de coton fromage et nous centrifugeons le filtrat à 8 000 X g, 50 s. Le processus entier doit prendre moins de 5 minutes. Les solutions et la verrerie utilisées sont refroidies à 4°C.

Le culot obtenu est alors dispersé dans une dilution 1:25 du tampon d'homogénéisation. La centrifugation à 8 000 X g, 5 minutes nous permet de récolter un culot de membranes de thylacoïdes.

2) Extraction des lipides

L'extraction des lipides des membranes obtenues se fait en dispersant dans un mélange de solvants organiques $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, 1:2 (v/v) et dans un ratio solvant:résidu de 10:1. La couche organique est alors filtrée à travers 4 épaisseurs de coton fromage puis, le résidu est lavé avec du CHCl_3 de façon à ce que le ratio final $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ atteigne 1:1 (v/v). Alors nous séparons les protéines hydrosolubles en ajoutant une solution saline (NaCl :1%, MgCl_2 :0.05%) dans un volume qui donnera un ratio final $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0.9)³³. La phase organique est alors recueillie et la couche aqueuse est lavée avec du CHCl_3 . On concentre les fractions organiques contenant les lipides.

3) Purification des lipides

L'extrait lipidique concentré est alors déposé sur une colonne de gel Sépharose C1-6B (2.5 x 20cm) (Pharmacia).

Préalablement le gel de sépharose a dû être transféré graduellement de l'eau à l'acétone et enfin à l'hexane³⁴. Le gel doit être complètement déshydraté.

L'adsorption des lipides sur la colonne se fait en éluant le dépôt de lipides avec de l'hexane. Par la suite la polarité de l'éluant est graduellement augmentée en ajoutant de l'alcool isopropylique (AIP). En ayant soin de ne pas dépasser un ratio 80:20 (hexane:AIP) (v/v), nous réussissons à éluer presque entièrement les pigments. Par la suite, lorsque la colonne est débarrassée des pigments, nous augmentons graduellement la polarité passant à l'AIP et enfin à l'acétone. Pendant ce temps le MGDG élue puis le reste des lipides demeure dans la colonne.

Afin d'obtenir l'extrait lipidique partiel des membranes de thylacoïde tel qu'utilisé pour les expériences, nous éluons la colonne avec du méthanol. L'analyse par chromatographie sur couche mince (gel de silice) éluee avec du $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4) puis révélée à l'iode, des diverses fractions obtenues nous montre une séparation entre les pigments, le MGDG et le reste des lipides, i.e. l'extrait lipidique partiel. Une purification supérieure était parfois nécessaire et nous repassons l'extrait partiel sur le même type de colonne, suivant la même technique. Les extraits lipidiques partiels furent rassemblés puis utilisés tel quel.

Malheureusement on n'a pu déterminer la composition quantitative de l'extrait lipidique partiel.

Les solvants utilisés proviennent tous de la compagnie Anachemia et sont classés dans la catégorie "distillé sous verre".

CHAPITRE III

CINÉTIQUE DE LA DIMÉRISATION

Que la coagulation des vésicules provienne de l'agrégation ou de la fusion des membranes, il faut, au préalable qu'il y ait contact entre les deux surfaces. Comme il s'agit de vésicules à majorité unilamellaires (cf. au profil d'élution, fig. 6), la coagulation provient de la collision entre deux vésicules et non d'une réaction de réarrangement entre les feuilletts bilipidiques d'un système multilamellaire. Pour qu'il y ait coagulation, il faut que la collision entre les surfaces soit efficace, c'est-à-dire, énergétiquement favorable. Dans les cas des vésicules chargées, la répulsion électrostatique et l'hydratation de l'interface peuvent nuire à l'efficacité des collisions. Dans les cas des vésicules neutres, l'hydratation des surfaces peut nuire au rapprochement des surfaces et empêcher l'établissement des forces de van der Waals.

C'est ce que nous spécifierons dans ce chapitre en comparant les cinétiques de la dimérisation des vésicules unilamellaires. Les lipides choisis présentent la caractéristique d'être soit chargés: PA; PS; PG ou neutre: DGDG. De plus, dans la séquence des lipides chargés, on a

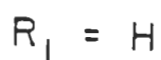
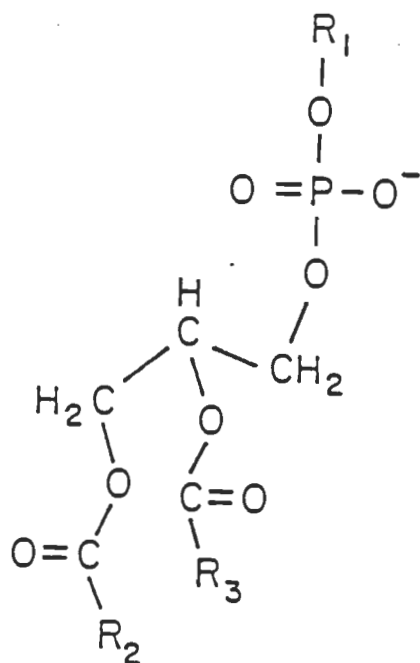
diverses têtes polaires (figure 9, PA:PS:PG) qui peuvent interférer différemment lors des collisions.

Nous croyons que les renseignements fournis nous aideront à définir davantage la cinétique de dimérisation obtenue en utilisant des vésicules issues de la dispersion aqueuse des lipides partiels des membranes des thylacoïdes.

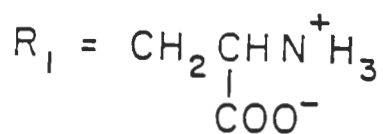
A) CONCENTRATION CATIONIQUE CRITIQUE DE LA COAGULATION

Afin de spécifier les conditions dans lesquelles les cinétiques de la dimérisation ont été mesurées, établissons au préalable les concentrations cationiques nécessaires pour provoquer la coagulation des vésicules. A l'aide de l'appareil à injection rapide décrit précédemment, nous mesurons la variation de l'intensité de lumière transmise des échantillons après l'addition de cation tel qu'indiqué. Un exemple des résultats obtenus est présenté en figure 10. Les unités de la variation de l'intensité de lumière transmise sont arbitraires. Le temps de 25.6 s a été déterminé par la capacité de l'échantillonneur temporaire.

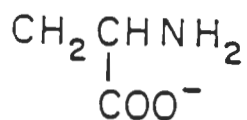
Le Tableau 5 présente les résultats obtenus à partir des diverses préparations de vésicules.



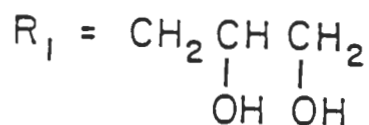
ACIDE PHOSPHATIDIQUE



OR



PHOSPHATIDYLSERINE



PHOSPHATIDYLGLYCEROL



Figure 9: Structure des lipides anioniques utilisés.

Tableau 5

Seuil de la coagulation des vésicules lipidiques

A) Préparées dans du tampon tris 10 mM; pH 8,0; NaCl 100 mM.

Concentration finale: NaCl 50 mM.

	Na ⁺ (mM)	Mg ²⁺ (mM)	Ca ²⁺ (mM)	Mn ²⁺ (mM)
Extrait lipidique partiel (pH 8,0)	--	20	8	2
DGDG	--	50	50	40
PG (pH 8,0)	--	25	7	8
PG (pH 3,0)	--	25	6	5
PS (pH 8,0)	--	1	1,5	1
PA (pH 8,0)*	--	0,3	0,1	0,2

* Turbidité mesurée après 2,5 s. Tous les autres lipides ont été mesurés après 25 s.

B) Préparées dans du tampon tris 10 mM; pH 8,0.

	Na ⁺ (mM)	Mg ²⁺ (mM)	Ca ²⁺ (mM)	Mn ²⁺ (mM)
Extrait lipidique partiel (pH 8,0)	33	7,5	5	1
DGDG	50	13	10	12
PG (pH 8,0)	10	5	2	1

Des trois cations divalents utilisés, le Mg^{2+} se distingue des deux autres. Dans la majorité des cas, le Ca^{2+} et le Mn^{2+} sont efficaces aux mêmes concentrations pour provoquer la coagulation des vésicules. C'est dans le cas des vésicules de PG que le Mg^{2+} se distingue le plus des autres cations. Par contre, l'absence du Na^+ (partie b) dans les vésicules de PG, pH 8.0 ramène le Mg^{2+} au même ordre de grandeur que le Mn^{2+} et Ca^{2+} . Il en est de même pour le DGDG où l'absence du Na^+ ramène les concentrations critiques de coagulation à des valeurs s'approchant des concentrations cationiques cytoplasmiques.

Dans le cas des vésicules de PA et de PS, on voit qu'il faut à peu près dix fois moins de cations pour faire coaguler la PA que la PS. On retrouve à peu près le même écart avec la PG. Mais si on enlève le Na^+ , les valeurs obtenues pour la PG et la PS concordent. Mais les vésicules de DGDG, que ce soit en la présence ou en l'absence de Na^+ , nécessitent une forte concentration cationique pour coaguler. On distingue dès lors une différence entre les systèmes chargés PA, PS et PG et le DGDG, le système neutre. Dans les cas de l'extrait lipidique partiel des thylacoïdes, on aurait plutôt tendance à comparer ce système au PG plutôt qu'au DGDG.

Pris à l'inverse on en conclut donc que les vésicules de lipides préparées en présence de NaCl 100 mM sont stables jusqu'à une concentration des cations divalents de 0.2 mM dans le cas de la PA, de 1 mM dans le cas de la PS, de 5 ou 25 mM dans le cas de la PG en présence du Ca^{2+} et du

Mn^{2+} ou Mg^{2+} . Les vésicules de DGDG peuvent pour leur part tolérer une concentration cationique de 40 mM. Le pH du tampon ne change pas notablement la concentration cationique obtenue pour les vésicules de PG.

Lorsque les vésicules de DGDG et de PG sont préparées en absence de NaCl, les concentrations des cations divalents nécessaires à leur coagulation sont diminuées d'un facteur de près de 5, témoignant d'un effet du Na^+ sur la stabilité de ces systèmes.

Sauf dans le cas du Mg^{2+} , le Na^+ ne semble pas avoir un effet compétitif aussi important pour le Ca^{2+} et le Mn^{2+} .

Un fait à relever toutefois est la concentration de Na^+ nécessaire à la coagulation des systèmes lipidiques: PG, DGDG et extrait lipidique partiel est inférieure à la quantité de Na^+ utilisé pour la préparation des vésicules i.e. 100 mM. Sans doute sommes-nous en présence de vésicules de taille différente, avec et sans NaCl.

On retrouve quelques-unes de ces valeurs dans la littérature (Tableau 6) et, dans l'ensemble les valeurs concordent, malgré le fait que les temps d'attente ne soient pas toujours les mêmes. Cela est une indication que le processus de la coagulation est rapide. Le plus grand écart se retrouve au niveau du DGDG. Nous avons utilisé du DGDG provenant de la compagnie Serdary et les résultats ne diffèrent pas de ceux obtenus avec celui que nous avons extrait.

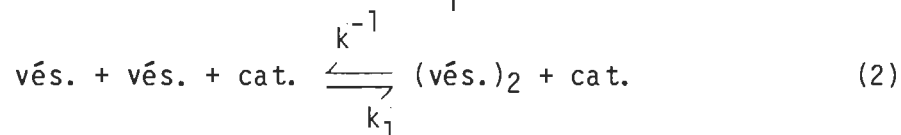
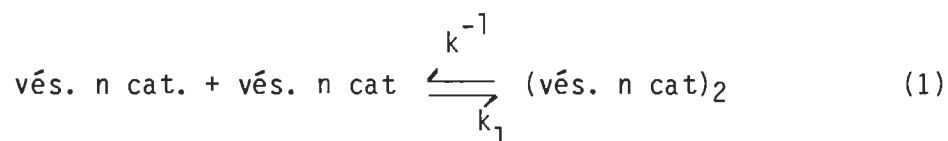
Tableau 6

Seuil de la coagulation des vésicules lipidiques

	Mg ²⁺ mM	Ca ²⁺ mM	ref. mM
Extrait lipidique des chloroplastes	10	10	38
DGDG	5	2	37
PG	20	10	35
PG		9	40
PS		1	36,39
PS		2,5	40
PS (Na ⁺ , 50 mM)		1	39
PS	1,8	0,8	41
PA pH 6,0		1,2	40
pH 7,4		0,15	40
pH 8,5		0,03	40

B) CONSTANTE DE LA DIMÉRISATION

Deux mécanismes sont proposés pour initialiser le processus de la dimérisation des vésicules. Celui proposé par Lansman et Haynes⁴² postule que les cations soient fixés sur les membranes avant qu'il y ait contact tandis que pour Nir et Bentz⁴³ la présence des cations dans le milieu entre les deux surfaces est essentielle mais pas nécessairement leur fixation sur les membranes. Les deux mécanismes peuvent être représentés par les équations suivantes:



Nous reviendrons subséquemment sur ces mécanismes. Néanmoins la phase initiale de la réaction de la coagulation est une dimérisation et par la méthode de la variation de la turbidité en fonction du temps, il est possible de suivre la progression de la réaction (figure 10).

