

Université de Montréal

**Caractérisation spectroscopique et thermodynamique de
l'organisation des lipides du *Stratum Corneum***

par

Marjolaine Arseneault

Département de chimie
Faculté des Arts et Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)
en Chimie

décembre, 2005

© Marjolaine Arseneault, 2005



QD

3

U54

2006

V.010

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation spectroscopique et thermodynamique
de l'organisation des lipides du *Stratum Corneum*

présentée par :

Marjolaine Arseneault

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Professeur Françoise Winnik, président-rapporteur
Professeur Michel Lafleur, directeur de recherche
Professeur Christian Pellerin, membre du jury
Professeur Michel Pézolet, examinateur externe
Professeur Alfred Berteloot, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le présent projet est une étude structurale des lipides du *stratum corneum* (SC), la couche supérieure de la peau. La compréhension de son imperméabilité revêt un caractère important, notamment pour l'administration transdermale. Il a été proposé que cette imperméabilité est attribuable à l'organisation sous forme cristalline des lipides du SC¹. L'observation directe de ces domaines cristallins a été récemment rendu possible par microscopie Raman sur des mélanges modèles². L'un des objectifs de ce projet est de comprendre les facteurs régissant la formation de domaines cristallins par une étude de mélanges modèles de lipides du SC. Composés d'acides gras, de céramides et de stérols, ces mélanges ont été caractérisés par spectroscopie infrarouge et microscopie Raman. La cartographie chimique de ces mélanges a permis de constater l'impact de la composition en stérol sur l'organisation lipidique. Nous avons déterminé que le site de complexation d'ions Ca^{2+} peut être déplacé selon le type de stérol. Pour un mélange contenant du cholestérol, il y a déprotonation des acides gras et formation de complexes avec la fonction carboxylique conduisant à l'ordre conformationnel élevé des acides gras et ce, même à de hautes températures. D'autre part, en présence de sulfate de cholestérol, peu de Ca^{2+} se complexe avec l'acide, suggérant le groupement SO_4^- comme site d'interaction. La titration calorimétrique isotherme a permis de démontrer que l'association du Ca^{2+} aux bicouches lipidiques implique principalement des interactions électrostatiques.

La microscopie confocale Raman a été utilisée pour développer une méthode permettant d'étudier la perméabilité de la peau *in vitro*. L'importance du maintien de l'hydratation de l'épiderme pour en conserver les propriétés et la structure originale a été montrée et un nouveau porte-échantillon maintenant les conditions d'hydratation tout en conservant la face extérieure exposée à l'air, sur une plage de températures allant de 15 à 75 °C, a été conçu. Les avantages et limites de cette approche sont discutés en détail.

1. Forslind, B. Acta Dermato-Venereologica 1994, 74, 1-6

2. Percot, A.; Lafleur, M. Biophys. J. 2001, 81, 2144-2153

Mots-clés : *Stratum corneum*, lipides, sulfate de cholestérol, calcium, spectroscopie infrarouge, microscopie confocale Raman, perméabilité, épiderme, *in vitro*.

Abstract

The present project is a structural study of *stratum corneum* (SC) lipids, the last layer of the epidermis. The understanding of the barrier function is a major interest in regard of drug transdermal absorption. It is mainly accepted that this property of the SC is the result of the high level of organization of the lipids forming solid domains¹. A direct observation of domains in model SC lipid mixtures by Raman microscopy has been recently published². Our goal is to evaluate the impact of different factors leading to the domains formation. Composed of fatty acid, ceramide and sterol, model mixtures of SC lipids have been characterized by infrared spectroscopy and Raman microscopy. The chemical mapping of the mixtures reveals the impact of the type of sterol on the lipid organization. In presence of calcium, the binding site of the ion may be different depending on the sterol. When cholesterol is used to form the ternary lipid mixture, the fatty acid is deprotonated, forming a complex with the calcium, increasing the level of conformational order of the fatty acid and heterogeneity distribution on the component, even to high temperatures. On the other hand, in the presence of cholesterol sulfate no fatty acid/calcium complex is formed suggesting a SO_4^- as binding site. An isothermal titration calorimetric experiment demonstrated the electrostatic nature of the ion binding to lipid membranes.

Raman confocal microscopy is also performed on human skin sample. We developed an *in vitro* method to measure skin permeability. A new design of skin holder allows the conservation of the native hydration with an air-skin interface, and the control of

the temperature over a range going from 15 to 75 °C. The advantages and limits of this approach are discussed in detail.

1. Forslind, B. *Acta Dermato-Venereologica* 1994, 74, 1-6

2. Percot, A.; Lafleur, M. *Biophys. J.* 2001, 81, 2144-2153

Keywords : *Stratum corneum*, lipids, cholesterol sulphate, calcium, infrared spectroscopy, Raman confocal microscopy, permeability, epiderm, *in vitro*.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations	xviii
1. INTRODUCTION	1
1.1. Une description générale du SC	2
1.2. Les phases lipidiques	6
1.3. La structure lipidique du SC	9
1.3.1. <i>Les lipides extraits du SC</i>	9
1.3.2. <i>Les mélanges lipidiques simplifiés</i>	13
1.3.3. <i>L'effet des d'ions calcium sur les lipides du SC</i>	16
1.4. La propriété de cohésion du SC	20
1.4.1. <i>L'ichtyose récessive liée à l'X</i>	20
1.4.2. <i>Le sulfate de cholestérol dans les mélanges modèles</i>	23
1.4.3. <i>L'effet du sulfate de cholestérol et du calcium sur les lipides du SC</i>	25
1.5. La propriété de perméabilité du SC	26
1.5.1. <i>Les études in vivo, in vitro de perméabilité</i>	26
1.5.2. <i>Les approches spectroscopiques</i>	28
1.5.3. <i>Le développement d'une technique de mesure de pénétration par microscopie Raman</i>	30
1.6. Les techniques de caractérisation	33
1.6.1. <i>La titration calorimétrique isotherme</i>	33
1.6.2. <i>La spectroscopie infrarouge</i>	34
1.6.3. <i>La microscopie Raman</i>	40
1.6.3.1. <i>La cartographie des mélanges lipidiques</i>	40

1.6.3.2.	La microscopie Raman de l'épiderme humain	44
2.	PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	47
2.1.	Préparation des mélanges lipidiques.....	47
2.1.1.	<i>Vésicules de POPC/POPG</i>	48
2.1.2.	<i>Mélanges modèles de lipides du SC</i>	49
2.2.	Préparation des épidermes humains.....	49
2.3.	Mesures thermodynamiques	50
2.3.1.	<i>Titration calorimétrique isotherme</i>	50
2.3.2.	<i>Microcalorimétrie à balayage</i>	51
2.4.	Spectroscopie infrarouge	51
2.5.	Spectroscopie Raman	52
2.5.1.	<i>Cartographie des mélanges lipidiques</i>	54
2.5.2.	<i>Microscopie confocale de l'épiderme humain</i>	55
3.	ÉTUDE DE L'ASSOCIATION DU CALCIUM AUX MEMBRANES DE POPC/POPG PAR TITRATION CALORIMÉTRIQUE ISOTHERME	59
3.1.	Résultats	59
3.1.1.	<i>Effet de la taille et du mode de préparation des vésicules</i>	59
3.1.2.	<i>Titration de lipides chargés par l'ajout de calcium : traitement selon le modèle de partition</i>	65
3.1.3.	<i>Titration de lipides chargés par l'ajout de calcium : traitement selon le modèle de l'isotherme d'absorption de Scatchard</i>	73
3.1.4.	<i>Effet de la force ionique</i>	75
3.1.5.	<i>Effet de la composition lipidique de la membrane</i>	78
3.2.	Discussion.....	80
3.2.1.	<i>Effet de la taille et du mode de préparation des vésicules</i>	80
3.2.2.	<i>Thermodynamique de l'association du calcium aux membranes de POPC/POPG</i>	83

4. ÉTUDE DE L'EFFET DU CALCIUM SUR LE THERMOTROPISME DES MÉLANGES MODÈLES DU SC PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET RAMAN.....	88
4.1. Thermotropisme par spectroscopie infrarouge	88
4.1.1. <i>Résultats</i>	88
4.1.2. <i>Discussion</i>	100
4.2. Thermotropisme par microscopie Raman.....	109
4.2.1. <i>Résultats</i>	109
4.2.1.1. Étude de la distribution spatiale en fonction de la température	109
4.2.1.2. Étude de l'ordre conformationel en fonction de la température	122
4.2.1.3. Détermination des fractions molaires à basse température.....	136
4.2.2. <i>Discussion</i>	144
4.2.2.1. Thermotropisme du mélange sans calcium.....	144
4.2.2.2. Thermotropisme du mélange avec calcium	149
5. ÉTUDE DE L'EFFET DU SULFATE DE CHOLESTÉROL SUR LE THERMOTROPISME DES MÉLANGES MODÈLES DU SC PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET MICROSCOPIE RAMAN.....	154
5.1. Thermotropisme par spectroscopie infrarouge	154
5.1.1. <i>Résultats</i>	154
5.2. Thermotropisme par microscopie Raman.....	165
5.2.1. <i>Résultats</i>	165
5.2.1.1. Étude de la distribution spatiale en fonction de la température	165
5.2.1.2. Étude de l'ordre conformationel en fonction de la température	172
5.3. Discussion.....	181
6. MICROSCOPIE RAMAN DE L'ÉPIDERME HUMAIN <i>IN VITRO</i>	186
6.1. Résultats	186
6.1.1. <i>Spectres Raman de l'épiderme humain</i>	186
6.1.2. <i>Effet du mode de conservation</i>	190

6.1.3.	<i>Résolution spatiale</i>	196
6.1.4.	<i>Effet de la variation de la température</i>	196
6.1.5.	<i>Suivi de la pénétration du DMSO</i>	199
6.2.	Discussion.....	201
Conclusion		207
Bibliographie		214
Annexe 1		226

Liste des tableaux

Tableau I :	Assignation des principales bandes d'absorption infrarouge utilisées pour l'analyse conformationnelle et structurale des lipides.	36
Tableau II :	Assignation des principaux paramètres spectraux Raman utilisés pour l'analyse conformationnelle et structurale des lipides.	42
Tableau III :	Assignation des principales bandes de diffusion Raman visibles sur un spectre d'épiderme humain.	46
Tableau IV :	Enthalpie d'association du calcium mesurée par la titration vésicules extrudées de POPC/POPG	65
Tableau V :	Constantes physiques de l'association du calcium à des vésicules extrudées de POPC/POPG obtenues à partir de l'isotherme de partage modifié pour le gradient de concentration de Gouy-Champman.	73
Tableau VI :	Constantes physiques de l'association du calcium à des vésicules extrudées de POPC/POPG obtenues à partir de l'isotherme d'absorption de Scatchard.	75
Tableau VII :	Paramètres de contraintes imposés permettant de reproduire la région vCH d'un spectre Raman, allant de 2795 à 2980 cm^{-1}	136
Tableau VIII :	Résumé des différentes phases et organisation du mélange CER III/PA-d31/Chol (1/1/1) avec et sans calcium en fonction de la température.	154
Tableau IX :	Résumé des différentes phases et organisation du mélange CER III/PA-d31/Schol (1/1/1) avec et sans calcium en fonction de la température.	186

Liste des figures

Figure 1.1 :	Représentation schématisée de la structure stratifiée de l'épiderme vivant...	3
Figure 1.2 :	Modèle simplifié du SC ayant la structure d'un mur de briques.....	6
Figure 1.3 :	Empilement orthorhombique et hexagonal des chaînes alkyles.....	7
Figure 1.4 :	Phase des lipides. Phase solide cristalline, phase gel et phase liquide-cristalline.....	8
Figure 1.5 :	Structures des céramides du SC humain.....	11
Figure 1.6 :	Structure des lipides utilisés dans la composition des mélanges modèles du SC.....	19
Figure 1.7 :	Structures des phospholipides utilisés.....	20
Figure 1.8 :	Comparaison de la composition en lipide du SC pour une peau saine et une peau atteinte de l'ichthyose récessive liée à l'X.....	22
Figure 1.9 :	Spectre d'absorption infrarouge d'un mélange équimolaire CER III/PA-d ₃₁ /Chol.....	35
Figure 1.10 :	Spectre de diffusion Raman d'un mélange équimolaire CER III/PA-d ₃₁ /Chol.....	41
Figure 2.1 :	Shémas des montages pour la spectroscopie Raman.....	56
Figure 2.2 :	Montage pour la spectroscopie Raman sur des échantillons d'épiderme humain.....	57
Figure 2.3 :	Schémas illustrant le principe de la microscopie Raman confocale utilisant une fente et une portion de la caméra CCD.....	58
Figure 3.1 :	Titration calorimétrique isotherme de vésicules composées de POPC/POPG (7/3) par une solution de CaCl ₂ obtenues à partir de vésicules soniquées et de vésicules extrudées.	60

Figure 3.2 :	Thermogrammes de membranes de POPC/POPG (7 :3) en absence de calcium et en présence de calcium.....	63
Figure 3.3 :	Titration calorimétrique isotherme de vésicules extrudées par une solution de CaCl_2	66
Figure 3.4 :	Titration calorimétrique isotherme de vésicules extrudées de POPC/POPG (7/3) par une solution de CaCl_2 . Isotherme d'association du calcium aux membranes. Isotherme corrigé pour la théorie de GouyChapman. Isotherme de Scatchard.	70
Figure 3.5 :	Titration calorimétrique isotherme de vésicules extrudées composées de POPC/POPG (7/3) (100 mM NaCl) par une solution de CaCl_2 . Isotherme de l'association du calcium aux membranes. Isotherme de Scatchard.....	76
Figure 3.6 :	Titration calorimétrique isotherme de vésicules extrudées composées de POPC/POPG (5/5) par une solution de CaCl_2 . Isotherme de l'association du calcium aux membranes. Isotherme de Scatchard..	79
Figure 4.1 :	Variation de la position des bandes $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ en fonction de la température pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....	89
Figure 4.2 :	Spectres infrarouges de la région δCH_2 pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium, à 30 °C et 75 °C.....	92
Figure 4.3 :	Variation de la largeur de la bande δCH_2 en fonction de la température pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....	93
Figure 4.4 :	Spectres infrarouges de la région δCD_2 pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium, à 30 °C et 75 °C.....	94
Figure 4.5 :	Variation du rapport d'aire de la bande centrale δCD_2 (A_M) et de l'aire totale des trois composante (A_T) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....	95

- Figure 4.6 : Spectres infrarouges de la région amide I' et ν_{COO^-} en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....98
- Figure 4.7 : Spectres Raman de la région ν_{CD} de PA-d₃₁ de la région ν_{CH} des CER III et du Chol à 25 et 75 °C.....110
- Figure 4.8 : Distributions de PA-d₃₁ et des CER III vs Chol pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence de calcium, de 25 à 75 °C..... 112
- Figure 4.9 : Distributions de PA-d₃₁ et des CER III vs Chol pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en présence de calcium de à 75 °C.....113
- Figure 4.10 : Cartes de la distribution de PA-d₃₁ et des CER III vs Chol pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence de calcium, de 25 à 75 °C.....116
- Figure 4.10b : Spectres des régions enrichies par rapport à la moyenne pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence de calcium, à 35 °C.....117
- Figure 4.11 : Cartes de la distribution de PA-d₃₁ par rapport à la moyenne et des CER III vs Chol par rapport à la moyenne pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en présence de calcium, de 25 à 75 °C.....118
- Figure 4.12 : Variation de l'entropie topographique de PA-d₃₁ et des CER III vs Chol en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....121
- Figure 4.13 : Variation du rapport d'intensité des bandes ν_{CH} 2880 et 2850 cm^{-1} et de la largeur de bande ν_{CD} à 2096 cm^{-1} en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....125
- Figure 4.14 : Distributions de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III et de PA-d₃₁ pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence de calcium, de 25 à 75 °C.128
- Figure 4.15 : Distributions de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III et de PA-d₃₁ pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en présence de calcium, de 25 à 75 °C.129

- Figure 4.16 : Cartes de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III et de PA-d₃₁ pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence de calcium, de 25 à 75 °C.132
- Figure 4.17 : Cartes de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III et de PA-d₃₁ pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en présence de calcium, de 25 à 75 °C.133
- Figure 4.18 : Variation de l'entropie topographique de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles de PA-d₃₁ et des CER III en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....135
- Figure 4.19 : Spectres Raman expérimental de la région région ν_{CH} et décomposition spectrale à 25 °C pour un mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1).....138
- Figure 4.20 : Courbe de calibration, pour la détermination de la fraction binaire en cholestérol (Chol^b).....139
- Figure 4.21 : Courbe de calibration du rapport d'aire des régions ν_{CD} et ν_{CH} en fonction de la contribution du cholestérol.....140
- Figure 4.22 : Cartes superposées de la distribution des fractions molaires des CER III, de PA-d₃₁ et du Chol à 25 °C pour un mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....142
- Figure 4.23 : Histogrammes des fractions molaires des CER III, de PA-d₃₁ et du Chol pour les cartes de la figure 4.22.....143
- Figure 5.1 : Variation de la position des bandes ν_sCH_2 et ν_sCD_2 en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....155
- Figure 5.2 : Spectres infrarouges de la région δCH_2 pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence et en présence de calcium, à 30 et 75 °C.....158
- Figure 5.3 : Variation de la largeur de la bande δCH_2 en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....159

- Figure 5.4 : Spectres infrarouges de la région δCD_2 pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence et en présence de calcium, à 30 et 75 °C.....161
- Figure 5.5 : Variation du rapport d'aire de la bande centrale δCD_2 (A_M) et de l'aire totale des trois composante (A_T) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....162
- Figure 5.6 : Spectres infrarouges de la région amide I' et ν_{COO} en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence et en présence de calcium, à 30 et 75 °C.....163
- Figure 5.7 : Distributions de PA-d₃₁ et des CER III vs Chol pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence de calcium, de 25 à 75 °C.....166
- Figure 5.8 : Distributions de PA-d₃₁ et des CER III vs Chol pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en présence de calcium, de 25 à 75 °C.....167
- Figure 5.9 : Cartes de la distribution de PA-d₃₁ et des CER III vs Chol pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence de calcium, de 25 à 75 °C.....169
- Figure 5.10 : Cartes de la distribution de PA-d₃₁ par rapport à la moyenne et des CER III vs Chol par rapport à la moyenne pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en présence de calcium, de 25 à 75 °C.....170
- Figure 5.11 : Variation de l'entropie topographique de PA-d₃₁ et des CER III vs Chol en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....171
- Figure 5.12 : Variation du rapport d'intensité des bandes ν_{CH} 2880 et 2850 cm^{-1} et de la largeur de bande ν_{CD} à 2096 cm^{-1} en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence et en présence de calcium.....173
- Figure 5.13 : Distributions de l'ordre conformationel des chaînes alkyles des CER III et de PA-d₃₁ pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) en absence de calcium, de 25 à 75 °C.....175

Figure 5.14 :	Distributions de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III et de PA-d ₃₁ pour le mélange CER III/PA-d ₃₁ /Schol (1/1/1) en présence de calcium, de 25 à 75 °C.....	176
Figure 5.15 :	Cartes de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III et de PA-d ₃₁ pour le mélange CER III/PA-d ₃₁ /Schol (1/1/1) en absence de calcium, de 25 à 75 °C.....	178
Figure 5.16 :	Cartes de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III et de PA-d ₃₁ pour le mélange CER III/PA-d ₃₁ /Schol (1/1/1) en présence de calcium, de 25 à 75 °C.....	179
Figure 5.17 :	Variation de l'entropie topographique de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles de PA-d ₃₁ et des CER III en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d ₃₁ /Schol (1/1/1) en absence et en présence de calcium	180
Figure 6.1 :	Spectres Raman de peau et d'épiderme humain sur gel d'Agar.....	187
Figure 6.2 :	Spectres Raman d'un épiderme sur gel d'Agar, à 1 et 48 heures après le retrait du derme.....	191
Figure 6.3 :	Spectres Raman d'un épiderme hydraté, séché, réhydraté, sec et décongelé puis réhydraté après la congélation	192
Figure 6.4 :	Spectres Raman confocals d'un film de téflon déposé sur un épiderme sec.....	194
Figure 6.5 :	Variation du rapport d'aire des bandes associées au film de téflon sur l'aire des bandes de peau en fonction de la profondeur du point focal.....	194
Figure 6.6 :	Variation de la bande $\nu_s\text{CH}_2$ par spectroscopie infrarouge et du rapport I_{2880}/I_{2850} par spectroscopie Raman d'un épiderme humain en fonction de la température.....	197
Figure 6.7 :	Spectre Raman d'épiderme humain après et avant l'ajout de DMSO.....	200
Figure 6.8 :	Schémas de l'effet du changement d'indice de réfraction du milieu sur le point focal en fonction de la profondeur.....	204

Liste des abréviations

ATR	Réflexion totale interne atténuée
CER III	Céramides III
Chol	Cholestérol
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
DMPG	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoglycérol
DMSO	Diméthyle sulfoxide
DSC	Calorimétrie à balayage
EDTA	Acide éthylènediaminetétracétique
MES	Acide 2-[N-morpholino]éthanesulfonique
MLV	Vésicule multilamellaire
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
ITC	Titration calorimétrique isotherme
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine
POPG	1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -phosphatidylglycérol
L _α	Phase liquide-cristalline
L _β	Phase gel
l _o	Phase liquide ordonnée
LUV	Grosse vésicule unilamellaire
PA	Acide palmitique (hexadécanoïque)
PC	Phosphatidylcholine
PG	Phosphatidylglycérol
RMN	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
SC	<i>Stratum corneum</i>
Schol	Sulfate de cholestérol
SUV	Petite vésicule unilamellaire
T _m	Température de transition principale
v	Mode d'élongation
δ	Mode de déformation

*À mes parents pour les raisons d'usage,
mais pour les autres surtout.*

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de recherche, le professeur Michel Lafleur, pour avoir supervisé mes travaux de recherche durant mes cinq années aux études graduées. Sa grande rigueur dans toutes les étapes de la recherche, depuis le développement d'un projet au laboratoire jusqu'à l'interprétation des résultats, a contribué au développement de mon esprit scientifique. De même, sa pédagogie m'a appris à communiquer clairement mes idées de manières orales et écrites.

En second lieu, je veux souligner l'importance du docteur Aline Percot dans ma formation scientifique. Ce fut un modèle lors de ma première année de travaux qui m'a notamment appris l'organisation du travail et des résultats, une qualité si importante en recherche.

Je remercie le fond québécois FQRNT et l'Université de Montréal pour le support financier qui m'a été accordé durant mes études supérieures.

Un merci finalement à tous ceux qui ont croisé mon parcours universitaire, tout particulièrement à mes collègues de travail qui ont vécu au quotidien les périodes de démotivation mais aussi de grandes joies que procure la recherche. Un merci surtout à Eric Demers, Gertrude Fiset, Benoît Arseneault, Lucie Marcotte et Lesley Courtemanche.

1. INTRODUCTION

La peau n'est pas une surface plane et uniforme, mais un organe complexe et fascinant. La conservation de l'hydratation du corps humain repose sur une structure d'à peine quelque 100 μm d'épaisseur avec en moyenne près de 2 m^2 de surface exposée à l'environnement (Montagna et Parakkal, 1974). Il est généralement admis que le *stratum corneum* (SC), la couche superficielle de la peau, est le principal responsable de l'imperméabilité du corps (Onken et Moyer, 1963 ; Schaefer et Redelmeier, 1996). Cette barrière de protection contre l'environnement tient ses propriétés de sa composition toute particulière en lipides, distincte des autres membranes du corps.

C'est au cours du 19^e siècle que débutent les travaux sur les lipides de la peau. En 1890, Liebreich postule que la formation du SC chez les mammifères demande un arrangement hautement organisé de lipides (Schurer et Elias, 1991). Les premières observations de la propriété d'imperméabilisation du SC sont faites par Winsor et Burch en 1944 alors qu'ils notent une augmentation de la perte d'eau transdermique lorsque le SC est endommagé par l'usage de solvant organique (Winsor et Burch, 1944). L'idée selon laquelle un SC avec un contenu en lipide intact est nécessaire pour maintenir l'intégrité de la barrière épidermique a depuis été confirmée et a conduit à de nombreuses recherches dans le but de caractériser cet ensemble complexe.

Cette thèse s'inscrit donc dans une série de travaux portant sur le comportement des lipides du SC, notamment des travaux faits au sein du groupe (Benachir et Lafleur,

1995 ; Kitson et al., 1994 ; Lafleur, 1998 ; Paré et Lafleur, 2001 ; Percot et Lafleur, 2001 ; Velkova et Lafleur, 2002). Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à l'organisation lipidique, par le biais de mélanges lipidiques modèles en spectroscopie infrarouge et Raman, et à l'absorption transdermique, en proposant une nouvelle approche utilisant l'épiderme humain *in vitro*.

Bien que les mélanges lipidiques du SC aient déjà fait l'objet de nombreuses études, certains aspects restent à être caractérisés. Ces travaux se penchent sur l'effet de la présence d'ions divalents sur l'organisation lipidique, à savoir s'il en modifie jusqu'à la structure très ordonnée du SC. Ils examinent aussi le rôle du sulfate de cholestérol (Schol), un constituant minoritaire des lipides du SC dont l'accumulation change les propriétés de cohésion du SC et les processus de desquamation de la peau (Elias, 1983 ; Williams, 1991 ; Yarkley et Summerly, 1981). Finalement, la spectroscopie Raman est utilisée comme méthode pour suivre la diffusion dans l'épiderme afin de savoir s'il était possible de mettre en relation la pénétration d'un composé et son effet sur le SC.

1.1. Une description générale du SC

Le SC est l'épithélium de surface de l'épiderme (Odland, 1971 ; Schaefer et Redelmeier, 1996 ; Thivolet, 1980). La peau peut se diviser en trois régions principales, depuis l'intérieur vers l'extérieur : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. Les systèmes nerveux, sanguins et lymphatiques n'atteignent pas l'épiderme. Ce dernier possède, à sa

base, une couche de cellules souches se reproduisant pour former des cellules épithéliales filles qui se différencient au cours de leur progression vers la surface de la peau. La migration depuis le *stratum basal* jusqu'au *stratum granulosum* termine la différenciation et conduit à la formation de cornéocytes (figure 1.1). Ces cellules sont caractérisées par leur grande taille, avec des diamètres allant de 20 à 30 μm , et par la production d'une protéine fibreuse, la kératine. Terminant leur progression vers la surface, les cornéocytes parviennent au dernier épithélium, le SC, meurent et deviennent des structures plus ou moins cylindriques (Thivolet, 1980) d'environ 40 μm de diamètre et 0,5 μm d'épaisseur,

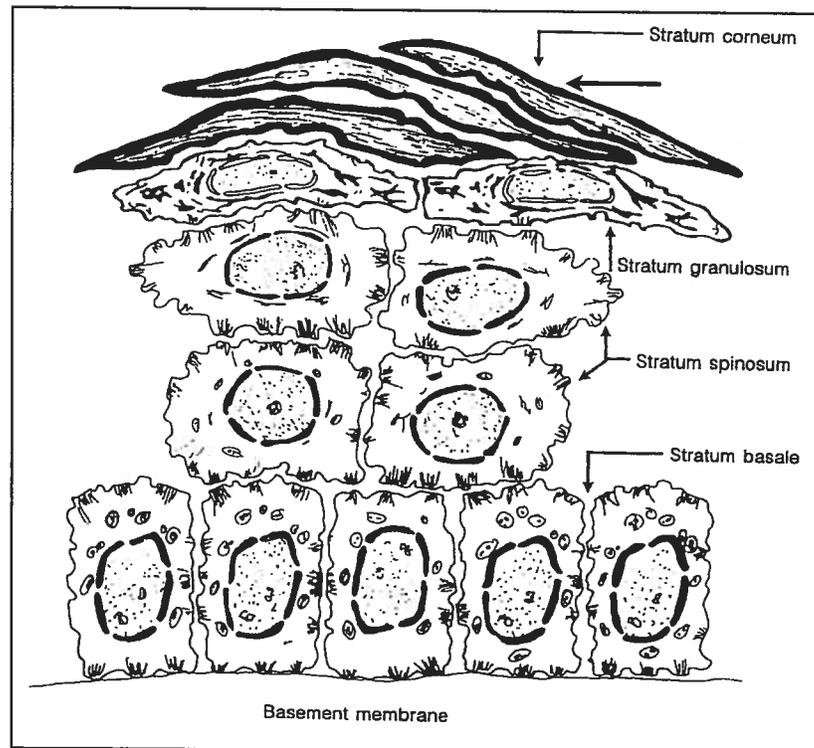


Figure 1.1 : Représentation schématisée de la structure stratifiée de l'épiderme vivant. (Schaefer et Redelmeier, 1996).

sans organelles ou cytoplasme, remplies de fibres de kératine insolubles (Schaefer et Redelmeier, 1996). Bien que la couche cornée de l'épiderme, ou SC, soit formée de cellules mortes, il n'en demeure pas moins qu'il s'agit d'un tissu métaboliquement actif continuellement soumis à un renouvellement de sa structure.

Hautement spécialisé, le SC se divise en deux sous-couches de fonctionnalités distinctes, le *stratum compactum* et le *stratum disjonctum* (Schaefer et Redelmeier, 1996). Le *stratum compactum* est une couche compacte suivant le *stratum granulosum* qui assure une fonction de barrière pour l'épiderme vivant. Le *stratum disjonctum* est quant à lui la couche où se produit la desquamation de la peau permettant un renouvellement constant de l'épiderme.

La composition lipidique particulière du SC est le résultat de changements se produisant au cours de la différenciation cellulaire. Pendant la migration à travers les couches successives de l'épiderme, différents processus enzymatiques modifient les lipides cellulaires de la couche basale. Ainsi, à la base de l'épiderme, les membranes cellulaires, telles qu'on les retrouve ailleurs dans le corps, sont composées principalement de phospholipides, formant près de 50 % en poids de la totalité des lipides (Schurer et Elias, 1991). Le reste se compose de sphingolipides, de stérols, d'acides gras, de triglycérides et de stérols estérifiés. Durant la différenciation finale des cornéocytes, les acides gras sont formés principalement à partir de l'hydrolyse des phospholipides (Elias et Menon, 1991 ; Elias et al., 1988). Le sulfate de cholestérol présent dans l'épiderme viable est dégradé

enzymatiquement presque en totalité en cholestérol (Chol) par la stéroïde sulfatase, lors de son passage du *stratum granulosum* au *stratum corneum*. Finalement, la différenciation des cornéocytes se termine par la métabolisation par la glycosidase des sphingolipides pour augmenter significativement la fraction en céramides. Il existe également un gradient de pH depuis l'épiderme vivant jusqu'à la couche morte que représente le SC. Différent du pH physiologique neutre d'environ 7,4, le pH de la couche cornée se situe entre 4 et 6 (Öhman et Vahlquist, 1994 ; Öhman et Vahlquist, 1998). Ce pH acide pourrait être nécessaire pour plusieurs processus enzymatiques se produisant lors de la cornification (Freinkel et Aso, 1969 ; Meyer et al., 1990). L'épiderme humain produit ainsi près de 100 mg de lipides par jour (Elias et al., 1988 ; Yarkley et Summerly, 1981).

Grossièrement, le SC est donc constitué de cellules kératinisées retenues entre elles principalement par la matrice lipidique (Thivolet, 1980). Son organisation est ainsi souvent représentée par le modèle simple du mur de brique (Elias, 1983 ; Forslind, 1994); les cornéocytes représentés par les briques sont maintenus entre eux par la matrice lipidique qui tient lieu de mortier (figure 1.2). Ce modèle simple suggère que les lipides intercellulaires forment un domaine continu dans le SC. Ce domaine est la clé des propriétés de perméabilité et de cohésion du SC.

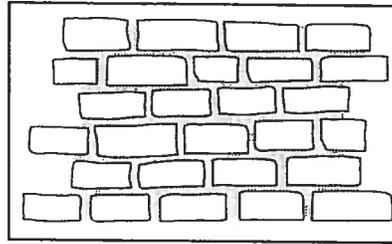


Figure 1.2 : Modèle simplifié du SC ayant la structure d'un mur de briques (cellules cornéocytes) retenues entre elles par un mortier (matrice lipidique). (Schaefer et Redelmeier, 1996)

1.2. Les phases lipidiques

De par leur caractère amphiphile, les lipides, lorsqu'hydratés, adoptent différents empilements de façon à réduire les contacts défavorables avec le milieu aqueux. Les interactions de types Van der Waals entre les chaînes alkyles stabilisent ces associations. À l'interface avec l'eau, des forces électrostatiques, stériques ou des liaisons hydrogène peuvent être présentes. La préférence morphologique des auto-assemblages de lipides dépend d'une fine balance entre les interactions de type hydrophile/hydrophobe, influencée par des paramètres physiques, comme la température, et des paramètres chimiques, tels que le pH ou la force ionique.

Dans l'état cristallin, la bicouche est rigide et les chaînes alkyles sont complètement *trans*. Différentes mailles peuvent être distinguées, notamment les empilements orthorhombiques (figure 1.3.A) et hexagonal (figure 1.3.B) (Mendelsohn et Moore, 2000). Sous leur forme hydratée, à basse température, on retrouve généralement les lipides dans la phase gel (L_{β}) (figure 1.4.B). Dans cette phase, l'ordre conformationnel des

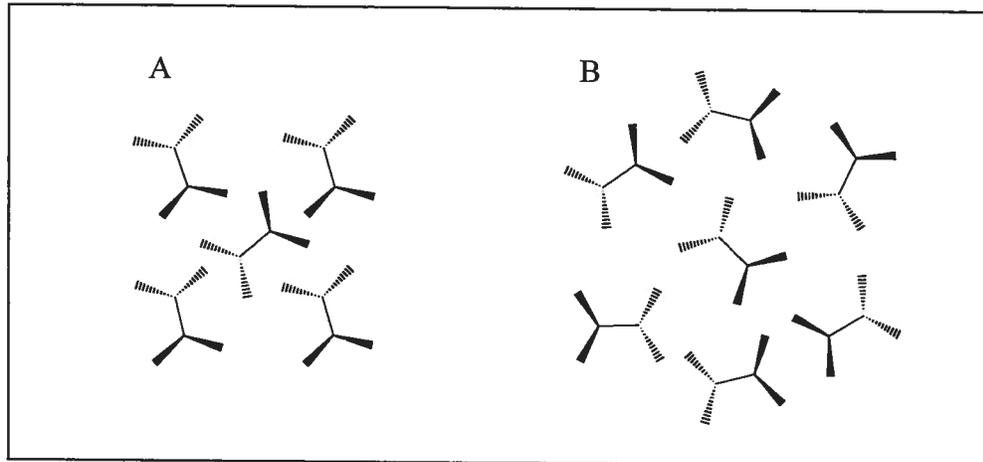


Figure 1.3 : Empilement orthorhombique (A) et hexagonal (B) des chaînes alkyles.

chaînes alkyles est important et on ne retrouve pratiquement que des conformations *trans* (Gennis, 1989). Les mouvements axiaux et latéraux des lipides y sont lents. À la température de transition (T_m), la bicouche devient plus fluide et les lipides se retrouvent dans la phase liquide cristalline (L_α) (figure 1.4.C). Cette transition est analogue à la fusion d'un solide par l'introduction d'un gain de liberté pour les mouvements axiaux et latéraux (Levin, 1984). On observe aussi un désordre des chaînes alkyles par l'introduction de conformations *gauches*.

Dans les membranes, en quantité suffisante, le cholestérol est reconnu pour induire la formation de phase liquide ordonnée (l_o) et pour modifier significativement le thermotropisme de plusieurs lipides notamment les acides gras (McMullen et al., 1993 ; Ouimet et Lafleur, 2004 ; Paré et Lafleur, 1998 ; Thewalt et Bloom, 1992 ; Vist et Davis,

1990). Cette phase lo est caractérisée par un ordre conformationel des chaînes alkyles se rapprochant de la phase gel, mais avec une rotation axiale et une mobilité dans la bicouche comparable à celles de lipides dans la phase liquide cristalline (Mouritsen et Zuckermann, 2004). Par sa structure rigide et plane, le cholestérol contraint les chaînes alkyles à conserver un ordre conformationel important sans réduire considérablement la diffusion dans la structure lamellaire fluide.

Les formations lamellaires peuvent adopter différentes organisations dans l'espace. Les bicouches peuvent se refermer spontanément sur elles-mêmes pour former une structure sphérique appelée vésicule (Gennis, 1989). Les vésicules formées de multicouches (multilamellar vesicles ou MLVs) peuvent être brisées mécaniquement pour former des vésicules unilamellaires. Deux méthodes sont utilisées. Les multicouches peuvent être

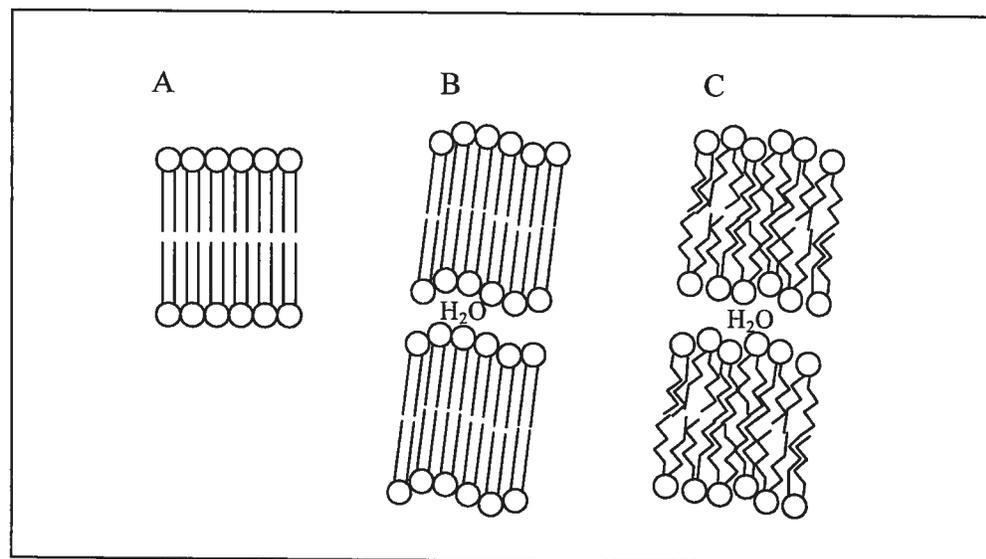


Figure 1.4 : Phase des lipides. Phase solide cristalline (A), phase gel (B), phase liquide-cristalline (C).

brisées par l'utilisation d'ondes acoustiques de fréquence ultrason pour donner de petites vésicules unilamellaires (small unilamellar vesicles ou SUVs) dont la taille varie généralement de 30 à 60 nm. Alternativement, les MLVs peuvent être contraintes de passer à travers un filtre dont les pores possèdent un diamètre bien défini. Ces pores varient entre 50 et 200 nm et les vésicules résultantes sont appelées Large unilamellar vesicles ou LUVs.