Comme méthode de mesure, nous adopterons la technique utilisée par Day et coll.⁴⁴. Elle est essentiellement basée sur la théorie de Rayleigh-Gans-Debye qui relie l'absorbance aux dimensions des particules⁴⁵.

$$I = I_0 \exp(-B d)$$

INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE TRANSMISE

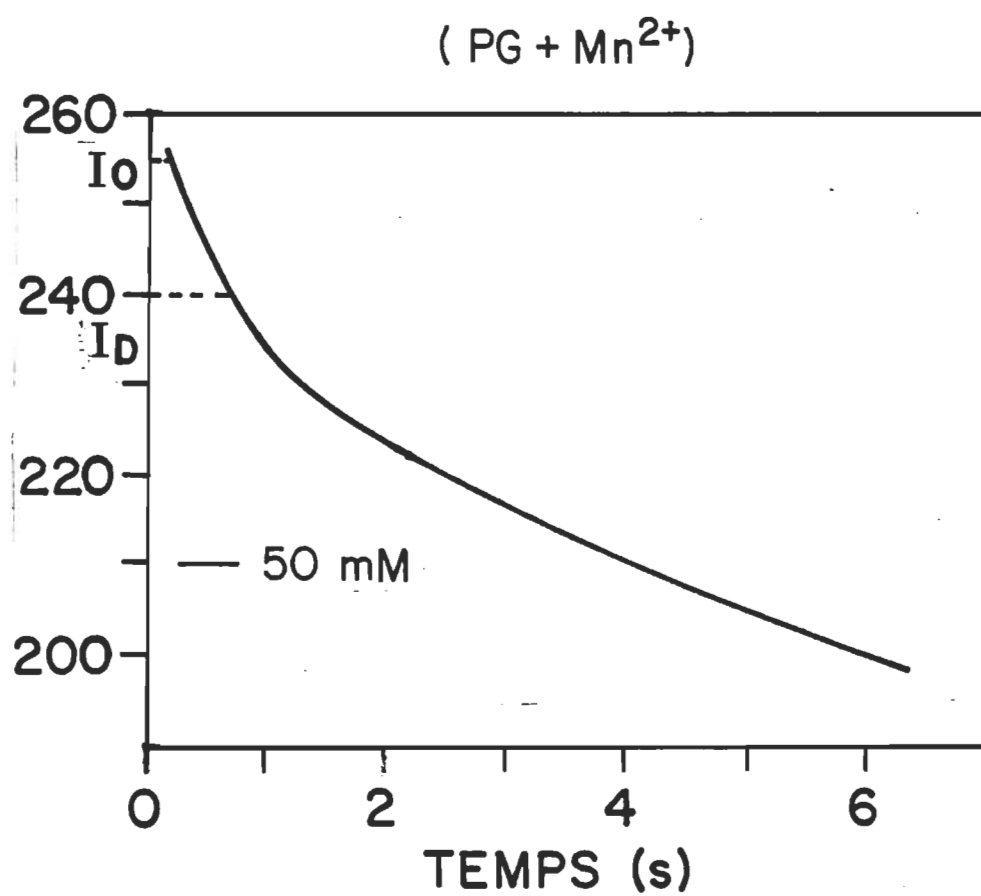


Figure 10: Courbe de cinétique.

où

I = intensité de la lumière transmise

I_0 = intensité de la lumière incidente

d = le trajet optique

B = absorbance

$$B = \frac{8\pi^3 (\epsilon_L - \epsilon_W)^2}{3\lambda^4 \epsilon_W^2} NV^2$$

où ϵ_L et ϵ_W sont les indices de refraction du lipide et de l'eau.

λ = est la longueur d'onde de la lumière incidente

N = le nombre de particules par unité de volume

V = le volume de la particule dispersante

On peut donc considérer que le volume des vésicules doublera lorsqu'il y aura la dimérisation. Comme le dimère provient de 2 monomères, N sera réduit de moitié à chaque dimère formé.

L'expression de B pour le dimère devient alors $N \rightarrow N/2$ et $V \rightarrow 2V$.

$$B = \frac{8\pi^3 (\epsilon_L - \epsilon_W)^2}{3\lambda^4 \epsilon_W^2} \cdot \frac{N (2V)^2}{2}$$

$$\frac{B_D}{B} = 2$$

De la cinétique obtenue (fig. 10) seule la partie concernant la dimérisation sera retenue. L'absorbance de départ B_0 est la valeur maximale obtenue, tandis que la valeur finale, B , correspond à la valeur obtenue lorsque la dimérisation a eu lieu, i.e. $2 (B_0)$.

Reliant ces paramètres mesurés à la cinétique en cours selon les équations 1 et 2, nous exprimons la variation du nombre de vésicules

$$- \frac{dV}{dt} = 2k_1 [V]^2 - 2k_{-1} [V_2]$$

qui devient, si l'on néglige la réaction inverse,

$$- \frac{d[V]}{dt} = 2k_1 [V]^2$$

Comme l'on suit l'augmentation de la dispersion de la lumière, la constante de la réaction, k_1 sera déterminée suivant ce paramètre mesurable. Si l'on définit α , comme étant le degré d'avancement de la réaction⁴⁷, on le mesure par le ratio de la variation totale de l'absorbance correspondant à la formation du dimère:

$$\text{alors} \quad \alpha = \frac{(B_t - B_0)}{(B_\infty - B_0)}$$

En appliquant l'équation cinétique générale d'une réaction d'ordre 2 au phénomène de la dimérisation, on trouve:

$$k_1 = \frac{1}{2[V_0]} \cdot \frac{\alpha}{1 - \alpha} \cdot \frac{1}{t}$$

où $[V_0]$ représente la concentration initiale de vésicules dont la valeur est établie à partir de la concentration de lipides et du nombre de molécules de lipides retrouvées par vésicule. Ce nombre est évalué à environ 4 000 pour des vésicules unilamellaires de 125 Å de rayon⁴⁸.

L'évaluation de la pente de la portion linéaire de la courbe obtenue en traçant $\frac{\alpha}{1 - \alpha} = f(t)$ donnera la valeur de $k_1 \cdot 2 [V_0]$ (fig. 11A).

La déviation de la linéarité de la relation $\alpha/(1 - \alpha) = f(t)$ provient des réactions suivant celle de la dimérisation. Un schéma (fig. 11B) illustre ce phénomène: la courbe n correspond à la courbe idéale s'il y avait seulement des dimérisations, les courbes n_2 et n_3 représentent des conditions où le dimère n réagit avec un autre monomère pour former un trimère, n_3 est la réaction de n_2 avec un monomère et ainsi de suite. La courbe obtenue (fig. 10) est le reflet expérimental de la sommation de toutes ces courbes et correspond à celle illustrée par n.

En choisissant la partie initiale de la réaction comme n_2 et n_3 et $n_1 \approx 0$, on est certain de mesurer uniquement la dimérisation. Le

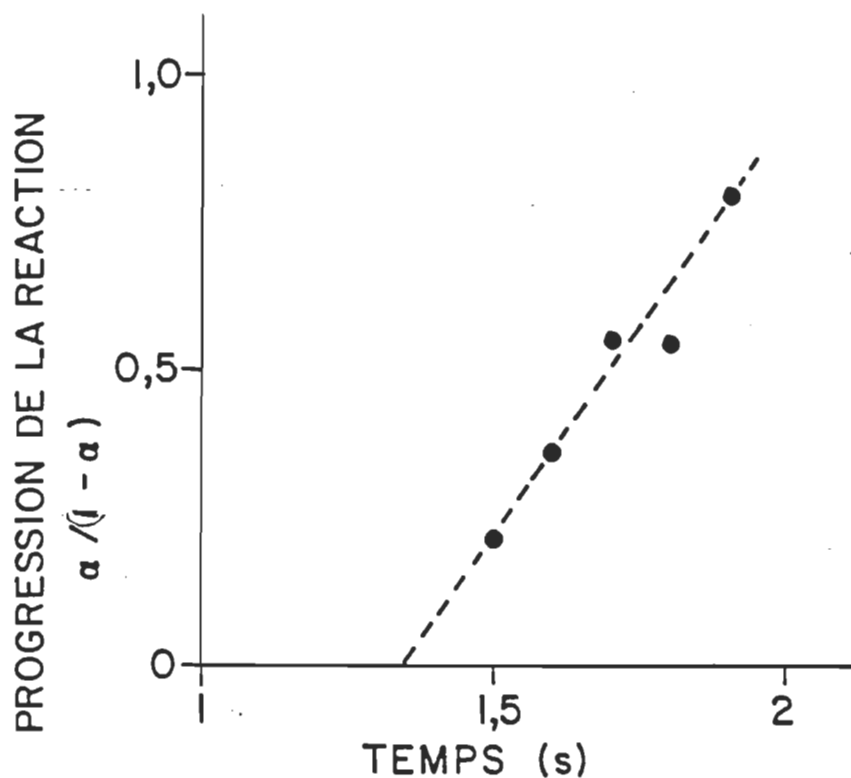


Figure 11A: Variation du paramètre de la progression de la réaction, $\alpha/(1-\alpha)$ en fonction du temps.

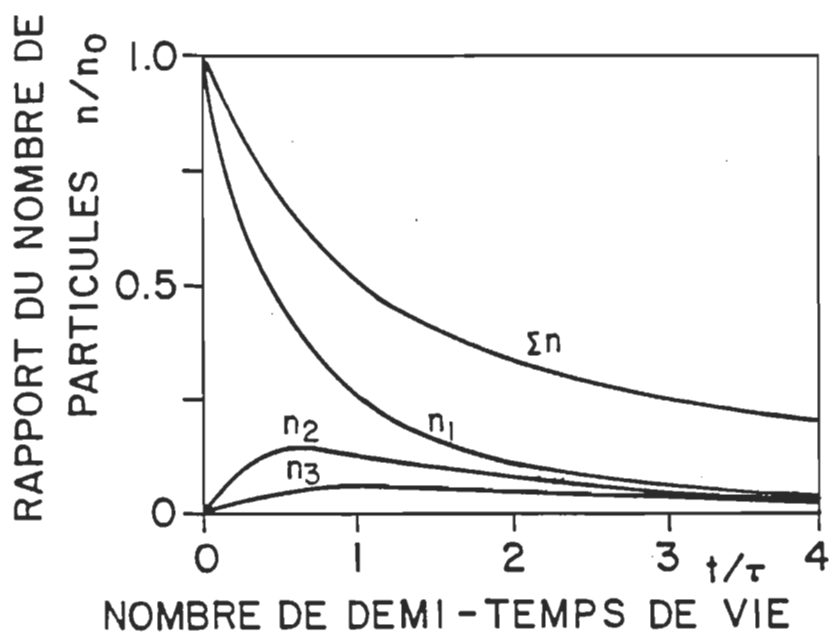


Figure 11B: Schéma représentant l'incidence de la présence des "n" mères sur la turbidité. (d'après la réf. 49).

coefficient de corrélation fut utilisé pour déterminer la linéarité de la courbe $\alpha/(1 - \alpha) = f(\text{temps})$.

Des exemples des cinétiques obtenues sont représentées à la figure 10 et 12. Les courbes obtenues avec la PA, la PS et la PG sont typiques (cf. fig. 10), i.e. qu'elles correspondent à la Σn représentée en figure 11B. Elles ne comportent pas de variation comme celles obtenues avec l'extrait lipidique partiel et le DGDG en présence de Mn^{2+} (fig. 12). Nous reviendrons sur l'allure de ces courbes à la fin de cette section.

Le Tableau 7 nous donne les résultats obtenus pour les divers lipides dans des conditions variables de concentrations et d'espèces cationiques.

Les résultats montrent une décroissance de la valeur de k_1 , en fonction de la concentration d'une même espèce cationique. Ce fait démontre que le cation est bien l'élément déclencheur de cette réaction de la dimérisation.

Les conditions limites étudiées ont été déterminées par les limites de l'enregistreur temporaire pour ce qui est des temps de la réaction. Les concentrations des vésicules ont été établies de façon à pouvoir enregistrer une courbe de cinétique significative dans les cas des plus grandes concentrations cationiques. La concentration cationique inférieure correspond à une variation presque nulle de la turbidité des vésicules après

INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE TRANSMISE

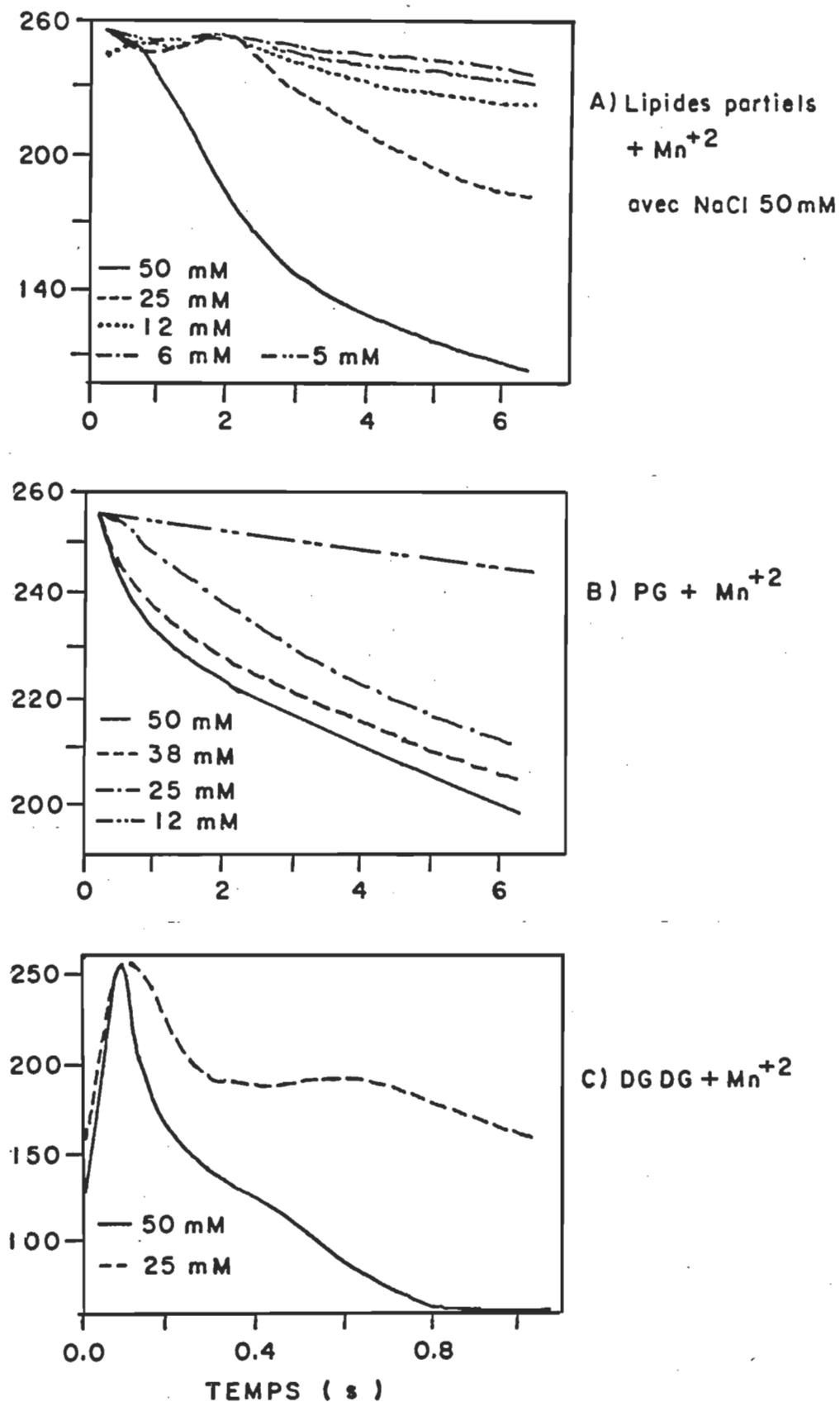


Figure 12: Variation de l'intensité de la lumière transmise des vésicules en fonction du temps d'incubation avec les cations.

l'addition des cations (cf. à la figure 12A et B). La concentration des lipides fut gardée à 0.5 mg/ml et, comme les rayons de ces dernières sont à peu près équivalents (cf. profil d'élution, figure 7) on a donc une concentration égale de vésicules d'une préparation à l'autre. Ainsi il fut déterminé que la variation de l'intensité de la lumière transmise pour la dimérisation correspondait à 15 unités de valeur arbitraire de la digitalisation. Cette variation est représentée à la figure 10 par les paramètres I_0 , intensité de la lumière mesurée initialement, et I_D , intensité de la lumière mesurée après la dimérisation. Expérimentalement, cette valeur s'établit par la différence d'intensité de lumière mesurée lorsqu'une solution de vésicules remplace une solution de tampon dans la cellule de réaction.

Cette valeur de 15 unités s'est avérée répétitive pour la concentration de vésicules utilisée.

L'analyse du Tableau 7 (parties A et B) nous renseigne sur le comportement des différents types de lipides lors du processus de la coagulation en présence de diverses concentrations de chlorures de cations divalents. Pour chacune des préparations de vésicules analysées on distingue nettement les catégories de résultats de Ca^{2+} et Mn^{2+} de ceux obtenus en présence du Mg^{2+} .

Dans la majorité des cas les valeurs obtenues avec le Mg^{2+} sont plus faibles que celles des autres, il en était aussi ainsi pour les concentrations limites de la coagulation où le Mg^{2+} semblait moins

Tableau 7

A) Constantes de la dimérisation

Espèce lipidique	[Cat]	$k_1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
PA	0,1 mM < Mn^{2+} < 5 mM	688 à 1 250
	0,1 mM < Ca^{2+} < 5 mM	440 à 2 200
	0,1 mM < Mg^{2+} < 5 mM	30 à 1 600
PS	1,5 < Mn^{2+} < 6 mM	1 900 à 7 500
	1,5 < Ca^{2+} < 5 mM	1 250 à 7 500
	Mg^{2+} : 5 mM	2 500
PG (pH 8,0)	12 mM < Mn^{2+} < 50 mM	0,3 à 1,5
	12 mM < Ca^{2+} < 50 mM	1,5 à 24
	38 mM < Mg^{2+} < 50 mM	0,3 à 0,9
PG (s,s) pH 8,0	2 mM < Mn^{2+} < 10 mM	5
	5 mM < Ca^{2+} < 8 mM	12
	8 mM < Mg^{2+} < 10 mM	2 à 7
PG (pH 3,0)	8 mM < Mn^{2+} < 50 mM	0,15 à 6
	25 mM < Ca^{2+} < 50 mM	0,6 à 1,2
	38 mM < Mg^{2+} < 50 mM	0,12 à 0,24
DGDG (S,S)	25 mM < Mn^{2+} < 50 mM	200
	20 mM < Ca^{2+} < 38 mM	38 à 168
	20 mM < Mg^{2+} < 38 mM	114 à 164
Extrait lipidique partiel	2 mM < Mn^{2+} < 50 mM	2 à 40
	20 mM < Ca^{2+} < 50 mM	2 à 8
	38 mM < Mg^{2+} < 50 mM	6
Extrait lipidique partiel (s,s)	8 mM < Mn^{2+} < 50 mM	1,2 à 48
	10 mM < Ca^{2+} < 50 mM	4 à 60
	10 mM < Mg^{2+} < 50 mM	70
	Na^+ : 50 mM	8

s,s le tampon ne contient pas de NaCl.

N.B. Les valeurs de k_1 sont nulles pour les concentrations cationiques plus faibles que celles indiquées.

Tableau 7

B) Tableau résumé des écarts maximums mesurés

PA : 3×10^7 à $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

PS : 1×10^9 à $7,5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

PG : 1×10^5 à $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

DGDG : 3×10^7 à $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Extrait: 2×10^6 à $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

efficace que les Ca^{2+} et Mn^{2+} . Dans ce tableau-ci on remarque que les valeurs pour le Mg^{2+} sont plus faibles que celles obtenues avec les autres cations. Le Tableau 7B nous aidera pour le reste de l'analyse puisqu'on a regroupé les valeurs limites de la constante de dimérisation obtenues pour une catégorie de lipides. La PS est le lipide qui se coagule le plus rapidement avec des constantes mesurées supérieures à $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tandis que l'acide phosphatidique malgré des concentrations limites de coagulation inférieures d'un facteur de 10 à la PS, nous donne des valeurs limites de coagulation inférieures à celles de la PS: 3×10^7 à $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Dans le cas des vésicules faites à partir de la phosphatidylglycerol, il est impossible de mesurer des constantes de réaction aussi élevées, même si la concentration cationique est augmentée jusqu'à 50 mM. Le Ca^{2+} nous donne les plus hautes séquences où la valeur maximale approche $2.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Les cations Mn^{2+} et Mg^{2+} nous donnent des valeurs plus faibles, à une concentration cationique de 50 mM, i.e. 1.5×10^7 et $0.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Par ailleurs, si l'on enlève le Na^+ , préparant les vésicules de PG dans du tampon Tris HCl 10 mM pH 8.0 l'ordre de grandeur de la constante de la réaction ne change pas, sauf pour le Mg^{2+} qui montre une variation $\times 10$ de la valeur de k_1 . Dans ce cas l'on observe aussi une variation dans la concentration critique de la coagulation. Il devient donc évident qu'il y a une compétition entre le Na^+ et le Mg^{2+} pour un même site de fixation ou

d'action sur les vésicules de PG. Les valeurs obtenues pour le Ca^{2+} et le Mn^{2+} changent de façon moins significative.

Le DGDG nous donne des valeurs de k_1 supérieures à celles de la PG (10^8 au lieu de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) malgré le fait que la concentration cationique de la coagulation soit supérieure. Il ne semble pas y avoir de variations significatives entre les valeurs obtenues pour les trois cations. L'effet du NaCl sur les vésicules de DGDG est important, la concentration cationique critique de coagulation dépasse les concentrations initiales utilisées pour déterminer les cinétiques de réaction, i.e. 50 mM en CaCl_2 , MgCl_2 et MnCl_2 .

L'extrait lipidique partiel des membranes des thylacoïdes montre des valeurs intermédiaires entre celles obtenues pour la PG et le DGDG. Nous devons toutefois noter que nous n'avons pas réussi à obtenir de valeur aussi faibles que celles obtenues avec des vésicules de PG.

L'allure des courbes obtenues est typique dans les cas des lipides anioniques, mais le DGDG et l'extrait partiel des lipides des thylacoïdes montrent la formation d'un plateau avant que la coagulation se produise.

Les lipides partiels montrent une anomalie après 2 secondes lorsque la concentration cationique est faible. A notre avis cette anomalie est due à une compétition entre la PG et le DGDG puisque les temps d'agrégation

sont nettement différents, de l'ordre de près de dix fois plus rapide dans le cas de la DGDG comparativement au PG (Tableau 7B). L'effet est moindre à forte concentration de cations puisque le temps de dimérisation de la PG augmente pour rejoindre celui du DGDG. Il nous est difficile de tirer une conclusion certaine sur le lipide qui limite la réaction dans le cas de l'extrait partiel puisque les vésicules pures de DGDG montrent un tracé de courbe semblable à faible concentration cationique tandis que la PG semble déterminer le temps de la réaction.

C) DISCUSSION

Dans les cas où une faible quantité de cations peuvent induire la coagulation, on note une constante de la dimérisation plus élevée, de l'ordre de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dans les cas des lipides extraits des membranes du thylacoïde les valeurs obtenues autant pour la concentration limite de la coagulation que pour les constantes de la dimérisation se comparent à celles obtenues pour la PG et le DGDG. Pas surprenant puisqu'ils constituent la majeure partie de ces lipides. Ce qui est plutôt surprenant dans ce cas c'est l'écart qui existe entre les deux groupes de constantes. Les lipides anioniques PA et PS montrent des valeurs s'approchant de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ tandis que les lipides neutres tel le DGDG, l'ordre de grandeur est de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et la PG, pourtant un lipide anionique donne une valeur inférieure à $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, i.e. cent fois moins que ses congénères PA et PS.

Il est possible de distinguer au niveau cinétique si les valeurs de k_1 sont déterminées seulement par la vitesse de diffusion de deux vésicules ou si le processus est ralenti par une variation quelconque au niveau de l'interface. Smoluchowski⁴⁹ établit une relation permettant d'évaluer une constante de réaction à partir d'une réaction bimoléculaire:

$$k_1 = 8\pi NRD$$

où D est la relation de Stokes-Einstein:

$$D = kT/6\pi\eta R$$

N est le nombre d'Avogadro, $6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$

η est la viscosité du milieu 0,0097 P

R est le rayon de la vésicule

k, la constante de Boltzmann

et T, la température en Kelvin.

$$\text{On évalue ainsi } k_1 = \frac{4kTN}{3\eta} = 3.36 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

On se rend donc compte que pour les lipides anioniques PA et PS, les valeurs obtenues s'approchent de la valeur théorique et ce pour la concentration cationique maximale. Lorsqu'elle est plus faible, cette valeur diminue et laisse supposer une diminution dans l'efficacité des

collisions. Nous devons mentionner que les valeurs obtenues pour la PA et la PS sont approximativement 100 fois plus élevées que celles obtenues par Lansman et Haynes⁴². Quoique l'on ne puisse expliquer cette différence, on peut néanmoins se référer à Pryor et coll.⁵⁰ qui ont obtenu une valeur cent fois plus élevée que celle de Kolber et Haynes⁵¹ pour la constante de la dimérisation de vésicules constituées de dimyristoylphosphatidyléthanolamine. Ces auteurs ne parviennent pas non plus à expliquer la différence si ce n'est qu'en de vagues spéculations au sujet des dimensions et du nombre de lipides constituant la vésicule. Mais la variation de ce paramètre ne peut expliquer des valeurs qui diffèrent par un facteur de 100. Tout au plus peut-il expliquer un facteur de 2 ou 3. Nous devons toutefois ajouter que dans les mesures de Lansman et Haynes⁴⁰ au Tableau 1, ils indiquent une concentration cationique de 50 mM comme étant celle utilisée pour la majorité des calculs. Les valeurs de concentration cationiques servant à notre calcul sont inférieures à 5 mM pour la PA et la PS. Ces mêmes auteurs observent une diminution dans la cinétique de la dimérisation lorsque la concentration cationique dépasse la concentration critique de la coagulation, or, selon nos évaluations, ce seuil est à 0.1 mM pour la PA et 1 mM pour la PS. Il se peut donc que la trop forte concentration cationique modifie les interfaces de façon à rendre la dimérisation plus difficile, peut-être par une répulsion électrostatique due à la fixation des cations sur la surface.

Néanmoins nous constatons par ce calcul que les autres lipides utilisés n'obéissent pas au patron de la diffusion et qu'une modification doit

être apportée pour expliquer les résultats. Comme la PA a une valeur de k_1 plus caractéristique des lipides extraits et du DGDG, les forces qui nuisent à la coagulation rapide sont sans doute les mêmes. Rien ne nous permet de présumer que le nombre de collisions ait diminué. Comme les vésicules ont approximativement le même rayon il ne reste qu'à considérer l'efficacité des collisions: toutes les collisions ne mènent pas à la dimérisation dans les cas des lipides extraits des thylacoïdes, de la PG et du DGDG. Dans l'ensemble, il est nécessaire de fournir une concentration cationique plus élevée afin d'augmenter l'efficacité des collisions.