1.3. La structure lipidique du SC

1.3.1. Les lipides extraits du SC

Le SC est riche en céramides à près de 20-30 % (p/p), en acide gras à 20-30 % (p/p) et en cholestérol à 20-40 % (p/p) (Elias et Menon, 1991 ; Gray et Yardley, 1975 ; Schurer et Elias, 1991 ; Wertz et al., 1987 ; Zellmer et Lasch, 1997). D'autres lipides tels que le sulfate de cholestérol avec 2 % (p/p), les stérols estérifiés à 9% (p/p) et les triglycérides 5% (p/p) se trouvent aussi dans le SC. Des hydrocarbures et des glycolipides sont présents en quantités traces. En regard des trois principaux constituants, les différences inter-individus sont très importantes de même qu'en regard de la position sur le corps, de l'âge de la peau ou de la saison de l'année (Brancaleon et al., 2001 ; Humbert, 2003 ; Norlén et al., 1999), expliquant ainsi les variations dans les pourcentages rapportés dans la littérature.

Les céramides, qu'on retrouve presque exclusivement dans le SC, sont constitués d'un groupement sphingosine dérivé de la dégradation de la sphingomyéline (Monger et al., 1988) auquel est lié un acide gras par une fonction amide. Les céramides représentent un groupe de lipides de structures hétérogènes (Gray et White, 1978). On distingue, dans le SC humain, les céramides selon leurs têtes polaires en 6 classes (CER(1-6)) (Schurer et Elias, 1991 ; Wertz et Downing, 1983). Les céramides 1 à 3 sont représentés à la figure 1.5 afin d'illustrer les différences structurales. Toutes les classes contiennent des chaînes aliphatiques allant de 16 à 30 carbones, avec une large proportion de chaînes saturées C₂₂ à C₂₆ (Elias et al., 1979 ; Gray et White, 1978). Hautement saturés, ces lipides sont particulièrement résistants à l'oxydation lors de l'exposition à l'air. De même, leur géométrie cylindrique et l'importance des longueurs de chaîne permettent un empilement particulièrement compact, une propriété importante pour l'imperméabilité du SC (Wertz et al., 1987).

Des études mettent en relief les différences d'organisation des lipides selon le choix du type de céramides (Jager et al., 2004a ; Jager et al., 2004b). Les céramides 2 représentent la principale catégorie de céramides isolés du SC et jouent un rôle majeur dans son organisation. Les céramides III (CER III) extraits du cerveau bovin sont l'équivalent des céramides 2 de la peau. L'appellation CER III est cependant conservée pour tenir compte du fait que la distribution des chaînes peut être légèrement différente de celle obtenue pour les lipides isolés de la peau humaine (Wertz et al., 1985). Chen et al. rapportent que le comportement des céramides 2 est pratiquement indépendant de la

longueur de chaîne, entre 16 et 20 atomes de carbone, principalement à cause de la sphère d'hydratation très réduite du lipide (Chen et al., 2000). De plus, l'utilisation répandue de ces céramides pour l'étude des propriétés du SC permet de comparer les résultats obtenus avec ceux d'autres équipes de recherche.

Les acides gras sont présents dans toutes les couches de l'épiderme et possèdent des chaînes allant de C_{12} à C_{24} (Lampe et al., 1983 ; Schurer et Elias, 1991). Dans le SC humain, les chaînes sont majoritairement saturées (à environ 90 %) et les plus abondantes sont C_{24} (~27 %) suivies de C_{18} (~9 %) (Odland, 1971).

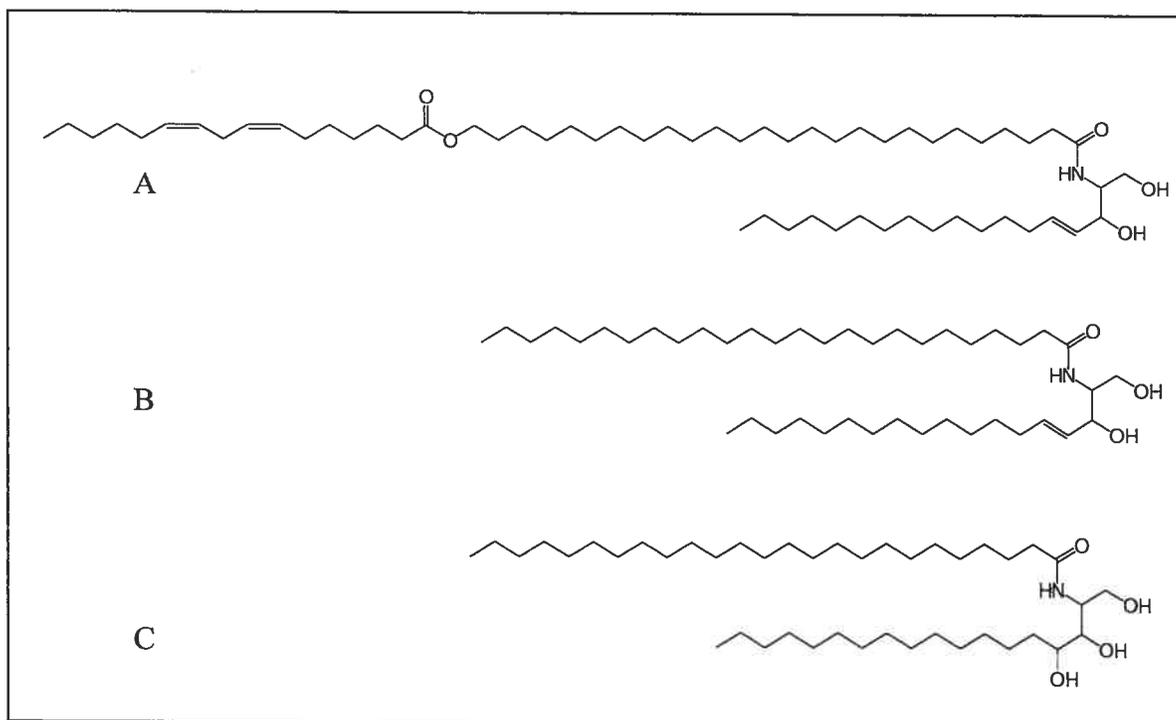


Figure 1.5 : Structures de céramides du SC humain. Céramides 1 (A), céramides 2 (B), céramides 3 (C).

La synthèse *de novo* du cholestérol se produisant dans l'épiderme totalise près de 10 % du cholestérol total synthétisé chez les mammifères (Schurer et Elias, 1991). La production de cholestérol est régularisée par l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase afin de maintenir une concentration massique d'environ 20 à 40 % des lipides totaux.

L'étude par microscopie électronique à transmission électronique révèle la présence dans le SC de structures lamellaires complexes avec une répétition de bandes larges-étroites-larges dont la périodicité est d'environ 13 nm (Hou et al., 1991 ; Kuempel et al., 1998 ; Madison et al., 1987). Parmi les différents modèles expliquant cette périodicité, Bouwstra et al. proposent une répétition de bicouches intercalées de bicouches de moindre épaisseur induite par la présence de céramides 1 (figure 1.5.A) (Bouwstra et al., 2001). Ce céramide plus long servirait de lien entre les bicouches et jouerait le rôle de « fermeture éclair » pour rapprocher les structures lamellaires durant la différenciation cellulaire (Wertz, 2000). La même périodicité dans les lipides extraits du SC est observée par diffraction des rayons X. À basse température, deux phases lamellaires hautement ordonnées avec une périodicité de 13 et 4 nm sont rapportées pour des lipides extraits du SC (Bouwstra et al., 1994 ; Bouwstra et al., 1991 ; Hatta et al., 2001 ; White et al., 1988 ; Zellmer et al., 1998). Par microscopie cryoélectronique, où des structures denses de 44 nm sont observables dans les régions adjacentes aux cornéocytes, on a noté une répétition d'environ 4,3 nm (Wieprecht et al., 2002).

En plus de la structure lamellaire, les lipides extraits du SC forment des domaines cristallins. On rapporte la présence de cristaux de cholestérol observables par diffraction des rayons X aux petits angles (Bouwstra et al., 1994 ; Zellmer et al., 1998). En dessous de 40 °C, plusieurs résultats montrent la présence d'une structure cristalline ayant un empilement orthorhombique (Bouwstra et al., 1994 ; Pilgram et al., 1999 ; Zellmer et al., 1998), notamment par la présence d'un dédoublement des bandes δCH_2 en spectroscopie infrarouge (Ongpipattanakul et al., 1994). Lors du chauffage, on observe une transition depuis la phase cristalline orthorhombique vers une phase hexagonale entre 40 et 55 °C (Bouwstra et al., 1994 ; Bouwstra et al., 1992 ; Chen et Wiedmann, 1996 ; Pilgram et al., 1999). Une seconde transition de phase, de 60 à 70 °C, conduit à la fluidification des lipides extracellulaires qui n'adoptent plus une structure lamellaire (Bouwstra et al., 1992 ; Knutson et al., 1986 ; White et al., 1988).

1.3.2. Les mélanges lipidiques simplifiés

Les lipides du SC représentent un mélange complexe où les contributions de chaque composante à l'organisation lipidique sont difficiles à clairement définir. Pour cette raison, on utilise des mélanges simplifiés permettant de mettre en évidence les paramètres importants qui dictent le polymorphisme des lipides.

Il a été établi qu'un mélange ternaire équimolaire composé de céramides, d'acides gras et de cholestérol permettait de reproduire les structures lamellaires observées pour les mélanges de lipides extraits du SC. Par diffraction des rayons X, les unités de répétition sont de 13,4 et 6,4 nm, pour les mélanges modèles à basse température, tel qu'observé pour les lipides extraits du SC (Bouwstra et al., 1999 ; Bouwstra et al., 1996 ; Hill et Wertz, 2003 ; Kitagawa et al., 1995). Ces résultats sont obtenus avec différents mélanges de céramides extraits ou de synthèse (Bouwstra et al., 2001 ; Grotenhuis et al., 1996 ; Mizushima et al., 1996).

À température physiologique, les groupes de Mendelsohn et de Lafleur observent par spectroscopie infrarouge un dédoublement des bandes de déformation des groupements méthylènes des chaînes alkyles des lipides, signature d'empilements orthorhombiques (Lafleur, 1998 ; Mendelsohn et Moore, 1998 ; Mendelsohn et Moore, 2000 ; Moore et Rerek, 2000 ; Moore et al., 1997a ; Moore et al., 1997b ; Velkova et Lafleur, 2002). L'utilisation de mélanges modèles de la matrice lipidique du SC permet d'introduire une composante marquée isotopiquement et de distinguer le comportement de ce produit dans les mélanges par spectroscopie vibrationnelle et par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire. Il a ainsi été établi qu'à basse température, la phase hautement ordonnée était le résultat de la formation de domaines cristallins de chacune des composantes (Fenske et al., 1994 ; Lafleur, 1998 ; Moore et al., 1997a ; Thewalt et al., 1992). L'étude par spectroscopie RMN-²H révèle aussi une phase solide pour l'acide palmitique (PA) et le cholestérol (Fenske et al., 1994) dans le mélange ternaire CERIII/PA(-d₃₁)/Chol(-d₅). Finalement, la

diffraction des rayons X confirme la présence de domaines cristallins de cholestérol et d'acide palmitique dans ce mélange modèle (Bouwstra et al., 1997).

Avec l'augmentation de la température, les lipides subissent une transition de phase, depuis un état cristallin très ordonné vers une phase fluide. Il existe cependant une divergence dans la littérature sur l'évolution de l'ordre des céramides et de l'acide gras lors de cette transition. Moore et al. ont observé, à partir des bandes d'élongation des chaînes alkyles, que l'acide palmitique et les céramides se fluidifient séparément autour de 50 et 67 °C respectivement (Moore et al., 1997a). D'autre part, une transition simultanée des deux lipides est rapportée par d'autres études (Fenske et al., 1994 ; Kitson et al., 1994 ; Lafleur, 1998). Dans ce cas, les lipides passeraient par une phase l_0 , autour de 50 °C, pour se désordonner encore plus à 70 °C.

Plus récemment, des images obtenues par spectroscopie vibrationnelle ont été publiées. Mendelsohn et Moore ont rapporté, par microscopie infrarouge, une hétérogénéité de la distribution des céramides par rapport aux acides gras dans un mélange ternaire CER III/PA-d₃₁/Chol (Mendelsohn et Moore, 2000). L'imagerie de 400 × 400 μm montre une hétérogénéité de l'intensité ν_{CH} , ν_{CD} et ν_{OH} , avec une résolution spatiale de 7 μm². Avec une meilleure résolution, de l'ordre du μm², la microscopie Raman a confirmé, par une observation directe de la distribution spatiale des composantes du mélange, la présence de domaines enrichis en chacune des trois composantes du mélange CERIII/PA-d₃₁/Chol (1/1/1), de l'ordre de grandeur d'une dizaine de μm (Percot et Lafleur, 2001). À plus petite

échelle, des images AFM ont permis de visualiser la nucléation de domaines cristallins (Sparr et al., 2001).

Ce comportement cristallin n'est pas reproduit lorsque les céramides sont remplacés par leurs précurseurs naturels. Ainsi les mélanges ternaires équimolaires composés de sphingomyéline, d'acide gras et de cholestérol se trouvent dans la phase lamellaire fluide aux basses températures (Bouwstra et al., 1997 ; Fenske et al., 1994 ; Kitson et al., 1994 ; Thewalt et al., 1992) et aucune séparation de phase n'est observée (Velkova et Lafleur, 2002). Il est possible que l'organisation cristalline, responsable des propriétés de perméabilité, repose sur la taille restreinte de la tête polaire des céramides, leur permettant un empilement compact et des interactions fortes entre les fonctions amide (Moore et al., 1997b).

1.3.3. L'effet des d'ions calcium sur les lipides du SC

Le calcium joue un rôle essentiel dans le maintien de la barrière épidermique (Lee et al., 1998 ; Tanojo et Maibach, 1999). Le gradient de concentration du calcium dans l'épiderme permet dans le *stratum basal*, où la concentration en calcium total est faible, la prolifération des cellules, puis à mesure que les cellules migrent, l'augmentation de calcium induit la différenciation cellulaire (Lee et al., 1998 ; Tanojo et Maibach, 1999 ; Vicanova et al., 1998). De la même façon, lorsque du calcium est introduit par électrophorèse dans les couches profondes de l'épiderme, la récupération de la barrière épidermique est

particulièrement lente (Tokudome et Sugibayashi, 2004), la concentration élevée réduisant la capacité de l'épithélium de se régénérer.

Un profil de la concentration du calcium libre dans l'épiderme montre que sa concentration passe de 200 μg par g d'épiderme dans la couche basale à environ 800 μg par g dans les *stratums spinosiste* et *granulosum* (Tanojo et Maibach, 1999). Ces quantités se réfèrent au calcium libre intra - et extracellulaire. La concentration d'ions Ca^{2+} chute rapidement dans le SC jusqu'à être inférieure à la limite de détection dans la partie supérieure, soit le *stratum disjonctum*. Vicanova et al. rapportent un profil semblable de la distribution du calcium dans l'épiderme, montrant une concentration d'environ 440 ppm à la base du *stratum granulosum*, suivi d'une décroissance dans les couches supérieures du SC pour atteindre des valeurs sous la limite de détection (Vicanova et al., 1998). La concentration extracellulaire exacte de Ca^{2+} dans le SC n'est pas connue.

Jusqu'à maintenant, les mélanges modèles du SC ont été étudiés dans des milieux excluant le calcium. En fait, un agent chélatant tel que l'EDTA est souvent inclus dans le tampon. On retrouve une certaine quantité de calcium dans le SC et celui-ci pourrait modifier considérablement le comportement des lipides du SC. Il a été montré pour plusieurs phospholipides et acide gras, notamment en présence de cholestérol, que les ions Ca^{2+} modifient drastiquement la structure adoptée et induisent des séparations de phases (Tilcock C.P.S. Tilcock et al., 1988 ; Van Dijck et al., 1978). D'autres études soulignent une transition $L_{\alpha} \rightarrow L_{\beta}$ pour les membranes en présence de calcium, conduisant à la

rigidification des chaînes alkyles dans une configuration complètement *trans* (Findlay et Barton, 1978 ; Papahadjopoulos et al., 1975 ; Van Dijck et al., 1975 ; Verkleij et al., 1974).

Nous avons donc examiné l'impact des ions calcium sur le mélange modèle composé CER III/PA-d₃₁/Chol dans un rapport équimolaire (figure 1.6). Le thermotropisme de ce dernier est caractérisé par spectroscopie infrarouge et microscopie Raman. Les spectres infrarouges permettent d'observer l'ordre conformationnel des chaînes du mélange ainsi que les groupements polaires de l'acide gras et des céramides en fonction de la température. La cartographie Raman ajoute la dimension spatiale à la caractérisation de ces mélanges hétérogènes. Ces travaux sont présentés au chapitre 4 de cette thèse.

Dans le but de caractériser les interactions lipides-ions calcium, nous avons examiné l'influence de la composition lipidique sur l'affinité du Ca²⁺ pour les membranes en utilisant la titration isotherme calorimétrique. Cette méthode a déjà été utilisée pour examiner l'affinité d'ions calcium pour des mélanges de phospholipides, soit le 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylglycérol (POPG) ainsi que la 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (POPC) (figure 1.7) (Garidel et Blume, 1999 ; Lehrmann et Seelig, 1994). Ces travaux sont rapportés au chapitre 3.

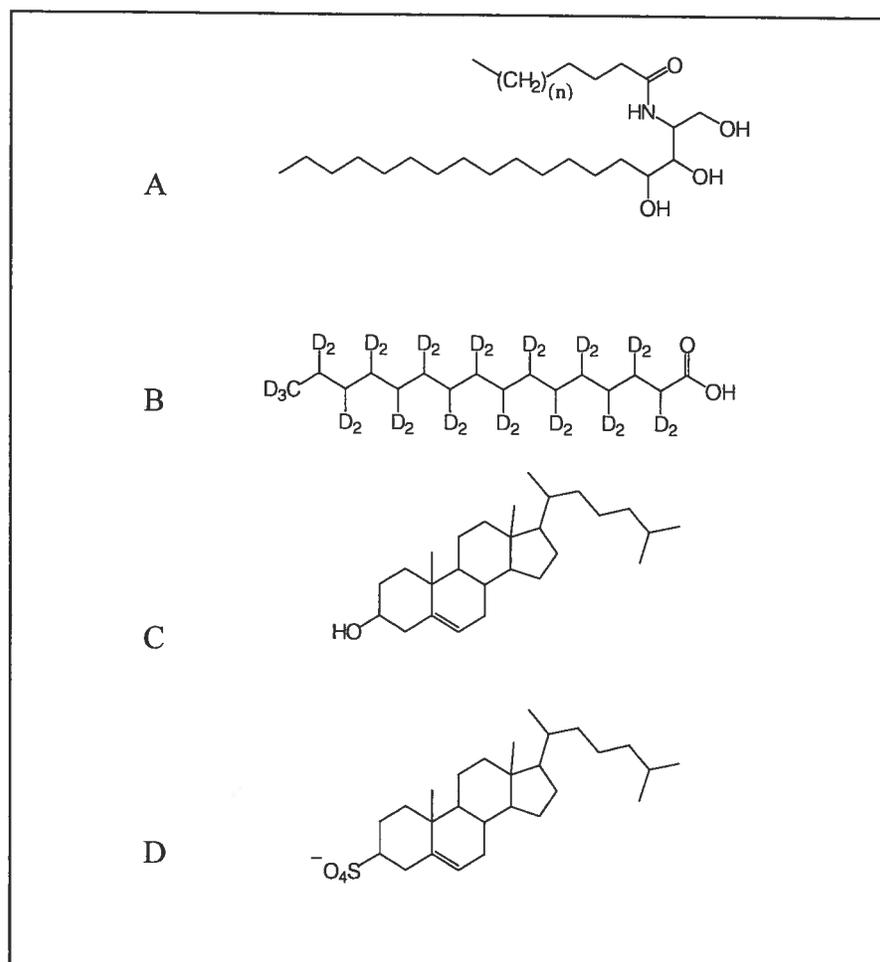


Figure 1.6 : Structure des lipides utilisés dans la composition des mélanges modèles du SC. Céramides III (A), acide palmitique perdeutééré (B), cholestérol (C), sulfate de cholestérol (D).

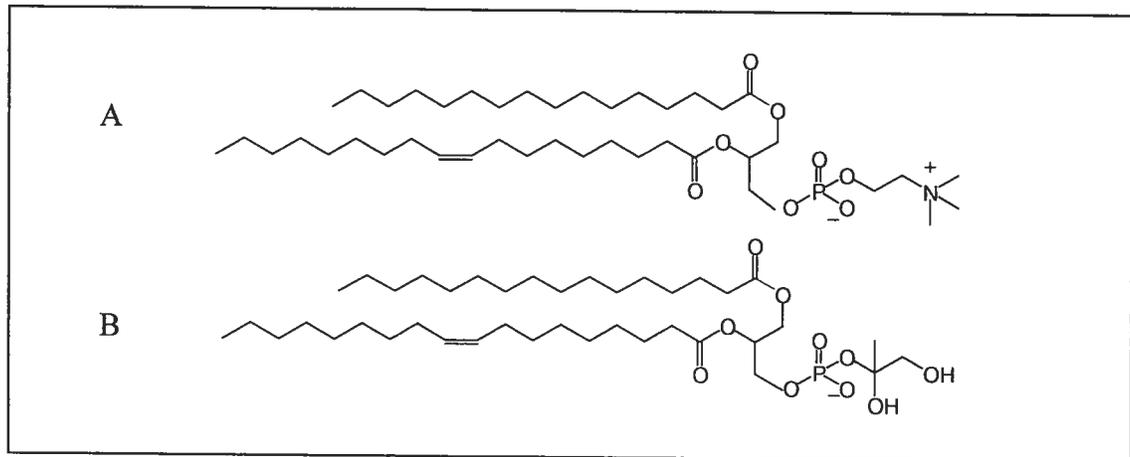


Figure 1.7 : Structures des phospholipides utilisés. POPC (A), POPG (B).

1.4. La propriété de cohésion du SC

1.4.1. L'ichtyose récessive liée à l'X

Au terme de la différenciation cellulaire, lorsque les cornéocytes parviennent à la surface de la peau, il y a desquamation au cours de laquelle le SC s'effrite. Les mécanismes de ce phénomène qui permettent une régénération continue de l'épiderme sont encore mal compris.

Dans l'épiderme vivant, des structures protéiques nommées desmosomes et dont la morphologie est bien définie servent à retenir les cornéocytes entre eux. Cependant, ces structures sont complètement dénaturées par le processus de kératinisation lorsque les cellules atteignent le SC (Epstein et al., 1981 ; Williams, 1991). Dans le SC, tel que décrit

plus tôt, il a été suggéré que les lipides jouent le rôle de mortier entre les cellules. De même, on a observé que le traitement par des solvants organiques permettait la dissolution du SC en cellules individuelles, et que ces dernières pouvaient être réagrégées en présence d'un mélange lipidique approprié pour donner un SC reconstitué dont les propriétés élastiques sont très similaires au SC natif (Smith et al., 1982).

Chez les personnes atteintes de l'ichtyose récessive liée au chromosome X, ce processus de desquamation est retardé, conduisant à la formation sur leur peau de larges squames foncées. Cette maladie rare est associée à un déséquilibre des lipides du SC (Williams et al., 1983 ; Yarkley et Summerly, 1981 ; Öhman et Vahlquist, 1998). Une tare génétique associée au chromosome X crée un déficit en stéroïde sulfatase qui, comme mentionné plus tôt, est une enzyme ayant pour fonction d'hydrolyser le sulfate de cholestérol en cholestérol au niveau du SC. Il s'ensuit une accumulation de sulfate de cholestérol (figure 1.8) qui n'est observée que pour ce type particulier d'ichtyose (Williams et al., 1983). Le SC contient normalement un faible pourcentage de sulfate de cholestérol allant de 2 % en masse de lipides dans le *stratum compactum* à environ 1 % dans le *stratum disjunctum* (Elias et al., 2004 ; Weerheim et Ponc, 2001). Dans le cas d'une peau en déficit de stéroïde sulfatase, la concentration en sulfate de cholestérol augmente à près de 12 %. Cette déficience enzymatique du SC conduit à penser que les lipides extracellulaires sont responsables de la cohésion de la couche cornée, et le sulfate de cholestérol pourrait participer au retardement du processus de desquamation.

Par sa structure chimique, le sulfate de cholestérol se différencie du cholestérol par sa tête polaire chargée négativement et l'absence de possibilité de liaisons hydrogène.

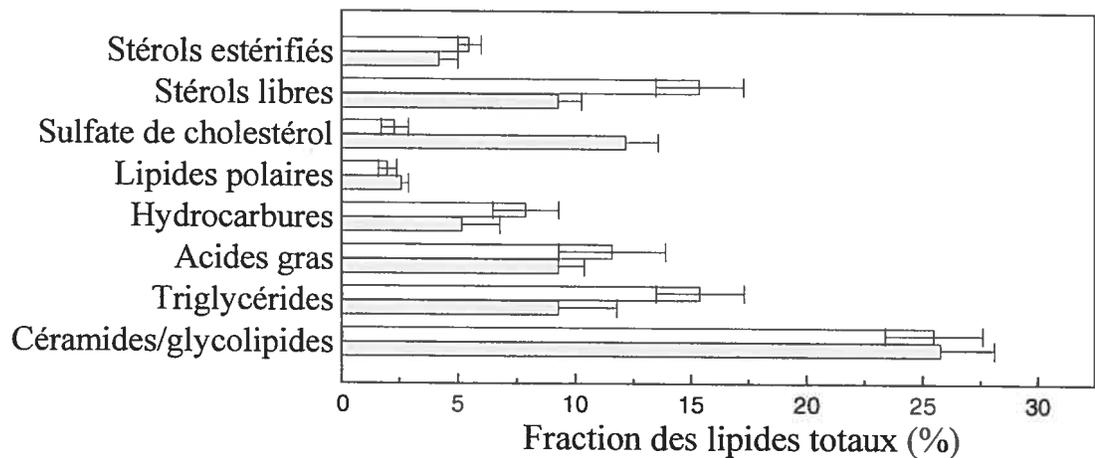


Figure 1.8 : Comparaison de la composition en lipide du SC pour une peau saine (□) et de la peau d'une personne atteinte de l'ichthyose récessive liée à l'X(●). À partir de (Williams et al., 1983).

Certains auteurs ont déjà proposé que cette charge négative permettrait une association avec les ions divalents tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Zn^{2+} , ce qui conduirait au pontage des bicouches et serait à l'origine d'une cohésion accrue du SC (Elias, 1983 ; Epstein et al., 1981). Le sulfate de cholestérol pourrait aussi modifier, à température physiologique, la fluidité de la matrice lipidique extracellulaire (Elias, 1983 ; Epstein et al., 1981). La modification de la cristallinité des lipides du SC pourrait aussi jouer un rôle dans le friabilité de la couche

cornée de la peau (Williams, 1991). Cependant, aucune évidence ne permet encore d'établir clairement le mécanisme retardant la desquamation normale.

Il a également été proposé que le taux plus élevé de sulfate de cholestérol limite la production *de novo* de cholestérol ; le sulfate de cholestérol est un inhibiteur *in vitro* puissant de l'enzyme hydroxyméthylglytaryl CoA réductase impliquée dans la synthèse du cholestérol. Le manque de cholestérol serait peut-être plus critique pour le fonctionnement normal du processus de desquamation que la présence de sulfate de cholestérol (Williams, 1991). Aucune évidence ne permet encore de distinguer l'importance du rôle joué par la surabondance ou l'absence de l'un ou l'autre de ces deux stérols dans le retardement de l'effritement du SC.

1.4.2. Le sulfate de cholestérol dans les mélanges modèles

Dans les mélanges de phospholipides, le sulfate de cholestérol, à la façon du cholestérol, augmente la fluidité des chaînes alkyles des lipides à des températures plus basses que la T_m . (Kitson et al., 1992). En contre-partie, aux températures supérieures à la T_m , la présence du stérol augmente l'ordre conformationel des chaînes lipidiques. L'ordre induit est cependant moins important dans le cas du sulfate de cholestérol que du cholestérol. Le sulfate de cholestérol conduit aussi à la formation de la phase l_o (Grimelec et al., 1984). Cependant, une étude en spectroscopie de fluorescence rapporte que le comportement du sulfate de cholestérol n'est pas exactement semblable à celui du

cholestérol quant à sa capacité à induire la formation de domaines dans les membranes de phospholipides (Xu et London, 2000).

On connaît encore peu l'impact de la présence du sulfate de cholestérol dans les mélanges modèles du SC. Bouwstra et al. ont observé par diffraction des rayons X que l'introduction de 2 à 10 % en masse du sulfate de cholestérol dans un mélange équimolaire CER/acides gras/Chol, à pH 5, permet la solubilisation du cholestérol et réduit les domaines cristallins (Bouwstra et al., 1999). Lorsque le sulfate de cholestérol est mélangé uniquement à un acide gras dans un rapport de 1/1, l'acquisition de thermogrammes successifs permet de constater que l'acide gras et le sulfate de cholestérol forment un mélange homogène (Rehfeld et al., 1986) et ne donnent pas lieu à la formation d'un mélange eutectique tel qu'observé pour le mélange PA/Chol (1/1) dans les mêmes conditions (Ouimet et Lafleur, 2004). Cependant, lorsque le sulfate de cholestérol remplace totalement le cholestérol dans un mélange modèle du SC équimolaire CER/PA-d₃₁/stérol, le thermotropisme obtenu par spectroscopie infrarouge ne permet pas de distinguer entre le comportement des deux mélanges (Velkova, 2000).

Compte tenu de la nature anionique du sulfate de cholestérol, il est possible que la présence de cations modifie le comportement des lipides. Ainsi, en présence de 2 % en masse de sulfate de cholestérol, les mélanges équimolaires CER/acides gras/Chol, auxquels sont ajoutés 2 mM de calcium, présentent les phases lamellaires avec une périodicité de 12,3 et 5,6 nm, typiques des lipides du SC (Bouwstra et al., 2000). Sans sulfate de

cholestérol, le calcium stabilise la structure lamellaire organisée jusqu'à environ 60 °C. Il a été proposé que les ions calcium s'associent aux acides gras ou au sulfate de cholestérol lorsque ce dernier est présent (Bouwstra et al., 1999). Les techniques utilisées ne permettent cependant pas de confirmer ces associations.

1.4.3. L'effet du sulfate de cholestérol et du calcium sur les lipides du SC

Pour relier les propriétés de cohésion du SC à sa composition en lipide, nous proposons l'étude d'un mélange ternaire équimolaire CER III/PA-d₃₁/stérol, où le cholestérol est remplacé par le sulfate de cholestérol. Il s'agit d'un changement important visant à mettre en relief l'effet du sulfate de cholestérol. De plus, l'ajout de calcium permet de noter l'impact d'ions divalents sur ces mélanges contenant un lipide anionique.

Une étude a déjà été faite par spectroscopie infrarouge sur un mélange CERIII/PA-d₃₁/Schol en absence de calcium. Il ne semble pas y avoir de changements notables entre les mélanges contenant du sulfate de cholestérol et ceux contenant du cholestérol (Velkova, 2000). Nous avons réexaminé le comportement de ce mélange en spectroscopie infrarouge et nos résultats sont quelque peu différents. Des mesures en microscopie Raman permettent de mieux caractériser l'hétérogénéité du mélange induite par le sulfate de cholestérol en termes de distribution, de taille et de forme des domaines. Ces travaux sont présentés au chapitre 5.

1.5. La propriété de perméabilité du SC

1.5.1. Les études *in vivo*, *in vitro* de perméabilité

Comme mentionné plus tôt, le SC est responsable de l'imperméabilité de la peau. Plusieurs études suggèrent que ce sont les lipides intercellulaires du SC qui forment la structure principale responsable de cette barrière (Ahn et al., 2001 ; Golden et al., 1987 ; Onken et Moyer, 1963 ; Smith et al., 1982 ; Sweeney et Downing, 1970). La cristallinité des lipides serait à l'origine de cette propriété de même que la continuité de la matrice lipidique. Golden et al. observent que l'augmentation du flux d'eau à travers le SC isolé se produit aux températures où la fluidification des chaînes est observée par spectroscopie infrarouge (Golden et al., 1987). Une étude faite sur un SC reconstitué à partir de cellules isolées du SC et de mélanges lipidiques extraits, montre que l'efficacité de la fonction de barrière est directement proportionnelle à la quantité de lipides dans la structure (Smith et al., 1982).

La mesure de la perte transdermique en eau est une technique souvent utilisée comme standard pour déterminer des variations de perméabilité de la peau (Tagami et al., 1982). La technique consiste à faire la mesure *in vivo* de la différence de pression de vapeur entre la surface de la peau et l'air ambiant. Les mesures doivent être faites à température et humidité de la pièce constantes sur un volontaire au repos.

Pour caractériser la pénétration d'un composé dans le SC *in vivo*, la méthode d'arrachement, ou le « tape test », est fréquemment utilisée (Rougier et Lotte, 1993). Cette méthode consiste à arracher une partie du SC à l'aide d'un ruban adhésif appliqué sur la peau avec une pression régulière. La couche de SC qui reste adhérente au ruban adhésif est typiquement de quelque μm d'épaisseur (Corcuff et al., 1993 ; Jacobi et al., 2005). Au fur et à mesure des arrachements, la couche retenue sur le ruban adhésif s'amincit dû à la plus grande résistance du SC dans les couches profondes. Par la répétition de l'opération et le dosage de l'analyte sur chaque ruban, il est possible d'établir le profil de pénétration dans le SC. Il n'est pas possible d'aller au-delà du SC, les cellules de l'épiderme vivant étant trop fortement liées entre elles. Cette méthode est fréquemment utilisée pour sa simplicité relative, et sa rapidité lors d'utilisation de radio-isotopes. Cependant, lorsque le marquage radioactif de l'analyte n'est pas possible, cette technique présente une difficulté en ce qui a trait à l'extraction des analytes de la colle utilisée sur le ruban. Cette mesure *in vivo* du profil de pénétration est aussi difficilement reproductible d'un laboratoire à l'autre (Schaefer et Redelmeier, 1996).

La perméabilité du SC peut aussi être mesurée *in vitro* en utilisant des cellules de diffusion de Franz (Bronaugh, 1993 ; Potts et al., 1989). À la manière d'une membrane, le SC est placé entre deux compartiments contenant des solutions de potentiels chimiques différents. En fonction du temps, on mesure le passage d'un analyte de part et d'autre du SC. Ceci implique que le SC est complètement immergé et donc son hydratation n'est pas

celle native, ce qui peut grandement modifier sa perméabilité (Blank, 1985 ; Hadgraft, 1999).

1.5.2. Les approches spectroscopiques

Plusieurs approches spectroscopiques ont été étudiées afin de développer une méthode fiable permettant des mesures de perméabilité avec une résolution spatiale satisfaisante tout en fournissant de l'information sur les mécanismes en jeu. La pénétration de divers agents dans la peau a été mesurée *in vivo* et *in vitro* par spectroscopie infrarouge (Bommannan et al., 1990 ; Brancalion et al., 2001 ; Hadgraft, 2004 ; Mak et al., 1990 ; Snieder et Hansen, 1997 ; Williams et al., 1992). Il est possible de sonder les modifications moléculaires que subit le SC. La connaissance de l'ordre conformationnel des chaînes des lipides, ou les changements des structures secondaires des protéines, apportent de l'information quant au mode d'action d'agents transdermiques (Cotte et al., 2004). Les mesures de diffusion sont facilitées par l'utilisation de solvants ou d'agents transdermiques perdeutérés dont les bandes infrarouge occupent une fenêtre différente de celles de la peau (Cotte et al., 2004 ; Hadgraft, 2004). La spectroscopie infrarouge par réflexion interne totale atténuée (ATR) permet de sonder la surface de la peau *in vitro* et *in vivo* et d'établir des profils de diffusion en suivant l'augmentation du signal du composé à mesure qu'il progresse dans la peau variant la concentration à la surface du cristal (Brancalion et al., 2001 ; Mak et al., 1990). Il est possible d'établir un profil de pénétration dans le SC, en procédant à une mesure d'intensité du signal en ATR-FTIR après chaque arrachement, pour

des arrachements successifs (Naik et al., 1995). Cependant, il est impossible d'obtenir des informations à des profondeurs plus grandes que la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, soit de l'ordre de l'ordre de 0,5 à quelques 5 μm selon l'indice de réfraction du milieu (Fredericks, 2002). La microscopie infrarouge en transmission permet quant à elle d'obtenir des images de couches cryomicrotomées. L'épaisseur des couches minces est limitée par l'absorptivité du film qui doit demeurer transparent à la lumière infrarouge, et avoir un signal qui ne soit pas trop faible. Dans le cas de la peau, des tranches microtomées de 2-10 μm ont permis l'acquisition de spectres IR de bonne qualité (Mendelsohn et al., 2003 ; Xiao et al., 2005). La résolution longitudinale pour une source de type corps noir est de 10-12 μm^2 (Fredericks, 2002 ; Xiao et al., 2005). L'usage d'une source synchrotron permet d'améliorer ceci avec une résolution de l'ordre de 6 μm^2 (Cotte et al., 2004). Les détecteurs matriciels (*array detectors*) dans la région de l'infrarouge permettent l'imagerie par microscopie infrarouge d'une manière efficace (Mendelsohn et al., 2003). Une mosaïque de détecteurs infrarouges enregistre simultanément plusieurs spectres à différentes positions de l'échantillon. Comparativement à la cartographie point par point de la microscopie infrarouge traditionnelle, cette approche permet un gain de temps et de résolution axiale, cette dernière n'étant restreinte principalement que par la résolution de la caméra.