Les résultats nous permettent donc de classer les lipides utilisés en deux catégories: PA et PS puis les lipides extraits des thylacoïdes incluant la PG puis le DGDG, qui en sont deux représentants majeurs. L'autre facteur à faire ressortir de cette étude est la quantité de cations divalents nécessaires pour induire la coagulation ou pour briser la stabilité des systèmes neutres.

Si l'on reprend les hypothèses sur le mécanisme de la fusion, on demande une déshydratation de l'interface¹⁷. L'induction de la fusion par les cations s'explique de cette façon lorsque les cations sont fixés sur les membranes, comme dans les cas des lipides anioniques PA et PS. Ce modèle a d'ailleurs été largement discuté^{42,43} puis commenté^{52,53}. Selon ce dernier, la présence des ions divalents sur l'interface, en plus de neutraliser les charges de la surface pour enrayer la répulsion électrostatique, doit induire un réarrangement des molécules d'eau de

l'interface afin que l'énergie à fournir pour déshydrater le site d'impact soit plus faible. Pour les lipides neutres, il n'y a pas de modèle expliquant la dimérisation, à moins que les cations s'y fixent comme dans les cas des lipides anioniques. C'est ce que nous avons vérifié. Les isothermes d'adsorption des cations sur les lipides anioniques et neutres font l'objet du prochain chapitre. Si les cations ne se fixent pas sur ces lipides, nous pourrions assister à une déstabilisation des couches d'hydratation autour des vésicules neutres induite par la présence des cations. Nous reviendrons alors aux systèmes caractérisés par Rand et coll.^{13,15,17} et cités dans l'Introduction (section 3).

Reprenant la structure du thylacoïde et les effets des cations divalents sur le degré d'empilement, nous constatons par ce résultat qu'il faut une très grande quantité de cations divalents pour briser la stabilité des lipides extraits des membranes thylacoïdiennes. L'effet du Mn^{2+} sur les extraits partiels de lipides est à souligner, n'étant peu ou pas affecté par la neutralité du système. Il semble pouvoir interagir aussi facilement avec les lipides chargés que neutres. Attendons la fin du prochain chapitre afin de tenter d'expliquer les différences entre les cations.

CHAPITRE IV

ISOTHERMES D'ADSORPTION DES CATIONS SUR LES VÉSICULES LIPIDIQUES

La mesure des paramètres de fixation des cations sur les lipides a un double but. En plus de fournir des renseignements sur les interactions cations-lipides, cette mesure nous permettra de caractériser davantage le contrôle électrostatique que ces derniers peuvent avoir sur le phénomène d'agrégation. L'étude de la fixation des cations sur les lipides partiels extraits des membranes des thylacoïdes nous fournira des renseignements très intéressants sur le rôle que ces derniers peuvent "jouer" sur l'empilement des membranes des thylacoïdes.

La méthode de désalage par dialyse telle qu'utilisée nous permet de retenir principalement les cations qui sont en interaction avec les lipides.

La PA, la PS et la PG sont des lipides anioniques et peuvent de ce fait retenir, par attraction électrostatique, les cations mis en leur présence²⁰. La dialyse contre un tampon sans sel inorganique auquel nous soumettons les vésicules devrait mener à un désalage complet des vésicules puisque l'équilibre de concentration des différents cations est à refaire lorsque nous changeons les tampons de dialyse. Nous croyons

que les cations restant avec les lipides après la période de désalage ne contribuent plus à la concentration cationique de la solution mais sont en interaction forte avec le lipide.

A) RÉSULTATS

Les Tableaux 8A, B et C présentent les résultats obtenus sur les ratios (Cat/Pi) des dosages des cations (Cat) et des phospholipides (Pi) qui demeurent fixés sur les lipides après la dialyse. La concentration cationique initiale $[Cat]^0$ est celle mise en présence des vésicules préparées dans un NaCl 100 mM. La concentration des lipides se situe entre 200 et 300 μ M. Les mesures de cations résiduels après la dialyse ont été faites par absorption atomique et les lipides furent dosés par le taux de phosphate qu'ils contiennent. Les ratios Cat/Pi ont donc été établis pour chacun des sacs à dialyse. La quantité de cations résiduels après la fixation fut évaluée par la soustraction entre la quantité initiale et la quantité évaluée après la dialyse. L'utilisation du coefficient d'activité au lieu de la concentration cationique nous permet d'évaluer le nombre d'ions effectifs dans la solution ce qui est très important à notre avis lorsque l'on mesure les interactions qui peuvent se produire entre une molécule de phospholipide et un ion. Comme l'action des cations divalents sur les vésicules se fait dans un tampon contenant du NaCl 100 mM, à cette force ionique, seulement 35-45% des ions sont présents

Tableau 8

Concentration cationique résiduelle après la dialyse

A) Acide phosphatidique

[Cat] ^o (mM)	Mg ²⁺	Cat/Pi Mn ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	[A] Mn ²⁺	Ca ²⁺
0,05	0,12 (0,18)*	0,23	0,30	0,05	0,017	0,011	0,008
0,10	0,15 (0,25)	0,35	0,38	0,04	0,038	0,026	0,025
0,20	0,36	--	--	--	0,074	--	--
0,40	0,45	--	--	--	0,160	--	--
0,50	0,54	0,51	0,79	0,02	0,200	0,18	0,168
2	0,74	0,64	0,88	0,01	0,868	0,776	0,764
5	0,75	0,65	0,91	0,01	2,20	1,81	1,81
10	0,76	0,75	0,93	0,01	4,16	3,46	3,46

* Les concentrations entre parenthèses sont les valeurs corrigées pour tenir compte de l'imperméabilité des vésicules aux cations.

** Les valeurs de [A], les activités ioniques sont évaluées à partir du Tableau retrouvé dans la référence 5. A noter que la présence du NaCl 100 mM contribue pour la majeure partie des ions dans le calcul de la force ionique.

Tableau 8

Concentration cationique résiduelle après la dialyse

B) Phosphatidylglycérol

[Cat] ^o (mM)	Mg ²⁺	Cat/Pi Mn ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	[A] Mn ²⁺	Ca ⁺
0,1	0,03	0,05	0,05	0,09	0,032	0,02	0,02
0,2	0,03	0,05	0,05	0,09	0,076	0,06	0,06
0,5	0,03	0,06	0,05	0,09	0,21	0,18	0,18
1	0,05	0,14	0,06	0,03	0,428	0,34	0,38
5	0,07	0,20	0,08	0,03	2,22	1,92	1,97
10	0,08	0,21	0,14	0,01	4,17	3,63	3,65
20	0,12	0,17	0,14	N.D.	7,96	6,93	6,96

Tableau 8

Concentration cationique résiduelle après la dialyse

C) Phosphatidylsérine

[Cat] ^o (mM)	Mg ²⁺	Cat/Pi Mn ²⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	[A] Mn ²⁺	Ca ²⁺
0,1	0,048 (0,072)	0,10 (0,15)	0,07 (0,11)	0,10	0,023	00	0,012
0,2	0,046 (0,069)	0,13 (0,20)	0,08 (0,12)	0,07	0,070	0,068	0,048
0,5	0,046 (0,069)	0,20 (0,30)	0,09 (0,14)	0,12	0,21	0,12	0,16
1	0,058 (0,087)	0,52	0,17 (0,26)	0,03	0,42	0,23	0,33
3	0,21	0,38	0,32	--	1,26	0,99	1,02
5	0,19	0,92	0,46	0,03	2,16	1,51	1,68
10	0,24	1,0	0,5	0,02	4,1	3,2	3,3

sous forme monomérique⁵⁷. Les concentrations cationiques initiales sont donc évaluées en activité en tenant compte des coefficients d'activité déterminés auparavant.

Dans le tableau, au niveau des colonnes représentant la concentration finale des cations fixés sur les lipides, les valeurs données entre parenthèses sont des valeurs corrigées afin de tenir compte de l'imperméabilité des membranes lipidiques aux cations^{54,55}. Les valeurs ont donc été multipliées par 1.5 afin de tenir compte du ratio des lipides retrouvés dans les vésicules unilamellaires⁴. Cette correction s'applique uniquement lorsque la concentration cationique est inférieure à la concentration critique de la coagulation (Tableau 5). Nous supposons qu'à cette concentration il y a lyse des vésicules et que les cations peuvent accéder aux lipides situés sur la face interne des vésicules.

L'analyse du tableau ne nous renseigne pas tellement sur le comportement de ces systèmes en présence des cations.

L'expression de la fixation des cations (Cat/Pi) sur les vésicules lipidiques en fonction de la concentration initiale des cations est représentée en figure 13. La première observation à relever est qu'il ne présente que les valeurs obtenues pour les lipides PA, PS et PG tout simplement parce que le désalage enlève complètement les cations des membranes de DGDG et de l'extrait lipidique partiel des thylacoïdes. Nous

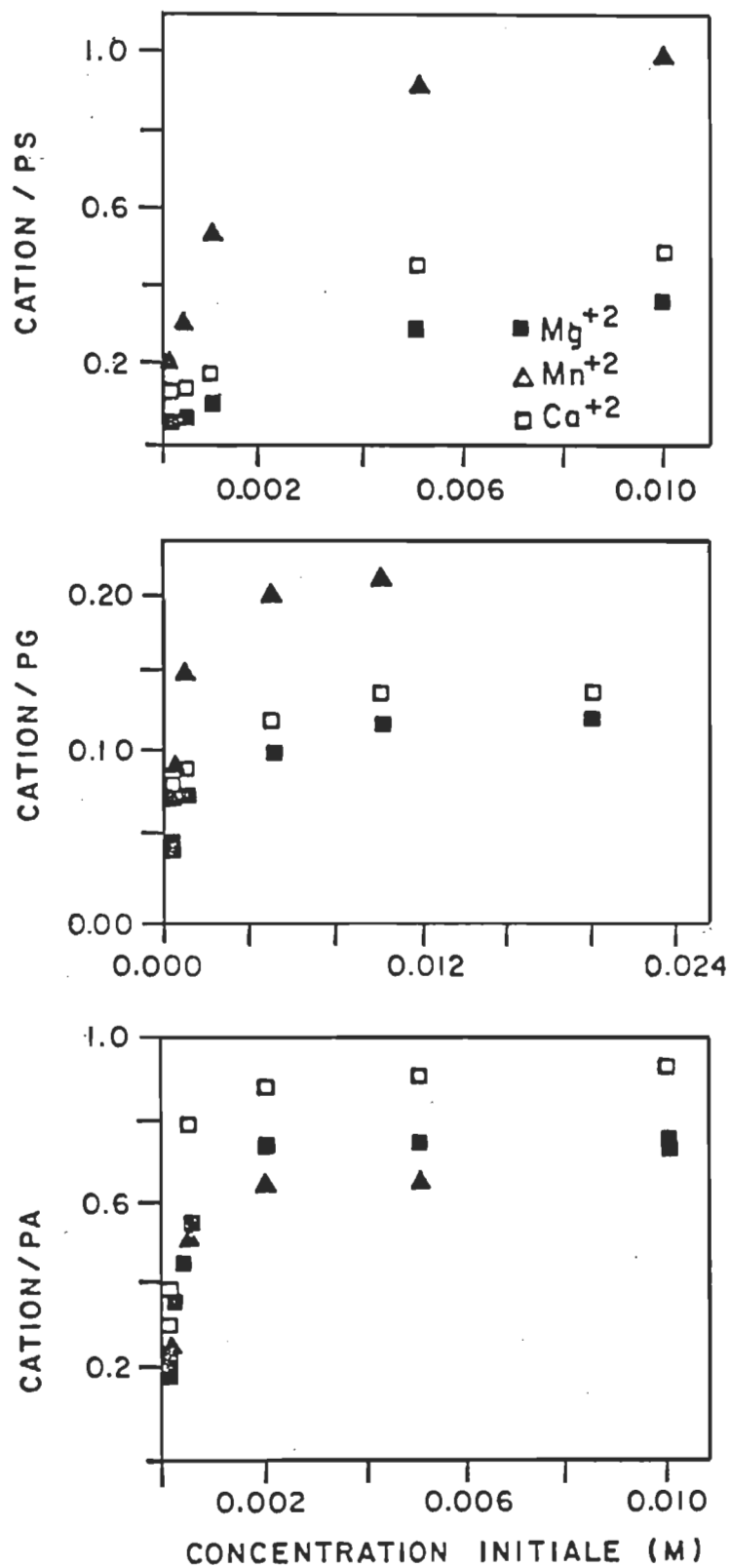


Figure 13: Isothermes d'adsorption des cations sur les lipides anioniques.

reviendrons sur cet aspect dans la partie B (Discussion) car il est très important dans le cas spécifique des membranes des thylacoïdes.

Au sujet des isothermes présentés, un aspect intéressant à noter est la valeur de n , la quantité de cations retrouvés par lipide. Elle s'approche de l'unité pour la PA, dans le cas de la PS, on distingue deux comportements, 0.5 pour Ca^{2+} et Mg^{2+} tandis que le Mn^{2+} s'approche du ratio idéal de 1. Les vésicules formées de PG retiennent peu de cations, la valeur maximale trouvée est de 0.25.

Autre fait notable est la lente fixation du Mg^{2+} comparativement au Ca^{2+} et au Mn^{2+} .

Nous retrouvons le même comportement lorsque l'on trace ce qu'il est convenu d'appeler la courbe des inverses tel que proposé par Scatchard⁵⁸

$$\frac{1}{\bar{v}} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nk_A} \cdot \frac{1}{[A]}$$

où \bar{v} est le nombre de cation lié par lipide ou dit communément, le ratio Cat/ P_i . Les autres paramètres sont n , le nombre maximal de cation retrouvé par lipide et K_A , la constante d'association entre le cation et le lipide. Le tracé de la courbe entre $1/\bar{v}$ et $1/A$ (où A est l'activité cationique à l'équilibre) nous permettra d'établir les paramètres n et K_A .

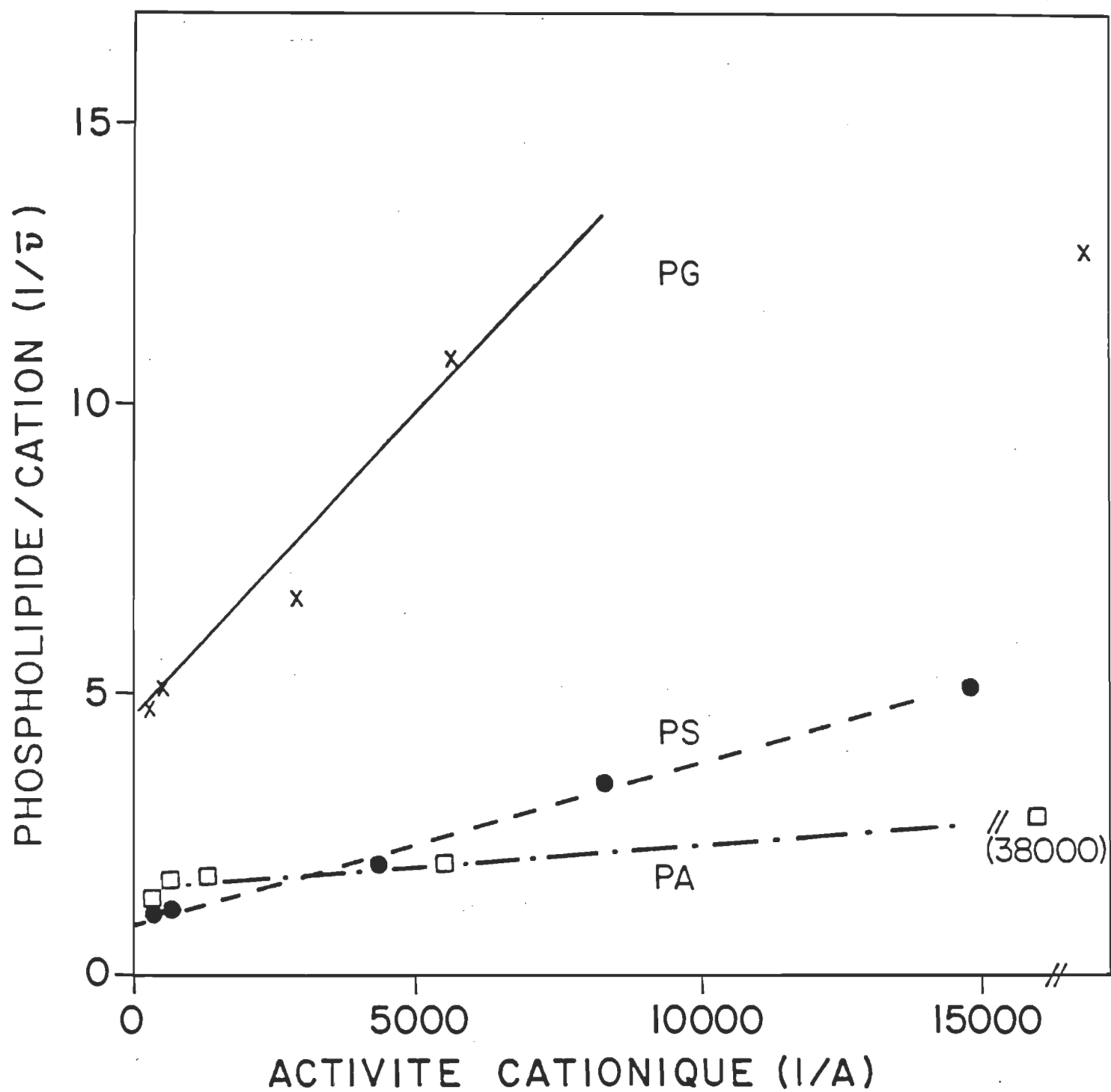


Figure 14: Courbe des inverses provenant des isothermes d'adsorption.

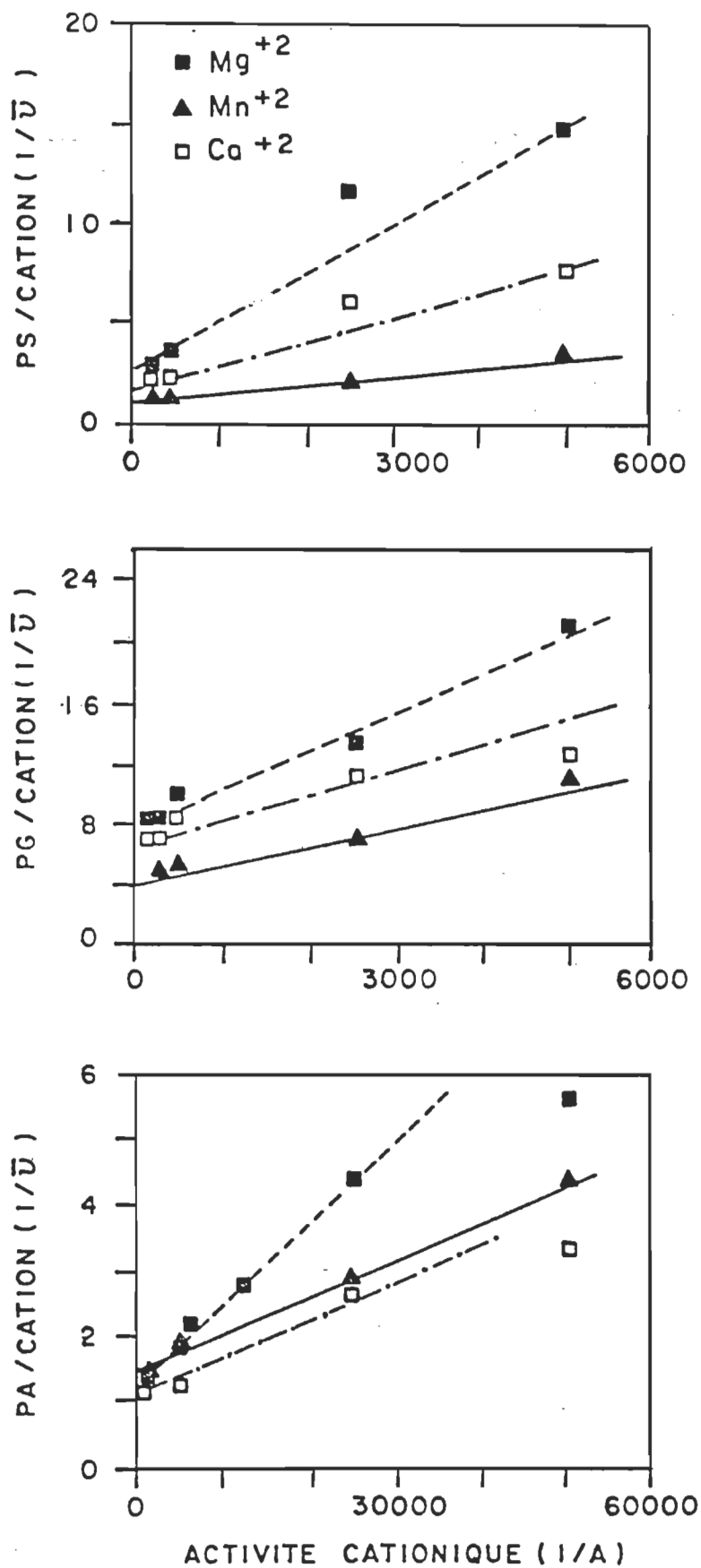


Figure 15: Courbes des inverses: $P_i/\text{cation} = f(\text{activité cationique})$.

Toutefois une surprise nous attend puisque le tracé de ces courbes n'est pas linéaire (fig. 14) mais plutôt semble se stabiliser aux faibles activités cationiques. De deux choses l'une, ou les valeurs aux faibles concentrations cationiques sont erronées suite aux capacités de l'absorption atomique ou il y a deux modes de fixations des cations sur les phospholipides. Nous tenons à faire remarquer que ce phénomène ne se produit pas dans le cas de la PA. Nous tenons à rappeler que deux modes d'association cation-PS ont déjà été mentionnés^{59,60} mais nous ne pouvons expliquer ce comportement à moins qu'il y ait compétition avec un autre site de fixation.

Si l'on revient à la méthode expérimentale de la formation des vésicules, le tampon de dispersion contient du NaCl 100 mM. Or, le dosage du Na par absorption atomique après la dialyse nous permet de constater qu'il y en a encore de fixé sur les phospholipides. A forte concentration de cations divalents ils sont déplacés (Tableau 8) presque complètement tandis qu'à faible concentration ils demeurent fixés sauf dans le cas de la PA où les cations divalents parviennent à déplacer le Na⁺ sur les sites d'interaction. Cette possibilité fut d'ailleurs déjà proposée par Kurland et coll.⁶¹ pour le cas de la fixation des cations sur la PS. Si l'on enlève ces points où la quantité de Na⁺ sur les lipides est trop grande, $1/A > 5\,000$ pour la PS et la PG, la courbe $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{A}\right)$ nous permet alors d'obtenir les paramètres n et K_A (fig. 15). Alors nous

pouvons considérer les paramètres de la fixation des cations sur les phospholipides anioniques.

Au Tableau 9 nous retrouvons ces paramètres compilés pour les différents lipides et les différents cations: Mg^{2+} , Ca^{2+} et Mn^{2+} . Un indice de la validité de ce calcul est la valeur de n obtenue par les courbes des inverses. Cette valeur de n correspond au ratio maximal de la fixation des cations sur les lipides tel qu'obtenu par le tracé des isothermes (fig. 13). La signification de ces valeurs sera précisée à la section 1 de la discussion de ce chapitre. Cette courbe nous permet aussi d'évaluer les valeurs de K_A , la constante d'association entre le cation et le lipide. Cette valeur est très importante car elle nous indique la force de l'interaction liant le cation et le lipide.

Avant de discuter de ces valeurs, comparons-les avec d'autres recueillies dans la littérature, parce que les méthodes de mesure diffèrent. Notons aussi que cette méthode nous permet de démontrer qu'il n'y a pas de cation divalent qui demeure fixé sur les vésicules après le désalage lorsqu'elles sont fabriquées à partir du DGDG ou de l'extrait partiel des lipides des thylacoïdes. On retrouve ces valeurs de la littérature au Tableau 10. Il est à remarquer que sont exclues de ce tableau les valeurs de K_A obtenues par les auteurs qui utilisent l'équation de Stern où la fixation des cations est évaluée à partir de la variation du potentiel de la surface.

Tableau 9

Paramètres de la fixation des cations sur les phospholipides anioniques

Cation	PA		PG		PS	
	n	k(M ⁻¹)	n	K(M ⁻¹)	n	k(M ⁻¹)
Mg ²⁺	0.75 (0.99)	12 800	0.12 (0.99)	3 000	0.25 (0.97)	1 700
Ca ²⁺	0.93 (0.99)	28 100	0.13 (0.94)	8 000	0.57 (0.99)	2 000
Mn ²⁺	0.65 (0.99)	50 200	0.23 (0.98)	3 900	1.15 (0.99)	3 100

Les valeurs entre parenthèses représentent les coefficients de corrélation obtenus pour les courbes de fixation $\frac{1}{v} = f\left(\frac{1}{A}\right)$.

Tableau 10

Comparaison entre les constantes d'association K_A des cations divalents liés sur les phospholipides déterminées par ce travail (A) et par d'autres travaux (B)

Lipide ^a	Cation	A	B		Ref.
		K _A (M ⁻¹) ^b	K _A (M ⁻¹)		
PA	Mg ²⁺	12 800	9 700		70
	Ca ²⁺	28 100	16 000		70
	Mn ²⁺	50 200	58 000	190 ^c	74
			35 000	290	74
PG	Mn ²⁺	3 900	1 200	250	87
PS	Mg ²⁺	1 700	1 600	100	59
			18 000	100	67
	Ca ²⁺	2 000	3 900	100	59
			1 200 - 2 900 ^d	100	67
			2 600 - 8 100 ^e	100	67
			24 000		60
			2 300		60
	Mn ²⁺	3 100	2 000	160	87

a) PA, acide phosphatidique; PG, phosphatidylglycérol; PS, phosphatidyl-sérine.

b) La concentration du NaCl dans le milieu d'incubation est de 100 mM.

c) La concentration du NaCl dans le milieu d'incubation.

d) Grandes vésicules.

e) Petites vésicules.

Succintement, l'évaluation de la constante d'association à partir de la relation de Stern provient du même développement de la neutralisation successive des sites d'adsorption sur une surface. L'emploi du développement de Stern provient dans certains cas de l'évaluation du potentiel au site de l'adsorption de la molécule. Ce fait a été démontré par le groupe de McLaughlin où ils utilisèrent les variations dans les mesures de la conductance⁶² ou de la mobilité électrophorétique⁶³ dues à l'adsorption de molécules sur des vésicules lipidiques anioniques afin d'évaluer le potentiel au site d'occupation de l'adsorbant.

L'application de la relation de Boltzmann

$$[A^-]_{x=0} = [A^-] \exp(Ze\psi_0/kT) \quad (1)$$

leur permet d'évaluer la concentration de l'adsorbant à la surface de la membrane. L'évaluation du potentiel à la surface se fait, suite à l'application de la relation Poisson-Boltzmann:

$$\sigma = \frac{\epsilon\kappa}{4\pi} \psi_0 \quad (2)$$

où κ est la longueur de Debye.