La microscopie confocale laser est une technique largement répandue fournissant des images complémentaires à celles obtenues par les méthodes de microscopie et d'histologie conventionnelles. Cette technique spectroscopique est un outil non destructif

pour suivre la pénétration transdermique, comme récemment résumé par Alvarez-Román et al. (Alvarez-Roman et al., 2004). Par illumination séquentielle d'éléments de volume de la taille du faisceau focalisé, la microscopie confocale laser permet d'obtenir une résolution de l'ordre de 150 nm^2 et de $1 \text{ }\mu\text{m}$ en profondeur. Selon la transparence de l'échantillon, il est possible de pénétrer à environ $50 \text{ }\mu\text{m}$ de profondeur dans la peau. Utilisant des sondes fluorescentes, cette technique a l'avantage de permettre l'acquisition rapide du signal. Les lasers offrent un choix restreint de longueurs d'onde d'excitation disponibles que le nombre important de sondes fluorescentes compense très largement. Pour une description structurale, plusieurs composantes de la peau peuvent être elles-mêmes utilisées comme sondes, telles que les acides aminés aromatiques ou différentes protéines (mélanine, kératine, collagène, élastine, etc.). Cette autofluorescence peut cependant être une nuisance importante lorsqu'elle masque le signal. La limitation la plus importante de cette méthode provient de l'utilisation même des sondes. Ces dernières peuvent, par leur nature chimique, modifier de façon significative la perméabilité en termes de vitesse de diffusion ou de mécanisme de pénétration.

1.5.3. Le développement d'une technique de mesure de pénétration par microscopie Raman

Comme les autres techniques de spectroscopie, la microscopie Raman est une technique non destructive qui permet de suivre *in vivo* et *in vitro* un profil de pénétration dans la peau. Comme la microscopie infrarouge, la méthode Raman permet d'obtenir de l'information sur l'organisation moléculaire des composantes et ainsi de déterminer les

modes d'action des agents transdermiques. Caspers et al. ont démontré la portée de cette méthode pour l'obtention de profils de composition de l'épiderme *in vivo* jusqu'à une profondeur de 40 μm (Caspers et al., 2000 ; Caspers et al., 1998) ainsi que le profil de pénétration du DMSO jusqu'à 100 μm de profond (Caspers et al., 2002). L'utilisation de produits pénétrants exogènes deutérés permet de suivre indépendamment le comportement moléculaire des composantes de la peau et des agents transdermiques étudiés (Xiao et al., 2005). La résolution est cependant améliorée par le biais des sources laser qui permettent une résolution axiale de l'ordre de 2-3 μm^2 . Comme pour la microscopie de fluorescence, la microscopie Raman peut être appliquée en mode confocal pour réduire le volume échantillonné.

Comme pour la microscopie infrarouge, la microscopie Raman a l'avantage de fournir des informations structurelles et spatiales, sans ajout de sonde comme en microscopie de fluorescence (Alvarez-Roman et al., 2004). S'il est possible d'utiliser un composé non deutéré, les agents deutérés présentent l'avantage de ne pas contribuer dans la région spectrale νCH et de permettre de suivre l'évolution du paramètre I_{2880}/I_{2850} . Diverses informations moléculaires sur l'organisation des lipides, par le biais des vibrations νCH et δCH peuvent ainsi être isolées. La spectroscopie Raman permet aussi de suivre l'évolution de paramètres associés aux protéines, tels que les bandes de la région $\nu\text{Amide I}$. Le contenu total en eau peut aussi être estimé à l'aide des bandes νOH de l'eau (Caspers et al., 2000 ; Gniadecka et al., 1998). L'étude spectrale permet aussi de déterminer le pourcentage d'eau restreint dans l'espace (Lafleur et al., 1989) ou lié par pont hydrogène à des structures polaires dans la peau (Gniadecka et al., 1998). Il est aussi possible de tirer avantage de la

présence de bandes de résonance. Ceci a été fait notamment pour déterminer le profil de concentration *in vivo* des pigments β -carotène et lycopène (Darvin et al., 2005 ; Hata et al., 2000). Contrairement à la microscopie de fluorescence (Alvarez-Roman et al., 2004) pour laquelle la calibration de l'intensité de fluorescence n'a pas été démontrée jusqu'ici, réduisant cette technique à des mesures semi-quantitatives, les mesures Raman sont quantitatives et permettent de déterminer les concentrations relatives des différents composés dans la peau à partir des intensités des bandes des composantes de la peau telles que les protéines ou les lipides (Marcotte et al., 2004).

La résolution en profondeur diffère selon l'opacité de l'échantillon, le grossissement de l'objectif et le parcours optique, allant jusqu'à aussi peu que 1-2 μm dans des conditions idéales (Fredericks, 2002 ; Xiao et al., 2005). L'utilisation de caméra à dispositif de transfert de charge (caméra CCD) permet, comme dans le cas de la microscopie infrarouge, de faire l'acquisition d'images Raman.

Les présents travaux ont pour objectif de développer une technique *in vitro*, permettant de mesurer la pénétration transdermique de composés à l'aide de la microscopie Raman. Notre méthode est développée en parallèle de la méthode *in situ* proposée récemment par Caspers et al. (Caspers et al., 2002). Les approches sont complémentaires en ce sens que les mesures *in vitro* permettent de caractériser la pénétration d'agents transdermiques toxiques ou en fonction de paramètres expérimentaux difficiles à varier *in vivo*, tels que la température. Les résultats obtenus démontrent l'efficacité de la méthode

pour conserver l'hydratation de l'échantillon tout en conservant une face exposée à l'air. Ces travaux sont présentés au chapitre 6.

1.6. Les techniques de caractérisation

1.6.1. La titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme est utilisée pour caractériser les variations d'enthalpie lors d'une transformation en milieu liquide. Cette technique a déjà été utilisée pour mesurer l'association de peptides (Breukink et al., 2000 ; Saboury, 2003), de détergents (Heerklotz et Seelig, 2000 ; Wenk et Seelig, 1997) et d'ions à différentes membranes lipidiques (Garidel et Blume, 1999 ; Heerklotz, 2004 ; Lehrmann et Seelig, 1994). Brièvement, il s'agit d'injecter une solution contenant le complexant à la solution d'intérêt maintenue à température et pression constantes. L'énergie nécessaire au maintien de la température lors d'une injection est mesurée et rapportée sous la forme d'une courbe de titration du flux thermique, en unité d'énergie/temps, en fonction du temps. À chaque injection, l'aire sous le pic représente donc l'énergie de la réaction associée à l'ajout du titrant dans le milieu. La mesure de la variation d'enthalpie permet de déduire des enthalpies de réaction ainsi que des constantes d'équilibre. La titration calorimétrique isotherme est utilisée dans le cadre de ces travaux afin de déterminer les enthalpies et constantes d'association du calcium à des membranes de POPC/POPG, ainsi que l'effet de la force ionique du tampon et de la composition de la membrane sur ces valeurs.

Différents isothermes peuvent être utilisés afin de décrire l'association des ions calcium aux membranes. Deux approches sont développées ici, soit un isotherme corrigé pour le potentiel de membrane par la théorie de Gouy-Chapman (McLaughlin, 1977), et l'isotherme de Scatchard. Dans le premier cas, on considère le partage de l'ion entre deux phases : la phase aqueuse et la phase pseudo-lipidique. Les interactions électrostatiques entre les ions Ca^{2+} et la membrane chargée sont traitées isolément des interactions de courte distance associées au transfert de l'ion de la phase aqueuse à la phase lipidique. Dans le second cas, le modèle de Scatchard considère la membrane comme une macrostructure ayant plusieurs sites d'association tous équivalents et indépendants. Les deux modèles, ainsi que les résultats qui en découlent, sont décrits en détail au chapitre 3.

1.6.2. La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge a été utilisée pour caractériser l'organisation structurale des lipides dans les mélanges modèles du SC en fonction de la température, en examinant certains modes vibrationnels. Les modes de vibration examinés lors de cette étude sont résumés dans le tableau I et indiqués sur un spectre d'un mélange modèle de lipides du SC sur la figure 1.9. Les spectres des lipides sont déjà bien décrits dans la littérature (Parker, 1983) et sont reproduits ici dans un but descriptif.

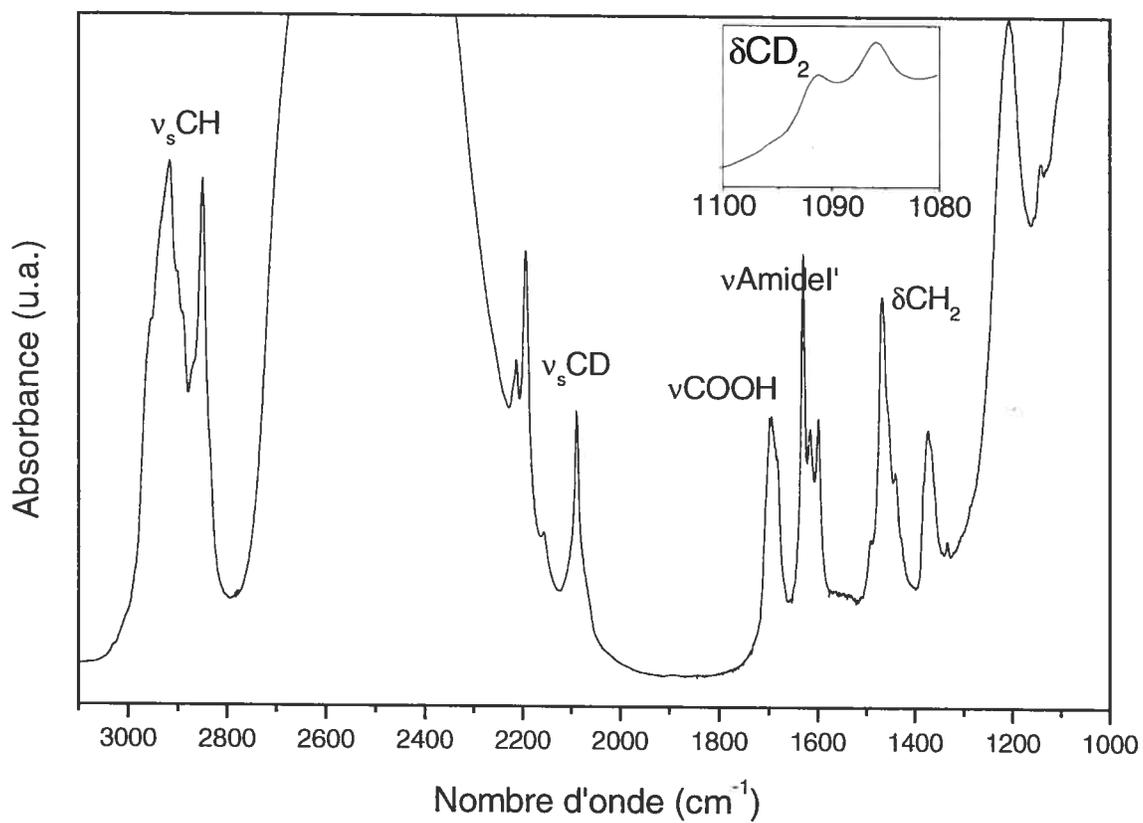


Figure 1.9 : Spectre d'absorption infrarouge d'un mélange équimolaire CER III/PA-d₃₁/Chol dans un tampon deutéré à 30 °C.

Mode de vibration	Région spectrale (cm ⁻¹)	Information
ν_s CH ₂ ν_s CD ₂	2848-2854 2087-2097	La position de la bande est sensible à l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des lipides, et permet d'identifier les transitions de phases.
δ CH ₂ δ CD ₂	1460-1470 1090-1095	L'éclatement de la bande indique un empilement orthorhombique des chaînes alkyles pour lesquelles ce mode est couplé à celui des molécules voisines, s'ils sont la mêmes fréquences.
ν AmideI'	1570-1670	La forme de la bande est sensible à la structure de la tête polaire des céramides.
ν COOH ν COO-	1770-1510	La présence d'une composante ou d'une autre indique l'état de protonation ou de complexation de la fonction carboxylique de l'acide gras.

Tableau I : Attribution des principales bandes d'absorption infrarouge utilisées pour l'analyse conformationnelle et structurale des lipides.

On retrouve, dans la région allant de 3100 à 2780 cm^{-1} , les bandes associées aux modes d'élongation des groupements méthyles et méthylènes, où de nombreuses bandes sont utiles pour la caractérisation moléculaire des lipides. Les groupements méthylènes possèdent deux modes d'élongation, symétrique et antisymétrique, $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_a\text{CH}_2$, à 2850 et 2880 cm^{-1} respectivement. Des bandes faibles à 2870 et 2960 cm^{-1} sont attribuables aux modes d'élongation symétrique et asymétrique des groupements méthyles, $\nu_s\text{CH}_3$ et $\nu_a\text{CH}_3$. Le large massif est dû à une résonance de Fermi entre le mode $\nu_s\text{CH}_2$ et les modes de déformation des méthylènes, δCH_2 , observés dans la région 1400 à 1500 cm^{-1} .

La région 2015 à 2150 cm^{-1} est associée aux modes d'élongation des groupements méthylènes et méthyles pour les chaînes alkyles deutérées. Parmi les avantages de cette technique, l'effet isotopique est particulièrement important puisqu'il permet de distinguer deux groupements de masses réduites différentes, modifiant l'énergie vibrationnelle du groupement fonctionnel. Les bandes d'élongation symétrique et antisymétrique des méthylènes, $\nu_s\text{CD}_2$ et $\nu_a\text{CD}_2$, se trouvent respectivement à 2090 et 2195 cm^{-1} , alors que les bandes d'élongation des méthyles, νCD_3 , se trouvent à 2070, 2169 et 2212 cm^{-1} .

Les bandes d'absorption $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$, entre 2848-2854 cm^{-1} et 2087-2097 cm^{-1} respectivement, sont sensibles aux transitions de phases des lipides. Le passage d'une phase gel ou cristalline à une phase fluide se traduit notamment par l'augmentation du nombre de conformères *gauches*. La modification de l'ordre conformationnel des chaînes lipidiques a pour effet le déplacement vers de plus hautes fréquences des bandes $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ (Casal

et Mantsch, 1984 ; Mantsch et McElhaney, 1991). La position de ces bandes permet ainsi d'évaluer l'ordre conformationnel moyen des chaînes. Cette mesure est cependant semi-quantitative et ne permet pas d'établir avec certitude la phase dans laquelle se trouvent les lipides puisque d'autres facteurs peuvent aussi affecter la fréquence tel que le couplage interchaîne (Kodati et Lafleur, 1993). Dans cette étude, l'utilisation d'acide gras deutéré permet de caractériser de manière indépendante et simultanée le comportement du lipide marqué isotopiquement dans un mélange. Bien que le cholestérol contribue aux modes ν_{CH} , les déplacements de la bande ν_{sCH_2} sont associés principalement aux contributions des chaînes alkyles des céramides considérant la structure relativement rigide du cholestérol.

Les bandes de déformation des groupements méthylènes, δCH_2 et δCD_2 , situées respectivement entre $1462\text{-}1471\text{ cm}^{-1}$ et $1086\text{-}1094\text{ cm}^{-1}$, sont sensibles à l'empilement des chaînes alkyles. Dans le cas d'un empilement orthorhombique, on peut observer l'éclatement de la bande en deux composantes, autour de 1465 et 1471 cm^{-1} pour les chaînes non deutérées, et 1086 et 1094 cm^{-1} pour les chaînes deutérées (Philippot et al., 1995 ; Snyder et al., 1992 ; Snyder et al., 1994). Cet éclatement de la bande est dû à un couplage interchaîne de courte distance des modes de vibration. Ce couplage se produit seulement si les vibrations des chaînes voisines sont de mêmes fréquences. Ainsi, dans les mélanges composés de céramides et d'acides gras deutérés, en plus d'indiquer la symétrie de l'empilement des chaînes, l'éclatement des bandes de déformation des groupements méthylènes est aussi une signature d'une séparation de phases. Il a été établi que ce

dédoublé atteint sa valeur maximale lorsque les domaines orthorhombiques contiennent une centaine de molécules ou plus (Snyder et al., 1992). Pour une phase non orthorhombique, une seule composante est observée autour de 1468 cm^{-1} pour les chaînes hydrogénées, et 1089 cm^{-1} pour les chaînes deutérées.

L'utilisation d'un tampon deutéré permet de déplacer les bandes d'élongation de l'eau autour de 2500 cm^{-1} , et les bandes de déformation à 1205 cm^{-1} pour ainsi dégager la fenêtre correspondant aux fréquences de vibration des bandes amide I'. L'indice (') est utilisé pour différencier les liaisons amide dont le proton labile est remplacé par un deutérium. La région spectrale amide I', $1570\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$, associée aux céramides, est une sonde de la surface de la bicouche. La présence de composantes, à 1630 et 1615 cm^{-1} , est observable pour les céramides cristallins purs (Moore et al., 1997b). Une troisième composante à 1597 cm^{-1} , est utilisée pour suivre l'incubation des mélanges afin de faire les mesures sur des échantillons thermodynamiquement stables (Lafleur, 1998).

De 1770 à 1510 cm^{-1} , on retrouve les bandes associées à la fonction carboxylique de l'acide gras. Pour une fonction protonée, on observe une bande large autour de 1720 cm^{-1} , sensible aux transitions de phases (Mantsch et McElhaney, 1991). À pH élevé, la déprotonation conduit à l'apparition d'une bande située environ à 1550 cm^{-1} (Velkova, 2000). De même, la complexation de la fonction carboxylique avec un ion métallique donne naissance à différentes bandes entre 1529 et 1570 cm^{-1} (Marshbanks et Franses, 1994).

1.6.3. La microscopie Raman

1.6.3.1. La cartographie des mélanges lipidiques

Par l'utilisation d'une source laser de grande puissance, de détecteurs sensibles et le couplage avec la microscopie optique, il est possible d'obtenir des spectres vibrationnels de qualité dans un temps raisonnable avec une grande résolution spatiale. La microscopie Raman est utilisée comme technique complémentaire dans ces travaux afin d'établir la distribution spatiale des espèces dans les mélanges lipidiques en fonction de la température, en examinant certains modes vibrationnels. Le microscope utilisé est muni d'une plate-forme motorisée permettant des déplacements horizontaux de l'échantillon. Il est ainsi possible d'enregistrer une série de spectres à différents endroits de l'échantillon. On peut ainsi cartographier un échantillon lipidique pour connaître son hétérogénéité spatiale. Comme la méthode infrarouge décrite plus haut, la spectroscopie Raman, qui est aussi une spectroscopie vibrationnelle, peut tirer avantage de l'effet isotopique. Les mêmes mélanges utilisés pour la spectroscopie infrarouge ont pu être utilisés afin de distinguer les chaînes alkyles deutérées de l'acide palmitique PA-d₃₁ de celles hydrogénées des céramides, CER III. À partir de ces données, on peut tracer des cartes représentant le contenu relatif en chaque espèce dans un plan.

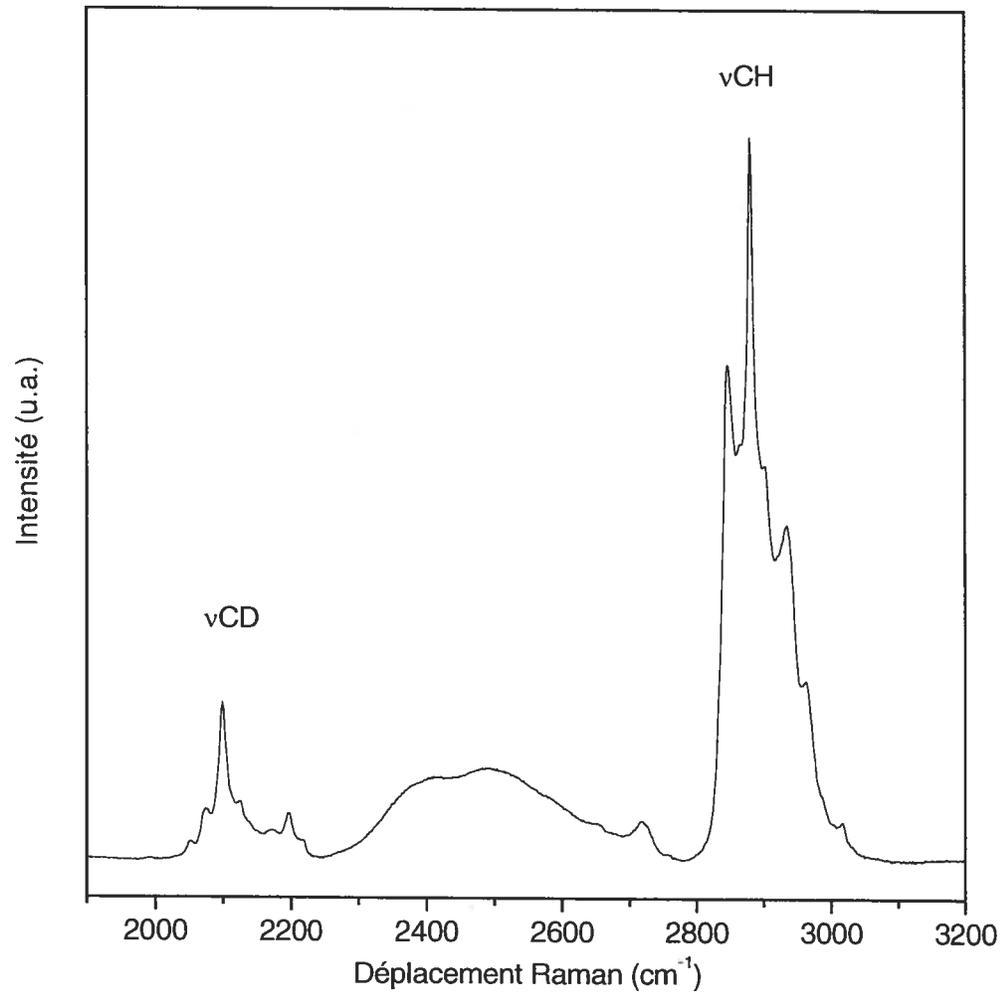


Figure 1.10 Spectre de diffusion Raman d'un mélange équimolaire CER III/PA-d₃₁/Chol dans un tampon deutéré à 25 °C.

Paramètre spectral	Information
A_{CH} (2780-3100 cm^{-1}) A_{CD} (2015-2250 cm^{-1})	Le rapport des aires des bandes associées aux ν CH_2 et ν CD_2 permet d'établir la composition molaire en chacune des espèces lipidiques.
I_{2880} / I_{2850}	Le rapport d'intensité des bandes ν CH_2 est sensible à l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des céramides et indique les transitions de phases.
Largeur ν_{2100}	La largeur de la bande ν CD_2 est sensible à l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des céramides et indique les transitions de phases.

Tableau II : Attribution des principaux paramètres spectraux Raman utilisés pour l'analyse conformationnelle et structurale des lipides.

Les paramètres spectraux utilisés lors de cette étude sont résumés dans le tableau II et indiqués sur un spectre d'un mélange modèle de lipides du SC sur la figure 1.10. Les modes de vibration sont ceux décrits plus tôt pour le spectre du mélange ternaire en spectroscopie infrarouge.

La spectroscopie Raman est une technique de diffusion et par conséquent les intensités sont en unités arbitraires. Pour estimer la composition en chaque point, on utilise des rapports d'aires de la région des élongations CH_2 et CD_2 représentant la composition en céramides III et en acide gras deutéré.

L'ordre conformationnel des chaînes alkyles des céramides est estimé par la mesure du rapport des intensités des bandes d'élongation des groupements méthyles des chaînes alkyles à 2880 et 2850 cm^{-1} , I_{2880}/I_{2850} . Dans une phase gel, ce rapport est de 1,5, alors qu'en phase fluide il descend à environ 0,7 (Bunow et Levin, 1977 ; Huang et al., 1983). La largeur de la bande d'élongation symétrique CD_2 à 2100 cm^{-1} , $\Delta\nu_s\text{CD}_2$, est aussi sensible à l'ordre conformationnel des chaînes deutérées de l'acide gras. L'introduction de conformères *gauches* a pour effet d'élargir la bande (Kouaouci et al., 1985 ; Mendelsohn et Koch, 1980).

Comme pour la spectroscopie infrarouge, un tampon aqueux deutéré est utilisé afin de déplacer les bandes de d'élongation O-D de l'eau à environ 2500 cm^{-1} . Dans ces conditions, la région spectrale balayée de 3100 à 1900 cm^{-1} inclut la contribution de l'eau.

Cette stratégie permet de réduire le temps d'acquisition nécessaire pour obtenir à la fois des informations sur les chaînes lipidiques et sur l'hydratation de l'échantillon.

1.6.3.2. La microscopie Raman de l'épiderme humain

La plate-forme du microscope permet des déplacements en z afin d'obtenir des spectres en fonction de la profondeur dans un échantillon de manière non invasive. L'épiderme utilisé pour faire le suivi de la diffusion de la peau est un matériel clair qui permet de focaliser le faisceau laser à différentes profondeurs.

Très hydraté, l'épiderme présente une bande d'eau importante et une signature Raman faible demandant un temps d'exposition plus ou moins long selon la qualité du rapport signal sur bruit désiré. Différentes plages spectrales ont été étudiées selon les besoins. Les régions les plus importantes sont résumées dans le tableau III.

Bien que le SC et l'épiderme soient plus complexes que les mélanges modèles, il est possible d'attribuer plusieurs régions spectrales aux différents constituants (Barry et al., 1992 ; Williams et al., 1993). Parmi les paramètres retenus pour cette étude, l'intensité relative de la bande d'élongation de l'eau, entre $3100-3700\text{ cm}^{-1}$, permet d'établir la variation de l'hydratation de l'échantillon. Les bandes d'élongation νCH sont quant à elles principalement attribuables aux chaînes alkyles des lipides. Finalement, les bandes amides sont principalement associées aux protéines, majoritairement la kératine. Les spectres

obtenus dans différentes conditions ainsi qu'une assignation spectrale plus en détail est donnée au chapitre 6.

Mode de vibration	Région spectrale (cm^{-1})	Information
$\nu \text{H}_2\text{O}$	3100-3700	Hydratation de l'échantillon
νCH	2848-2854	Principalement associé aux chaînes lipidiques et aux protéines
ν Amide	1570-1670	Principalement associé aux protéines, majoritairement de la kératine

Tableau III : Attribution des principales bandes de diffusion Raman visibles sur un spectre d'épiderme humain.

2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.1. Préparation des mélanges lipidiques

Les céramides III (CERIII) dérivés de la sphingomyéline de cerveau de bovin (99 %), le cholestérol (Chol) (99 %) ainsi que le sulfate de cholestérol (Schol) sont achetés de la compagnie Sigma (St-Louis, MO) et utilisés sans autre purification. L'acide palmitique perdeutééré (PA-d₃₁) est acheté de la compagnie CDN isotopes (Pointe-Claire, Qc). Le 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylglycérol (POPG) ainsi que la 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (POPC) proviennent quant à eux de la compagnie Northern Lipids (Vancouver, BC).

L'acide 2-[N-morpholino]éthanesulfonique (MES) et le D₂O utilisé pour la préparation des tampons proviennent de la compagnie Sigma (St-Louis, MO). Le NaCl est acheté d'Anachemica (Montréal, Qc), alors que le CaCl₂ est acheté chez A&C American Chemicals (Montréal, Qc).

Pour obtenir des mélanges homogènes, chaque lipide pur est dissout dans une solution organique de benzène/méthanol 95/5 (v/v), à l'exception du sulfate de cholestérol qui est dissout dans un mélange benzène/méthanol 1/3 (v/v). Des aliquots de chacun des lipides sont mélangés pour obtenir les proportions désirées. Les mélanges organiques sont ensuite lyophilisés pendant au moins 16 heures pour assurer l'élimination complète du solvant.

2.1.1. Vésicules de POPC/POPG

Les mélanges lipidiques ont été faits dans un rapport molaire POPC:POPG de (7/3) et (5/5). Les poudres sèches sont hydratées dans un tampon à pH 5,6 contenant 10 mM MES et du NaCl à différentes concentrations. Tous les tampons, faits à partir d'eau Millipore avec une résistance de 18 M Ω /cm, ont préalablement été filtrés à 0,2 μ m. Les échantillons sont ensuite soumis à trois cycles de gel-dégel, dans l'azote liquide puis à une température de 20 °C, afin d'assurer une hydratation complète. Les LUVs de 100 et 50 nm sont préparées par extrusion à partir de vésicules multilamellaires passées 10 fois à travers des membranes de polycarbonate à l'aide d'un extrudeur Liposofast (Avestin, Ottawa, ON). Des SUVs ont aussi été obtenues par sonication de suspensions multilamellaires, sur glace, à l'aide d'une sonde de titane 550 SonicDismembrator (FisherScientific, Pittsburgh, PA). Les différentes tailles moyennes des SUVs sont obtenues en soumettant les suspensions lipidiques plus ou moins longtemps aux ultrasons. Les suspensions sont ensuite centrifugées 5 minutes à 1000 \times g afin d'éliminer toutes traces possibles de débris métalliques de la sonde. La distribution de taille est déterminée par diffusion de la lumière sur un appareil N4 PLUS (BeckmanCoulter, Fullerton, CA). La concentration exacte en phospholipide est déterminée par la méthode de Fiske-Subbarow (Fiske et Subbarow, 1925).

2.1.2. Mélanges modèles de lipides du SC

Les poudres de mélanges modèles de lipides du SC sont hydratées dans un tampon contenant 100 mM de MES, 100 mM NaCl ainsi que du CaCl₂ en différentes concentrations, dans le D₂O, au pH physiologique de la peau, soit 5,2 (Schaefer et Redelmeier, 1996). Les concentrations en calcium utilisées sont de 100, 25, 10 et 0 mM. En absence de calcium, de l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) est ajouté à une concentration de 5 mM. Suivant l'hydratation des lipides, le pH est réajusté au besoin. La concentration finale en lipide pour les mélanges contenant du sulfate de cholestérol est de 20% (p/v). Dans le cas des mélanges contenant du cholestérol, le tampon est ajouté en large excès afin de permettre l'ajustement plus aisé du pH. Pour favoriser l'hydratation complète des lipides, des cycles de gel et dégel sont imposés aux mélanges. À trois reprises, les échantillons sont refroidis dans l'azote liquide, chauffés à 80 °C pendant 10 minutes, puis agités, pour être ensuite centrifugés 30 minutes à 3500 ×g. Afin de s'assurer que les échantillons sont dans l'état thermodynamiquement stable, un recuit de deux à quatre heures à 30 °C est effectué avant de procéder à l'enregistrement des spectres.

2.2. Préparation des épidermes humains

Les échantillons de peau proviennent de réductions mammaires de femmes caucasiennes d'âge adulte. Les échantillons sont traités et caractérisés dans la journée

suivant l'intervention chirurgicale. On procède d'abord au retrait du derme et des masses adipeuses en plongeant la peau complète dans un bain d'eau à 60 °C durant 45 s (Kligman et Christophers, 1963). Il est ensuite possible de retirer l'épiderme délicatement à l'aide de pinces. Le protocole de recherche sur des tissus anonymes humains a été approuvé par le comité d'éthique de la recherche de la faculté de médecine (CERFM (01) #22).

2.3. Mesures thermodynamiques

2.3.1. Titration calorimétrique isotherme

Toutes les mesures sont faites à l'aide d'un microcalorimètre VP-ITC de MicroCal (Northampton, MA). Les solutions utilisées sont dégazées sous vide à l'aide de l'accessoire Thermo Vac (MicroCal, Northampton, MA). La suspension lipidique est placée dans la cellule d'un volume de 1,14 mL et est titrée avec une solution de CaCl₂ 20 mM préparée dans le même tampon et placée dans la seringue. Typiquement, des injections de 5 µL, d'une durée de 10 secondes, sont faites toutes les 300 secondes. Durant toute l'expérience, la cellule est agitée par la rotation à 300 rpm de la seringue dont l'extrémité a la forme d'une palme. Toutes les expériences de titrations sont faites à 27 °C. Des mesures de l'énergie de dilution des vésicules ont été obtenues par l'injection de tampon sans calcium dans une solution de vésicules. De manière analogue, l'énergie de dilution du calcium a été déterminée par l'injection de la solution titrante dans une cellule comblée avec du tampon.

2.3.2. Microcalorimétrie à balayage

Aux vésicules de phospholipides, du CaCl_2 est ajouté de telle sorte que la concentration en calcium soit la même que celle obtenue à la fin d'une expérience de titration calorimétrique, pour une concentration en lipide d'environ 10 mM. Ces échantillons sont analysés par microcalorimétrie à balayage à l'aide d'un VP-DSC MicroCalorimeter (MicroCal, Northampton, MA) et les données sont traitées à partir du logiciel Origin 5 (MicroCal, Northampton, MA). La cellule de mesure est comblée pour un volume final de 510 μL . Des balayages de chauffe et de refroidissement, de $-10\text{ }^\circ\text{C}$ à $50\text{ }^\circ\text{C}$, à $60\text{ }^\circ\text{C}$ par heure, sont répétés à trois reprises.

2.4. Spectroscopie infrarouge

Des spectres infrarouge des mélanges modèles des lipides du SC ont été enregistrés. Un aliquot de l'échantillon est placé entre deux fenêtres de CaF_2 , espacées par un film de Téflon de 5 μm d'épaisseur. Le tout est placé dans une cellule thermostatée de laiton dont la température est contrôlée à l'aide d'éléments Peltier. Les spectres sont enregistrés à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier FTS-25 de Bio-Rad équipé d'une source global refroidie à l'eau et d'un détecteur de type MCT (tellure de mercure et de cadmium). Chaque spectre est le résultat de la coaddition de 100 balayages ayant une résolution nominale de 2 cm^{-1} et est obtenu à partir d'une transformée de Fourier

en utilisant une apodisation triangulaire. Les spectres sont enregistrés en fonction de la température croissante, de 15 à 75 °C.

Dans les régions νCH et νCD , une correction est apportée pour éliminer la contribution des modes νOD de l'eau lourde en soustrayant un polynôme d'ordre 3 simulant les flancs de la bande νOD , déterminé par la méthode des moindres carrés. Les positions de bande présentées correspondent aux centres de gravité sur 5 % du maximum des pics, déterminés à l'aide de l'algorithme proposé par Cameron et al. (Cameron et al., 1982). Les traitements de déconvolution et de simulation de bande sont faits à partir du logiciel GRAMS/32 (Galactic Industries Corporation).

À titre de comparaison avec les résultats en microscopie Raman, des spectres infrarouge en transmission ont été pris d'un épiderme placé entre deux fenêtres de CaF_2 en fonction de la température. Les paramètres sont ceux décrits pour l'étude des mélanges lipidiques.

2.5. Spectroscopie Raman

Les spectres sont obtenus à l'aide d'un spectromètre Raman Renishaw Raman Imaging Microscope WIRETM (V 1.2) (System 3000) (Renishaw, Gloucestershire, UK) équipé d'un réseau holographique de 1800 ligne/mm, ainsi que d'une caméra CCD Peltier (600 × 400 points). Un laser d'Ar⁺ à 514 nm de 106 mW, donnant une puissance à

l'échantillon d'environ 15 mW, est utilisé pour les spectres des mélanges lipidiques à différentes températures. Les spectres d'épiderme humain sont faits à partir d'une source laser He-Ne à 633 nm de 15 mW pour une puissance à l'échantillon de 1 mW. Un microscope Leica DM LM (Leica Inc, Deerfield, IL) est placé à la sortie du spectromètre. Un objectif à longue distance focale avec un grossissement de 50 × est utilisé. L'appareil utilisé est muni d'une platine mobile ProScan (Prior Scientific Instruments, Fulbourn, UK) permettant des déplacements de l'ordre du μm . Les données sont traitées à l'aide des logiciels GRAMS/32 (Galactic Industries Corporation, Salem, NH) et WIRETM (version 1.3) (Renishaw Spectroscopy Products Division, Gloucestershire, UK). Les calculs statistiques de topographie ont été faits à l'aide du logiciel MathLab 7.0 (MathWorks Inc, Natick, MA).

La microscopie confocale permet de prendre le spectre d'un volume restreint en coupant toute lumière ne provenant pas du point focal. Ceci conduit à augmenter la résolution spatiale dans le plan focal, mais de façon encore plus importante le long de l'axe de l'optique, la résolution en profondeur. Pour ce faire, deux fentes perpendiculaires sont utilisées pour reproduire l'effet du trou ponctuel (pinhole). La première fente à travers laquelle la lumière diffusée passe est horizontale. La seconde fente verticale est dite virtuelle puisqu'elle est créée par le choix d'une bande étroite de quatre pixels sur la caméra CCD du spectromètre (figure 2.1).

2.5.1. Cartographie des mélanges lipidiques

Les mélanges modèles de lipides du SC sont déposés, puis maintenus par succion, sous la fenêtre d'une cuvette thermostatée et scellée (figure 2.2.A). La température est assurée par la présence d'éléments chauffants dans la base d'aluminium. Le contrôleur de température est relié à un thermocouple directement sous la cuvette. Celle-ci est comblée d'eau afin de maintenir l'hydratation de l'échantillon tout au long de l'expérience. L'étanchéité de la cuvette est assurée par une lamelle de quartz maintenue par un couvercle de Téflon vissé à la base d'aluminium. Le montage est finalement fixé à la platine mobile puis placé sous le microscope Raman. Dans le cas des mélanges contenant du sulfate de cholestérol, les pâtes moins cireuse sont retenue à la surface de la fenêtre de quartz par une lamelle de Teflon supplémentaire.

La surface de l'échantillon balayée est de $40 \times 40 \mu\text{m}$. À $25 \text{ }^\circ\text{C}$, des spectres Raman confocaux de $1900 \text{ à } 3200 \text{ cm}^{-1}$ ont été enregistrés, avec des sauts de $3 \mu\text{m}$ pour un balayage ligne par ligne, pour un temps d'acquisition total de 2-3 heures. Le volume échantillonné à chaque point est estimé à $2 \mu\text{m}^2$ de surface, à partir de la surface du faisceau laser déterminée par réflexion sur une lamelle de silice, et de 3 à $5 \mu\text{m}$ de profondeur selon les informations fournies par la compagnie Renishaw. Une même région est cartographiée à tous les $10 \text{ }^\circ\text{C}$, de $25 \text{ à } 75 \text{ }^\circ\text{C}$, avec un temps d'équilibration de 10 minutes entre les températures.

2.5.2. Microscopie confocale de l'épiderme humain

Les échantillons d'épiderme humain sont déposés sur un hydrogel d'Agar 1,5 % (p/v) préparé dans l'eau, contenu dans un moule de Téflon perforé et entouré d'eau afin maintenir une hydratation constante (figure 2.2.B et 2.3). Le support de téflon sert à maintenir en place le gel d'Agar dans le bain d'eau. La température de l'épiderme est gardée constante à l'aide d'eau thermostatée circulant en circuit fermé dans les parois de la base en aluminium. Un thermocouple est placé dans le gel, sous l'épiderme pour assurer que la température de l'échantillon est bien celle désirée. Le montage est finalement fixé à la plate-forme mobile sous le microscope Raman. Les temps d'accumulation, de même que les régions spectrales observées, diffèrent selon les échantillons et la résolution désirée.