L'application de la relation de Langmuir suite à ce traitement des données permet d'évaluer la constante de dissociation:

$$\sigma = \frac{1}{K_D} (\sigma^{\max} - \sigma) [A^-]_{x=0} \quad (3)$$

où σ est le nombre de molécules adsorbées par unité de surface et $[A^-]_{x=0}$ est la concentration aqueuse de l'espèce adsorbée à l'interface.

La critique que nous pouvons faire de cette méthode d'évaluation des paramètres d'association d'une molécule sur une surface chargée provient de la méconnaissance des charges de surface d'une vésicule et de l'effet de la molécule adsorbée sur ces charges de surface.

Dans un article expliquant le principe de l'évaluation, McLaughlin et Harary⁸⁴ devaient postuler des pKa de 1 pour le groupement phosphate et de 10 pour le groupement amine. Ces évaluations sont contraires aux valeurs obtenues par divers auteurs et techniques (cf. discussion de ce chapitre).

De plus, les valeurs qu'ils obtiennent par cette méthode de mesure concernent la constante d'association des molécules à l'interface aqueuse. Ce n'est pas nécessairement à cette position que se situent les cations que nous mesurons, puisque par la dialyse nous laissons les cations qui sont en interactions fortes avec la tête polaire des lipides.

B) DISCUSSION

1) Discussion sur les valeurs de n

Les valeurs obtenues pour n sont importantes vu qu'elles représentent le nombre de cation fixé par unité de phospholipide.

Dans le cas de la PA, le comportement $n \rightarrow 1$ idéal est obtenu dans le cas de la fixation du calcium sur l'acide phosphatidique. Quant à la PS, on remarque une valeur de $n \rightarrow 1$ dans le cas de la fixation du Mn^{2+} mais le Ca^{2+} semble vouloir former un complexe $Ca(PS)_2$. Le Mg^{2+} se lie faiblement à la PS. Son comportement ressemble à celui des cations avec la PG, i.e. une valeur maximale d'environ 0.20.

Comme les valeurs de n sont dispersées de 0.1 à 1, il est difficile de généraliser un comportement des cations en présence des phospholipides.

L'analyse de la littérature nous permettra de vérifier la concordance de ces résultats. On ne trouve pas beaucoup d'études où les valeurs de n sont évaluées. Ainsi dans le cas de la PS, Newton et coll.⁵⁵ obtiennent le même type d'isothermes avec Ca^{2+} et

Mg²⁺ et un plafonnement à $n = 0,5$. Portis⁵⁹ arrive aussi à la conclusion qu'un complexe 2:1 est formé entre le lipide et les cations, soit Ca²⁺ et Mg²⁺. Plus récemment, la formation du complexe Ca(PS)₂ a été confirmée⁶⁵. Dans le cas du Mn²⁺, Hauser⁶⁶ trouva une valeur $n = 0,87$ donc se rapprochant de $n = 1$. Rehfeld et coll.⁶⁷ obtiennent des ratios qui varient entre 0,3 et 0,6 pour les fixations de Mg²⁺ et Ca²⁺ sur la PS.

Le cas de la PG demeure une énigme, mais Lau et coll.⁶⁸ notèrent le même comportement envers le cobalt, i.e. un degré de fixation plus faible que 20%.

L'interprétation de ces valeurs de n peut se faire de deux façons. L'une retrouvée dans Rehfeld et coll.⁶⁷ consiste à supposer la présence de complexes à indices stœchiométriques variables dépendamment de la concentration initiale de cations. Mais il est difficile de concevoir de tels complexes variables à l'intérieur de la monocouche lipidique.

L'autre hypothèse provenant des premiers travaux sur la fixation des cations^{69,70} relie la fixation des cations sur les phospholipides à une réaction de complexation:



où le proton H^+ est délogé de la tête polaire des phospholipides. Les travaux sur monocouches de Rojas et Tobias⁷¹, Papahadjopoulos⁷², Seimiya et Ohki⁷³ et Bulkin et Hauser^{73a} confirment la dépendance au pH de la fixation des cations sur les phospholipides. Néanmoins, nous avons vérifié cette hypothèse de la libération des ions H^+ lors de la fixation des cations en mesurant le pH de la solution aqueuse où la réaction avait lieu. Dans tous les cas on observe une diminution du pH, plus importante dans les cas de la PA et de la PS et faible dans le cas de la PG (Tableau 11). La différence dans le nombre de protons libérés provient de la nature chimique de la tête polaire et de la valeur n . Pour le cas de la PA, on y retrouve deux fonctions pouvant fournir des protons sur le groupelement phosphate. Papahadjopoulos²⁰ évalue les pK_a de ces deux fonctions acides à 3.5 et à une valeur située entre 6.5 et 9.5 pour le second. Comme la mesure de la fixation des cations fut faite à pH 8.0, la valeur du pH du tampon influence le degré d'ionisation des phospholipides et peut perturber l'interface lors de la fixation des cations. Nous pouvons donc classer les cations Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} comme ayant une plus ou moins grande facilité à déloger les protons du groupement phosphate. Dans le cas de la PS, le problème est plus complexe puisque nous avons à faire à 3 groupements "déprotonables". Papahadjopoulos⁷² évalue les 3 pK_a de la PS à moins de 3.5, une valeur entre 3 et 5.5 et un troisième à 9.2. Seimiya et Ohki²¹ amènent des valeurs plus faibles: 3.7, 4.0 et 7.5

Tableau 11

Variation du pH*

Lipide	Cat (mM)	pH
PA	0 et 6	6,3 à 5,0
PS	0 et 6	5,7 à 3,7
PG	0 et 6	7,6 à 6,5

Méthode: Conc. de lipides: 0,5 mM

Mesures de pH: - échantillon contenant le cation dans l'eau.
 - échantillon contenant le cation et le lipide dans l'eau.

* Déterminée avec un électrode combinée au calomel.

respectivement pour les groupements phosphate carboxyle et amines. On doit donc s'attendre à un ratio de fixation de 1:1 dans ce cas aussi. Seul le Mn^{2+} semble vouloir se conformer à cette règle. Tel que déjà mentionné, les complexes $Ca(PS)_2$ et $Mg(PS)_2$ ont déjà fait l'objet d'études. Il est à noter que ces complexes se forment différemment, le Ca^{2+} formant un complexe dit "trans" entre deux têtes polaires opposées^{59,60} tandis que le Mg^{2+} préfère complexer entre deux PS adjacents⁵⁹.

Le cas de la PG est plus simple, seule une fonction ionisable est présente. Nous évaluons la valeur du pKa à 4 puisqu'il s'agit d'une fonction acide située sur le groupement phosphate. Ce faible ratio de fixation tient probablement de l'encombrement stérique provoqué par le glycérol fixé sur le phosphate. Il masque les possibilités de liaisons entre le cation et le phospholipide. Le même comportement a été rapporté par Puskin⁷⁴ sur la fixation du Mn^{2+} sur la cardiolipine. Je rappelle que ce lipide double possède un groupement glycérol qui fait un pont moléculaire liant les deux acides phosphatidiques.

2) Discussion sur les valeurs de K_A

La valeur de K_A nous indique la stabilité relative du complexe auquel nous référons. Ainsi une forte valeur de K_A montrera que le complexe formé est favorisé:



$$K = \frac{[Pi Cat]}{[Pi] [Cat]}$$

Selon le Tableau 9 on remarquera le grand écart qui se produit entre les valeurs de K_A obtenues pour la PA (10 000 à 50 000 M^{-1}) la PG (3 000 à 8 000 M^{-1}) et la PS (2 000 - 3 000 M^{-1}).

Que les valeurs pour la PA soient si élevées, ne nous surprend pas puisque le complexe se forme avec le groupement phosphate qui est accessible à la surface des vésicules unilamellaires. Les valeurs obtenues pour la PS sont inférieures aux constantes d'association mesurées pour la PG.

Ce fait nous surprend puisque les groupements accessibles sont près de la surface pour la sérine, i.e. phosphate, carboxyle et amine tandis que, dans le cas de la PG, l'accessibilité au groupement phosphate est masquée par le glycérol.

Il est difficile de concevoir un mode d'association semblable entre les cations et la PA et les cations et les deux phospholipides, PS et PG. Nous tenons à rappeler les conditions extrêmes de désalage qui ont été appliquées à ces vésicules.

Très peu d'études spectroscopiques ont été faites afin d'expliquer les liens faits entre les cations et les phospholipides. Dans le cas du complexe $\text{Ca} - (\text{PS})_2$ Holwerda et coll.⁶⁰ mentionnent un fort lien de coordination entre le Ca et le phosphate. Ils mentionnent aussi la déprotonation des groupements carboxyles et amino avant qu'ils puissent interagir avec le calcium.

Toutefois beaucoup d'hypothèses circulent sur les modes de fixation entre les cations et les phospholipides. Retenons l'hypothèse de la formation de complexe entre le cation et le phospholipide qui implique la relocalisation des molécules d'eau d'hydratation parce que le réseau est perturbé par la venue du cation. D'ailleurs Casali et al.^{75,76} ont démontré récemment par spectroscopie infra-rouge qu'il y avait une déshydratation des groupements carboxyle et phosphate et qu'il s'établissait une liaison entre le groupement carboxyle et une molécule d'eau lors de la fixation du Ca^{2+} sur la PS.

Un autre mode de fixation peut provenir de la formation de paires-d'ions à l'interface cation phospholipide. Dans ce cas, il n'y a pas de lien spécifique entre le cation et le phospholipide mais plutôt une attraction électrostatique entre les différentes charges. Cette explication fut récemment donnée pour expliquer la faible fixation que l'on retrouve entre la PG et les cations⁷⁷.

L'application de la technique de désalage aux galactolipides, DGDG, puis aux extraits partiels des lipides de membranes de thylacoïdes a démontré qu'il n'y avait pas de fixation de cation sur ce genre de lipides. Si l'on compare ces résultats avec ceux de la PG, on n'a pas à être surpris puisque les galactolipides n'ont pas de phosphate et sont neutres. Il y a bien le sulphoquinovosyle, mais la charge portée par le sulfate est sans doute noyée dans le mélange de têtes polaires. Quant à la PG, nous notons un faible taux de fixation de cations sur des vésicules fabriquées seulement à partir de ce lipide. Donc les sites d'attraction électrostatique des molécules de PG sont noyés dans le réseau fait par les molécules de galactolipides.

Nous remarquons que du point de vue lipidique, l'on ne peut établir un contrôle électrostatique sur l'écart entre les membranes des thylacoïdes.

C) RETOUR SUR LES CINÉTIQUES DE DIMÉRISATION

Un point demeure en suspens au niveau des évaluations des constantes de la dimérisation et surtout à l'apport des cations divalents sur le mécanisme. On retrouve au Tableau 12 les ratios de fixation n des cations sur les vésicules des divers lipides à la concentration correspondant au seuil de la coagulation (Tableau 5). L'on remarque d'abord les faibles

Tableau 12

Valeur de n à la concentration critique

	Mg ²⁺ (mM)	Ca ²⁺ (mM)	Mn ²⁺ (mM)
PG (pH 8,0)	0,12	0,13	0,21
PA (pH 8,0)	0,47	0,50	0,52
PS (pH 8,0)	0,24	0,30	0,40
Extrait lipidique partiel	non-décelé		
DGDG	non-décelé		

quantités de cations fixés sur les vésicules de PG. De même, sur l'extrait lipidique partiel et sur les vésicules de DGDG, on ne décèle aucun cation après la dialyse.

Les faits sont toutefois différents pour la PA et la PS. L'on mesure que 50% des sites de fixation sont occupés par les cations dans le cas des vésicules fabriquées de PA. Pourtant on observe une grande variation dans les constantes de dimérisation (Tableau 7), le Mg^{2+} étant responsable de ce grand écart. Dans le cas de la PS, les valeurs diffèrent notablement au seuil de la coagulation. Si les cations ont un rôle à jouer dans le mécanisme de la dimérisation, leurs effets devraient se faire ressentir au niveau des constantes évaluées à partir des trois cations. Effectivement, si l'on se rapporte au Tableau 7, on note une valeur plus faible pour le Mg^{2+} comparativement au Ca^{2+} et Mn^{2+} . Malheureusement, l'insuffisance des résultats à plus forte concentration nous empêche de savoir si, éventuellement, la constante de la dimérisation plafonne ou augmente pour atteindre des valeurs identiques à celles obtenues pour le Ca^{2+} et le Mn^{2+} . Une étude plus systématique de ce phénomène devrait être entreprise. Toutefois l'analyse des isothermes d'adsorption des cations nous montre, que passée cette valeur limite du seuil de la coagulation, les ratios de fixation des cations sur les lipides, augmentent très lentement suivant l'augmentation de la concentration cationique.

Les résultats comparés de la PA, PS et PG ne nous permettent pas de discerner l'importance de la fixation des cations sur la cinétique de la dimérisation. Notons que la PA avec 50% des sites de fixation occupés a une constante de dimérisation plus faible que la PS. Similairement, les vésicules de PG qui fixent des cations ont une constante de dimérisation plus faible que le DGDG qui n'en fixe pas.

Nous croyons donc à l'importance de la présence des cations pour la dimérisation dans les failles qu'ils peuvent provoquer dans le réseau d'hydratation à l'interface tête polaire:eau. Le cation qui a le plus de facilité à briser ce réseau aura une plus grande efficacité dans l'induction de la dimérisation. En second lieu, le rôle des cations dans la postdimérisation est importante. Les résultats en ce sens ne sont pas nombreux, mais il est mesuré par Rosenberg⁸⁵ que les vésicules de PG fusionnent sans qu'il y ait perte du contenu interne, tandis que la PS fusionne aussi, mais seulement en présence de Ca^{2+} . Par ailleurs, il est noté que la fusion des petites vésicules de PS est possible en présence de Mg^{2+} mais qu'elle est limitée par les dimensions des vésicules.⁸⁶

Il est bon de noter que la PA floccule en présence des cations lorsque la concentration dépasse le seuil de la coagulation. Le même phénomène se produisait avec la PS. Par contre, la PG, le DGDG et l'extrait lipidique partiel ne flocculaient pas en présence de cations divalents respectivement de concentrations de 20 mM et de 50 mM.

Il serait très intéressant de faire des mesures avec deux marqueurs fluorescents qui peuvent interférer entre eux afin d'y étudier les phénomènes de post-dimérisation.

Les résultats obtenus ne permettent pas de répondre clairement à la question posée au début de la section B, Chapitre III, à savoir si la fixation des cations sur les phospholipides ou la présence de ces derniers dans le milieu est l'élément activateur de la réaction de dimérisation.

Nous croyons que l'agrégation des vésicules lipidiques est un processus qui dépend de la nature du lipide, de ses interactions avec l'eau et les cations et aussi des processus qui suivent la dimérisation. Les systèmes lipidiques, PA et PS, qui flocculent en présence des cations divalents ont des constantes de dimérisation attendues par l'hypothèse de Smoluchowski tandis que les lipides qui ne précipitent pas sous l'action des cations ont des constantes de dimérisation plus faibles.

CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce travail a mis en relief la ressemblance entre le comportement macroscopiques des lipides anioniques et des lipides neutres quant à la stabilité des systèmes. Les lipides anioniques fixent les cations divalents à divers taux et cette fixation n'est pas sans les aider lors du processus de la dimérisation puisqu'ils obéissent à la théorie de Smoluchowski, ne mettant peu ou pas d'écran à la dimérisation contrôlée tout simplement par le processus de la diffusion. Il s'agit bien d'un processus dû aux collisions puisque l'on observe une variation dans la dispersion de la lumière suite à l'action des cations divalents. S'il s'agissait uniquement d'un effet lytique dû à l'effet des cations sur les membranes artificielles, l'augmentation de la turbidité ne serait pas si forte. Nous ne nions pas qu'il y ait effet lytique suivant le processus de la dimérisation. D'ailleurs, la linéarisation des courbes obtenues à partir des isothermes d'adsorption implique que les cations pénètrent la bicouche.

Maintenant le cas des lipides neutres et de la PG est plus délicat puisqu'aucun cation ne demeure fixé sur les lipides neutres et seulement 20% dans le cas de la PG. Néanmoins la déstabilisation des dispersions

induite par les cations divalents se produit, mais à des concentrations cationiques plus élevées que pour la PA et la PS. Un autre mécanisme d'interaction cation-lipide se produit donc de façon à induire le même comportement. Des développements récents de la chimie-physique des surfaces⁸⁸ nous permettent de proposer un mécanisme d'action des cations sur les lipides neutres. Si l'on se rapporte à l'introduction, section 1, il est fait mention des forces structurales d'hydratation nécessaires afin de déshydrater l'interface de contact qu'elle soit ionique ou polaire. Nous rappelons le schéma de la figure 4 où l'énergie d'hydratation est supérieure aux forces de van der Waals et empêche le contact efficace entre les deux surfaces. Il ne faut pas oublier les caractéristiques énumérées concernant les surfaces neutres fixant ou non des cations en y notant la possibilité que ces systèmes forment des structures stables à des distances aussi grandes que 65 Å.

Rappelons les structures des têtes polaires de la PG et du DGDG qui sont les constituants majeurs de l'extrait lipidique partiel des membranes des thylacoïdes. Ce sont des structures très polaires avec des groupements hydroxyles qui peuvent très bien former des liens hydrogène avec les molécules d'eau.

Quel rôle les cations peuvent-ils jouer dans la régulation des forces d'hydratation? Une première réponse nous vient de Azfal et coll.⁷⁸. Ces auteurs reconnaissent qu'il y a une modification dans l'agencement

des molécules d'eau sur la surface des têtes polaires de la phosphatidylcholine (PC) et que les ions monovalents diminuent le taux d'hydratation de ces surfaces. Une telle couche d'hydratation existe sur les surfaces constituées de DGDG⁷⁹. Les effets des ions n'y ont pas été mesurés mais l'on peut s'aventurer à exprimer le même comportement sur les membranes de PC. Néanmoins, sans évidence expérimentale, de telles hypothèses avaient été amenées pour expliquer la coagulation des colloïdes neutres en présence des cations⁸⁰. Les auteurs présument que les cations aident à dissiper la barrière d'hydratation entre les surfaces opposées. L'efficacité relative des cations bien qu'inconnue dans son origine est néanmoins reconnue puisque certains cations comme le Mg^{2+} et le Na^+ sont reconnus comme étant de meilleurs cations structurants avec les molécules d'eau que ne l'est le Ca^{2+} . Je n'ai pas trouvé de semblables remarques pour le Mn^{2+} , mais nos résultats indiquent qu'il est un briseur de structure puisqu'il en faut une plus faible concentration pour induire la déstabilisation des dispersions lipidiques. Sur ce sujet on ne peut oublier l'aspect synergique du Na^+ et du Mg^{2+} sur la concentration limite de la coagulation de l'extrait lipidique partiel (cf. Tableau 5).

Le but de ce travail consistait à discerner le rôle des lipides dans le maintien de la stabilité des membranes des thylacoïdes. Les résultats obtenus pour les concentrations cationiques limites lors de l'étude de la stabilité des vésicules préparées des lipides extraits des membranes

des thylacoïdes nous amena à les comparer avec les valeurs obtenues pour les lipides anioniques. Le large écart entre les deux groupes de valeurs puis les différences entre les constantes de la dimérisation des diverses populations de vésicules nous amena à mesurer les taux de fixation des cations divalents sur les lipides.

Les valeurs de la littérature ne permettaient pas un échantillonnage complet des lipides et des cations utilisés. De plus la diversité dans les résultats puis dans les méthodes de mesure nous incita à n'utiliser qu'une méthode de mesure qui puisse s'appliquer à tous les cas.

Les résultats de la fixation des cations sur les divers groupes de lipides expliquent qualitativement les résultats de la concentration limite de la coagulation puis ceux de la cinétique de la dimérisation.

On ne peut, à ce stade de la recherche sur les interactions entre les surfaces formées de lipides membranaires aller plus quantitativement sans postuler plusieurs paramètres. On n'a qu'à se référer aux calculs effectués par Nir et Bentz⁴³ où ils ont complètement négligé les forces d'hydratation. La quantification de ces dernières et sa compréhension par les théoriciens est sans doute sur le point de se réaliser⁸¹.

Ce que ce travail a démontré, surtout au niveau des constantes de dimérisation est la différence dans les comportements des surfaces lorsqu'il

s'agissait d'un contrôle électrostatique (cf. Introduction, section C, 1a) ou d'un contrôle dû aux forces d'hydratation (cf. Introduction, section C, 1b). Dans ces cas, les cations ne se lient pas aux membranes et l'effet est provoqué par la perturbation qu'ils produisent dans l'agencement des molécules d'eau entre les surfaces. Les concentrations cationiques nécessaires pour déstabiliser les systèmes ainsi structurés sont plus grandes que dans les cas où un contrôle électrostatique stabilise les dispersions. Dans les cas où les lipides fixent les cations par formation de complexe, il s'agit aussi d'un contrôle de type électrostatique puisque ces derniers neutralisent les charges de la surface, modifient les surfaces et possiblement les déshydratent⁸² ou du moins modifient l'hydratation⁷⁵ de façon à faciliter le contact entre les surfaces lors des collisions.

Dans le cas des lipides des membranes des thylacoïdes, nous proposons le premier mécanisme d'action des cations puisqu'ils ne s'adsorbent pas sur ces lipides. C'est l'esprit du mécanisme proposé par Murakami et Packer⁹ qu'il faut retenir: ils proposent que le rapprochement entre les surfaces est dû à la protonation des charges puis à la déshydratation des interfaces. On n'a pas vérifié l'effet du pH, sauf sur le PG, mais nous savons que la présence des cations peut engendrer l'agrégation des systèmes neutres. La grande quantité de cations nécessaire pour provoquer le contact moléculaire entre les surfaces dépasse largement les concentrations habituellement trouvées dans cet environnement. Sur ce point

nous sommes en accord avec le modèle proposé par Duniec et coll. (cf. Introduction, section B)⁸³, sauf qu'au niveau lipidique, il n'y a pas de fixation des cations, ni d'échange possible avec les protons. Puisque le pH provoque le rapprochement entre les surfaces membranaires, et que le seuil cationique de la coagulation des vésicules de PG ne varie que légèrement avec le pH, il semble que les variations observées dans le rapprochement entre les membranes puissent être dues à une modification de la structure des protéines membranaires plutôt qu'à un échange proton-cations sur les lipides.

Ces résultats bien que fractionnaires nous procurent des renseignements supplémentaires sur le processus d'empilement et de déempilement des membranes des thylacoïdes. Aussi nous nous permettons une simulation de processus de la régulation.

Nous croyons donc qu'un réseau de molécules d'eau et de cations s'établit entre les membranes des thylacoïdes. L'arrivée d'autres cations lors de l'illumination force le système à se réarranger en tenant compte d'une plus grande proportion de cations, ce qui provoque le rapprochement entre les membranes puisque la présence des cations permet aux membranes neutres de s'agréger. Comme ces cations ne sont pas retenus par les lipides, lorsque l'illumination diminue, une diminution de l'activité du photosystème II provoque une diminution de concentration du calcium dans le stroma (89). Comme il n'est pas retenu par les lipides, il est libre de diffuser, sa concentration interfaciale diminue et le réseau de molécules

d'eau se reconstruit. Si des lipides anioniques tels la PA et la PS étaient présents dans ces systèmes, il ne pourrait y avoir de réversibilité puisqu'ils complexent avec les cations à des concentrations de 0.1 à 1 mM.

Alors le mécanisme de désempilement des membranes des thylacoïdes ne pourrait se faire et le système aurait une faible production de nucléotides.

CHAPITRE VI

BIBLIOGRAPHIE

- 1 Camefort, H. Morphologie des végétaux vasculaires. Paris, Dorin Editeurs, 1972, p. 28.
- 2 Emerson, R., Lewis, C.M. Dependence of the quantum yield of chloro-
rella photosynthesis on wavelength of light. Am. J. Botany, 1943,
30, 165-178.
- 3 Staehelin, L.A., Arntzen, C.J. Regulation of chloroplast membrane
function: Protein phosphorylation changes the spatial organization
of membrane components. J. Cell Biol., 1983, 97, 1327-1337.
- 4 Andersson, B., Anderson, J.M. Lateral heterogeneity in the distribu-
tion of the chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes
of spinach chloroplasts. Biochim. Biophys Acta, 1980, 593, 427-440.
- 5 Miller, K.R., Staehelin, L.A. Analysis of the thylakoid outer sur-
face. J. Cell Biol., 1976, 68, 30-47.

- 6 Berzborn, R.J. Study of the surface structure of the thylakoid systems of chloroplasts by using anti-ferredoxin NADP reductase antibodies. Z. Naturforsch., 1969, 246, 436-446.
- 7 Park, R.B., Sane, P.V. Distribution of function and structure in chloroplast lamellae. Ann. Rev. Plant Physiol., 1971, 22, 395-430.
- 8 Izawa, S., Good, N.E. Effect of salts and electron transport on the conformation of isolated chloroplasts. Plant Physiol., 1966, 41, 533-543.
- 9 Murakami, S., Packer, L. Protonation and chloroplast membrane structure. J. Cell Biol., 1970, 47, 332-351.
- 10 Staehelin, L.A. Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membranes in vivo. J. Cell Biol., 1976, 71, 136-158.
- 11 Barber, J., Mills, J., Love, A. Electrical diffuse layers and their influence on photosynthetic processes. FEBS Letters, 1977, 74, 174-181.
- 12 Israelachvili, J.N., Pashley, R.M. Molecular layering of water at surfaces and origin of repulsive hydration forces. Nature, 1983, 306, 249-250.

- 13 Parsegian, V.A., Rand, R.P., Gingell, D. Lessons for the study of membrane fusion from membrane interactions in phospholipids systems. Cell Fusion (CTBA Foundation). London: Pitman, 103, pp. 9-27.
- 14 Mitchel, D.J., Ninham, B.W., Pailthorpe, B.A. Solvent structure in particle interactions. J. Chem. soc. Far. Trans. II, 1978, 74, 1116-1125.
- 15 Parsegian, V.A., Fuller, N., Rand, R.P. Measured work of the formation and repulsion of lecithin bilayers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1979, 76, 2750-2754.
- 16 Pashley, R.M. DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li^+ , Na^+ , K^+ and Cs^+ electrolyte solutions. J. Colloid Interface Sci., 1981, 83, 531-546.
- 17 Rand, R.P. Interacting phospholipid bilayers: measured forces and induced structural changes. Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1981, 10, 277-314.
- 18 Trauble, H., Teubner, M., Woodley, P., Eible, H. Electrostatic interactions of charged lipid membranes. Biophys. Chem., 1976, 4, 319-342.