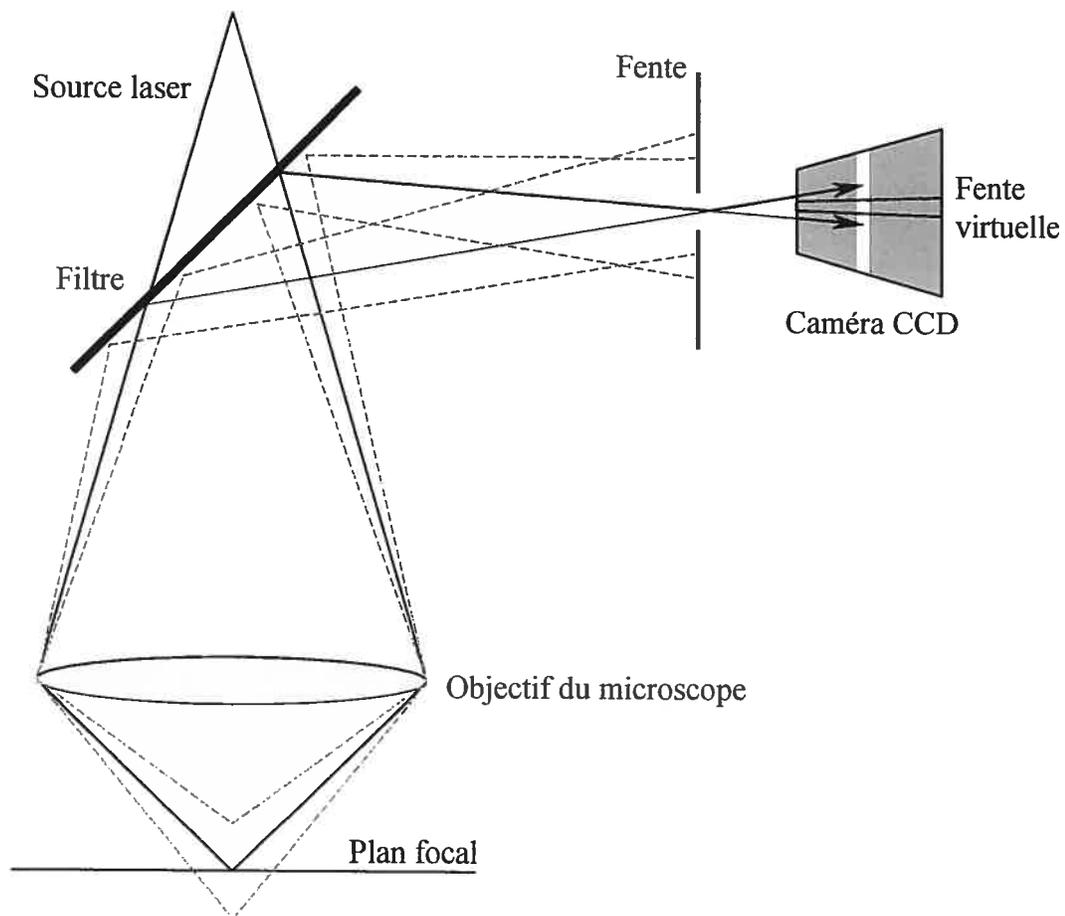


Figure 2.1 : Schéma illustrant le principe de la microscopie Raman confocale utilisant une fente et une portion de la caméra CCD pour recréer l'effet d'un trou ponctuel. (Hajatdoost et Yarwood, 1996).

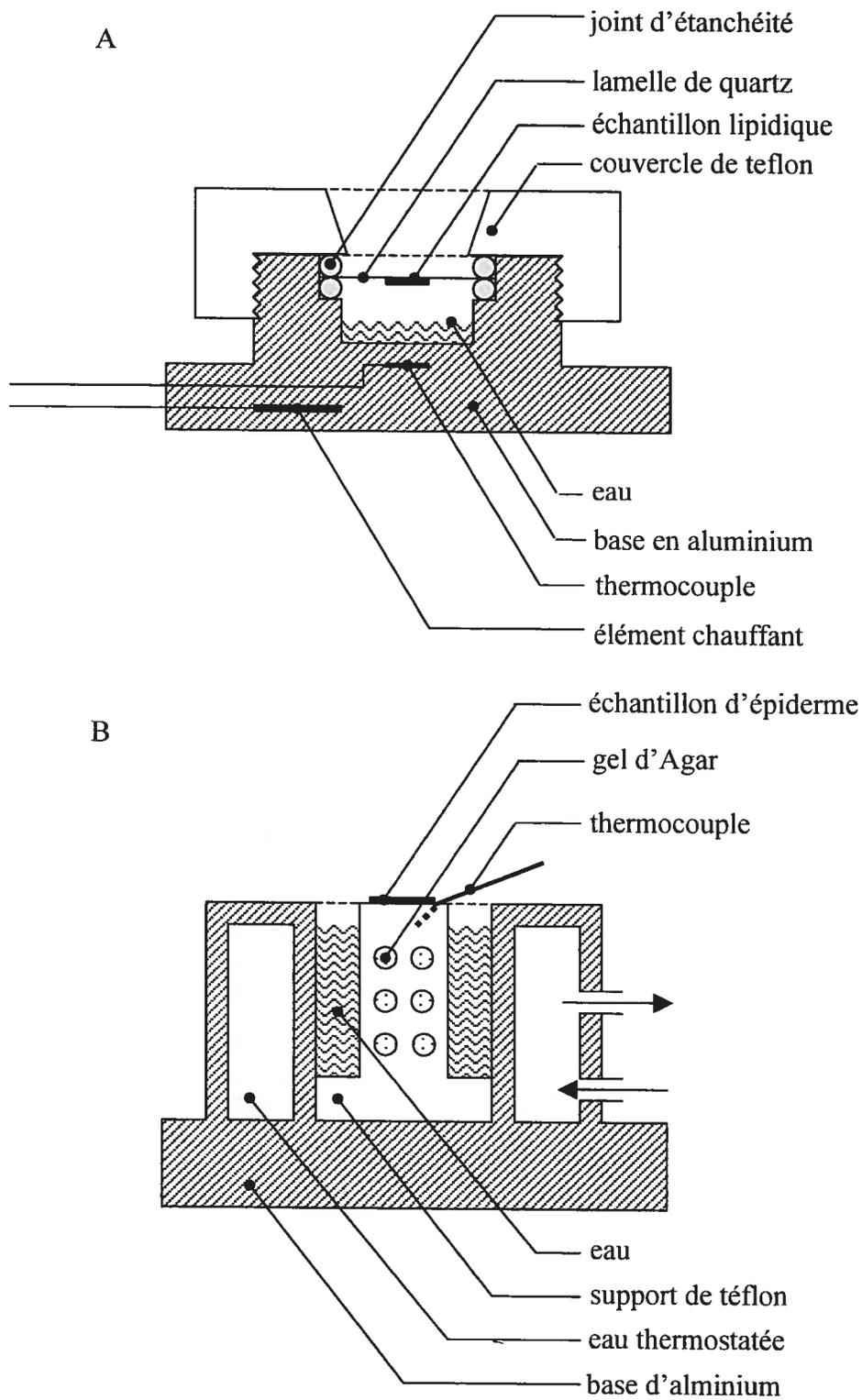


Figure 2.2 : Schémas des montages pour la spectroscopie Raman sur des mélanges lipidiques (A), et des échantillons d'épiderme humain (B).

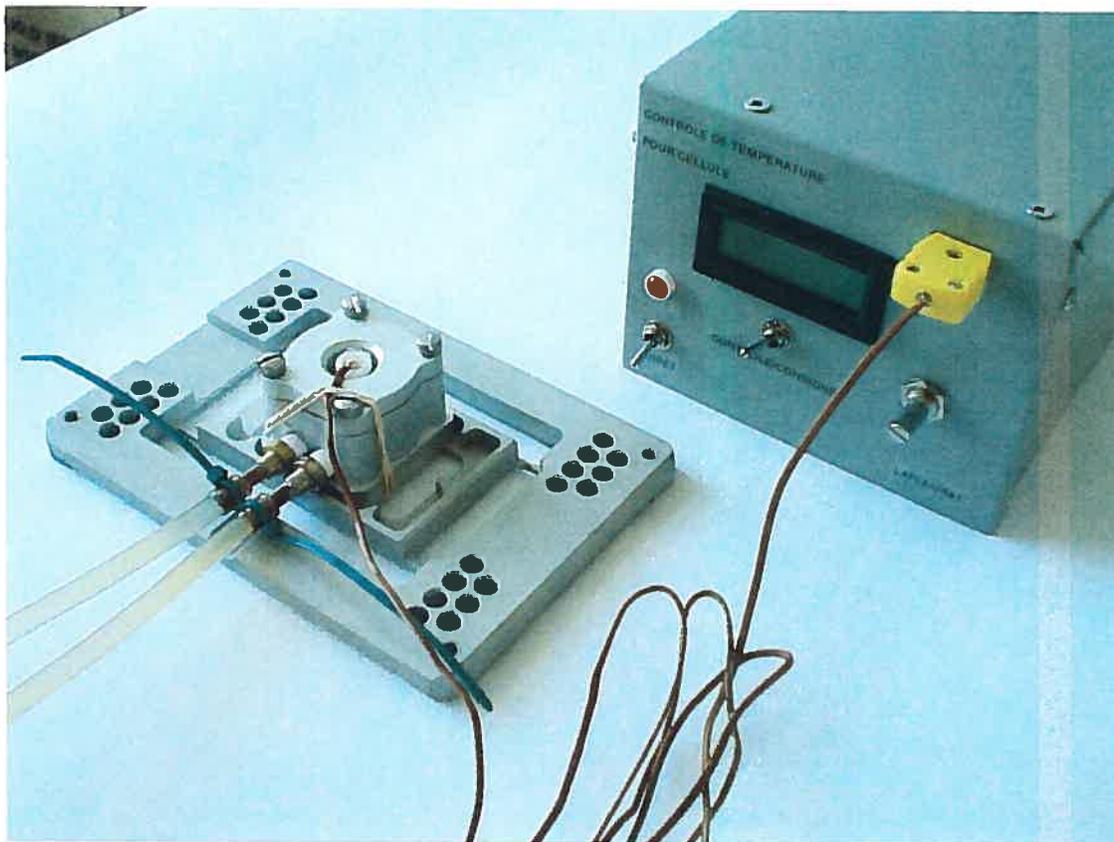


Figure 2.3 : Montage pour la spectroscopie Raman sur des échantillons d'épiderme humain.

3. ÉTUDE DE L'ASSOCIATION DU CALCIUM AUX MEMBRANES DE POPC/POPG PAR TITRATION CALORIMÉTRIQUE ISOTHERME

La présente étude examine l'association du calcium à des vésicules unilamellaires composées de POPC et POPG. Nous avons réexaminé ce système déjà caractérisé dans la littérature (Garidel et Blume, 1999 ; Lehrmann et Seelig, 1994) et trouvé qu'il existe un effet important du rayon de courbure des vésicules sur la thermodynamique de l'association du calcium aux membranes. Les effets de la force ionique ainsi que de la composition de la membrane sont aussi examinés dans cette étude.

3.1. Résultats

3.1.1. Effet de la taille et du mode de préparation des vésicules

Les données brutes de la titration calorimétrique isotherme, rapportées à la figure 3.1, illustrent les différences induites par la taille et le mode de préparation des vésicules. Toutes les expériences sont faites sur des vésicules de même composition en lipide, soit POPC/POPG (7/3), à la même concentration en lipide, $8,4 \pm 0,4$ mM, et avec une solution titrante de 20 mM en chlorure de calcium, à 27 °C.

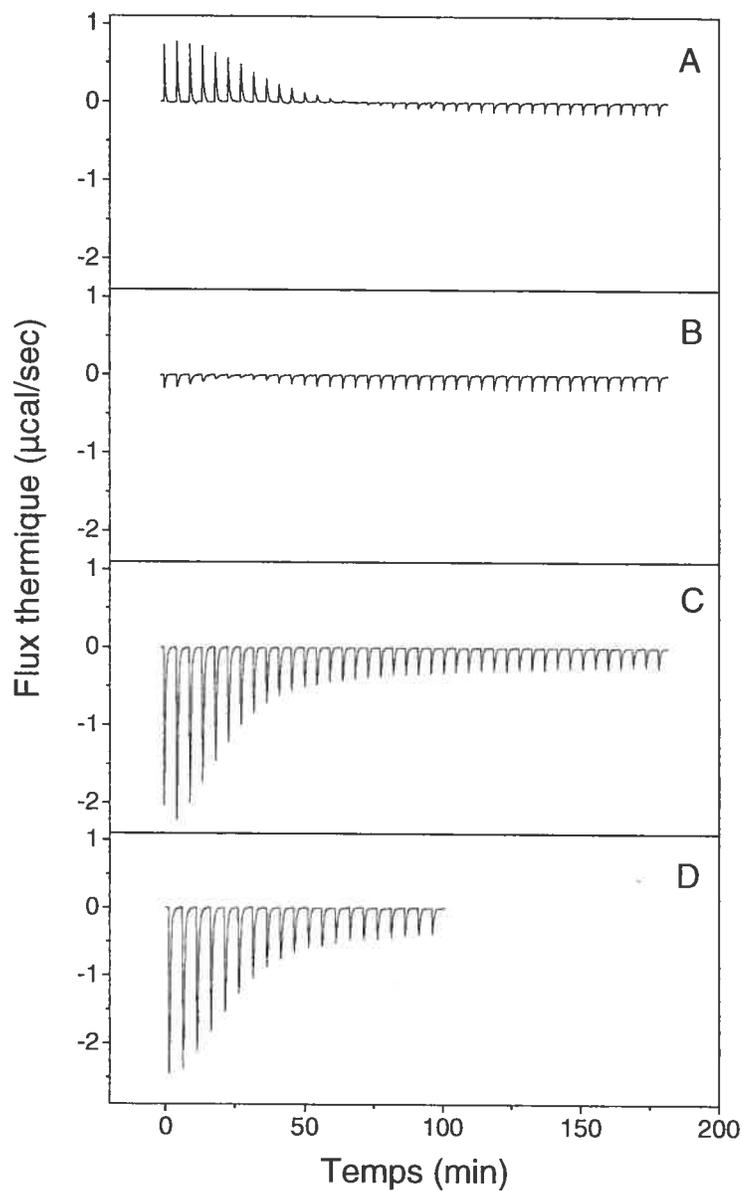


Figure 3.1 : Titration calorimétrique isotherme de vésicules composées de POPC/POPG (7/3) dans 10 mM MES et 10 mM NaCl, par une solution de 20 mM CaCl_2 à 27 °C. Le volume injecté est de 5 μL par injection. Les titrations sont obtenues à partir de vésicules soniquées de tailles moyennes de 60 nm (A) et 90 nm (B), et de vésicules extrudées de tailles moyennes de 100 nm (C), et 50 nm (D).

Le tracé de la figure 3.1.A est le résultat de la titration de vésicules obtenues par sonication, dont le diamètre moyen, obtenu par diffusion quasi élastique de la lumière, est de 57 nm pour une polydispersité de 0,3. Les vésicules sont obtenues par sonication les dispersions de MLVs pendant 25 min. Le titrage par le calcium des vésicules donne lieu à un phénomène endothermique au cours des 15 premières injections. L'aire des pics diminue graduellement pour laisser place à des pics exothermiques dont l'aire constante correspond à l'énergie de dilution de la solution de calcium, soit à environ $-35 \mu\text{J}$ par injection. Des vésicules avec un diamètre moyen de 87 nm, pour une polydispersité de 0,3, sont obtenues en diminuant le temps de sonication à 10 min. Le titrage des vésicules soniquées de plus large diamètre par une solution de calcium (figure 3.1.B) présente seulement des pics exothermiques de faibles intensités. L'aire décroît légèrement au cours des 5 premiers pics pour ensuite augmenter, jusqu'à atteindre l'énergie de dilution du calcium.

Les résultats de la titration du calcium sur des vésicules obtenus par extrusion sont radicalement différents (figure 3.1.C). Les vésicules extrudées à l'aide de membranes de porosité de 100 nm ont une distribution de taille autour de 106 nm pour une polydispersité de 0,07. Les premières injections de calcium sur les LUVs donnent lieu à une réaction exothermique. L'aire de ces pics diminue graduellement à mesure qu'une quantité importante de Ca^{2+} s'adsorbe sur la membrane et que de moins en moins de calcium s'y lie, pour atteindre finalement l'énergie de dilution du Ca^{2+} pour les derniers pics. Le même profil est obtenu pour des vésicules extrudées à l'aide de membranes de porosité de 50 nm

(figure 3.1.D). On remarque une différence de l'aire du premier pic. Cette légère sous-évaluation de l'énergie lors de la première injection est observable pour toutes les expériences. Elle est due à la présence d'air à la pointe de l'aiguille de la seringue d'injection et est inhérente à la méthode utilisée.

Il est connu que la présence d'ions calcium peut modifier les autos-assemblages lipidiques (Hauser, 1991). Nous avons donc examiné l'état de nos vésicules de POPC/POPG (7/3) en présence de Ca^{2+} . À partir de mesures en spectroscopie infrarouge, il est possible de vérifier que les expériences ont été faites avec des membranes à l'état fluide. Avant comme après l'ajout de calcium, à 27 °C, on observe une bande $\nu_s\text{CH}_2$ à 2854 cm^{-1} (données non illustrées). Cette fréquence est caractéristique de chaînes alkyles en phase L_α (Mantsch et McElhaney, 1991).

Des mesures en microcalorimétrie à balayage ont été faites sur les mélanges de vésicules composées de POPC/POPG (7/3), en absence et en présence de calcium (figure 3.2). La température de transition du mélange lipidique dans un tampon de faible force ionique, soit dans 10 mM NaCl, en absence de calcium, est de -3,2 °C (figure 3.2.A). Cette valeur est légèrement supérieure à la température de transition de -4 °C de chacun des lipides purs (Marsh, 1990). La largeur du pic observée sur le thermogramme est de quelques 6 °C. L'enthalpie de la transition est de 18,4 kJ/mol, soit de l'ordre de grandeur d'une transition $L_\beta \rightarrow L_\alpha$ pour un mélange de phosphatidylcholine (Marsh, D., 1990). L'ajout du calcium déplace la température de transition à +1,0 °C, en élargissant

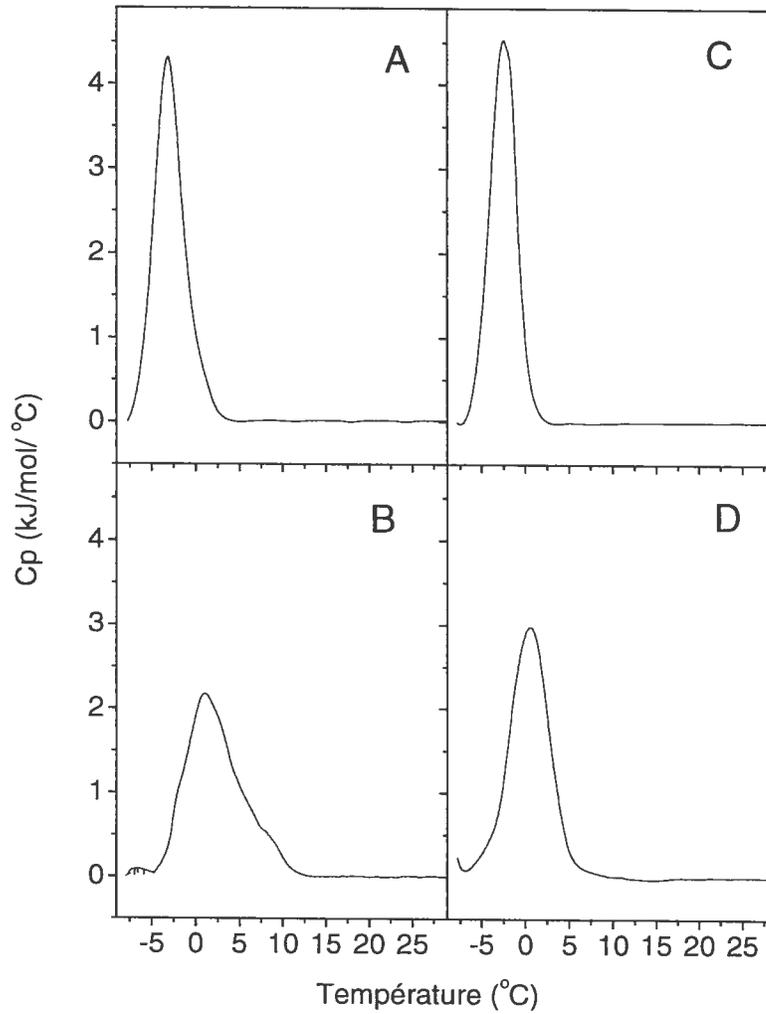


Figure 3.2 : Thermogrammes de membranes de POPC/POPG (7/3) dans un tampon à pH 5,6, 10 mM MES, et 10 mM NaCl (A-B) ou 100 mM en NaCl (C-D), en absence de calcium (A-C) ou en présence de calcium (B-D).

la transition indiquant une perte de coopérativité (figure 3.2.B). L'enthalpie est diminuée de 10 % pour atteindre 16,3 kJ/mol. Ces résultats abondent dans le même sens que ceux obtenus pour des mélanges de DMPC/DMPG (5/5) avec et sans calcium (Findlay et Barton, 1978 ; Van Dijck et al., 1978 ; Verkleij et al., 1974) pour lesquels on observe une augmentation de la température de transition, mais pas de séparation de phases.

Plusieurs études ont déjà été rapportées dans la littérature concernant l'association du calcium avec une membrane d'un mélange de PC/PG. Plusieurs résultats sont cependant contradictoires. Une séparation de phases est observée par le biais d'isothermes de compression (El Mashak et al., 1982), et RMN-³¹P (Tilcock C.P.S. Tilcock et al., 1988). Par diffraction des rayons X, on remarque que la séparation de phases ne présente pas de formes cylindriques (Harlos et Eibl, 1980) contrairement au phosphatidylsérine qui forme un cochléate en présence d'ions divalents (Papahadjopoulos et Poste, 1975). D'autres groupes soutiennent cependant qu'il existe une miscibilité parfaite des lipides PC et PG, pour des chaînes alkyles identiques, peu importe les concentrations en calcium. Cette idée est soutenue par des travaux faits en DSC (Findlay et Barton, 1978 ; Van Dijck et al., 1978 ; Verkleij et al., 1974), RMN-³¹P et ⁻¹³C (Macdonald et Seelig, 1987 ; Van Dijck et al., 1978 ; Zidovetzki et al., 1989). Finalement, une augmentation de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des lipides induite par la présence d'ions calcium est rapportée par des études en spectroscopie infrarouge (Binder et Zschörnig, 2002 ; Garidel et al., 2000) et Raman (Susi, 1981) sans pouvoir conclure à une séparation de phases.

3.1.2. Titration de lipides chargés par l'ajout de calcium : traitement selon le modèle de partition

L'enthalpie d'association du calcium avec des membranes contenant du POPG a été déterminée par la titration d'une suspension de grande concentration en lipide. Une solution de 20 mM en calcium est ajoutée à une solution de lipides en excès, à 30 mM, dans un tampon de 10 mM MES et 10 mM NaCl. Dans ces conditions, les énergies associées aux premières injections sont égales (figure 3.3) et on estime que l'association du calcium injecté est complète. L'enthalpie d'association, ΔH_{ass} , obtenue est de $-4,7 \pm 0,1$ kJ/mol (tableau IV). À la fin du titrage, le ratio du nombre de calcium lié sur le nombre de lipides est de $125 \pm 11 \times 10^{-3}$.

PC : PG	C_{NaCl} mM	ΔH_{ass} kJ/mol	n $\times 10^{-3}$ (Ca^{2+} /lipide)
7 / 3	10	-4.7 ± 0.1	125 ± 11
7 / 3	100	-2.01 ± 0.04	86 ± 4
5 / 5	10	-2.1 ± 0.3	190 ± 26

Tableau IV: Enthalpie d'association du calcium mesurée par la titration vésicules extrudées de POPC/POPG à 27 °C.

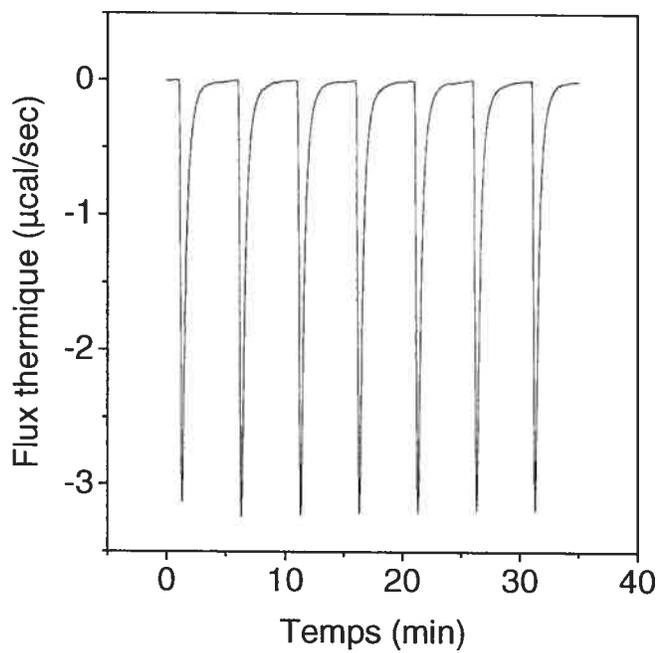


Figure 3.3 : Titration de vésicules extrudées avec une taille moyenne de 100 nm, à environ 30 mM, par une solution de 20 mM en CaCl_2 à 27 °C, dans un tampon 10 mM MES, 10 mM NaCl, pour des injections de $5\mu\text{L}$.

La titration calorimétrique isotherme, par la mesure de la décroissance de l'énergie dégagée à chaque injection de calcium, permet d'obtenir les constantes d'équilibre de cette association. Selon le modèle choisi afin de décrire les données, la signification de ces constantes est différente. L'isotherme le plus simple est décrit par l'équilibre de la distribution des ions entre deux phases : la phase pseudo lipidique et la phase aqueuse. Le coefficient de partage, K_w , est défini comme étant le ratio de la fraction molaire du calcium lié à la membrane, X_{CaL} , sur celle du calcium libre en solution $X_{Ca,eq}$.

$$K_w = \frac{X_{CaL}}{X_{Ca,eq}} \approx X_{CaL} \frac{C_w}{C_{Ca,eq}} = C_w K_{Partition} \quad \text{eq. 3.1}$$

où C_w et $C_{Ca,eq}$ représentent respectivement la concentration de l'eau et la concentration du calcium aqueux non lié. $K_{Partition}$ est la constante K_w divisée par C_w et est exprimée en M^{-1} . En admettant que le nombre de calcium se liant est proportionnel à l'énergie libérée à chaque injection, H_{inj} , et que ΔH_{ass} , mesuré par le titrage de lipides en excès est constant durant tout le titrage, on retrouve la fraction molaire de d'ion calcium lié à la surface membranaire, X_{CaL} :

$$X_{CaL} = \frac{H_{inj}}{\Delta H_{ass}} \frac{1}{(C_L \cdot V_{cell})} \quad \text{eq. 3.2}$$

où C_L est la concentration en lipide dans la cellule et V_{cell} le volume de la cellule, soit 1,45 mL. Nous supposons que le Ca^{2+} ne traverse pas la bicouche et n'interagit qu'avec les lipides des feuillettes externes des vésicules, la C_L considérée est la demie de la concentration totale en lipide.

Tel que décrit par MicroCal, les concentrations utilisées sont corrigées pour le déplacement du volume hors de la cellule. La nécessité de la correction vient du fait que l'appareil est sensible seulement aux variations calorifiques de ce qui est contenu dans le volume V_{cell} . Lors de l'injection, le volume ajouté déplace un volume dans le tube, ΔV , en dehors de V_{cell} . L'homogénéisation de la solution dans le tube n'est pas instantanée, si bien qu'après une injection, la concentration dans ΔV est une moyenne de la concentration initiale, C_L^0 , et de la concentration effective, C_L , dans la cellule. La conservation des masses permet d'écrire la relation suivante :

$$C_L^0 V_{cell} = C_L V_{cell} + \frac{1}{2}(C_L + C_L^0) \Delta V \quad \text{eq. 3.3}$$

Le terme de gauche, $C_L^0 V_{cell}$, définit la quantité totale de lipides dans le système conservé durant toute l'expérience. Le premier terme de droite, $C_L V_{cell}$, se rapporte à la quantité de lipides dans la cellule. Le second terme de droite, $\frac{1}{2}(C_L + C_L^0) \Delta V$, définit la quantité de lipides dans le tube. Par isolation, on peut retrouver la concentration de lipide dans la cellule de travail.

$$C_L = C_L^0 \left(\frac{1 - \frac{\Delta V}{2V_{cell}}}{1 + \frac{\Delta V}{2V_{cell}}} \right) \quad \text{eq. 3.4}$$

Le même raisonnement peut être appliqué à la distribution du calcium. La quantité totale de calcium dans le système est donnée par la concentration de calcium dans la seringue, C_{Ca}^S , et le volume injecté, ΔV .

$$C_{Ca}^s \Delta V = C_{Ca} V_{cell} + \frac{1}{2} (C_{Ca} + C_{Ca}^0) \Delta V \quad \text{eq. 3.5}$$

Avant l'injection du volume ΔV , la concentration initiale de calcium, C_{Ca}^0 , étant nulle, la concentration de calcium dans la cellule, C_{Ca} , est donnée par l'équation suivante :

$$C_{Ca} = C_{Ca}^s \Delta V \left(\frac{1}{V_{cell} + \frac{\Delta V}{2}} \right) \quad \text{eq. 3.6}$$

Les données brutes de la titration de vésicules de POPC/POPG (7/3) extrudées de 100 nm sont rappelées à la figure 3.4.A. Comme l'illustre la figure 3.4.B, les données ne présentent pas une relation linéaire entre la fraction de calcium lié, X_{CaL} , et la concentration de calcium libre en solution, $C_{Ca,eq}$. Une déviation est rapidement observée suivant les premières injections. L'isotherme simple ne permet pas de décrire ce système.

Il est possible d'apporter une correction à cet isotherme en tenant compte du gradient de calcium près de la surface de la membrane. L'approche décrite ici permet de distinguer les interactions à longue distance des interactions à courte distance entre l'ion et la membrane. La présence de lipides chargés négativement dans la membrane et d'ions Ca^{2+} à son interface conduit à la création d'une surface chargée. Le champ électrique associé à cette dernière crée un gradient ionique, depuis la couche interfaciale vers le cœur de la solution. La concentration de calcium à l'interface de cette surface chargée, $C_{Ca,I}$, doit alors être différente de la concentration de calcium libre en solution, $C_{Ca,eq}$. C'est cette concentration interfaciale de calcium libre, $C_{Ca,I}$, qui est en équilibre avec le calcium adsorbé. Ce modèle, proposé par le groupe de Seelig, a décrit avec succès l'association de

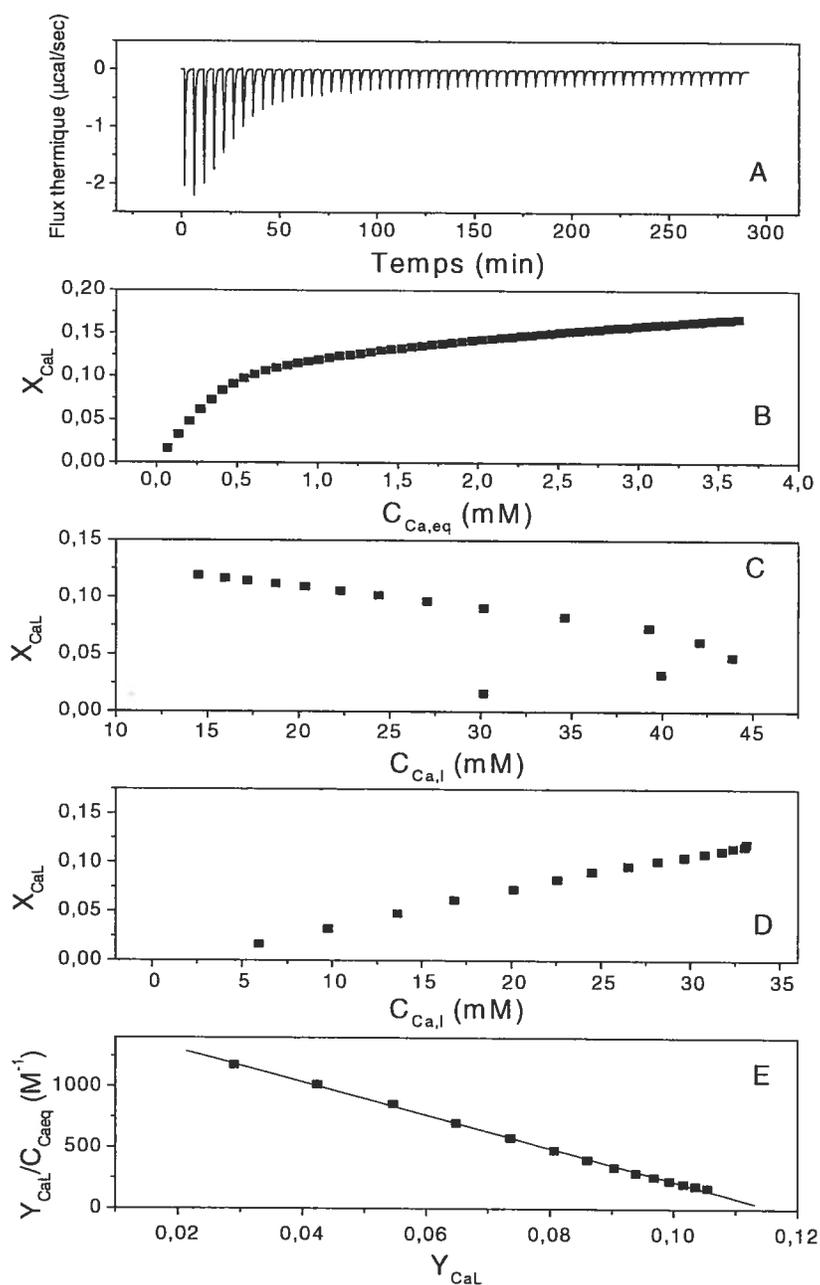


Figure 3.4 : Titration calorimétrique isotherme de vésicules extrudées à 100 nm de POPC/POPG (7/3) par une solution de 20 mM CaCl_2 , à 27 °C, dans 10 mM MES et 10 mM NaCl (A). Isotherme d'association du calcium aux membranes (B). Isotherme corrigé pour la théorie de Gouy-Chapman pour une charge effective de +2 (C) et de +1,3 (D). Isotherme de Scatchard (E).

peptides (Seelig, 1997) et de détergents aux membranes lipidiques (Breukink et al., 2000 ; Heerklotz et Seelig, 2000 ; Tan et al., 2002 ; Wieprecht et al., 2000). Le gradient de concentration en fonction de la distance à l'interface peut être estimé à partir du modèle de Gouy-Chapman (Cevc, 1990 ; Lehrmann et Seelig, 1994). On considère alors la bicouche comme une surface plane, et les charges des têtes polaires de POPG et des ions calcium sont uniformément réparties. Dans le cas présent, la concentration de Ca^{2+} à l'interface est décrite par l'équation suivante :

$$C_{\text{Ca},I} = C_{\text{Ca},eq} \cdot \exp(-z_{\text{Ca}} F \Psi / RT) \quad \text{eq. 3.7}$$

où F est la constante de Faraday, R la constante des gaz parfaits, T la température, et Ψ le potentiel de surface, pour une charge effective du calcium de z_{Ca} . Le potentiel de surface peut être calculé à partir de la densité de charge de la surface, σ , et de tous les composés ioniques i du milieu, avec une concentration $C_{i,eq}$ et une charge effective z_i :

$$\sigma^2 = 2000 \epsilon_r \epsilon_0 \sum_i C_{i,eq} [\exp(-z_i F \Psi / RT) - 1] \quad \text{eq. 3.8}$$

Les ions pris en considérations sont MES, pour lequel on admet une dissociation de la moitié des espèces pour assurer le maintien du pH, les ions chlorure du NaCl et du CaCl_2 , les contres ions sodium, ainsi que les ions calcium non liés à la membrane selon l'hypothèse de l'équation 3.2.

Finalement, la densité de charge peut être estimée en considérant la fraction de PG contenue dans la membrane, X_{PG} , la contribution du Ca^{+2} interfacial et l'aire moyenne d'un lipide, A_L , estimée indépendante de la présence de calcium interfacial à 68 \AA^2 POPC et POPG (Beschiaschvili et Seelig, 1990),

$$\sigma = \left(\frac{e_0}{4\pi\epsilon_0}\right)(-X_{PG} + z_{Ca}X_{CaL}) \quad \text{eq. 3.9}$$

L'isotherme associé à ce modèle, calculé pour une charge effective du calcium, z_{Ca} , fixée à +2, est rapporté à la figure 3.4.C. L'échelle des concentrations de calcium libre à l'interface est augmentée d'un facteur 10 par rapport aux concentrations d'ions libres en solution. Loin de corriger la courbure de l'isotherme simple, la correction faite est trop importante et conduit à une variation complexe de la concentration à l'interface. Ainsi, selon ce modèle, durant les 3 premières injections, la concentration à la surface de la bicouche augmente rapidement dû au gradient de charge créé par les lipides anioniques. Cependant, l'association du calcium de charge effective de +2 diminue la densité de charge négative. Ceci conduit à la réduction de la concentration de calcium à l'interface de la membrane, et ce, malgré l'augmentation constante de la concentration totale en calcium dans la solution. Il est possible d'obtenir un isotherme linéaire en ajustant la charge effective du calcium à +1,5 (figure 3.4.D) d'où une constante de partage, $K_{\text{Partition}}$, de $7 \pm 6 \text{ M}^{-1}$ peut être calculée (tableau V). Les valeurs tirées de cet isotherme qui sont rapportées dans la littérature varient de 8,5 à 20 M^{-1} (Cevc, 1990 ; Garidel et Blume, 1999 ; Lau et al., 1981 ; Macdonald et Seelig, 1987). Ces résultats ont cependant été obtenus sur des vésicules obtenues par sonication de compositions en PG différentes. On rapporte pour l'application de l'isotherme corrigée pour le potentiel de Gouy-Chapman, pour la titration de vésicules soniquées de POPC/POPG (7/3) par du calcium, que la charge effective de la bicouche doit être évaluée à la baisse, soit en diminuant la charge de POPG à $-0,68$ au lieu

de -1. Dans le cadre de la présente étude, la tendance inverse est observée et aucune relation linéaire n'est observée même lorsque la charge effective du POPG est portée à -2.

PC : PG	C _{NaCl}	Z _{Ca ajusté}	K _{Partage}
	mM		M ⁻¹
7 / 3	10	1,5 ± 0,2	7 ± 6
7 / 3	100	1,4 ± 0,2	11 ± 2
5 / 5	10	n.d.	n.d.

Tableau V : Constantes physiques de l'association du calcium à des vésicules extrudées de POPC/POPG à 27 °C obtenues à partir de l'isotherme de partage modifié pour le gradient de concentration de Gouy-Champman. (n.d. : non déterminé).

3.1.3. Titration de lipides chargés par l'ajout de calcium : traitement selon le modèle de l'isotherme d'absorption de Scatchard

L'isotherme de Scatchard est un modèle utilisé pour représenter l'association ligand-biomacromolécule (Saboury, 2003 ; Scatchard, 1949). Pour le présent système, on pose que les ions libres s'adsorbent sur des sites de liaison, $n_{\text{Scatchard}}$, identiques et indépendants les uns des autres. Ces sites sont composés d'un certain nombre de lipides. La constante d'association, $K_{\text{Scatchard}}$, décrit l'affinité intrinsèque d'un ion pour un site. Elle peut être déterminée à partir de l'équation suivante :

$$\frac{Y_{CaL}}{C_{Ca,eq}} = K_{\text{Scatchard}} \cdot n_{\text{Scatchard}} - K_{\text{Scatchard}} \cdot Y_{CaL} \quad \text{eq. 3.10}$$

où $C_{Ca,eq}$ est la concentration de calcium en solution aqueuse, Y_{CaL} est le ratio du nombre de moles de calcium associé à la surface de la bicouche, n_{CaL} , sur le nombre de moles de lipides, n_L :

$$Y_{CaL} = \frac{n_{CaL}}{n_L} \quad \text{eq. 3.11}$$

n_L , ne tient en compte que la demie de la concentration en lipide, soit les lipides des feuillettes externes des vésicules. On pose ici l'hypothèse que les ions calcium ne traversent pas la bicouche et que les lipides sont aléatoirement répartis entre les deux feuillettes, un nombre équivalent de POPG se trouvant à l'intérieur comme à l'extérieur de la membrane. Comme précédemment, le nombre de calcium associé à la surface lipidique, est établi à partir de la mesure d'énergie dégagée à chaque injection et de l'enthalpie molaire d'association $\Delta H_{Scatchard}$:

$$n_{CaL} = \frac{H_{inj}}{\Delta H_{Scatchard}} \quad \text{eq. 3.12}$$

Par ce modèle, nous avons déterminé la valeur de $\Delta H_{Scatchard}$ de façon à obtenir une relation linéaire, du graphique de Scatchard reliant $Y_{CaL}/C_{Ca,eq}$ à Y_{CaL} . De ce graphique, nous obtenons la constante d'association $K_{Scatchard}$, le nombre de sites par lipide, $n_{Scatchard}$, ainsi que l'enthalpie de réaction. La valeur $\Delta H_{Scatchard}$ peut ensuite être comparée à celle mesurée, ΔH_{ass} .

La figure 3.4.E présente l'isotherme de Scatchard pour les pics dont l'aire est au moins 10% celle de première injection. Les autres injections ne déplacent pas suffisamment l'équilibre pour amener de l'information nouvelle. Une relation linéaire est observée pour

toutes ces injections. La valeur $\Delta H_{\text{Scatchard}}$ est de $-4,60$ kJ/mol. Elle est en accord avec la valeur mesurée en excès de lipide pour laquelle on trouve un écart de $0,10$ kJ/mol, soit 2 % (tableau VI). La constante d'association et le nombre de sites obtenus sont respectivement $11 \pm 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ et $132 \pm 25 \times 10^{-3}$ site par lipide. La valeur $n_{\text{Scatchard}}$ trouvée recoupe la valeur n trouvée à la fin du titrage (tableau IV).

PC : PG	C_{NaCl} mM	$\Delta H_{\text{Scatchard}}$ kJ/mol	$K_{\text{Scatchard}}$ $\times 10^3 \text{ M}^{-1}$	$n_{\text{Scatchard}}$ $\times 10^{-3}$ (site/lipide)
7 / 3	10	-4,60	11 ± 2	132 ± 25
7 / 3	100	-2,76	$1,4 \pm 0,4$	122 ± 15
5 / 5	10	-2,47	11 ± 3	236 ± 19

Tableau VI : Constantes physiques de l'association du calcium à des vésicules extrudées de POPC/POPG, à 27°C , obtenues à partir de l'isotherme d'absorption de Scatchard.

3.1.4. Effet de la force ionique

Dans le but d'examiner l'effet de la force ionique sur l'association du calcium avec une bicouche POPC/POPG, le contenu en NaCl du tampon a été augmenté par un facteur 10, jusqu'à 100 mM. Le profil obtenu dans ces conditions (Figure 3.5.A) montre que ce changement affecte l'association du calcium aux membranes de PC/PG. Le profil de la titration est similaire à celui observé pour l'expérience à faible concentration en NaCl (figure 3.4) : tous les pics décrivent une réaction exothermique et l'aire de ces derniers décroît allant jusqu'à la valeur d'énergie de dilution du calcium dans ce tampon. L'énergie

de dilution du calcium, pour un tampon avec une force ionique augmentée, est diminuée de

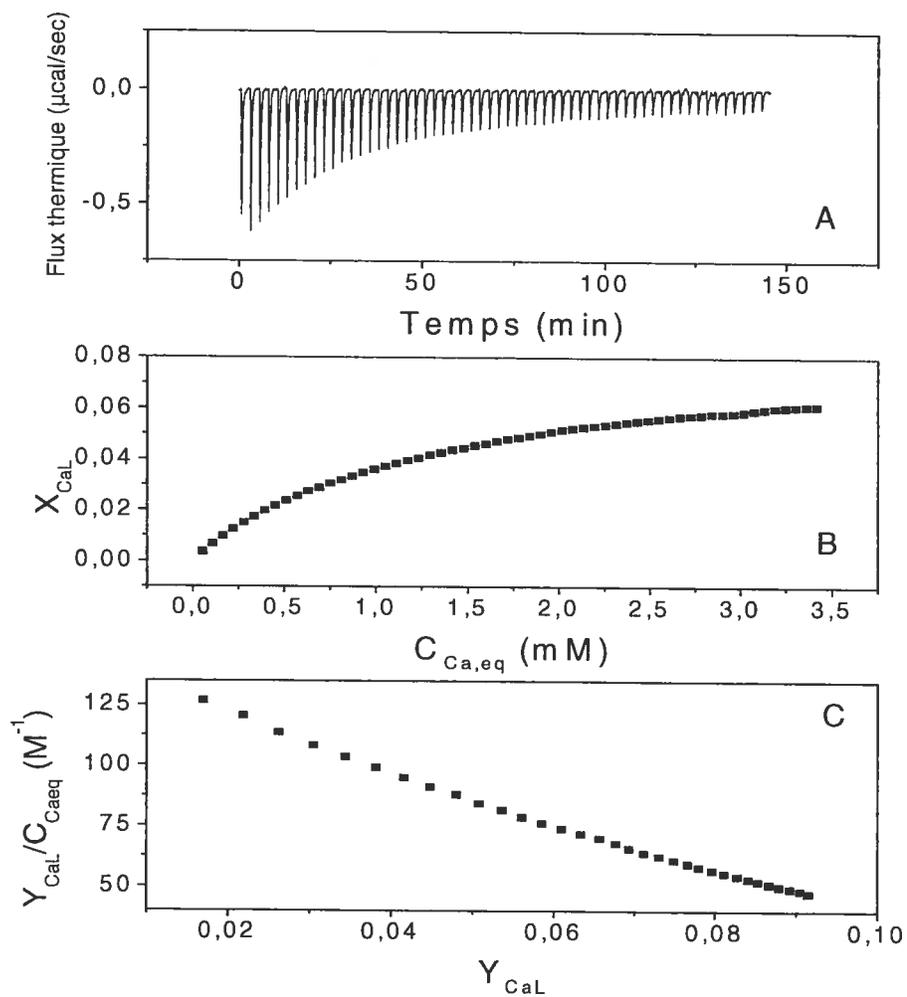


Figure 3.5 : Titration calorimétrique isotherme de vésicules extrudées composées de POPC/POPG (7/3) dans 10 mM MES et 100 mM NaCl par une solution de CaCl_2 , à 27 °C, pour des injections de 5 μL (A). Isotherme de l'association du calcium aux membranes (B). Isotherme de Scatchard (C).

près de la moitié, passant de $-35,5 \mu\text{J}$ à $-19 \mu\text{J}$ par injection. Les enthalpies associées aux premières injections sont réduites d'un facteur d'environ 3. L'enthalpie mesurée en présence de lipides en excès est de $-2,01 \pm 0,04 \text{ kJ/mol}$, soit une réduction de près de 50 % par rapport à ΔH_{ass} mesurée avec 10 mM NaCl (tableau IV). On remarque aussi que la décroissance des pics est moins abrupte et traduit une variation de la constante d'association.

Comme précédemment, l'isotherme simple ne permet pas d'obtenir une relation linéaire (figure 3.5.B). Cependant, la courbure de l'isotherme est moins prononcée. Les charges présentes dans le tampon font écran aux ions et réduisent le gradient de concentration de Ca^{2+} entre l'interface membranaire et le cœur de la solution. La valeur de K_{partage} est de $11 \pm 2 \text{ M}^{-1}$ pour z_{Ca} de 1,4 (tableau V).

Le modèle de Scatchard quant à lui conduit à une relation linéaire pour tous les points du titrage (figure 3.5.C). $\Delta H_{\text{Scatchard}}$ obtenu en simulant les données est de $-2,76 \text{ kJ/mol}$, soit un écart de $0,75 \text{ kJ/mol}$ par rapport à la valeur mesurée. La constante d'association calculée est de $1,4 \pm 0,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, d'un facteur 10 inférieur par rapport à celle obtenue pour le tampon de force ionique inférieur. Quant au nombre de sites accessibles, le modèle donne $0,122 \pm 0,015$ site par lipide, alors qu'à la fin du titrage, le rapport Ca_L/L est de $0,086 \pm 0,004$.

Les enthalpies de transition gel-fluide des lipides sont peu sensibles à l'augmentation de la force ionique, à 100 mM en NaCl, et sont semblables, soit 17,1 et 16,7 kJ/mol sans et avec calcium respectivement (figure 3.2.C-D). Les températures de transitions sont elles aussi peu sensibles à la présence de 100 mM NaCl, on les retrouve respectivement à -2,5 et 0,6 °C sans et avec calcium. La membrane se trouve dans un état fluide durant toute la titration, laquelle est faite à 27 °C.

3.1.5. Effet de la composition lipidique de la membrane

Afin de connaître le rôle du POPG dans la liaison du Ca^{2+} aux bicouches lipidiques, la titration de vésicules de POPC/POPG (5/5) par Ca^{2+} dans un tampon NaCl 10 mM a été réalisée (figure 3.6.A). L'aire associée aux 6 premières injections est la même. La surface constante de ces pics indique que tout le calcium injecté s'associe aux membranes. L'enthalpie d'association résultant de l'évaluation de l'aire de ces pics est de $-2,1 \pm 0,3$ kJ/mol. Il s'en suit une décroissance des énergies par injection pour atteindre des valeurs relativement constantes, de l'ordre de grandeur de la dilution du calcium dans le tampon.

L'isotherme de la figure 3.6.B présente uniquement les points pour lesquels la concentration de calcium en solution est différente de zéro. Lors des premières injections, l'équilibre est complètement déplacé vers la forme associée du calcium, et la concentration de calcium libre en solution est pratiquement nulle. Seuls les points pour lesquels l'énergie associée à l'injection est inférieure de plus de 10 % à l'énergie des premières injections

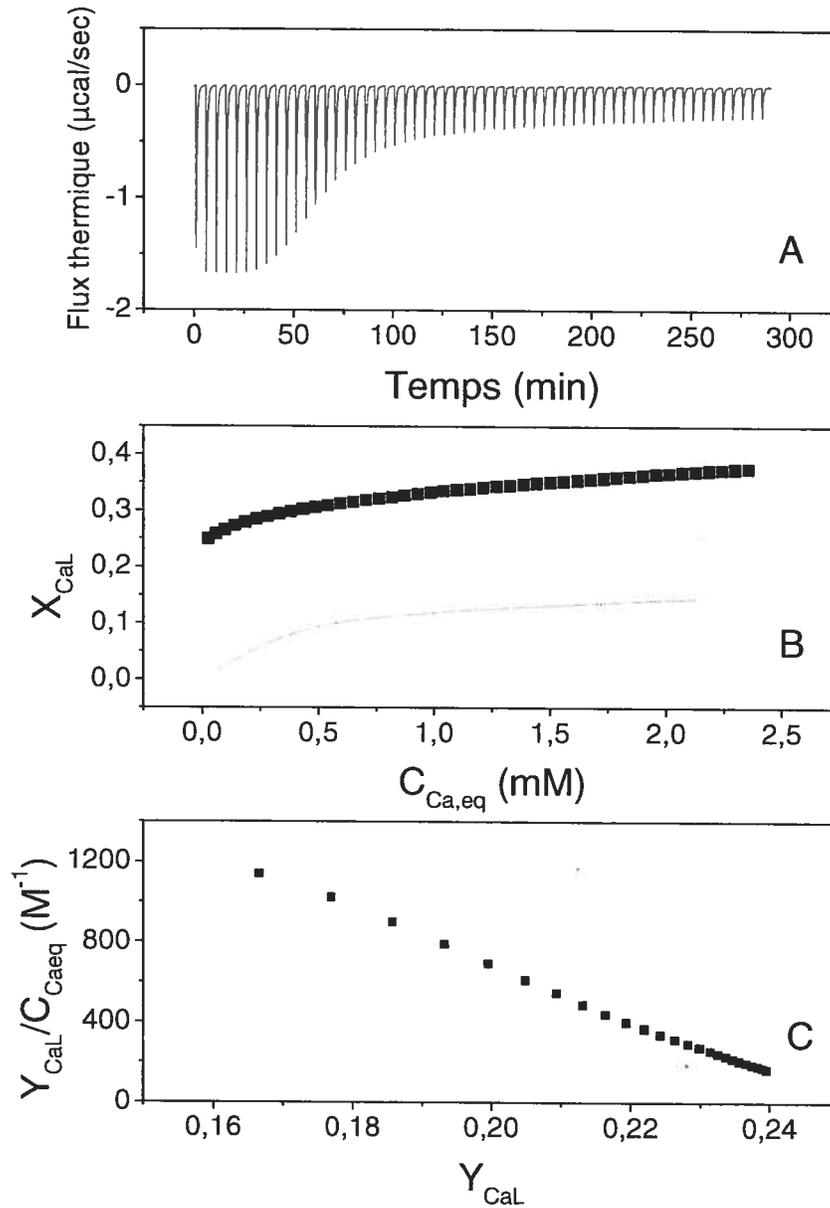


Figure 3.6 : Titration calorimétrique isotherme de vésicules extrudées composées de POPC/POPG (5/5) dans 10 mM MES et 10mM NaCl par une solution de CaCl_2 à 27 °C, pour des injections de 5 μL (A). Isotherme de l'association du calcium aux membranes (B). L'isotherme obtenu pour une membrane de POPC/POPG (7/3) dans le même tampon est présenté pour fins de comparaisons (---). Isotherme de Scatchard (C).

sont considérés (figure 3.6.B-C). En deçà de ce pourcentage de différence, une grande incertitude existe sur ces valeurs. Bien que l'échelle de grandeur soit différente, on observe un isotherme semblable à celui observé pour une membrane de POPC/POPG (7/3). Une décroissance d'énergie d'association semblable à celle observée pour l'association sur des membranes à 30 % en POPG est aussi observable sur les données brutes (figure 3.6.A).

Il n'est pas possible d'obtenir une relation linéaire à partir du modèle de partage pour ce système, et ce peu importe z_{Ca} .

À partir du modèle de Scatchard, la constante d'association est de $11 \pm 3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, une valeur équivalente à celle trouvée pour l'association du calcium à une membrane contenant 30 % de POPG. Le nombre de sites est de $236 \pm 19 \times 10^{-3}$, soit environ le double de celui trouvé avec les membranes contenant 30 % de POPG. En contrepartie, le nombre d'ions calcium liés à la bicouche par lipide obtenu à partir de H_{ass} , est de $190 \pm 26 \times 10^{-3}$.

3.2. Discussion

3.2.1. Effet de la taille et du mode de préparation des vésicules

Nos résultats montrent clairement que la méthode de préparation de vésicules unilamellaires a un effet important sur la thermodynamique de l'association de Ca^{2+} à une membrane composée de POPC et POPG. Pour des vésicules obtenues par extrusion,

indépendamment de la taille, l'association du Ca^{2+} aux membranes de POPC/POPG est essentiellement exothermique (figure 3.1.C-D). Dans le cas des vésicules obtenues par sonication, les variations d'enthalpie associées à l'ajout du calcium sont plus complexes. Selon le temps d'exposition des membranes aux ultrasons, un comportement différent est observé, allant d'un phénomène endothermique important à une réaction que légèrement exothermique. Ce phénomène endothermique est observable lors des premières injections de calcium lorsque l'échantillon contient une grande quantité de petites vésicules obtenues par sonication (figure 3.1.A). Lorsque la suspension lipidique est soumise pour une période plus courte aux ultrasons, le phénomène endothermique est moins important et semble contrebalancer la contribution exothermique de l'association du calcium aux bicouches (figure 3.1 B). La titration de vésicules POPC/POPG (7/3) préparées par sonication a conduit Lehrmann et Seelig à l'obtention de valeurs d'enthalpie exothermiques (Lehrmann et Seelig, 1994). Dans leurs études, les différences induites par le mode de préparation des vésicules unilamellaires sont examinées uniquement pour une suspension lipidique de POPC, et aucune différence n'a été remarquée. Cette conclusion est ensuite étendue aux vésicules contenant le lipide anionique POPG. Plus récemment, le groupe de Seelig a cependant publié les résultats de titrations calorimétriques isothermes d'un peptide et des vésicules produites à partir des deux méthodes (Wieprecht et al., 2002). Les résultats montrent que l'enthalpie d'adsorption du peptide étudié est plus exothermique pour des vésicules de 100 nm obtenues par extrusion, pour une différence d'environ 10 % comparativement à l'enthalpie mesurée pour l'adsorption à des vésicules de 30 nm obtenues par sonication.

À la lumière de nos résultats, l'association du calcium aux membranes de POPC/POPG est exothermique et ne dépend pas de la taille moyenne des vésicules. La contribution endothermique dans le cas de vésicules soniquées serait associée à la présence de très petites structures instables dont le calcium induit la réorganisation. La sonication de mélanges lipidiques produit une large polydispersité des tailles des vésicules unilamellaires résultantes. La polydispersité mesurée dans nos expériences est près de cinq fois supérieure à celle mesurée dans le cas de vésicules extrudées. Ces différences de polydispersité sont en accord avec les travaux présentés par De Kruijff et al. (De Kruijff et al., 1975). Ceci conduit à la présence de vésicules ayant des rayons de courbure réduits induisant un stress sur la membrane, affectant plusieurs propriétés des vésicules unilamellaires telles que la transition de phase gel-liquide cristallin (De Kruijff et al., 1975) et l'association de peptide (Rex et Schwarz, 1998 ; Wieprecht et al., 2002). Dans cette étude, l'ajout de calcium aux bicouches semble produire une réorganisation de ces structures moins stables, un phénomène endothermique.

Garidel et Blume rapportent aussi des résultats de titrations calorimétriques isothermes concernant l'association du calcium à une membrane formée exclusivement de DMPG (Garidel et Blume, 1999). Les titrages utilisent des vésicules obtenues par sonication et ne présentent que des pics associés à des phénomènes exothermiques. Cette contribution est probablement due à une compétition entre l'association du calcium à la bicouche, un phénomène exothermique, et la réorganisation des vésicules de faibles rayons

de courbure, un phénomène endothermique. La membrane présentant un grand nombre de sites, il est possible de croire que l'association du calcium prédomine sur la réorganisation des structures instables.

3.2.2. Thermodynamique de l'association du calcium aux membranes de POPC/POPG

L'association du calcium aux membranes a été modélisée à l'aide de l'approche de partition présentée par Seelig et al. (Macdonald et Seelig, 1987). Ce modèle permet de décrire seulement la première partie de la titration, soit les 5 premières injections, à la suite de lesquelles une déviation à la linéarité importante est observée lorsque la charge du calcium a été posée à +2 (figure 3.2.B). Après la 5^e injection, 50 % du calcium injecté est estimé lié à la bicouche. Il est possible de faire varier cette valeur afin d'améliorer l'ajustement des données au modèle. La constante de partage ainsi obtenue pour une membrane de POPC/POPG (7/3) dans un tampon à faible teneur en NaCl est comparable aux résultats de Seelig et al. pour le même système, soit $7 \pm 6 \text{ M}^{-1}$ comparativement à 10-20 M^{-1} (Lehrmann et Seelig, 1994 ; Macdonald et Seelig, 1987). Il est difficile de justifier la réduction de la charge du calcium, sinon par le biais d'un écrantage causé par les contres ions présents. Finalement, le modèle ne permet pas d'obtenir une relation linéaire lorsque le rapport POPC/POPG est de 5/5 montrant la limite de l'approche.

En contrepartie, l'isotherme de Scatchard permet de bien reproduire les résultats. Afin d'obtenir une relation linéaire, l'enthalpie d'association, $\Delta H_{\text{Scatchard}}$, est fixée pour optimiser les simulations. La valeur obtenue s'approche de la valeur mesurée par le titrage de lipides en excès (tableau VI), renforçant la validité du modèle. Le faible écart pourrait provenir de la variation de l'enthalpie molaire d'association durant la titration qui n'a pas été prise en compte. Il est à noter qu'il est aussi possible d'obtenir une relation linéaire en faisant varier l'énergie de dilution du calcium plutôt que l'enthalpie d'association. Dans ce cas, les valeurs obtenues présentent un écart aux valeurs mesurées significativement plus important, allant jusqu'à 77 %. De plus, les énergies de dilution ainsi trouvées pour ajuster l'isotherme de Scatchard sont considérablement plus importantes que la valeur mesurée pour le plus grand gradient de concentration entre la seringue d'injection et la cellule de mesure. Il a donc été jugé préférable d'ajuster la valeur de l'enthalpie d'association. La constante d'association ainsi que le nombre de sites trouvés sont donc influencés par ce choix.

La constante d'association est estimée à $11 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ et ce, pour les deux compositions membranaires étudiées. Cette valeur est difficilement comparable à celle trouvée à partir du modèle de partition ne tenant compte que de l'association intrinsèque à courte distance (Lehrmann et Seelig, 1994 ; Macdonald et Seelig, 1987), dont les valeurs sont de $10\text{-}20 \text{ M}^{-1}$. Comme décrit plus tôt, seules les interactions à courtes distances sont considérées et ces valeurs ne tiennent pas compte de la variation d'énergie libre d'une charge approchant une surface chargée (eq. 3.13), le transfert de l'ion calcium depuis la

solution à l'interface de la membrane. En utilisant le potentiel de membrane, ψ , avant la première injection de calcium, on obtient une valeur d'énergie libre du même ordre de grandeur que la constante $K_{\text{Scatchard}}$, de $6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

$$\Delta G = -z_i F \psi \quad \text{eq. 3.13}$$

L'importance du rôle joué par les forces électrostatiques dans l'association du calcium aux membranes est soulignée davantage par l'effet de la variation de la force ionique. L'augmentation de la force ionique du tampon d'un facteur 10 amène une décroissance de 30 % de l'enthalpie ainsi que de la constante d'association. Ces observations peuvent être expliquées par l'effet de blindage du tampon qui réduit les forces électrostatiques entre la membrane et les ions divalents. En utilisant le modèle de partition corrigé pour les forces électrostatiques par la théorie de Gouy-Chapman, un effet de la force ionique différent est rapporté pour l'association du calcium à une membrane composée exclusivement de POPC (Altenback et Seelig, 1984). Une constante d'association de $13,8 \text{ M}^{-1}$ est déterminée pour une bicouche de POPC, en présence de 100 mM NaCl, à 25 °C, et de $7,0 \text{ M}^{-1}$ en absence NaCl, à 40 °C. On remarque cependant, que les mesures ont été faites à différentes températures, sur des vésicules obtenues par sonication.

À la fin du titrage, la membrane atteint l'électroneutralité. Pour une membrane POPC/POPG (7/3) ou (5/5), le rapport $\text{POPG}/\text{Ca}^{2+}$ obtenu à partir de l'enthalpie mesurée est d'environ 2. L'augmentation linéaire de l'association du calcium avec le contenu en lipide anionique de la membrane a déjà été relevée dans le passé (Macdonald et Seelig,

1987). Les isothermes de Scatchard permettent d'obtenir des valeurs concordantes définissant un site de liaison comme un groupe de lipides contenant deux lipides chargés. Ceci ne permet cependant pas de conclure sur la nature des sites de liaisons. Des observations par RMN rapportent que les têtes polaires PC et PG subissent des changements conformationnels (Macdonald et Seelig, 1987), et du paramètre d'ordre des chaînes alkyles (Zidovetzki et al., 1989) lors de l'ajout de calcium. De même, l'association du calcium à la PC a déjà été observée par spectroscopie infrarouge (Binder et Zschörnig, 2002) et par RMN (Zidovetzki et al., 1989). Cependant, l'ajout de calcium aux membranes de POPC ne permet pas d'obtenir un signal mesurable en ITC. Tel que mentionné plus tôt, il existe une divergence dans la littérature quant à la séparation de phase induite par le calcium sur ces mélanges. Plus récemment, il a été proposé qu'il existe une séparation de phase lorsque le mélange approche la température de transition du mélange (Huster et al., 2000). Pour autant que les lipides se trouvent à une température suffisante pour être dans une phase fluide, il semblerait que la bicouche reste homogène en présence de calcium. Les mesures infrarouges faites sur les mélanges étudiés confirment que les lipides se trouvent dans une phase fluide avec et sans calcium. De là, les sites de liaisons sont considérés comme des groupes de lipides composés de POPC et POPG dont la dimension est dictée par le nombre de PG. Ceci est cohérent avec le fait que l'association du calcium augmente linéairement avec l'augmentation de la concentration de lipide anionique dans la bicouche.

En conclusion, l'association du calcium à des membranes de POPC/POPG est un processus spontané enthalpiquement favorable. L'attraction électrostatique semble en être

la force motrice conduisant à des *sites* de liaison dont la taille est définie par le contenu en PG. Il importe de souligner l'importance du mode de préparation des vésicules pour réduire les structures instables qui peuvent conduire lors de leur réorganisation à des mesures erronées. Bien que le modèle de Scatchard semble vouloir expliquer les comportements du système étudié, il est cependant important de garder à l'esprit que la flexibilité d'un modèle, et par le fait même sa capacité à reproduire les données expérimentales, repose sur le nombre et la qualité des paramètres ajustables.

4. ÉTUDE DE L'EFFET DU CALCIUM SUR LE THERMOTROPISME DES MÉLANGES MODÈLES DU SC PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET RAMAN

Nous avons étudié l'effet du calcium sur les propriétés de mélange ainsi que sur la distribution spatiale des lipides du mélange équimolaire CER III/PA-d₃₁/Chol. Pour ce faire, le thermotropisme est examiné par spectroscopie infrarouge. La microscopie Raman permet ensuite de caractériser les hétérogénéités locales des mélanges en fonction de la température.

4.1. Thermotropisme par spectroscopie infrarouge

4.1.1. Résultats

Un spectre infrarouge caractéristique du mélange est illustré à la figure 1.9, les principales bandes attribuées dans le tableau I. La figure 4.1 présente la variation des maxima des bandes de $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ en fonction de l'augmentation de la température. Les échelles y sont normalisées de manière à ce que l'amplitude du déplacement des bandes, lors de la transition des chaînes depuis une phase ordonnée à désordonnée, soit similaire (Casal et Mantsch, 1984 ; Mantsch et McElhaney, 1991). La contribution du cholestérol étant considérée comme constante, la variation de $\nu_s\text{CH}_2$ représente un changement de l'ordre conformationnel des chaînes acyles des céramides, alors que la

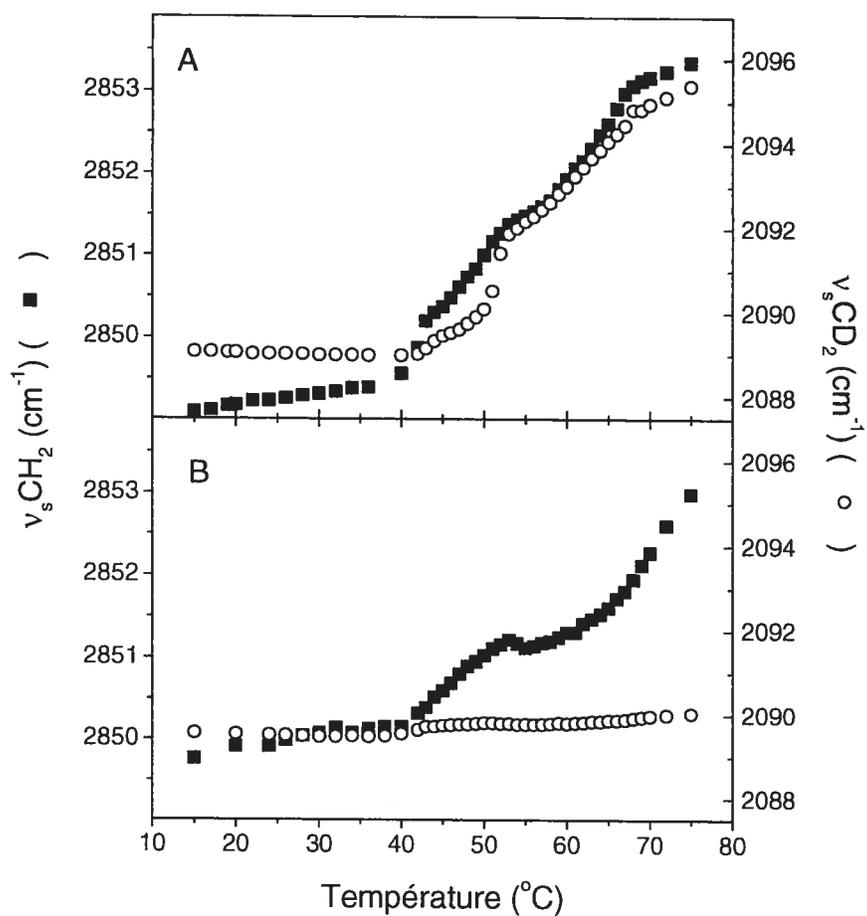


Figure 4.1 : Variation de la position de la bande $\nu_s\text{CH}_2$ (■) et $\nu_s\text{CD}_2$ (○) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A) et en présence de calcium (B).

variation de la position de la bande $\nu_s\text{CD}_2$ est sensible au changement d'ordre conformationnel des chaînes de l'acide palmitique deutéré.

La figure 4.1.A représente le thermotropisme du mélange équimolaire CER III/PA- d_{31} /Chol dans un tampon sans Ca^{2+} . Ce comportement est similaire à celui observé par Lafleur pour le même mélange (Lafleur, 1998). À basse température, les fréquences d'élongation se trouvent sous 2850 et 2090 cm^{-1} , ce qui est caractéristique d'une phase cristalline (Moore et al., 1997a ; Moore et al., 1997b). De 40 à 70 °C, on remarque un déplacement des maxima de $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ jusqu'à 2854 et 2096 cm^{-1} respectivement. Ces fréquences sont celles observées pour une phase fluide désordonnée (Mantsch et McElhaney, 1991). Les transitions de phase des céramides et de l'acide gras semblent concertées et se produisent en deux temps : un premier déplacement abrupt se produit vers 40 °C, tandis que l'autre est observé vers 55 °C.

En présence d'ions calcium, le comportement du mélange est grandement modifié (Figure 4.1.B). On voit ainsi que la fréquence de $\nu_s\text{CD}_2$ demeure à 2089 cm^{-1} sur tout le domaine thermique examiné, indiquant que les chaînes des acides gras restent très ordonnées. Bouwstra et al. rapporte une observation en ce sens (Bouwstra et al., 2000). L'ajout de 2 mM de calcium augmente la plage de température pour laquelle une phase lamellaire d'une périodicité de 12,3 nm est observée par diffusion des rayons X dans un mélange équimolaire CER/acides gras/Chol à un pH de 7,2. D'autre part, les céramides semblent peu affectés par la présence des ions Ca^{2+} et les chaînes se désordonnent à partir

de 40 °C pour atteindre un plateau autour de 2851,2 cm⁻¹ entre 53 et 58 °C. La superposition des dérivées secondes des courbes de fusion obtenues à partir de $\nu_s\text{CH}_2$ pour le mélange ternaire avec et sans Ca²⁺ permet de constater que les transitions se produisent aux mêmes températures. Les résultats présentés sont obtenus avec des concentrations en calcium de 100 mM. Les mêmes observations sont faites pour des concentrations 25 mM en CaCl₂, alors qu'à 10 mM, le thermotropisme est semblable à celui du mélange sans calcium.

La présence d'un doublet de la bande δCH_2 (figure 4.2) est associée à une forme cristalline avec empilement de chaînes orthorhombique (Fenske et al., 1994 ; Moore et al., 1997a). L'éclatement de la bande est trop petit pour donner lieu à deux composantes bien résolues. Les spectres déconvolués cependant montrent bien deux composantes à 1470 et 1464 cm⁻¹ pour les mélanges CERIII/PA-d₃₁/Chol avec (figure 4.2.A) et sans calcium (figure 4.2.C). L'éclatement, cependant, conduit à une augmentation de la largeur de la bande à 95 % de sa hauteur sur les spectres bruts. À 30 °C, les largeurs de bande sont de 8 cm⁻¹. Comme cet éclatement est attribué au couplage interchaîne (Philippot et al., 1995 ; Snyder et al., 1992 ; Snyder et al., 1994), sa présence signifie qu'il y a séparation de phase entre les céramides et les acides gras puisque les fréquences de δCD_2 et de δCH_2 sont distinctes. À haute température, la bande δCH_2 étroite de 3 cm⁻¹ ne possède plus qu'une composante à 1468 cm⁻¹ (figure 4.2.B-D) signifiant la perte de l'organisation orthorhombique, lors d'une transition solide-solide (Mendelsohn et Moore, 2000). La variation de la largeur de la bande de déformation δCH_2 est peu affectée par la présence du

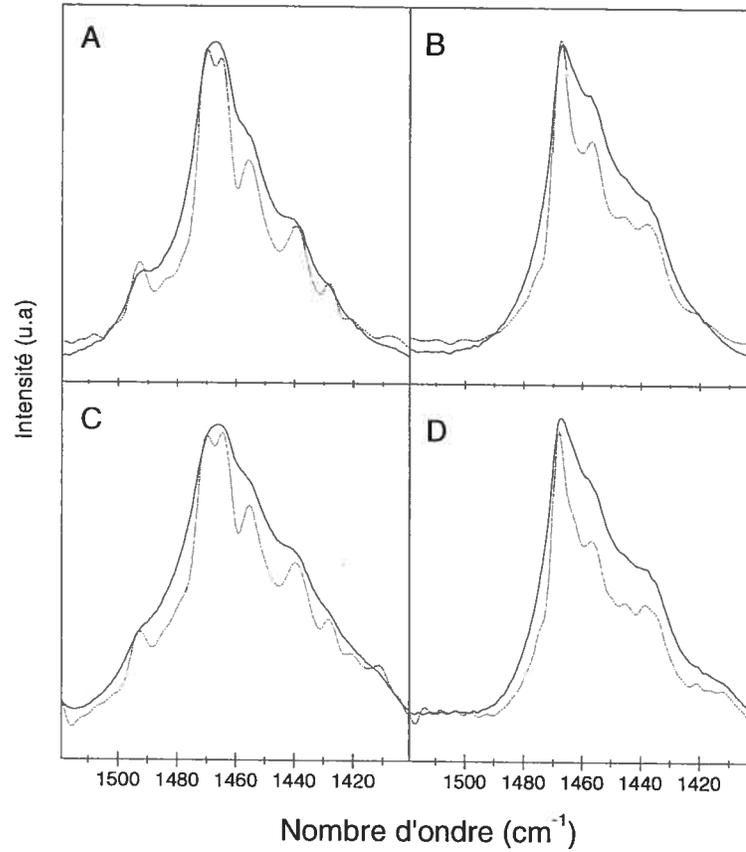


Figure 4.2 : Spectres infrarouges de la région δCH_2 pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A-B), en présence de calcium (C-D), à 30 °C (A-C) et 75 °C (B-D). Résultat de la déconvolution du spectre brut (- - -)

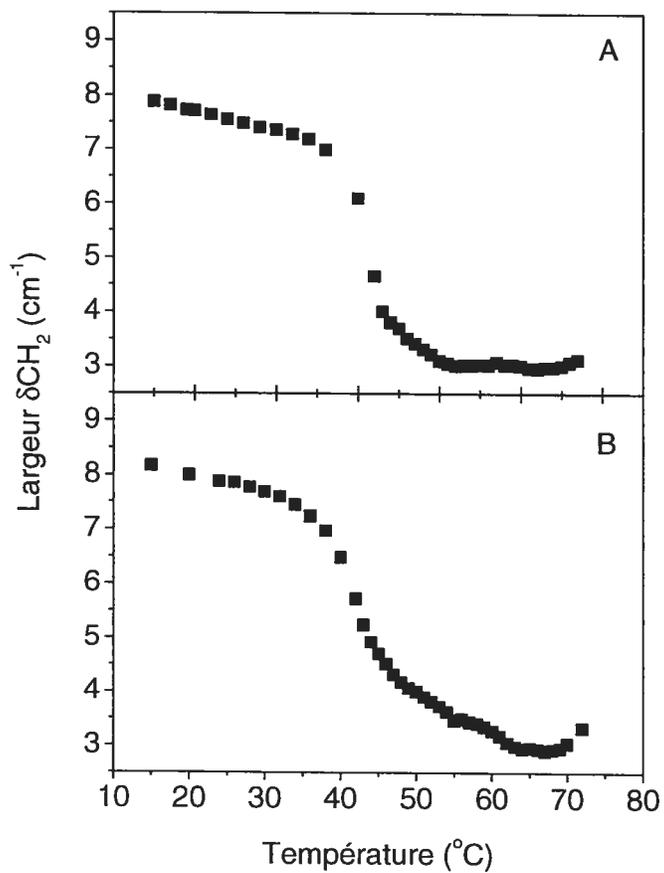


Figure 4.3 : Variation de la largeur de la bande δCH_2 à 95 % de sa hauteur en fonction de la température pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A) et en présence de calcium (B).