- 19 Overbeek, J.Th.G. The interaction between colloidal particles. In: H.R. Kruyt (Ed.), Colloid Science. Amsterdam: Elsevier Publishing Co., 1974, chap. VI.
- 20 McLaughlin, S. Electrostatic potentials at membrane solution interface. Current Topics in Membrane Transport, 1977, 9, 71-144.
- 21 Horn, R.G. Direct measurement of the force between two lipid bilayers and observation of their fusion. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 778, 224-228.
- 22 Christensen, H.K., Horn, R.G., Israelachvili, J.N. Measurement of forces due to structure in hydrocarbon liquids. J. Colloid Interface Sci., 1982, 88, 79-87.
- 23 Israelachvili, J.N., Adams, G.E. Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous electrolyte solutions in the range 0-100 nm. J. Chem. Soc. Far. Trans. I, 1978, 74, 975-1001.
- 24 Le Neveu, D.M., Rand, R.P., Parsegian, V.A., Gingell, D. Measurement of forces between lecithin bilayers. Nature, 1977, 259, 601-603.

- 25 Arntzen, C.J., Ditto, C.L. Effects of cations upon chloroplast membrane subunit interactions and excitation energy distribution. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 449, 259-274.
- 26 Murphy, D.J., Woodrow, I.E. The lateral segregation model. Biosynthesis and function of plant lipids. Edited by Thomson, Mudd and Gibbs. American Society of Plant Physiologists, 1983, pp. 104-125.
- 27 Murata, N. Primary process in photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 189, 171-181.
- 28 Rivas, E., Luzzati, V. Polymorphism of corn chloroplasts polar lipids and galactolipids in the presence of water. J. Molec. Biol., 1969, 41, 261-275.
- 29 Sprague, S.G., Staehelin, A. Effects of reconstitution method on the structured organization of isolated chloroplasts membrane lipids. Biochim. Biophys. Acta, 1984, 777, 306-322.
- 30 Murphy, D.J. The importance of non-planar bilayer regions in photosynthetic membranes and their stabilisation by galactolipids. FEBS Letters, 1983, 150, 19-26.

- 31 Bartlett, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem., 1959, 234, 466-468.
- 32 Yamamoto, Y., Ueda, T., Shinkai, H., Nishimura, M. Preparation of O₂ evolving photosystem II subchloroplasts from spinach. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 679, 347-350.
- 33 Allen, C.F., Good, N. Acyl lipids in photosynthetic systems. Methods in Enzymology, 1971, 23, 523-547.
- 34 Omata, T., Murata, N. Preparation of chlorophyll-a, chlorophyll b and bacteriochlorophyll a by column chromatography with DEAE sepharose C1-6B and sepharose C1-6B. Plant and Cell Physiol., 1983, 24, 1093.
- 35 Papahadjopoulos, D., Vail, W.J., Pangborn, W.A., Poste, G. Studies on membrane fusion. II. Induction of fusion in pure phospholipid membranes by calcium ions and other divalent metals. Biochem. Biophys. Acta, 1976, 448, 265-283.
- 36 Papahadjopoulos, D., Poste, G., Schaeffer, B.E., Vail, W.J. Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 1974, 352, 10-28.

- 37 Webbs, M.S., Tilcock, C.P.S., Green, B.R. Salt-mediated interactions between vesicles of the thylakoid lipid digalactosyldiacylglycerol. Biochim. Biophys. Acta, 1988, 938, 323-333.
- 38 Gounaris, K., Arindarn, S., Brain, A.P.R., Quinn, P.J., Williams, P.J. The formation of non-bilayer structures in total polar lipid extracts of chloroplasts membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 728, 129-139.
- 39 Bentz, J., Düzgünes, N., Nir, S. Kinetics of divalent cation induced fusion of phosphatidylserine vesicles: Correlation between fusogenic capacities and binding affinities. Biochemistry, 1983, 22, 3320-3330.
- 40 Sundler, R. Role of phospholipid head group structure and polarity in the control of membrane fusion. Dans Biomembranes, vol. 12, Ed. M. Kates and L.A. Manson. New York, Plenum Press, 1984, pp. 563-583.
- 41 Ohki, S. Effects of divalent cations, temperature, osmotic pressure gradient, and vesicles curvature on phosphatidylserine vesicle fusion. J. Membrane Biol., 1984, 77, 265-275.

- 42 Lanssman, J. Haynes, D.H. Kinetics of a Ca^{2+} triggered membrane aggregation reaction of phospholipid membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 394, 335-347.
- 43 Nir, S., Bentz, J. On the forces between phospholipid bilayers. J. Colloid Interface Sci., 1978, 65, 399-414.
- 44 Day, E.P., Kwok, A.Y.W., Hark, S.K., Ho, J.T., Vail, W.J., Bentz, J., Nir, S. Reversibility of sodium-induced aggregation of sonicated phosphatidylserine vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci., 1980, 77, 4026-4029.
- 45 Tredgold, R.H. The use of synthetic membranes in biophysical research. Adv. Phys., 1977, 26, 79-128.
- 46 Kerker, M. The scattering of light and other electromagnetic radiation. New York, Academic Press, 1969, pp. 83-91.
- 47 Pannetier, G., Souhay, P. Cinétique chimique. Paris: Masson et Cie, 1964, pp. 108-136.

- 48 Wilschut, J., Duzgunes, N., Fraylay, R., Paphadjopoulos, D. Studies on the mechanism of membrane fusion: Kinetics of calcium induced fusion of phosphatidylserine vesicles followed by a new-assay for making of aqueous vesicle contents. Biochemistry, 1980, 19, 6011-6021.
- 49 Jones, M.N. Biological Interfaces. New York, Elsevier Scientific Publishing Company, 1975, Chap. VII.
- 50 Pryor, C., Bridge, M., Loew, L.M. Aggregation, lipid exchange, and metastable phases in dymyristoylphosphatidylcholine vesicles. Biochemistry, 1985, 24, 2203-2209.
- 51 Kolber, M.A., Haynes, D.H. Evidence for a role of phosphatidylethanolamine as a modulated of membrane-membrane contact. J. Membrane Biol., 1979, 48, 95-114.
- 52 Haynes, D.H., Westine, L. Why divalent cations induced aggregation of phosphatidylserine and phosphatidic acid vesicles occurs at less than diffusion-controlled rates. J. Colloid Interface Sci., 1980, 74, 291-294.

- 53 Nir, S., Bentz, J. Düzgunes, N. Two modes of reversible vesicle aggregation: particle size and the DLVO theory. J. Colloid Interface Sci., 1981, 84, 266-269.
- 54 Papahadjopoulos, D., Vail, W.J., Newton, C., Nir, S. Jacobson, K., Poste, G., Lazo, R. Studies on membrane fusion. III. The role of calcium-induced phase changes. Biochim. Biophys. Acta, 1977, 465, 579-598.
- 55 Newton, C., Pangborn, W., Nir, S., Papahadjopoulos, D. Specificity of Ca^{2+} and Mg^{2+} binding to phosphatidylserine vesicles and resultant phase changes of bilayer membrane structure. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 506, 281-287.
- 56 Huang, C. Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. Biochemistry, 1969, 8, 344-352.
- 57 Skoog, D.A., West, D.M. Fundamentals of Analytical Chemistry. New York: Holt, Rinehart, Winston, 1976.
- 58 Scatchard, G. The attraction of protein for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1949, 51, 660-672.

- 59 Portis, A., Newton, c., Pangborn, W., Papahadjopoulos, D. Studies on the mechanism of membrane fusion. Biochemistry, 1980, 18, 780-790.
- 60 Holwerda, D.L., Ellis, P.d., Wuthier, R.E. Carbon-13 and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies on interaction of calcium with phosphatidylserine. Biochemistry, 1981, 20, 418-428.
- 61 Kurland, R.J., Hammondah, M., Nir, S., Papahadjopoulos, D. Binding of Ca^{2+} and Mg^{2+} to phosphatidylserine vesicles: Different effects on P-31 NMR shifts and relaxation times. Biochim. Biophys. Res. Comm., 1979, 88, 927-932.
- 62 McLaughlin, S.G.A., Szabo, G., Eisenman, G. Divalent ions and the surface potential of charged phospholipid membranes. J. Gen. Physiol., 1971, 58, 667-687.
- 63 McLaughlin, A., Grathwohl, C., McLaughlin, S. The adsorption of divalent cations to phosphatidylcholine bilayer-membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1978, 513, 338-357.
- 64 Aveyard, R., Haydon, D.A. An introduction to the principles of surface chemistry. London: Cambridge University Press, 1973.

- 65 Florine, K.I., Feigenson, G.W. Influence of the calcium-induced gel phase on the behavior of small molecules in phosphatidylserine and phosphatidylserine-phosphatidylcholine multilamellar vesicles. Biochemistry, 1987, 26, 1757-1768.
- 66 Hauser, H., Darke, A., Phillips, M.C. Ion-binding to phospholipids. Interaction of calcium with phosphatidylserine. Eur. J. Bioch., 1976, 62, 335-344.
- 67 Rehfeld, S.J., Hansen, L.D., Lewis, E.A., Eatough, D.J. Alkaline earth cations binding to large and small bilayer phosphatidylserine vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 691, 1-12.
- 68 Lau, A., McLaughlin, A., McLaughlin, S. The adsorption of divalent cations to phosphatidylglycerol bilayer membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1981, 645, 279-292.
- 69 Hendrickson, H.S., Fullington, J.G. Stability of metal complexes of phospholipids: Ca (II), Mg (II), and Ni (II) complexes of phosphatidylserine and triphosphoinositide. Biochemistry, 1965, 4, 1599-1605.
- 70 Abramson, M.B., Katzman, R., Gregor, H., Curci, R. The reactions of cations with aqueous dispersions of phosphatid acid. Biochemistry, 196, 5, 2207-2213.

- 71 Rojas, E., Tobias, J.M. Membrane model: association of inorganic cations with phospholipid monolayers. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 9, 394-404.
- 72 Papahadjopoulos, D. Surface properties of acidic phospholipids. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 163, 240-254.
- 73 Seimiya, T., Ohki, S. Ionic structure of phospholipid membranes and binding of calcium ions. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 298, 546-561.
- 73a Bulkin, G.J., Hauser, R. Lipid-protein interaction. I. Role of divalent ions in binding of glycylglycine to phosphatidylserine. Biochim. Biophys. Acta, 1973, 326, 289-292.
- 74 Puskin, J.S. Divalent cation binding to phospholipids: An EPR study. J. Membrane Biol., 1977, 35, 39-55.
- 75 Casal, H.L., Mantsch, H.H., Hauser, H. Infrared studies of fully hydrated saturated phosphatidylserine bilayers. Effects of Li^+ and Ca^{2+} . Biochemistry, 1987, 26, 4408-4416.
- 76 Casal, H.L., Mantsch, H.H., Paltauf, F., Hauser, H. Infrared and ^{31}P -NMR studies of the effect of Li^+ and Ca^{2+} on phosphatidylserines. Biochim. Biophys. Acta, 1987, 919, 275-286.

- 77 MacDonald, P.M., Seelig, J. Calcium binding to mixed phosphatidylglycerol-phosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium nuclear magnetic resonance. Biochemistry, 1987, 26, 1231-1240.
- 78 Azfall, S., Tesler, W.J., Blessing, S.K., Collins, J.M., Lis, L.J. Hydration force between phosphatidylcholine surfaces in aqueous electrolyte solutions. J. Colloid Interface Sci., 1984, 97, 303-307.
- 79 Marra, J. Controlled deposition of lipid monolayers and bilayers onto mica and direct force measurement between galactolipid bilayers in aqueous solution. J. Colloid Interface Sci., 1985, 107, 446-458.
- 80 Eagland, D. The influence of hydration on the stability of hydrophobic colloidal systems. Dans, F. Franks (Ed.), Water a Comprehensive Treatise. New York: Plenum Press, 1975, 5, pp. 1-74.
- 81 Attard, P., Mitchell, D.J., Ninham, B.W. The attractive forces between polar lipid bilayers. Biophys. J., 1988, 53, 457-460.
- 82 Bellemare, F., Lacroix, N., Fragata, M. Ionic effects at the interface water polar head group of unilamellar phosphatidylcholine vesicles. 69^e Congrès de chimie du Canada, 1986, Saskatoon, Saskatchewan, et article en préparation.

- 83 Duniec, J.T., Israelachvili, J.N., Ninham, B.W., Pashley, R.M., Thorne, S.W. An ion-exchange model for thylakoid stacking in chloroplasts. FEBS Letters, 1981, 129, 193-196.
- 84 McLaughlin, S., Harary, H. The hydrophobic adsorption of charged molecules to bilayer membranes: a test of the applicability of the Stern equation. Biochemistry, 1976, 15, 1941-1948.
- 85 Rosenberg, J., Düzgünes, N., Kayalar, C. Comparison of two liposome fusion assays monitoring the intermixing of aqueous contents and of membrane components. Biochem. Biophys. Acta, 1983, 735, 173-180.
- 86 Wilschut, J., Düzgünes, N., Paphadjopoulos, D. Calcium/magnesium specificity in membrane fusion. Biochemistry, 1981, 20, 3126-3133.
- 87 Puskin, J.S., Martin, T. Divalent cation binding to phospholipid vesicles. Dependence on temperature and lipid fluidity. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 552, 53.
- 88 Israelachvili, J.N. Intermolecular and surface forces: with applications to colloidal and biological systems. New York: Academic Press, 1985.

- 89 Black, C.C., Brand, J.J. Roles of calcium in photosynthesis. Dans Calcium and Cell Function, 1986, VI, pp. 327-355.