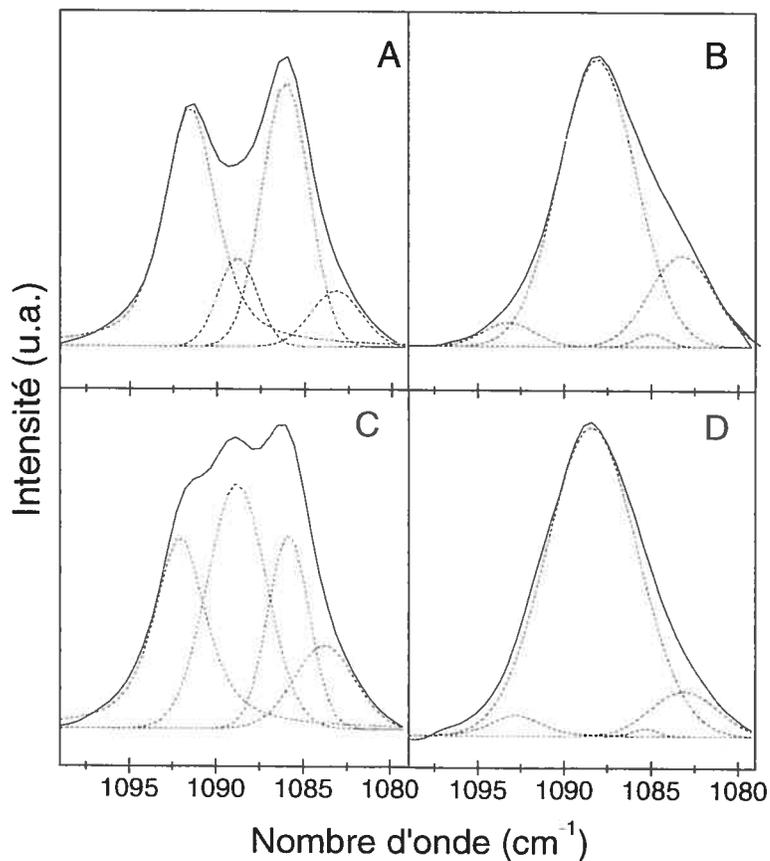


Figure 4.4 : Spectres infrarouges de la région δCD_2 pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A-B), en présence de calcium (C-D), à 30 °C (A-C) et 75 °C (B-D). Décomposition du spectre en quatre composantes (- - -)

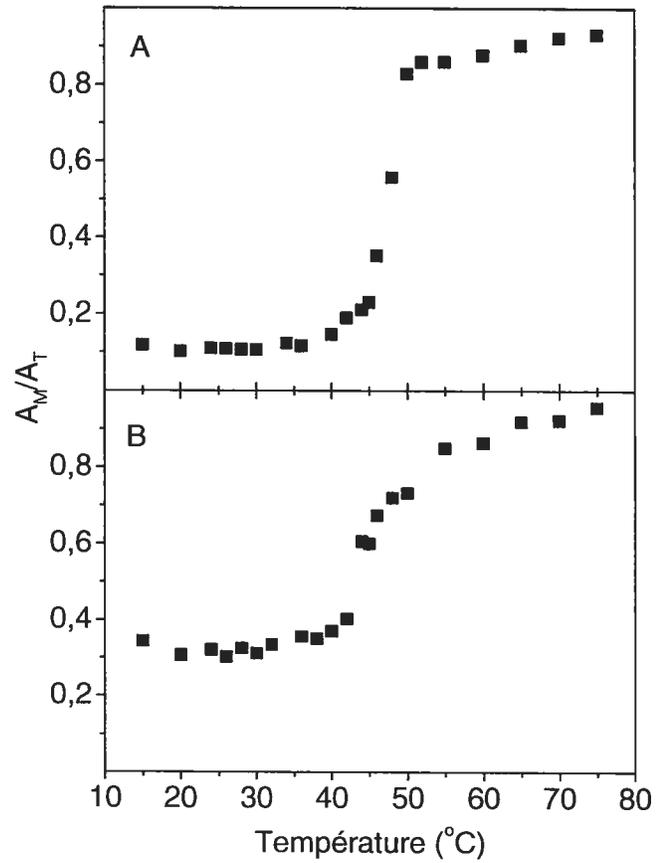


Figure 4.5 : Variation du rapport d'aire de la bande centrale δCD_2 (A_M) et de l'aire totale des trois composantes (A_T) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A) et en présence de calcium (B).

calcium (figure 4.3). On remarque une transition à 40 °C alors que la largeur de la bande passe de 8 à 3 cm^{-1} . Cependant, on note que la transition est moins abrupte dans le cas du mélange équimolaire en présence d'ions divalents.

La figure 4.4 montre la région de déformation δCD_2 des spectres, de 1100 à 1075 cm^{-1} , à 30 et 75 °C, pour le mélange équimolaire en présence et en absence de calcium. Les deux mélanges présentent à 30 °C (figure 4.4.A-C) un éclatement de bande associé aux chaînes des acides gras deutérés dont les composantes à 1086 et 1091 cm^{-1} sont caractéristiques de l'empilement orthorhombique (Philippot et al., 1995 ; Snyder et al., 1992). Cependant, on remarque que la présence d'ions calcium amène une composante centrale à 1089 cm^{-1} indiquant qu'une partie du PA-d₃₁ n'adopte pas cet empilement. À haute température (figure 4.4.B-D), seule la composante centrale à 1089 cm^{-1} est visible, indiquant que l'empilement perd la symétrie orthorhombique. Par décomposition spectrale de cette région, il est possible d'estimer le pourcentage de PA-d₃₁ possédant à un empilement orthorhombique des chaînes des acides gras. La composante centrale est contrainte entre 1085 et 1095 cm^{-1} avec une largeur à mi-hauteur inférieure à 7 cm^{-1} . Les deux composantes, signature d'un empilement orthorhombique, ont les mêmes contraintes, soit une position entre 1085 et 1095 cm^{-1} , avec une largeur maximale de 3,5 cm^{-1} . La contrainte de largeur permet d'éviter que l'algorithme mathématique n'utilise ces bandes pour simuler la largeur de la composante centrale à haute température. L'ajout d'une quatrième bande, entre 1085 et 1080 cm^{-1} est nécessaire pour la simulation du flanc du massif. Les bandes résultantes de la simulation sont représentées en pointillé à la figure

4.4. En établissant le rapport de l'aire de la composante du milieu, A_M , sur l'aire totale des trois bandes significatives, A_T , on peut établir la variation de la contribution orthorhombique dans le mélange. Pour un empilement hexagonal ou en absence de symétrie, le spectre brut présente une seule composante centrale et le rapport A_M/A_T tend vers 1. La figure 4.5.A montre l'évolution du rapport en fonction de l'augmentation de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol sans calcium. À basse température, le rapport de 0,10 signifie qu'une part importante de l'acide gras possède un empilement orthorhombique. Une augmentation abrupte se produit à 47 °C suivie d'un plateau qui atteint une valeur de 0,93 à 75 °C. On remarque que la valeur n'est pas de 1 dû à la présence de composantes à 1086 et 1092 cm⁻¹ (figure 4.4.B). Celles-ci représentent moins de 10 % de l'aire totale et contribuent principalement à la simulation de la forme évasée de la base de bande. Il ne s'agit probablement pas d'une présence réelle d'une phase orthorhombique puisque les résultats en spectroscopie RMN-²H indiquent que la presque totalité de l'acide, dans ce mélange, se trouve sous forme désordonnée à partir de 50 °C (Fenske et al., 1994). Avec l'ajout de calcium, la proportion d'acide gras deutéré adoptant un empilement orthorhombique est moindre, le rapport A_M/A_T se trouvant à 0,33. Cette portion d'acide palmitique subit une transition à 43 °C pour atteindre une valeur de 0,96 à 75 °C.

Les régions spectrales de 1750 à 1500 cm⁻¹, comprenant les vibrations de la fonction carboxylique de l'acide gras et de la fonction amide I' des céramides, sont rapportées à la figure 4.6 en fonction de l'augmentation de la température du mélange par

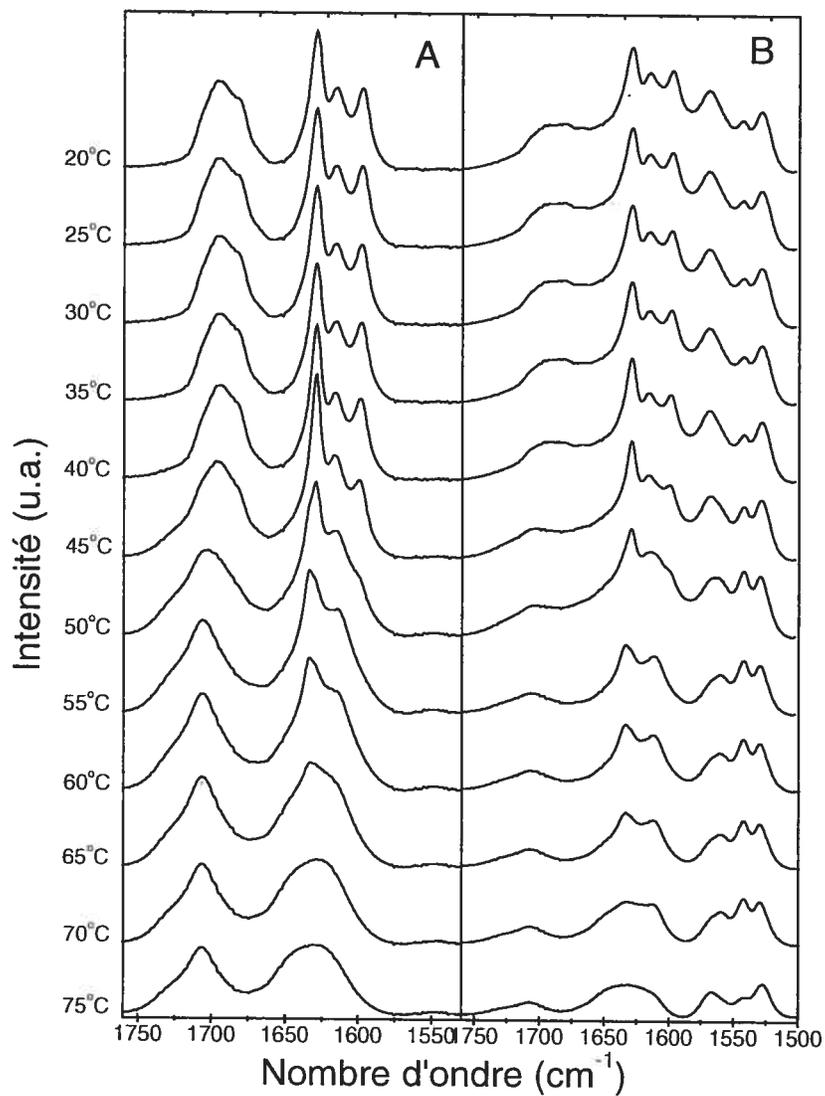


Figure 4.6 : Spectres infrarouges de la région amide I' et ν_{COO^-} en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A) et en présence de calcium (B).

saut de 5 °C, de 20 à 75 °C. À basse température, en absence et en présence de Ca^{2+} , la bande amide I' montre trois composantes, à 1628, 1615 et 1598 cm^{-1} . Ces trois composantes ont été associées à divers patrons de liens hydrogène impliquant les groupements amide. Ce profil est comparable à celui observé en absence de calcium et rapporté dans la littérature pour un mélange sans calcium (Lafleur, 1998). La similitude des deux mélanges dans cette région souligne que l'organisation des céramides est peu affectée par la présence des ions calcium. Cependant, on remarque qu'il existe un rapport d'intensité différent des trois composantes suggérant des interactions avec l'environnement légèrement modifiées au niveau des ponts hydrogène. L'évolution de la bande amide I' en fonction de la température du mélange ternaire avec Ca^{2+} est similaire à ce qui est observé pour le mélange sans calcium. La composante vers 1600 cm^{-1} disparaît dans un premier temps et, à plus hautes températures, les deux composantes à 1628 et 1615 cm^{-1} fusionnent pour donner lieu à une seule composante large vers 1620 cm^{-1} . Cependant, dans le cas du mélange contenant du calcium (Figure 4.6.B), les deux premières composantes restent visibles à plus haute température, soit environ 10 °C de plus que pour le mélange sans Ca^{2+} .

Les bandes associées à la fonction carboxylique présentent différents modes selon que le mélange contient ou non des ions divalents. Dans le cas du mélange sans calcium, à basses températures, la bande ν_{COOH} , observable à 1700 cm^{-1} (figure 4.6.A), indique que l'acide se trouve sous forme protonnée (Mantsch et McElhaney, 1991 ; Velkova, 2000). Les deux composantes de cette bande à 1694 et 1683 cm^{-1} sont aussi présentes pour l'acide palmitique cristallin et suggèrent qu'il existe dans les mélanges ternaires des liaisons

intermoléculaires comparables à celles observées pour l'acide solide (Lafleur, 1998). En fonction de l'augmentation de la température, on constate la fonte de l'acide à partir de 45 °C, la composante à 1682 cm^{-1} disparaissant, en accord avec les études précédentes (Lafleur, 1998 ; Velkova et Lafleur, 2002). Dans le cas du mélange contenant du calcium, on remarque trois composantes supplémentaires à 1568, 1543 et 1531 cm^{-1} (figure 4.6.B). Le profil de cette bande est plus complexe que celui observé pour l'acide déprotonné dans le même mélange à haut pH, sans calcium, ce dernier ne présentant qu'une seule composante à 1550 cm^{-1} (Velkova, 2000). Les deux composantes à 1568 et 1531 cm^{-1} sont observables pour l'acide gras déprotonné seul à pH 13 en présence de CaCl_2 (Marshbanks et Franses, 1994) et sont caractéristiques du carboxylate complexé avec les ions calcium. Bien que le rapport d'intensité des bandes change avec l'augmentation de la température du mélange, la présence de ces modes de vibration montre que la complexation du calcium avec l'acide est stable sur tout le domaine de températures étudiées. Une faible portion de l'acide gras demeure cependant sous la forme protonnée conduisant à la présence d'une bande ν_{COOH} de faible intensité, observable à 1700 cm^{-1} . À haute température, l'aire de la bande ν_{COOH} équivaut à 40 % de celle des bandes $\nu_{\text{COO-Ca}}$.

4.1.2. Discussion

Plusieurs études ont déjà permis d'établir le comportement particulier du mélange ternaire équimolaire CER III/PA-d₃₁/Chol dans un tampon sans ion divalent. Les

informations recueillies au cours de ces travaux montrent que la présence de Ca^{2+} induit un thermotropisme différent de ce mélange modèle des lipides du SC.

Le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol en absence de calcium, à basse température, est principalement dans une phase cristalline. La nature de cette phase solide dans le mélange modèle possède un grand intérêt puisque l'existence de lipides sous forme cristalline a été observée *in vivo* dans le SC (Bouwstra et al., 1992 ; Golden et al., 1987 ; White et al., 1988). Dans le cas de mélanges modèles composés de CER III/PA(- d_{31})/Chol(- d_5) (1/1/1) à pH 5,2, l'observation d'un éclatement quadrupolaire maximal en RMN- ^2H indique la présence d'une phase solide d'acide palmitique (Fenske et al., 1994 ; Kitson et al., 1994), et de cristaux de cholestérol (Fenske et al., 1994). De même, la présence de pics de diffraction des rayons X distincts permet d'établir la présence d'une séparation de phase de l'acide palmitique solide ainsi que de cristaux de cholestérol monohydratés (Bouwstra et al., 1997). Les études faites par spectroscopie infrarouge abondent dans ce sens. Les valeurs en deçà de 2850 et 2090 cm^{-1} , pour les modes $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ respectivement, sont associées à un ordre conformationnel important en phase solide des chaînes des céramides III ainsi que de l'acide palmitique deutéré (Lafleur, 1998 ; Moore et al., 1997a). D'autre part, l'éclatement des bandes δCH_2 et δCD_2 signifie une séparation de phase des céramides III et de l'acide palmitique deutéré sous forme de domaines cristallins (Lafleur, 1998 ; Moore et al., 1997a). L'éclatement maximal de ces bandes nécessite l'association sous forme cristalline d'au moins une centaine de lipides (Snyder et al., 1992). L'empilement orthorhombique de l'acide palmitique et des céramides est présent de 15 à 40 °C. Au niveau des têtes polaires,

la région ν Amide I' suggère l'existence de liaisons hydrogène intermoléculaires au niveau des têtes polaires par la présence de trois composantes à 1630, 1615 et 1597 cm^{-1} signifiant un empilement compact des céramides (Lafleur, 1998). Les fréquences d'élongation C=O du groupement carboxylique de l'acide gras sont les mêmes que dans le cas d'acide palmitique pur pour une structure cristalline (Lafleur, 1998). Il est à noter que la période d'incubation est particulièrement importante afin de permettre la formation des structures cristallines dans les mélanges modèles. Il a été observé que le temps et la température d'incubation influencent le pourcentage d'acide gras ou de cholestérol sous forme solide dans le mélange équimolaire CER III/PA(-d₃₁)/Chol(-d₅) à pH 5,2 (Fenske et al., 1994). Ceci expliquerait les différences rapportées dans l'étude infrarouge faite par Mimeault et Bonenfant (Mimeault et Bonenfant, 2002) sur le même mélange et pour laquelle les positions des bandes $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ ainsi que les formes de bandes dans la région ν Amide I' à basse température ne sont pas celles de structures cristallines.

À 40 °C, il y a perte de l'empilement orthorhombique (Moore et al., 1997a) ; (Moore et al., 1997b), (Lafleur, 1998) probablement lors d'une transition solide-solide. Le mélange ternaire équimolaire subit une première transition à 40 °C conduisant à la formation d'une phase de type lo par l'acide gras, se caractérisant par la présence d'un éclatement quadrupolaire réduit en spectroscopie RNM-²H (Fenske et al., 1994 ; Kitson et al., 1994). De même, par spectroscopie infrarouge, les positions des bandes $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ passent de 2849 à 2854 cm^{-1} et de 2092 à 2096 cm^{-1} pour les chaînes des céramides et de l'acide gras deutéré respectivement (Lafleur, 1998), des valeurs compatibles avec la phase

lo rapportée par Kitson et al. (Kitson et al., 1994). La seconde transition survient à 55 °C, conduisant à une phase fluide désordonnée (Lafleur, 1998). À cette température, la région spectrale de $\nu_{\text{amide I}}$ et de ν_{COOH} est modifiée : la bande large et asymétrique à 1634 cm^{-1} de l'amide I' des céramides III ainsi que le déplacement à 1730 cm^{-1} du maximum de la fréquence d'élongation du groupement carboxylique de l'acide palmitique caractérisent une phase fluide désordonnée (Lafleur, 1998 ; Velkova et Lafleur, 2002).

Comme il a déjà été souligné, il existe une divergence en ce qui a trait à la perte d'ordre conformationnel simultanée des céramides III et de l'acide gras deutéré lors du chauffage. En effet, Moore et al. rapportent la perte d'ordre des chaînes alkyles deutérées de l'acide gras entre 40 et 50 °C, tandis que les chaînes des céramides III se désordonnent à partir de 52 °C (Moore et al., 1997a ; Moore et al., 1997b). Plusieurs facteurs, tels que la distribution des longueurs de chaînes des céramides ou le temps d'incubation de l'échantillon, peuvent expliquer cette différence dans le thermotropisme du mélange modèle. Il faut mentionner aussi que le paramètre utilisé pour suivre l'ordre conformationnel des céramides n'est pas le même, soit la bande de d'élongation antisymétrique pour Moore et al. (Moore et al., 1997a) plutôt que la bande d'élongation symétrique pour Lafleur (Lafleur, 1998) et cette étude. Cette bande possède une sensibilité légèrement différente à l'ordre des chaînes. Le suivi de la bande $\nu_{\text{a}}\text{CH}_2$ pour notre mélange équimolaire montre en effet un thermotropisme légèrement différent avec une seconde transition légèrement moins prononcée que lorsque la position de la bande $\nu_{\text{s}}\text{CH}_2$ est utilisée.

Même si, aux basses températures, il y a séparation de phase et que les lipides se trouvent sous forme cristalline, ces derniers ne se comportent pas comme des produits purs et voient leur température de transition grandement diminuée. La tête polaire réduite des céramides permet un empilement compact et stable conduisant à une température de transition solide-liquide cristallin de 80 °C (Moore et al., 1997b) alors que l'acide palmitique deutéré pur hydraté possède une température de transition solide-liquide de 63 °C (Ouimet et Lafleur, 2004). Ceci est nettement supérieur à la première température de transition observée pour les deux mélanges, autour de 40 °C. Pour le mélange CER III/PA-d₃₁ (1/1), la transition de l'acide gras est de 53 °C, alors que la transition des céramides est au-dessus 75 °C (Lafleur, 1998). Il a été montré que le cholestérol agit comme promoteur de la formation de la phase de type lo notamment avec l'acide palmitique (Ouimet et Lafleur, 2004 ; Paré et Lafleur, 2001) réduisant la température de transition. Le cholestérol joue aussi un rôle crucial dans les propriétés de mélange des lipides du SC. Ainsi, il a été observé que, comparativement au thermotropisme du mélange ternaire CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1), dans le mélange binaire CER III/PA-d₃₁ (1/1) les deux lipides ne subissent pas une transition simultanée ; l'acide gras présente une transition abrupte vers une phase désordonnée à 53 °C, alors que les céramides, dont le désordre augmente légèrement à partir de cette même température, n'atteignent pas la phase fluide lorsque le mélange est chauffé jusqu'à 75 °C (Velkova et Lafleur, 2002).

La caractérisation du mélange CER III/PA-d₃₁/Chol en présence de calcium permet de constater, qu'en deçà de 40 °C, les lipides, à l'instar du mélange sans calcium, adoptent

généralement un empilement solide orthorhombique. Les fréquences d'élongation $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ (figure 4.1.B) sont attribuables à une phase solide avec des valeurs de 2849,5 et 2089 cm^{-1} respectivement. Comme précédemment, la présence d'un éclatement des bandes de déformation δCH_2 et δCD_2 indique une séparation de phase entre les céramides III et l'acide palmitique deutéré sous forme de domaines cristallins avec des empilements orthorhombiques. Dans le cas des céramides, cette structure est adoptée jusqu'à 40 °C (figure 4.3.B). Cependant, dans le cas des chaînes deutérées de l'acide palmitique, la simulation de bandes (figure 4.4.C), indique une composante centrale significative. Si on suppose des coefficients d'extinction molaire identiques pour les composantes de la région δCD_2 , on estime que plus du tiers des lipides ne se trouve pas sous la forme d'un empilement orthorhombique. La fréquence de $\nu_s\text{CD}_2$ exclut une phase fluide en aussi grande proportion. Il est possible que la présence de calcium induise une distorsion dans l'empilement des chaînes d'acide gras brisant la symétrie de l'empilement ou le couplage interchaîne. On remarque en effet par la présence de trois composantes des bandes $\nu_{\text{COO-Ca}}$ (figure 4.6.B) que les ions calcium s'associent à la tête polaire de l'acide gras. Bien que le calcium, dans l'échantillon, soit dans un rapport de près de 4 ions calcium par lipide, tous les groupements acides ne sont pas complexés au calcium et une fraction de l'acide palmitique reste protonée comme l'indique la bande ν_{COOH} de faible intensité à 1700 cm^{-1} . Le rapport d'aire de la bande ν_{COOH} sur l'aire des bandes $\nu_{\text{COO-Ca}}$ est de près de 30 %. Il est possible que la fraction de l'acide gras ayant un empilement orthorhombique à basse température soit celle qui conserve une fonction acide protonée. On remarque aussi que la perte de l'empilement orthorhombique (figure 4.5.B) se produit parallèlement à une faible

augmentation de la fréquence, de moins d'un cm^{-1} , de la bande $\nu_s\text{CD}_2$ (figure 4.1.B), et du déplacement vers les hautes fréquences de la composante ν_{COOH} (figure 4.6.B). Ceci suggère que cette fraction non complexée au calcium, organisée sous forme de domaines cristallins orthorhombiques à basse température, subit une transition autour de 40°C .

Avec l'augmentation de la température, le thermotropisme du mélange CER III/PA-d₃₁/Chol est aussi modifié par la présence de calcium. L'association entre l'acide palmitique et le Ca^{2+} induit un grand ordre conformationnel des chaînes acyles, à haute température, que met en lumière la basse fréquence du mode de vibration $\nu_s\text{CD}_2$ observable entre 15 et 75°C . La présence de trois composantes de la bande $\nu_{\text{COO-Ca}}$ jusqu'à 75°C propose que l'ordre conformationnel est induit par l'association du calcium avec la fonction carboxylique de l'acide. Il est connu que le calcium introduit de l'ordre au niveau des chaînes des phospholipides augmentant ainsi la température de transition (Cevc, 1990 ; Hauser et al., 1979 ; Susi, 1981). Ceci peut être causé notamment par la déshydratation des têtes polaires par les ions divalents (Binder et Zschörnig, 2002 ; Rujoi et al., 2002). La présence d'ion calcium modifie l'environnement des têtes polaires en déplaçant les molécules d'eau associées à la surface de la bicouche. La sphère de solvation des acides gras étant réduite, les distances intermoléculaires peuvent diminuer, la proximité des chaînes hydrophobes induisant l'augmentation de l'ordre conformationnel de celles-ci. Certaines études rapportent aussi que la modulation des interactions à la surface peut induire une inclinaison des chaînes par rapport à la normale de la bicouche (Jähnig et al., 1979 ; Watts et al., 1981). Les chaînes sont alors toutes *trans* mais inclinées par rapport à la

normale de la bicouche empêchant un empilement orthorhombique. Une inclinaison des chaînes pourrait expliquer la perte de l'empilement orthorhombique à basse température dans le mélange étudié lorsque du calcium est ajouté.

À basse température, aucune différence n'est observable dans le comportement des céramides dans les mélanges ternaires avec et sans calcium. Les céramides se trouvent dans une phase cristalline avec un empilement orthorhombique. Cependant à partir de 52 °C, les chaînes des céramides sont moins désordonnées en présence de calcium. Par sa rigidification des chaînes de l'acide palmitique, le Ca^{2+} réduit possiblement la disponibilité de l'acide gras pour la formation d'une phase désordonnée avec les céramides. Le comportement des céramides dans le mélange ternaire avec calcium s'approche davantage du thermotropisme observé pour le mélange binaire CERIII/Chol (1/1) (Velkova et Lafleur, 2002). À partir des études sur les mélanges binaires CERIII/Chol à différents rapports, Velkova et Lafleur ont montré que la présence seule du cholestérol n'est pas suffisante pour introduire un désordre conformationnel des céramides comparable à celui du mélange ternaire. Les valeurs des positions de bandes $\nu_s\text{CH}_2$ mesurées pour le mélange binaire CERIII/Chol (1 :1) passent de 2851 à 2852 cm^{-1} entre 55 et 75 °C. Avec un profil semblable, les valeurs de $\nu_s\text{CH}_2$ pour le mélange ternaire avec calcium varie de 2851,2 à 2852,2 entre 53 et 69 °C. Dans le même sens, la présence de deux composantes Amide I' visibles à plus haute température dans le cas du mélange avec calcium rappelle le comportement rapporté pour le mélange équimolaire CER III/Chol. À 55 °C notamment, l'intensité de la bande à 1612 cm^{-1} relativement à celle à 1637 cm^{-1} est plus prononcée,

comme ce qui est observé pour le mélange binaire. La phase lo est possiblement modifiée dans sa composition par l'absence de la fraction de l'acide palmitique complexé aux ions calcium.

Ces travaux montrent l'impact de la présence d'ions divalents sur l'organisation des lipides des mélanges modèles du SC. Ces changements se traduisent par :

- a) la rigidification des chaînes de l'acide palmitique sur toute la plage de température observée par le biais de la complexation des ions calcium à la fonction carboxylique de l'acide ;
- b) à basse température, la présence d'empilement non orthorhombique de l'acide gras. Cependant, une portion possède toujours un empilement orthorhombique, celle-ci étant possiblement la fraction d'acide protoné qui participe à la formation de la phase lo avec les céramides à plus haute température;
- c) la modification de la composition de la phase lo se traduisant par un comportement des céramides s'approchant de ce qui est observé pour le mélange binaire équimolaire CERIII/Chol.

4.2. Thermotropisme par microscopie Raman

4.2.1. Résultats

4.2.1.1. Étude de la distribution spatiale en fonction de la température

Les échantillons ont été analysés, en fonction de la température, par cartographie chimique Raman. Chaque carte obtenue est le résultat de l'acquisition de 196 spectres Raman en divers endroits de l'échantillon, espacés de 3 μm , et couvrant une surface de $40 \times 40 \mu\text{m}^2$. Les cartes représentent la même surface qui est balayée en fonction de la température. La figure 4.7 présente les régions νCD et νCH pour les trois lipides utilisés, à 35 et 75 $^\circ\text{C}$, et illustre les changements spectraux induits par le changement de phase des lipides. Dans le cas de l'acide palmitique deutéré (figure 4.7.A-B), l'introduction de conformères *gauches* a principalement pour effet d'élargir la bande $\nu_s\text{CD}_2$ (Kouaouci et al., 1985). Le passage d'une phase ordonnée à une phase désordonnée des céramides conduit à une variation importante de l'intensité de la bande $\nu_a\text{CH}_2$. Finalement, le spectre du cholestérol subit peu de modifications sur la plage de température étudiée.

Le rapport de $A_{\nu\text{CD}}$, sur l'aire totale ($A_{\nu\text{CH}} + A_{\nu\text{CD}}$), permet de d'estimer la distribution de l'acide palmitique dans le mélange. Les bornes d'intégration sont de 2015 à 2250 cm^{-1} et 2780 à 3100 cm^{-1} , pour $A_{\nu\text{CD}}$ et $A_{\nu\text{CH}}$ respectivement. À cause des changements spectraux engendrés par les variations de phase des lipides, les valeurs

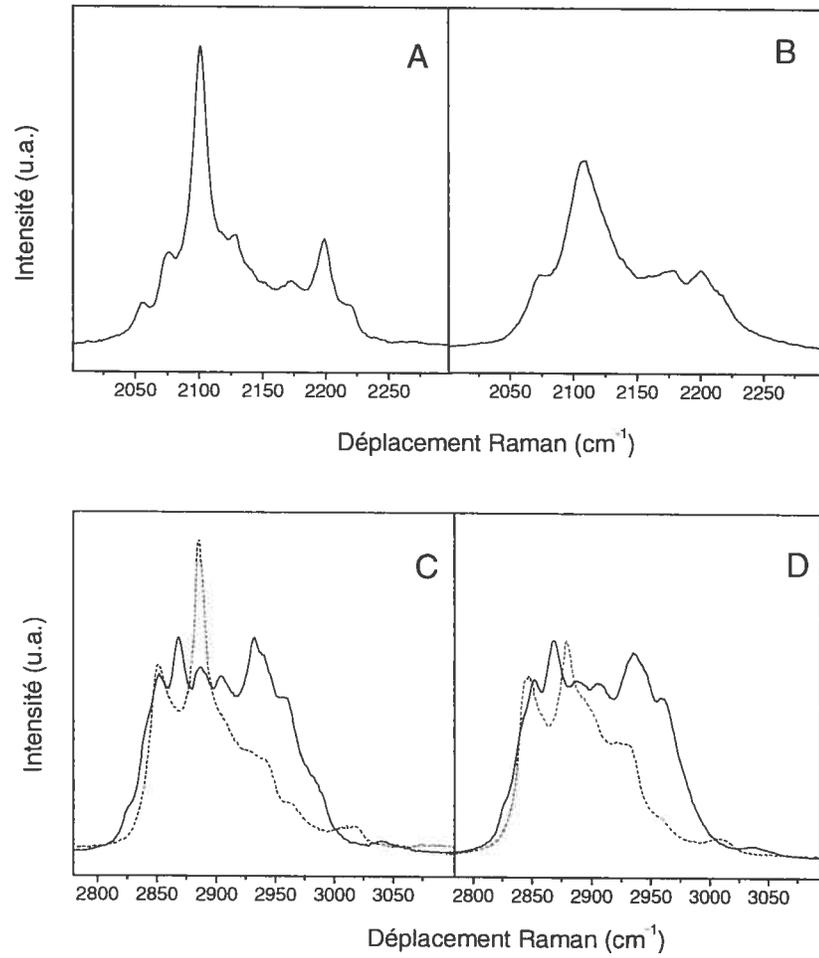


Figure 4.7 : Spectres Raman de la région ν_{CD} de PA-d₃₁ (A-B), de la région ν_{CH} (C-D) des CER III (- - -) et du Chol (—) à 35 (A-C) et 75 °C (B-D).

absolues de $A_{V_{CD}} / (A_{V_{CH}} + A_{V_{CD}})$ changent aussi en fonction de la température pour une composition donnée. $A_{V_{CH}}$ change aussi en fonction du rapport CER/Chol, pour cette raison, le paramètre $A_{V_{CD}} / (A_{V_{CH}} + A_{V_{CD}})$ ne peut être directement relié à la fraction molaire en acide gras. Pour faciliter la comparaison entre les températures, ces valeurs sont normalisées par rapport à la moyenne obtenue pour chaque température. Les distributions sont donc centrées autour de zéro, un point positif représentant un enrichissement par rapport à la moyenne, alors qu'un résultat négatif signifie un appauvrissement. Les échelles sont établies à partir des histogrammes présentant la plus large distribution et sont conservées pour faciliter les comparaisons. La distribution spatiale d'acide palmitique relativement à la moyenne pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol sans calcium est illustrée par les histogrammes A à F de la figure 4.8. De 25 à 45 °C (figure 4.8.A-C), on remarque une distribution large de plus de 1 unité dont plusieurs points présentent un enrichissement important en acide gras. À partir de 55 °C, les distributions deviennent plus étroites avec une largeur à la base d'environ 0,5 unité, témoignant de la perte de régions très enrichies en acide palmitique deutéré dans le mélange. En comparaison, le rapport $A_{V_{CD}} / (A_{V_{CH}} + A_{V_{CD}})$ est calculé pour le mélange ternaire équimolaire sous forme de poudre, à 25 °C, (figure 4.8.M) et présente une distribution d'environ 0,25 unité de largeur à la base.

Il est possible de distinguer les contributions des céramides III et du cholestérol dans la région v_{CH} (figure 4.7.C-D). Le spectre du cholestérol, bien que celui-ci semble participer aux transitions, n'est pas modifié significativement sur la plage de température observée. Ceci a déjà été utilisé avec succès comme hypothèse pour le traitement

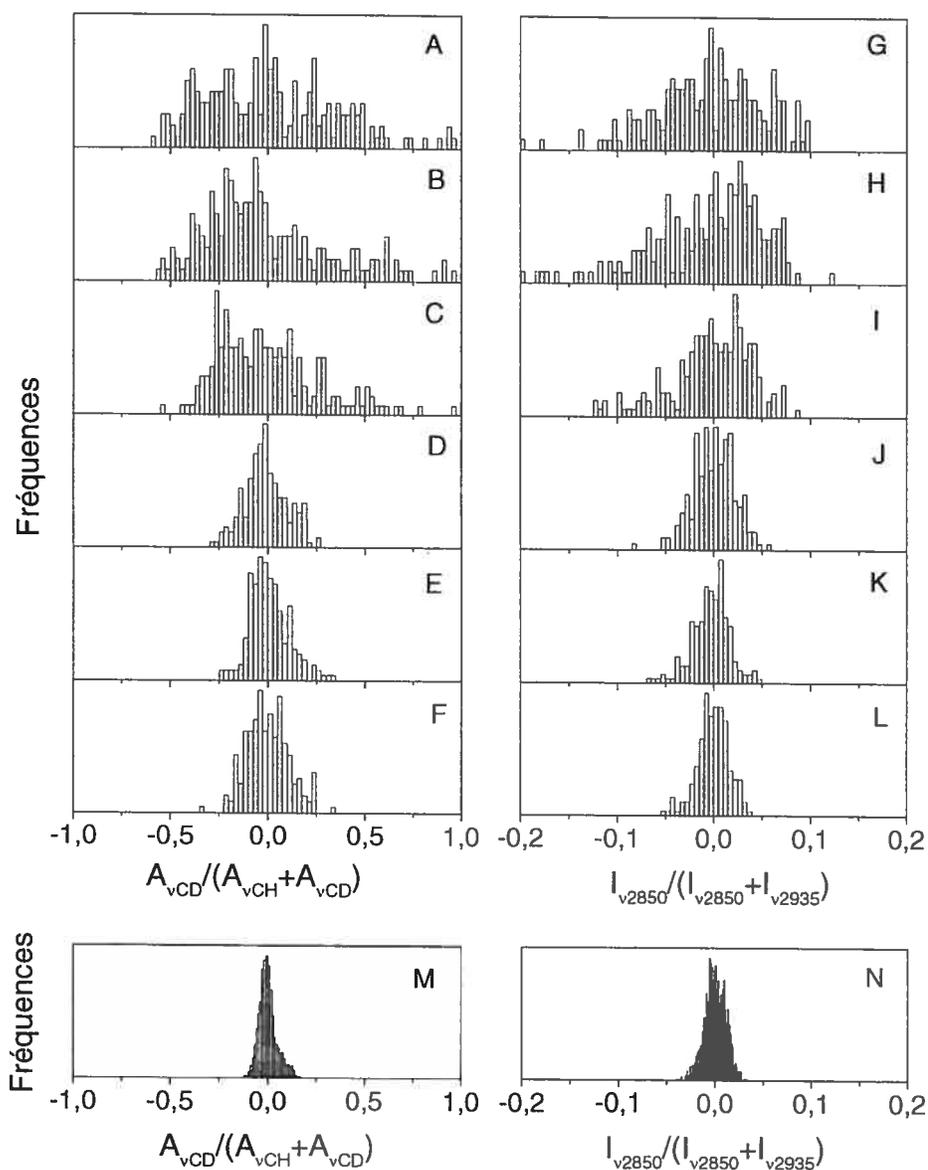


Figure 4.8 : Distributions de PA-d₃₁ (A-F) et des CER III/Chol (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L). Distribution de PA-d₃₁ (M) et des CER III/Chol (N) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) sec.

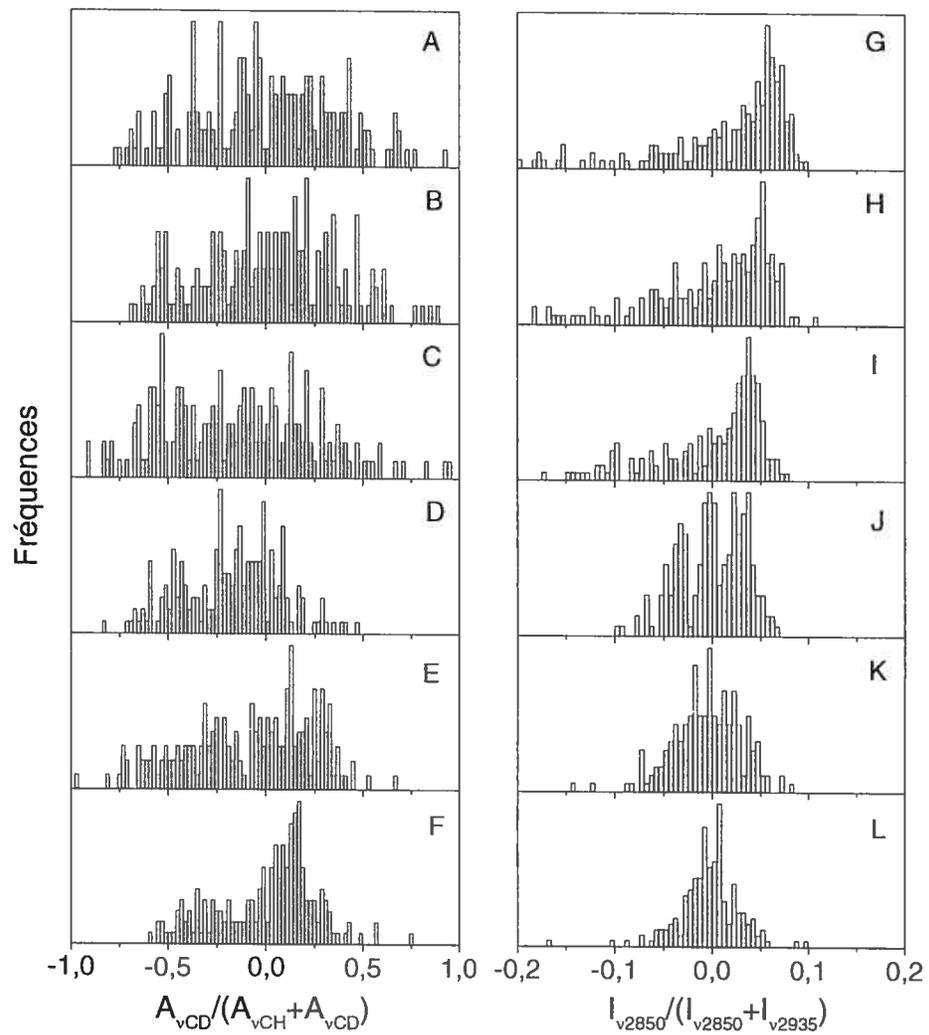


Figure 4.9 : Distributions de PA-d₃₁ (A-F) et des CER III/Chol (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en présence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L).

spectroscopique de mélanges de phospholipides/Chol (Kodati et Lafleur, 1993). Ce phénomène serait relié à sa structure rigide. Dans le cas des céramides, la désorganisation des chaînes entraîne la variation du rapport $I_{\nu 2880}/I_{\nu 2850}$. Cette variation du rapport est principalement due à la composante à 2880 cm^{-1} qui s'élargit et perd en intensité avec l'augmentation du désordre des chaînes (Bunow et Levin, 1977), alors que la composante à 2850 cm^{-1} reste inchangée en fonction de la température. D'autre part, la contribution à 2935 cm^{-1} comprend une bande caractéristique du cholestérol. Le rapport $I_{\nu 2850}/(I_{\nu 2850} + I_{\nu 2935})$ peut ainsi être utilisé pour caractériser d'une manière semi-quantitative la proportion de céramides relativement aux céramides et cholestérol combinés. En passant d'un spectre de céramides purs à celui du cholestérol, la valeur du rapport varie de 0,67 à 0,46. Dans le cas des céramides III purs, on trouve que $I_{\nu 2850}/(I_{\nu 2850} + I_{\nu 2935})$ varie de 0,67 à 0,61 de 25 à 75 °C. Les variations du rapport traduisent donc principalement une variation de composition CERIII/Chol, mais elles peuvent inclure des changements associés au désordre des chaînes de céramides. Comme précédemment, les valeurs sont normalisées sur la moyenne pour chaque température. Les valeurs supérieures à zéro sont associées à des points enrichis en céramides et inversement pour les points enrichis en cholestérol. Dans une distribution statistique que représente le mélange avant l'hydratation, on obtient une distribution très étroite avec une base de 0,025 unité environ centrée à zéro (figure 4.8.N)

La figure 4.8.G-L rapporte l'hétérogénéité du contenu en CER III d'une carte en fonction de la température. La distribution est hétérogène, pour une largeur à la base de près de 0,2 unité, à basse température, indiquant la présence de points enrichis et appauvris

(figure 4.8.A-B). On remarque particulièrement la présence de valeurs négatives signifiant des points enrichis en cholestérol. Avec l'augmentation de la température, la largeur de la distribution se réduit de façon plus importante à partir de 55 °C à 0,05 unité de largeur à la base (figure 4.8.J), signifiant la perte, du moins en partie, de la séparation de phase. À 75 °C, la distribution est semblable à celle obtenue pour la poudre sèche avec une largeur de 0,025, signifiant l'homogénéisation des deux composantes dans le mélange.

Pour le mélange en présence de calcium (figure 4.9), la distribution de l'acide gras deutéré est plus large que ce qui est observé en absence de calcium, allant de -0,78 à 0,79 autour de la moyenne. La distribution pour le paramètre $AV_{CD} / (AV_{CH} + AV_{CD})$ reste similaire jusqu'à 45 °C, se réduisant quelque peu entre 45 et 55 °C. Ainsi, même à 75 °C, on relève des points de l'image ayant un rapport nettement supérieur et inférieur à la moyenne avec des valeurs d'environ -0,5 à 0,5 (figure 4.9.D-F). La distribution large du paramètre $I_{V2850} / (I_{V2850} + I_{V2935})$ souligne une hétérogénéité du rapport céramide/cholestérol plus importante que dans le cas du mélange sans calcium (figure 4.9.G-L). Particulièrement à basse température, on remarque des contributions jusqu'à -0,2, soit très pauvres en céramides.

Les premières cartes de la figure 4.10 illustrent la distribution spatiale de l'acide gras par rapport aux deux autres composantes lipidiques dans les échantillons en absence de calcium par le biais du rapport $AV_{CD} / (AV_{CH} + AV_{CD})$. Pour simplifier la lecture, les points

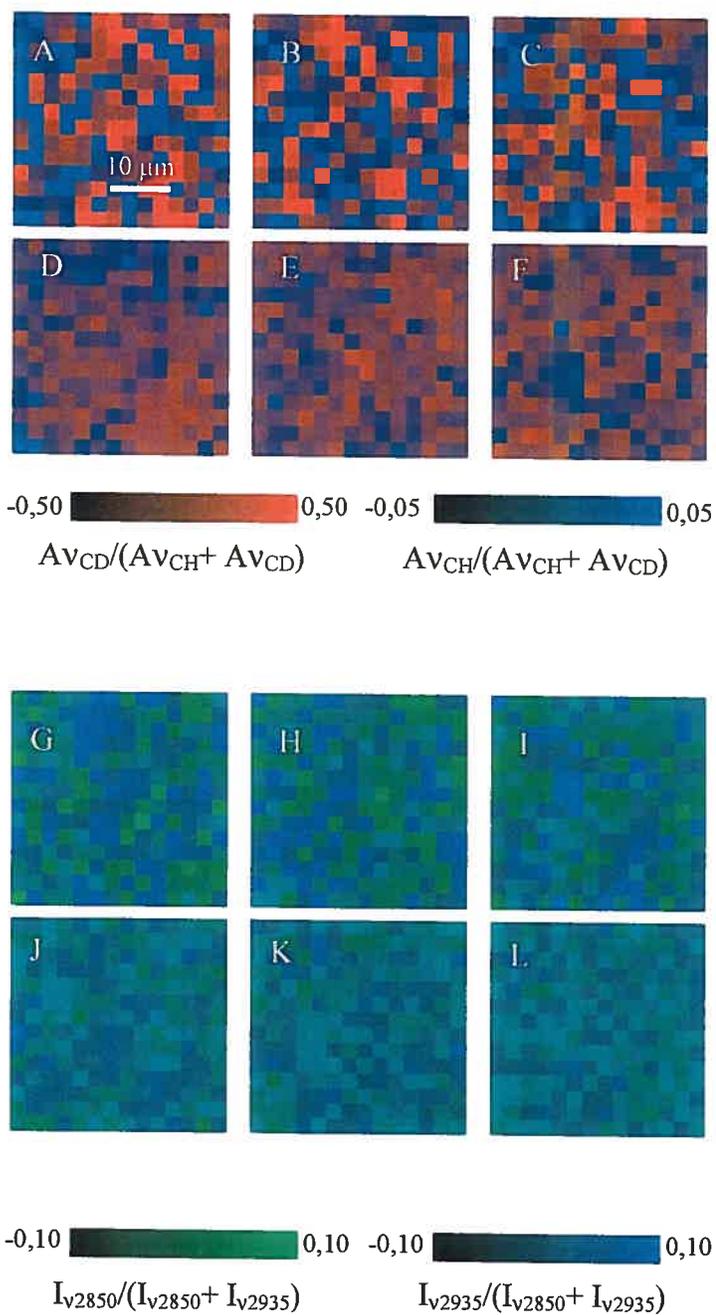


Figure 4.10 : Cartes de la distribution de PA-d₃₁ par rapport à la moyenne (A-F) et des CER III/ Chol par rapport à la moyenne (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L). Images de 40 × 40 μm pour des sauts de 3 μm.

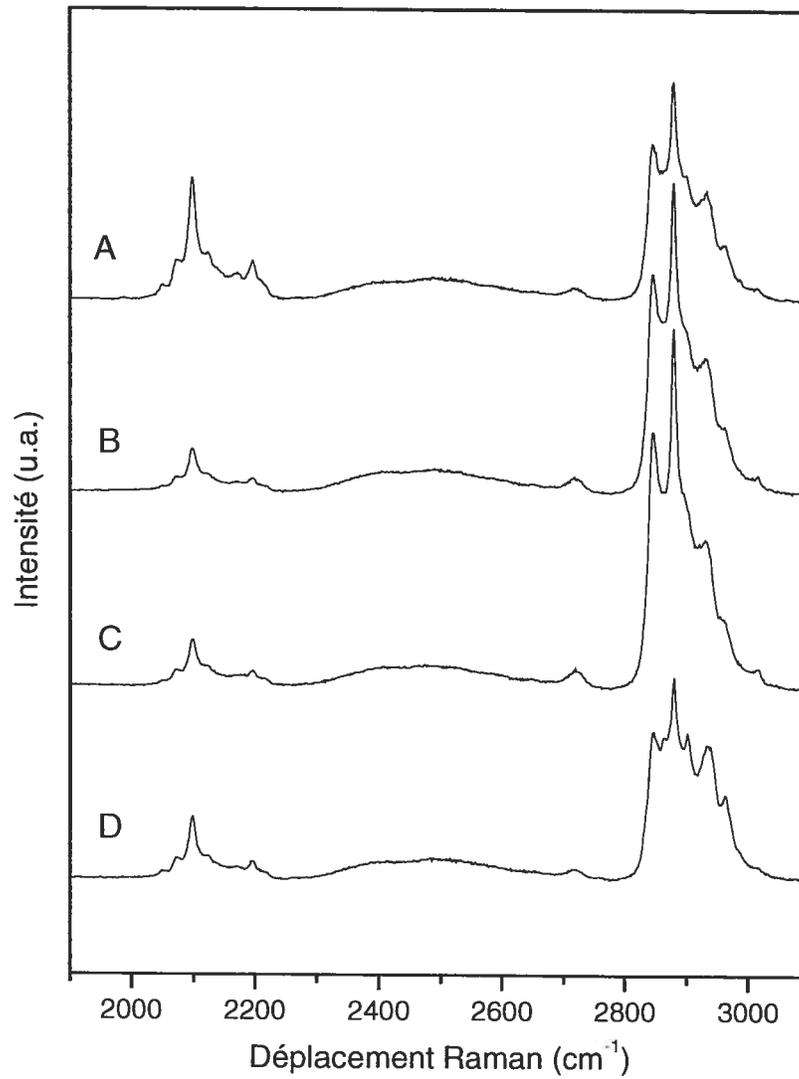


Figure 4.10 b: Spectres Raman de régions enrichies par rapport à la moyenne en PA-d₃₁ (A) et en CER+Chol (B) du mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium à 35 °C (Figure 4.10.B), et d'enrichissement par rapport à la moyenne en CER (C) et Chol (D) (Figure 4.10.H)

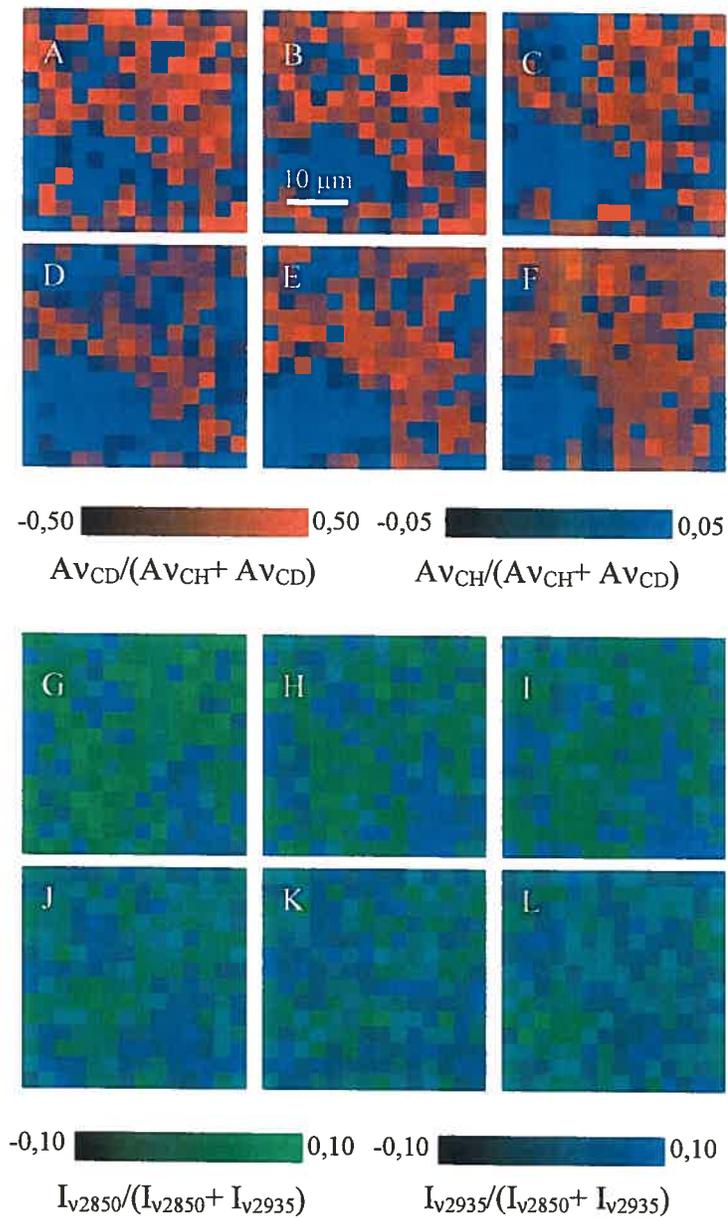


Figure 4.11 : Cartes de la distribution de PA-d₃₁ par rapport à la moyenne (A-F) et des CER III/ Chol par rapport à la moyenne (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en présence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L). Images de 40 × 40 μm pour des sauts de 3 μm.

de l'image enrichis et appauvris en PA-d₃₁ comparativement à la moyenne, sont colorés respectivement en rouge et en bleu. Les spectres correspondant à ces régions sont présentés à la figure 4.10.b. À basse température (figure 4.10.A), on remarque des contrastes importants signifiant la présence de petits domaines enrichis en acide dont la taille est de l'ordre d'une dizaine de μm comme rapporté par Percot et Lafleur (Percot et Lafleur, 2001). À mesure que l'échantillon est chauffé, des domaines de tailles semblables demeurent observables (figure 4.10.A-C). Les contrastes s'amenuisent ensuite bien qu'il reste une hétérogénéité visible jusqu'à 75 °C (figure 4.10.F).

La distribution spatiale des céramides par rapport au cholestérol est illustrée à différentes températures à la figure 4.10.G-L. Comme précédemment, la lecture des images est simplifiée par l'utilisation d'un contraste de couleur : les points verts étant associés à un enrichissement en céramides III, lorsque $I_{\nu 2850}/(I_{\nu 2850} + I_{\nu 2935})$ est supérieur à la moyenne, alors que les points bleus signifient un enrichissement en cholestérol, lorsque $I_{\nu 2935}/(I_{\nu 2850} + I_{\nu 2935})$ est supérieur à la moyenne. Ces variations sont directement observables sur les spectres des régions enrichies (figure 4.10.b). Entre 25 et 45 °C (figure 4.10.G-I), des domaines enrichis en céramides sont observables dont les tailles sont de l'ordre des domaines enrichis en acide gras, soit d'environ $10 \mu\text{m}^2$. Les contrastes sont réduits à partir de 55 °C (figure 4.10.J).

L'ajout de calcium vient modifier les images de distributions spatiales (figure 4.11) à haute température. À 25 °C, l'image de la distribution des acides gras deutérés

(figure 4.11.A) est semblable à celle du mélange sans calcium. L'augmentation de la température réduit moins les contrastes. On remarque particulièrement un important domaine dans le coin inférieur gauche appauvri en acide gras deutéré qui est présent jusqu'à 75 °C (figure 4.11.A-F). De même, les domaines de d'acide palmitique observables en présence de calcium se déplacent peu avec l'augmentation de la température. Cette observation est aussi vraie pour la distribution des céramides relativement au cholestérol (figure 4.11.G-L), où on peut suivre dans le coin bas droit l'évolution d'une région riche en CER III jusqu'à une température de 55 °C. Pour ce mélange, les contrastes restent importants jusqu'à 75 °C avec des domaines enrichis en céramides de plus de 10 μm^2 . En comparant les cartes, on peut observer à 75 °C que la zone appauvrie en PA-d₃₁ (figure 4.11.F) se superpose à une région légèrement plus concentrée en céramides (figure 4.11.L).

Les observations visuelles sont quantifiées par le calcul de l'entropie topographique. Il s'agit d'une mesure de l'hétérogénéité des intensités relatives d'une image, de sa texture. Ce paramètre est défini de façon large par le taux et la direction des changements chromatiques d'une image (Yang et al., 2000). L'entropie topographique est une mesure du caractère aléatoire des contrastes d'une image qui se base sur la similitude entre des points voisins de l'image. Plus cette valeur est importante, plus le paramètre illustré possède une distribution hétérogène. Pour des valeurs d'intensité complètement aléatoires, l'entropie topographique atteint 4,5, alors que pour une image d'intensité uniforme, on obtient une valeur nulle. La perte d'entropie signifie un gain d'homogénéité du mélange des différentes composantes lipidiques dans l'échantillon. Le détail du calcul

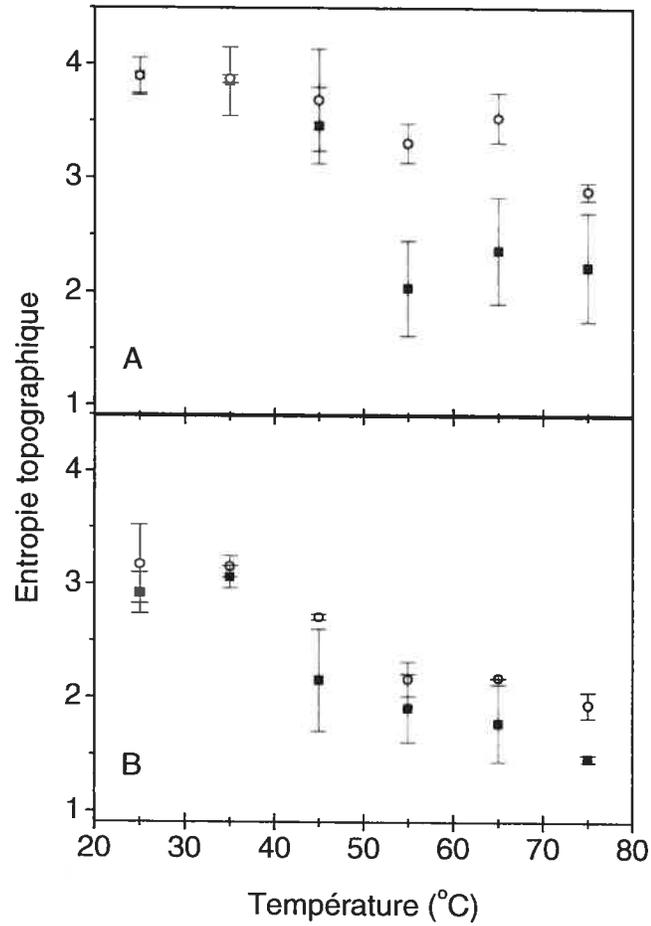


Figure 4.12 : Variation de l'entropie topographique de PA-d₃₁ (A) et des céramides sur le cholestérol (B) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1 :1 :1) à pH 5,2 en absence (■) et en présence de calcium (○). Les barres d'erreur représentent les écarts types obtenus à partir de calculs faits sur trois échantillons lipidiques distincts.

est décrit à l'annexe 1. La figure 4.12 résume la variabilité qui existe d'un échantillon à l'autre, les barres d'erreur étant le résultat du calcul fait sur des triplicata. La topographie entropique du paramètre $AV_{CD} / (AV_{CH} + AV_{CD})$ (figure 4.12.A) est semblable pour les deux mélanges examinés à basse température. Une transition survient entre 45 et 55 °C pour le mélange sans calcium avec une perte de 1,6 unité. La présence du calcium conduit au maintien de la valeur de l'entropie au-dessus de 2,9 pour toute la plage de température étudiée. Les changements d'entropie des cartes de distribution des céramides III vs le cholestérol par le biais du rapport $I_{v2850} / (I_{v2850} + I_{v2935})$ suivent le même profil pour les deux mélanges étudiés, avec des valeurs absolues systématiquement légèrement supérieures dans le cas où du calcium est ajouté.

4.2.1.2. Étude de l'ordre conformationnel en fonction de la température

À partir de la figure 4.7, on remarque que la largeur de la bande $\Delta v_s CD_2$ à 2100 cm^{-1} à mi-hauteur est de 13,5 cm^{-1} lorsque l'acide gras est dans une phase cristalline, et passe à 31,4 cm^{-1} lorsque le lipide est porté au-dessus de la température de transition principale et que les chaînes sont désordonnées. Il a déjà été montré en effet que $\Delta v_s CD_2$ est sensible à l'ordre conformationnel des chaînes deutérées de phospholipides (Kouaouci et al., 1985 ; Mendelsohn et Koch, 1980). Les largeurs $\Delta v_s CD_2$ ont été déterminées à partir du résultat d'une décomposition spectrale. Trois bandes sont utilisées pour reproduire la composante à 2100 cm^{-1} et les épaulements de part et d'autre : entre 2070 et 2080 cm^{-1} , et entre 2125 et 2160 cm^{-1} . Aucune contrainte de largeur de bande n'est imposée. Dans le

cadre de cette étude, $\Delta\nu_s\text{CD}_2$ est une mesure de la largeur à mi-hauteur de la composante centrale résultante. Les valeurs absolues ainsi obtenues pour une transition gel à liquide-cristallin pour le DMPE-d₅₄ varient entre 21,8 et 33,5 cm⁻¹. Ces valeurs sont en accord avec la variation de la largeur de bande mesurée à 65 % de l'intensité maximale, pour la transition gel à liquide-cristallin de DMPC-d₅₄, qui passe de 20 à 30 cm⁻¹ (Kouaouci et al., 1985). Pour le mélange modèle, les résultats en RMN-²H indiquent que l'acide gras est sous forme solide (Fenske et al., 1994 ; Kitson et al., 1994). La valeur de $\Delta\nu_s\text{CD}_2$ est inférieure à la valeur obtenue en phase gel, ce qui est attendu pour des chaînes très ordonnées.

La variation de l'ordre conformationel des chaînes alkyles donne lieu à une variation du rapport d'intensité des bandes à 2880 et 2850 cm⁻¹ (figure 4.7.C-D) (Bunow et Levin, 1977 ; Huang et al., 1983). Ce paramètre permet ainsi de suivre l'évolution de l'ordre conformationel des chaînes céramides dans le mélange en fonction de la température. À température ambiante, le rapport observé est de 1,7, puis diminue jusqu'à 1,2 lorsque les céramides III purs sont chauffés à 75 °C. Dans le mélange ternaire, le rapport I_{2880}/I_{2850} varie de 1.5 à 0.9, depuis l'état solide jusqu'à la phase fluide isotrope. La contribution du cholestérol modifie cependant ce rapport. En phase solide, le rapport I_{2880}/I_{2850} pour des céramides III purs est de 1,70. Lorsque le cholestérol est ajouté dans une proportion de 50 %, le rapport est réduit à 1,46. En parallèle, la soustraction du spectre du cholestérol, à celui du mélange à basse température, basée sur la bande à 2868 cm⁻¹, donne un spectre parfaitement superposable à celui des céramides III purs dans une phase

ordonnée. Le rapport I_{2880}/I_{2850} est de 1,72 lorsque la contribution du cholestérol est soustraite, ce qui est caractéristique d'une phase très ordonnée (Bunow et Levin, 1977). Aux hautes températures, lorsque le rapport I_{2880}/I_{2850} approche de l'unité. La contribution du cholestérol ne modifie cependant plus les valeurs puisque celui-ci a une contribution comparable en intensité à ces deux fréquences. À l'inverse, le rapport sera sous-estimé en présence de cholestérol lorsque les chaînes se trouvent dans une phase très désordonnée et que le rapport des bandes est inférieur à 1. Le résultat de la soustraction du spectre du cholestérol pour le mélange à haute température permet d'obtenir un spectre typique d'un lipide dans une phase désordonnée (Huang et al., 1983).

La figure 4.13 rapporte l'évolution de I_{2880}/I_{2850} et de $\Delta v_s CD_2$ sur les spectres moyens en fonction de la température. Pour obtenir une description globale du comportement de l'échantillon, tous les spectres d'une carte sont additionnés pour obtenir un spectre moyen. Cette moyenne tient en compte l'intensité de chaque spectre. Un volume échantillonné ayant une plus grande concentration de matériel aura un spectre de plus grande intensité et contribuera davantage lors du calcul du spectre moyen. La figure 4.13 représente ainsi le comportement moyen du mélange à chacune des températures. Les échelles sont ajustées de façon à pouvoir comparer l'ordre des chaînes. Comme discuté plus haut, à basse température, les deux paramètres indiquent que les chaînes sont très ordonnées pour les céramides III et l'acide palmitique deutéré. À mesure que la température augmente, on remarque que le rapport I_{2880}/I_{2850} diminue pour atteindre 0,91 à 75 °C. Cette valeur devient 0,88 lorsque le spectre du cholestérol est soustrait. La valeur de $\Delta v_s CD_2$

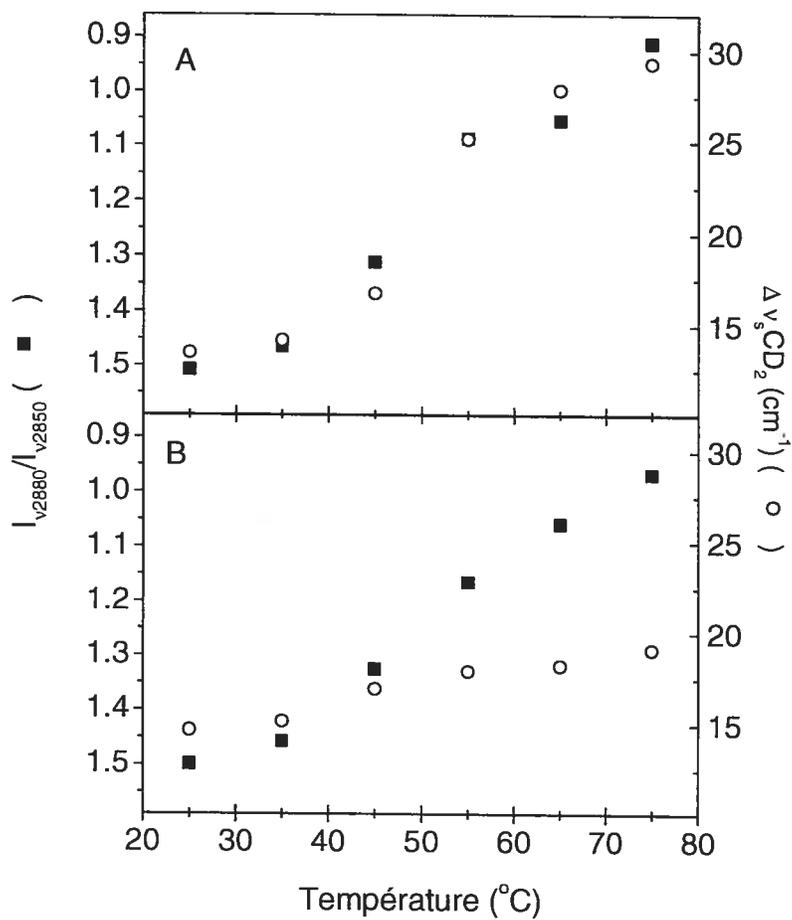


Figure 4.13 : Variation du rapport d'intensité des bandes ν_{CH} 2880 et 2850 cm^{-1} (■) et de la largeur de bande ν_{CD} à 2096 cm^{-1} (○) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A) et en présence de calcium (B).

atteint 30 cm^{-1} à haute température. Les valeurs de ces paramètres indiquent que les chaînes des deux composantes se désordonnent simultanément à partir de $45 \text{ }^\circ\text{C}$, pour atteindre une phase désordonnée (Bunow et Levin, 1977) à $75 \text{ }^\circ\text{C}$. Cette analyse Raman sur le mélange CERIII/PA-d₃₁/Chol, à notre connaissance la première sur ce mélange, concorde avec le comportement observé par spectroscopie infrarouge de la présente thèse et de ceux de la littérature (Lafleur, 1998 ; Velkova et Lafleur, 2002). L'étude du thermotropisme est réalisée sur un nombre beaucoup plus limité de température que par spectroscopie infrarouge et ne permet pas de distinguer la présence de deux transitions.

Le comportement du mélange en présence de calcium (figure 4.13.B) est cohérent avec celui observé par spectroscopie infrarouge. On remarque que le comportement des chaînes alkyles des céramides est peu modifié par la présence des ions divalents. Il n'existe qu'une faible augmentation du rapport I_{2880}/I_{2850} , qui devient égal à 1,0 à $75 \text{ }^\circ\text{C}$ en présence de Ca^{2+} . Les acides gras restent ordonnés sur toute la plage de température avec une largeur de bande variant graduellement de 15 à 19 cm^{-1} .

La mesure du rapport I_{2880}/I_{2850} et $\Delta\nu_s\text{CD}_2$ en divers endroits de l'échantillon permet d'établir l'hétérogénéité de cette distribution d'ordre. Les figures 4.14 et 4.15 permettent de visualiser l'hétérogénéité de l'ordre des chaînes dans les mélanges sans et avec calcium. Les échelles sont fixées comme précédemment à partir de la transition des chaînes ordonnées à désordonnées. Contrairement aux spectres moyens, la contribution du cholestérol n'est pas constante, puisque sa concentration locale est hétérogène (figure 4.10).

Il s'ensuit que pour un spectre riche en cholestérol, le rapport I_{2880}/I_{2850} est modifié en comparaison de la valeur obtenue en absence de cholestérol pour un même désordre des chaînes alkyles. Les traits rouges indiquent les valeurs du rapport obtenu lorsque les spectres moyens sont corrigés pour la contribution du cholestérol dans la région ν_{CH} . Le trait bleu à 0,95 est le rapport I_{2880}/I_{2850} du spectre du cholestérol seul. Les maxima des distributions sont équivalents aux valeurs trouvées pour le rapport I_{2880}/I_{2850} moyen des mélanges en fonction de la température (figure 4.13).

Pour les chaînes des céramides, entre 25 et 35 °C (figure 4.14.A-B), on remarque une distribution normale des valeurs de I_{2880}/I_{2850} , d'une largeur de 0,4 à la basse. La limite inférieure des distributions est égale à la valeur du rapport I_{2880}/I_{2850} lorsque le spectre du cholestérol est soustrait des spectres moyens du mélange. L'hétérogénéité de l'ordre conformationel, en deçà de la température de transition, peut donc être expliquée en partie par la distribution non uniforme du cholestérol. La mise en relation des paramètres I_{2880}/I_{2850} et $I_{\nu_{2850}}/(I_{\nu_{2850}} + I_{\nu_{2935}})$ permet de trouver qu'il existe une corrélation d'environ 0,35, significative à $p > 0,999$, les reliant, à 25 et 35 °C. Ceci signifie que pour ces deux températures, plus la composition locale en céramides est importante, plus le paramètre I_{2880}/I_{2850} est petit. Il s'ensuit que la largeur des distributions pour le paramètre I_{2880}/I_{2850} , à 25 et 35 °C, est possiblement attribuable à la composition locale en cholestérol et non à une réelle différence dans l'ordre conformationel des chaînes des céramides III dans le mélange CERIII/PA-d₃₁/Chol sans calcium. Il n'est pas possible à ce point de distinguer avec certitude la cause de la variation du paramètre I_{2880}/I_{2850} .

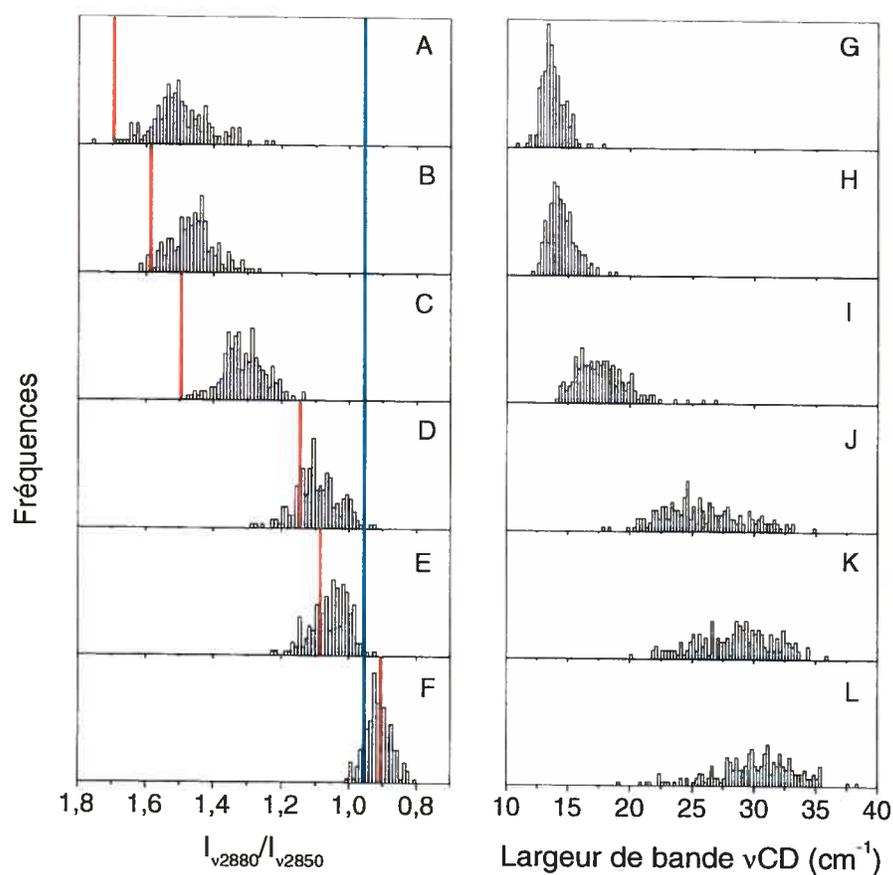


Figure 4.14 : Distributions de l'ordre conformationel des chaînes alkyles des CER III (A-F) et de PA-d₃₁ (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L).

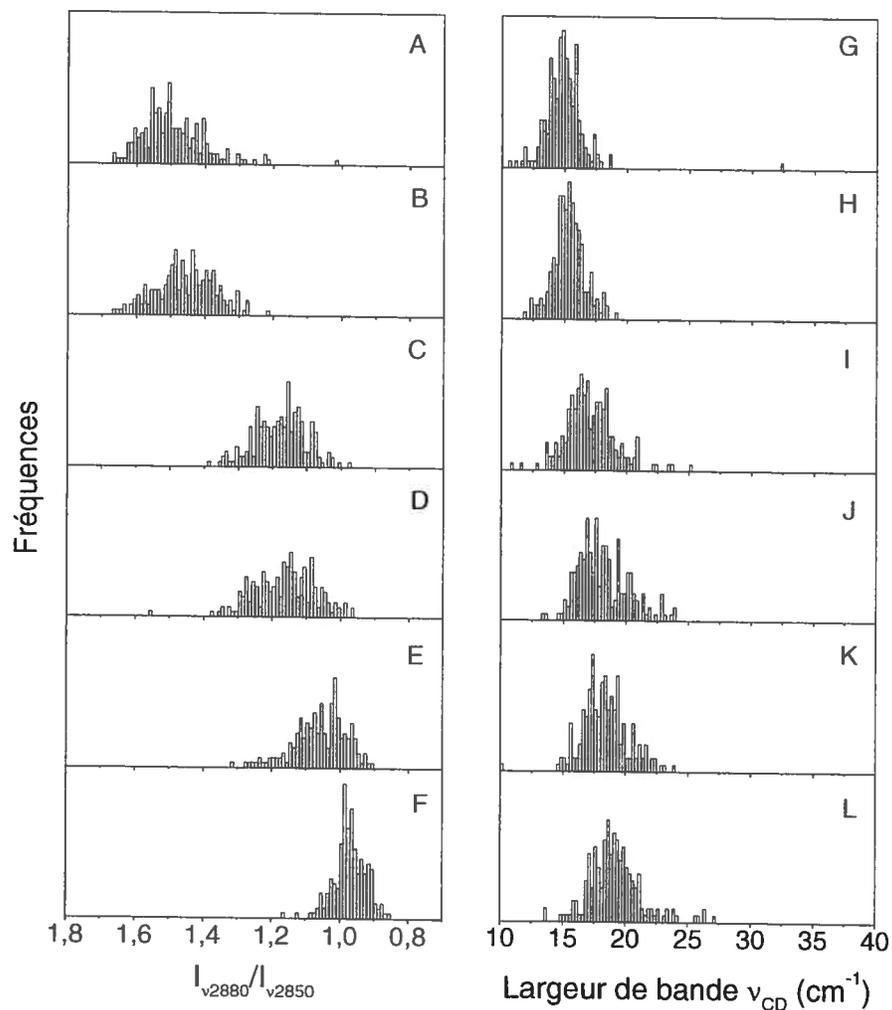


Figure 4.15 : Distributions de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III (A-F) et de PA-d₃₁ (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en présence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L).

Avec l'augmentation de la température (figure 4.14.D-E), la largeur des distributions reste constante à environ 0,4 unité à la base, jusqu'à 65 °C. Pour les cartes à 55 et 65 °C, il existe aussi une corrélation significative, avec $0,985 > p > 0,999$, reliant les paramètres I_{2880}/I_{2850} et $I_{v2850}/(I_{v2850} + I_{v2935})$. Donc, pour les deux températures, l'augmentation de céramides est corrélée avec la diminution du paramètre I_{2880}/I_{2850} . Dans tous les cas, il est difficile d'attribuer la cause de la variation du paramètre I_{2880}/I_{2850} : l'ordre conformationnel des chaînes alkyles plus désordonnés en présence de cholestérol, ou un ordre moyen dont le spectre est modifié par la contribution du cholestérol dans la région vCH. À 75 °C (figure 4.14.F), la distribution, avec une largeur à la base de 0,2, va au-delà des bornes représentant la variabilité du paramètre I_{2880}/I_{2850} sur la moyenne due à la contribution du cholestérol dans la région spectrale vCH. Les points de part et d'autre des traits de couleur signifient que l'échantillon possède localement une variabilité de l'ordre conformationnel des chaînes des céramides. À cette température, il existe toujours une corrélation entre la proportion de CER III/Chol et le paramètre I_{2880}/I_{2850} , cependant dans la relation est inversée : l'ordre conformationnel est moindre pour les points enrichis en céramides. La corrélation entre les paramètres I_{2880}/I_{2850} et $I_{v2850}/(I_{v2850} + I_{v2935})$ est jugée significative à $p > 0,999$.

À 25 °C, les valeurs de $\Delta v_s CD_2$ (figure 4.14.G) sont distribuées autour de $13,7 \text{ cm}^{-1}$, avec une largeur de distribution d'environ 5 cm^{-1} à la base. À mesure que la température augmente (figure 4.14.H-L), les moyennes des histogrammes suivent l'évolution observée

pour le mélange global alors que les distributions sont de plus en plus larges allant jusqu'à une largeur de 10 cm^{-1} à $75 \text{ }^\circ\text{C}$.

L'ajout de calcium ne modifie pas la distribution de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des céramides dont les histogrammes suivent le même comportement que décrit plutôt pour le mélange sans l'ion divalent (figure 4.15.A-F). Quant à l'ordre conformationnel de l'acide gras, la présence de calcium induit des distributions étroites, entre 5 et $7,5 \text{ cm}^{-1}$, dont la position moyenne et la largeur varient peu avec l'augmentation de la température (figure 4.15.G-L).

Les images de la variation de l'ordre conformationnel des chaînes permettent de comparer le comportement des céramides avec celui de l'acide palmitique dans les deux mélanges (figures 4.16 et 4.17). Pour ce qui a trait au comportement des céramides (figure 4.16.A-F) on remarque, à basse température, des images avec quelques taches plus claires soulignant davantage l'hétérogénéité de la distribution du cholestérol telle que décrite plus haut. Avec l'augmentation de la température, les valeurs du paramètre I_{2880}/I_{2850} augmentent alors que les cartes deviennent de plus en plus uniformes. La distribution de l'ordre conformationnel des chaînes des acides gras ne présente pas de schémas particuliers, mais une distribution relativement aléatoire (figure 4.16.G-L).

Les paramètres sont représentés pour le mélange en présence de calcium (figure 4.17). On remarque que la distribution spatiale en céramides est semblable à ce qui est

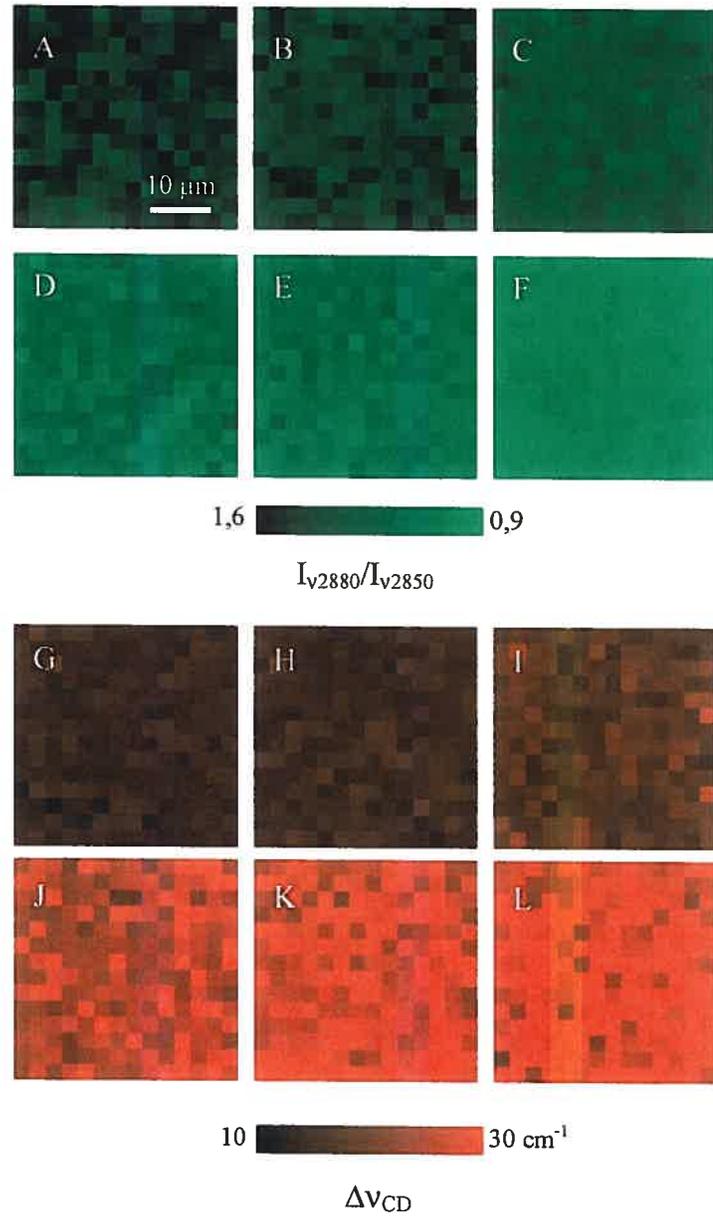


Figure 4.16 : Cartes de l'ordre conformationel des chaînes alkyles des CER III (A-F) et de PA-d₃₁ (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L). Images de 40 × 40 μm pour des sauts de 3 μm .

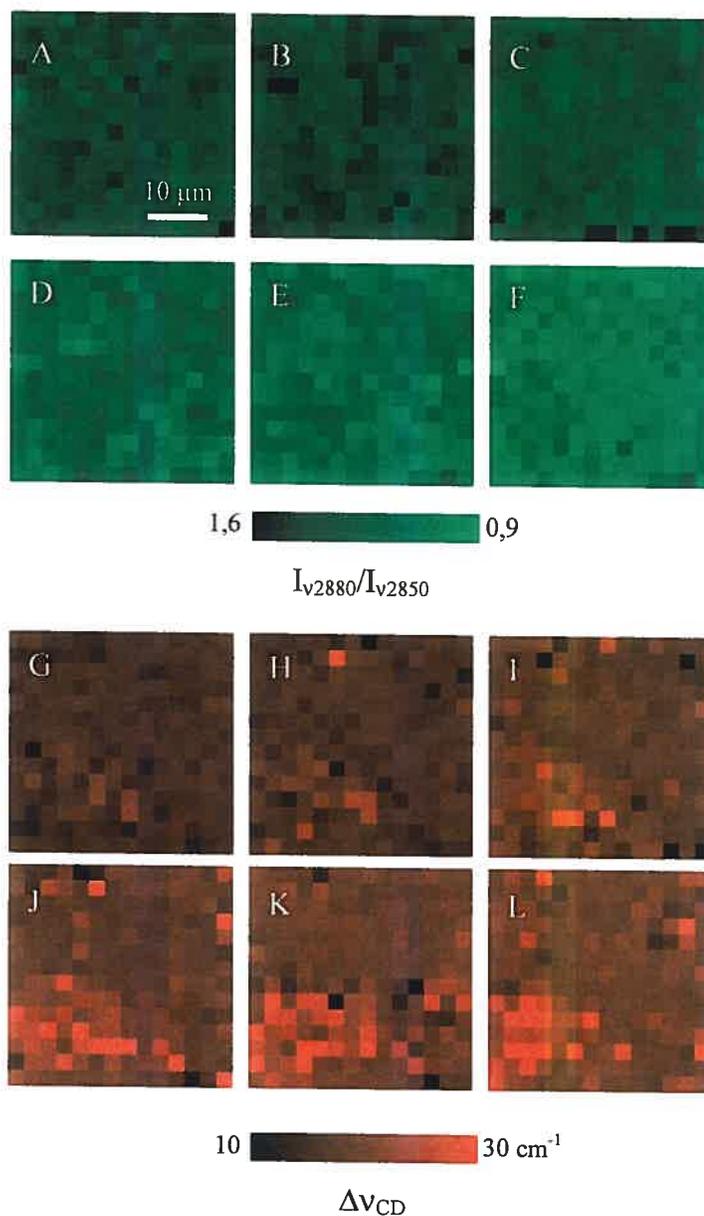


Figure 4.17 : Cartes de l'ordre conformationel des chaînes alkyles des CER III (A-F) et de PA-d₃₁ (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en présence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L). Images de 40 × 40 μm pour des sauts de 3 μm .

observé pour le mélange sans calcium (figure 4.17.A-F). Dans le cas de l'acide gras avec du calcium, les valeurs extrêmes de la distribution forment un domaine de plus en plus distinct à mesure que le mélange est chauffé (figure 4.17.G-L). À 75 °C, un domaine désordonné d'environ $10 \mu\text{m}^2$ où $\Delta\nu_s\text{CD}_2$ est en moyenne au-dessus de 25 cm^{-1} est clairement identifiable dans le coin gauche inférieur dans une matrice plus rigide, soit $\Delta\nu_s\text{CD}_2$ en deçà de 20 cm^{-1} (figure 4.17.L).

La figure 4.18 illustre les variations d'entropie topographique pour les images d'ordre conformationel des mélanges avec et sans calcium en fonction de la température. La figure 4.18.A présente l'évolution de l'entropie topographique du rapport I_{2880}/I_{2850} . Les mélanges avec et sans calcium présentent un profil semblable, quoi que légèrement supérieur pour le mélange en présence de calcium, qui s'accroît avec l'augmentation de la température passant d'environ 1,7 à 3 entre 35 et 45 °C. Comme précédemment, les céramides suivent la même tendance dans les mélanges ternaires avec et sans calcium. L'entropie topographique associée à l'ordre conformationel de l'acide gras, donnée par $\Delta\nu_s\text{CD}_2$, reste constant avec un plateau autour de 2,5 jusqu'à 65 °C suivit d'une perte d'entropie d'environ 1 unité. Les valeurs d'entropie indiquent que les images associées à l'ordre des chaînes de PA-d₃₁ sont moins uniformes, à partir de 45 °C, et ce, particulièrement en absence de calcium.

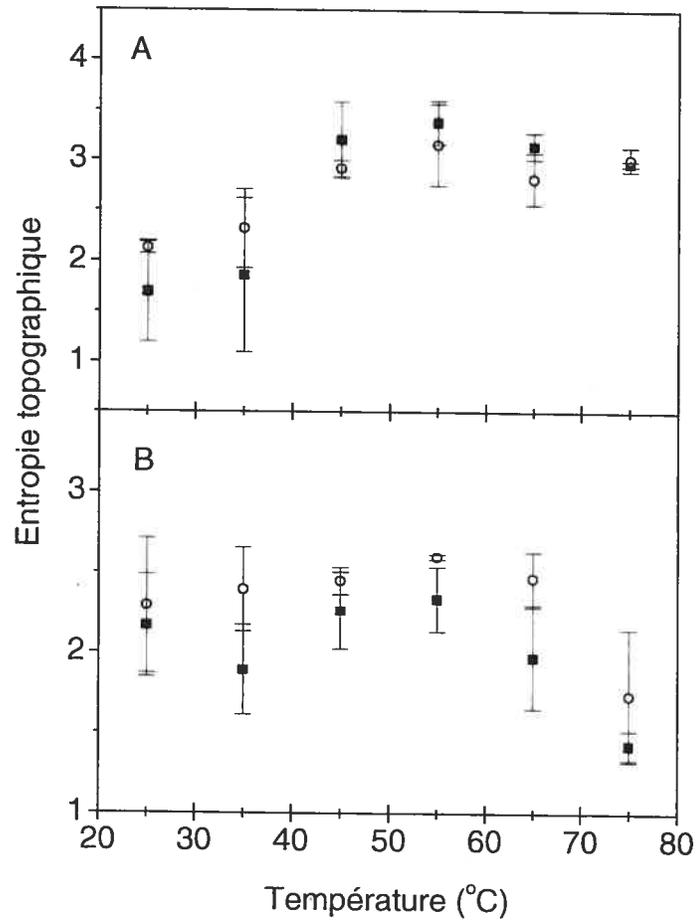


Figure 4.18 : Variation de l'entropie topographique de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles de PA-d₃₁ (A) et des CER III (B) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (■) et en présence de calcium (○).

Bandes	Position	Largeur	Forme
	cm⁻¹	cm⁻¹	% Lorentzienne
1	2842 - 2852	≥ 14	≤ 0,5
2	2860 - 2867	≤ 23	≤ 0,5
3	2875 - 2890	≥ 1	≤ 0,5
4	2890 - 2906	31,5	0
5	2928 - 2938	35	0
6	2950 - 2970	24 - 30	0

Tableau VII : Paramètres de contraintes imposées permettant de reproduire la région vCH d'un spectre Raman, allant de 2795 à 2980 cm⁻¹.

4.2.1.3. Détermination des fractions molaires à basse température

À basse température, les résultats de la spectroscopie infrarouge indiquent que les lipides sont en phase cristalline avec un ordre conformationnel important. Les spectres Raman enregistrés à 25 °C sont pratiquement formés d'une combinaison linéaire des spectres des composantes pures, et ce, sur toute la surface balayée. Ces conditions nous permettent de pousser plus loin l'analyse et ainsi d'obtenir les fractions molaires en céramides, cholestérol et en acide gras en chaque point d'une carte. La méthode utilisée s'inscrit à la suite des travaux de Percot et Lafleur (Percot et Lafleur, 2001).

La région ν_{CH} , allant de 2795 à 2980 cm^{-1} , est simulée pour obtenir le contenu en cholestérol et en céramides. Les contraintes imposées sur les six bandes durant la simulation sont résumées dans le tableau VII. Ces paramètres permettent de reproduire parfaitement la région CH des spectres de mélanges binaires de cholestérol et de céramides. La figure 4.19 présente les résultats typiques de cette simulation pour des fractions molaires en CER III/Chol (8:2) et (2:8). On remarque la variation importante de l'aire de la bande à 2935 cm^{-1} , illustrée en bleu, selon le contenu en cholestérol. Il est possible d'établir une courbe de calibration reliant la fraction de cholestérol dans le mélange binaire, $Chol^b$, avec l'aire de cette bande sur l'aire totale, $A_{2835}/A_{\nu_{CH}}$ (figure 4.20). L'équation 4.1 définit la courbe de calibration obtenue.

$$Chol^b = \frac{\left(\frac{A_{2835}}{A_{\nu_{CH}}} \right) - 0,172}{0,554 \cdot \left(\frac{A_{2835}}{A_{\nu_{CH}}} \right) - 0,032} \quad \text{eq. 4.1}$$

Appliqué en chaque point d'une carte, ce traitement permet de connaître la fraction binaire de cholestérol et de céramides correspondant à la contribution du cholestérol. On peut ensuite attribuer une fraction de $A_{\nu_{CH}}$ correspondant à l'aire corrigée du cholestérol, A_{Chol} , et à l'aire corrigée des céramides, A_{CER} . Ces aires sont dites corrigées parce qu'elles ne représentent pas les contributions réelles au signal, mais tiennent compte de la différence de coefficients d'activité Raman des deux composés.

$$A_{Chol} = A_{\nu_{CH}} \times Chol^b \quad \text{eq. 4.2}$$

$$A_{CER} = A_{\nu_{CH}} - A_{Chol} \quad \text{eq. 4.3}$$

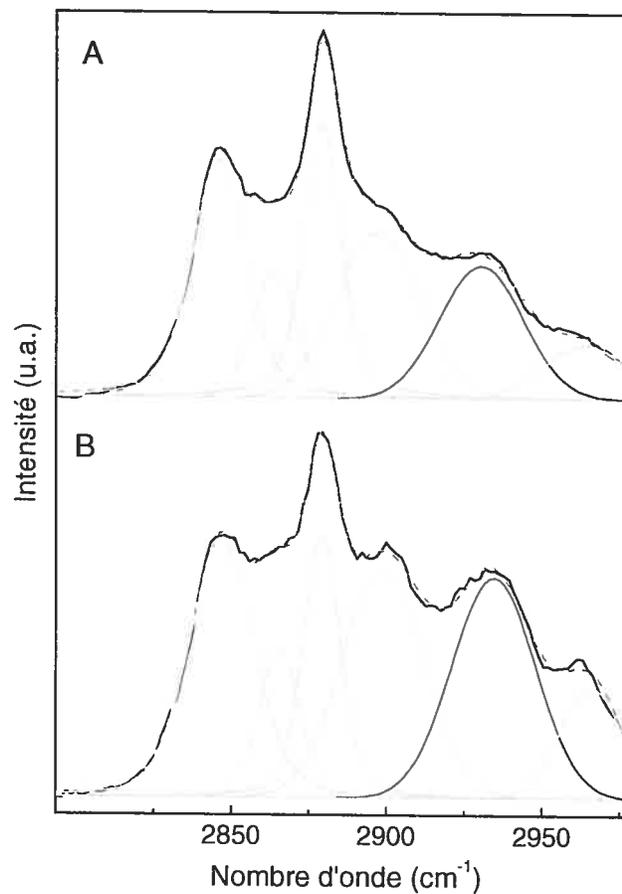


Figure 4.19 : Spectres Raman expérimental de la région région ν_{CH} (—) et décomposition spectrale (⋯) à 25 °C pour un mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1 :1 :1) correspondant à un domaine enrichi en céramides (A) ou en cholestérol (B). Bande sensible à la fraction de cholestérol (—).

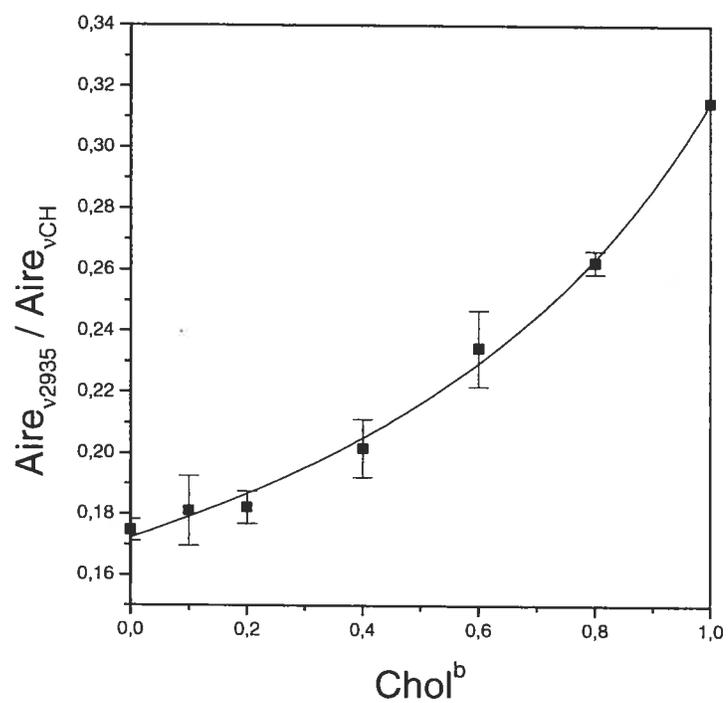


Figure 4.20 : Courbe de calibration, pour la détermination de la fraction binaire en cholestérol (Chol^b), de l'aire de la bande simulée autour de 2935 cm^{-1} sur l'aire totale de la région ν_{CH} .

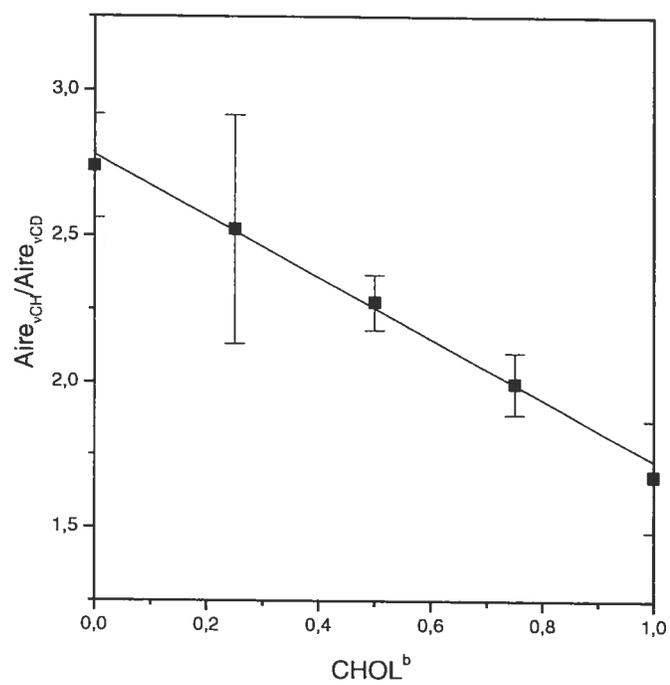


Figure 4.21 : Courbe de calibration du rapport d'aire des régions v_{CD} et v_{CH} en fonction de la contribution du cholestérol.

Pour déterminer la fraction molaire des acides gras deutéré, l'aire de la région CD, A_{vCD} , doit être corrigée pour tenir compte des activités Raman différentes des CD et des CH. Pour un mélange CER III/PA-d₃₁ (1/1), le rapport des aires A_{vCH}/A_{vCD} est de 2,84 et pour un mélange Chol/PA-d₃₁ (1/1), de 1,68. La figure 4.21 relie la concentration binaire en cholestérol, Chol^b, au rapport A_{vCH}/A_{vCD} . Corrigée en fonction du contenu en cholestérol établi précédemment en chaque point, A_{vCD} devient A_{PA} , soit l'aire corrigée de la fraction molaire en acide palmitique. Les fractions molaires ternaires, X^t , sont directement dérivées des aires corrigées, A_{CER} , A_{Chol} et A_{PA} :

$$CERIII^t = \frac{A_{CER}}{A_{CER} + A_{Chol} + A_{PA}} \quad \text{eq. 4.4}$$

$$Chol^t = \frac{A_{Chol}}{A_{CER} + A_{Chol} + A_{PA}} \quad \text{eq. 4.5}$$

$$PA-d_{31}^t = \frac{A_{PA}}{A_{CER} + A_{Chol} + A_{PA}} \quad \text{eq. 4.6}$$

Les images de la figure 4.22 sont le résultat du calcul des fractions molaires des trois composantes pour le mélange équimolaire CER III/PA-d₃₁/Chol sans (figure 4.22.A-B) et avec calcium (figure 4.23.C-D) à 25 °C. Le vert, rouge et bleu représentent les fractions molaires ternaires en CER III, PA-d₃₁ et Chol, respectivement, en chaque point. Comme décrit par Percot et Lafleur, un enrichissement est dit d'un point ayant une composante dont la fraction molaire est de plus de 25 % au-dessus de la moyenne soit ~ 0,43. L'image 4.22.A reproduit les résultats déjà publiés pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol sans calcium (Percot et Lafleur, 2001). On y observe des domaines enrichis en chacune des trois composantes de l'ordre de 10 μm². Au centre, on retrouve un domaine

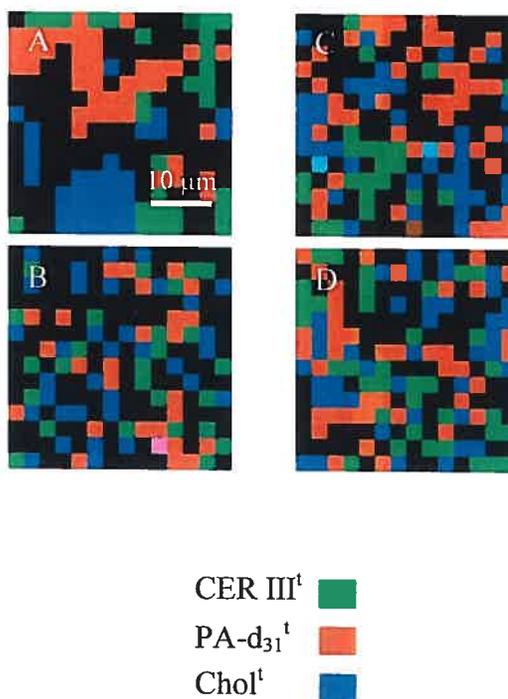


Figure 4.22 : Cartes superposées de la distribution des fractions molaires de CER III (vert), de PA-d₃₁ (rouge) et du Chol (bleu) à 25 °C pour un mélange CER III/PA-d₃₁/Chol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A-B) et en présence de calcium (C-D). Images de 40 × 40 μm pour des sauts de 3 μm.

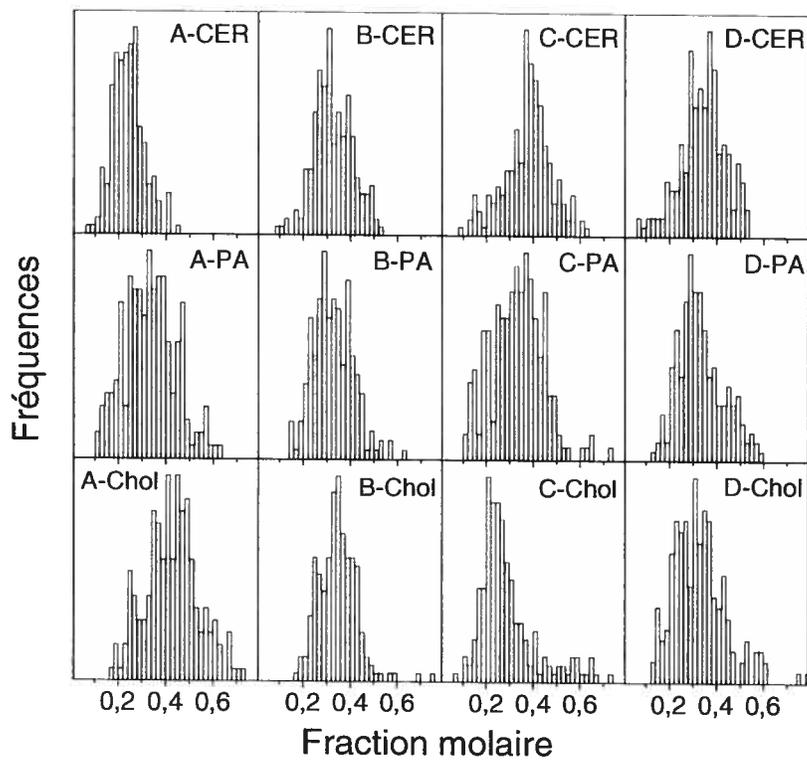


Figure 4.23 : Histogrammes des fractions molaires de CER III (CER), de PA-d₃₁ (PA) et du Chol (Chol) pour les cartes de la figure 4.22 (A-D).

enrichi en acide palmitique deutéré, alors qu'au bas de l'image, un domaine de cholestérol est clairement observable. Cependant, la carte obtenue du mélange ternaire préparé à partir d'un autre lot de céramides III donne à penser que la morphologie des domaines est très sensible aux conditions expérimentales. Pour ce second groupe d'échantillons, une séparation de phase est toujours présente, mais les domaines sont de taille inférieure. Il est possible que la distribution des longueurs de chaînes varie d'un lot à l'autre et ceci pourrait être à l'origine des différences. En présence de calcium, aucun domaine de grande taille n'est observé. Des points verts, rouges ou bleus sont présents, mais ils semblent plutôt isolés. Les histogrammes de la figure 4.23 illustrent l'hétérogénéité de la distribution des fractions molaires pour chacune des cartes présentées à la figure 4.22. Aucune corrélation n'est observable entre la largeur de la distribution et la taille plus ou moins importante des domaines.

4.2.2. Discussion

4.2.2.1. Thermotropisme du mélange sans calcium

Comme on l'a déjà dit, il a été suggéré depuis plus de 10 ans que les lipides du SC s'organisent sous forme d'une mosaïque de domaines cristallins réduisant la perméabilité de la peau (Forslind, 1994 ; Kitson et Thewalt, 2000). Plusieurs évidences indirectes ont permis de conclure à cette organisation telle que la présence d'une séparation de phases avec un empilement orthorhombique observée par spectroscopie infrarouge (Lafleur, 1998 ; Mendelsohn et Moore, 1998 ; Mendelsohn et Moore, 2000 ; Moore et Rerek, 2000 ; Moore

et al., 1997a ; Moore et al., 1997b ; Velkova et Lafleur, 2002). Cependant, ce n'est que par l'utilisation récente de la microscopie vibrationnelle qu'une caractérisation directe de la taille et de la forme des domaines a pu être faite (Percot et Lafleur, 2001). Ainsi, Percot et Lafleur ont publié en 2001 des images de la mosaïque que forme la séparation de phase d'un mélange modèle des lipides du SC. Par comparaison aux résultats obtenus pour des mélanges secs, cette étude montre la formation de domaines enrichis d'une taille de l'ordre de $10 \mu\text{m}^2$ pour le mélange ternaire équimolaire CER III/PA-d₃₁/Chol, dans un tampon sans ion divalent à 25 °C. S'inscrivant dans la suite de ces travaux, notre projet suit l'évolution de ces domaines en fonction de l'augmentation de la température et de la présence d'ions calcium.

La microscopie Raman confocale a permis de mettre en relief l'existence d'une hétérogénéité de distribution conduisant à la formation de domaines, à basse température, dans le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol en absence de calcium. Les distributions larges soulignent d'abord cette séparation de phase de l'acide gras, par le biais du rapport $A_{V_{CD}} / (A_{V_{CH}} + A_{V_{CD}})$, et de la distribution des céramides III en regard du cholestérol, par le biais du rapport $I_{V_{2850}} / (I_{V_{2850}} + I_{V_{2935}})$ (figure 4.8). La largeur de ces distributions est très supérieure à celles obtenues pour le mélange en poudre pour lesquelles les distributions des deux paramètres sont étroites. Les domaines enrichis (figure 4.10) sont mis en relief par la présence de régions de couleurs distinctes (rouge/bleu) (vert/bleu). Aux basses températures, le calcul des fractions molaires reproduit avec plus de nuances ces séparations de phase entre les trois composantes (figure 4.22). Il importe cependant de

souligner que le choix des échelles de couleurs est arbitraire, un point de couleur représentant un enrichissement de 25 % au-dessus de la moyenne. Si la résolution en profondeur, de l'ordre de 5 μm , ne permet pas d'isoler des domaines cristallins d'un seul lipide et d'obtenir des spectres excluant des contributions des deux autres composantes, les images montrent néanmoins une séparation de phase similaire à celle observée par Percot et Lafleur (Percot et Lafleur, 2001).

La figure 4.22 souligne qu'il existe une différence entre les échantillons quant à ce qui a trait à la morphologie des domaines, et ce, pour un même protocole d'incubation. Le thermotropisme suivi par spectroscopie infrarouge ainsi que par microscopie Raman ne permet pas de distinguer une différence dans l'organisation moyenne des mélanges. Outre l'organisation globale, les histogrammes de l'hétérogénéité locale de la composition ne permettent pas davantage de distinguer des échantillons dont la morphologie des domaines diffère (figure 4.23). Les lipides étant soumis à la même procédure d'hydratation et d'incubation, la différence la plus importante est les lots de céramides III utilisés. Puisqu'il s'agit d'un lipide extrait, il est possible que la distribution des longueurs de chaînes varie d'un lot à l'autre. Il a été rapporté que la miscibilité du cholestérol et des acides gras est fonction de l'association des groupements hydrophobes (Ouimet et Lafleur, 2004). Le cholestérol permet la formation de la phase l_0 dans les cas des mélanges avec des acides gras dont la chaîne alkyles est de C_{14} à C_{18} . De même, par microscopie Raman sur des mélanges CER C_{16} /PA- d_{31} /Chol, dans lesquels le céramide synthétique possède une longueur de chaînes définie, la séparation de phase conduit à des domaines au-delà de 10

μm^2 (Kwak et Lafleur, communication personnelle). Bouwstra et al. ont aussi montré que la formation de certains motifs de répétitions en diffraction des rayons X dépend du type et de la longueur de chaînes de céramides (Bouwstra et al., 2001). Très peu de choses sont connues quant aux paramètres qui régissent la dimension des domaines des mélanges lipidiques et, dans nos mélanges, la taille de domaines pourrait être intimement reliée à la longueur des chaînes. D'autres investigations sont nécessaires afin de répondre à cette question. Afin de permettre une comparaison entre les résultats en microscopie Raman, les mélanges étudiés en fonction de la température ont été faits à partir d'un même lot de céramides. Il faut néanmoins être prudent quant aux conclusions tirées sur la morphologie des domaines.

Les mesures faites en spectroscopie infrarouge indiquent la présence de domaines cristallins (Lafleur, 1998 ; Moore et al., 1997a). Les valeurs moyennes des paramètres $\Delta\nu_s\text{CD}_2$ et I_{2880}/I_{2850} obtenus ici abondent dans ce sens, avec des valeurs de 14 cm^{-1} et 1,5 respectivement (figure 4.13). Il n'est cependant pas possible d'établir qu'il existe clairement une relation entre l'ordre conformationnel des chaînes d'acide gras et l'enrichissement de ce lipide tel que rapporté par Percot et Lafleur (Percot et Lafleur, 2001). Ces derniers ont montré qu'il était possible d'observer une différence d'ordre conformationnel aux frontières des domaines. La mise en relation de la composition locale et des paramètres d'ordre, pour l'acide palmitique et les céramides, ne permet pas de conclure à une corrélation. Il est possible que la faible résolution des cartes, avec des sauts de $3\text{ }\mu\text{m}$ au lieu de $1\text{ }\mu\text{m}$, ne permette pas de sonder indépendamment les domaines cristallins des

zones frontalières où il est attendu que les lipides devraient être plus désordonnés. Le choix de la résolution des images a été dicté par le temps d'acquisition des cartes afin de permettre des lectures à plusieurs températures sur une période de temps raisonnable. De plus, la taille plus limitée des domaines, dans notre cas, rend plus difficile l'identification de régions à l'interface de domaines. On observe néanmoins une hétérogénéité des paramètres des paramètres d'ordre $\Delta\nu_s\text{CD}_2$ et I_{2880}/I_{2850} . Dans le cas du rapport I_{2880}/I_{2850} , il a déjà été mentionné que la présence du cholestérol peut modifier le spectre en introduisant une hétérogénéité qui n'est pas due uniquement à une variation de l'ordre conformationel. Notons que ceci n'a pas été pris en considération dans le traitement spectral proposé par Percot et Lafleur (Percot et Lafleur, 2001).

Entre 25 et 45 °C, le mélange conserve ses caractéristiques (figure 4.16). L'hétérogénéité des distributions diminue radicalement à partir de 55 °C avec une perte de contrastes des cartes et une diminution de la largeur des distributions. Ceci est supporté par la variation abrupte de l'entropie dans le cas des cartes de distribution de l'acide palmitique (figure 4.12.A). Selon les résultats en spectroscopie infrarouge, ceci correspond aux transitions observées entre 40 et 65 °C (Lafleur, 1998).

À 75 °C, les mesures d'ordre conformationel indiquent que le comportement moyen est celui d'un mélange en phase fluide désordonnée. Cependant, on remarque la distribution plus large que dans le cas du mélange sec homogène. Ceci est particulièrement vrai pour l'acide gras qui possède une large distribution de son ordre conformationel se

traduisant par des taches sombres sur la figure 4.11.L. Même à cette température élevée, la distribution de l'acide palmitique n'est pas celle d'un mélange parfaitement homogène.

Une nuance doit être apportée sur l'interprétation de l'entropie topographique (annexe 1). Cette dernière ne peut être comparée que lorsque le regroupement (le choix des bornes servant à établir l'échelle de 10 nuances) est le même. Il s'agit d'un choix arbitraire qui influence grandement le résultat des calculs. Les comparaisons doivent donc être faites entre les mêmes paramètres pour lesquels la segmentation utilisée est la même. Ainsi, il est difficile de discuter de la différence d'entropie topographique entre les cartes de distribution de l'acide gras, $AV_{CD} / (AV_{CH} + AV_{CD})$, et celles des céramides III par rapport au cholestérol, $I_{v2850} / (I_{v2850} + I_{v2935})$.

4.2.2.2. Thermotropisme du mélange avec calcium

Outre la signalisation cellulaire, le calcium semble jouer un rôle dans l'organisation lipidique au niveau du SC (Lee et al., 1998 ; Tanojo et Maibach, 1999). Nos observations sur le mélange ternaire équimolaire par spectroscopie infrarouge le montrent clairement. Les résultats de microscopie Raman confirment la présence d'une séparation de phase en présence de l'ion divalent, et ce, même avec l'augmentation de la température. Ceci est parfaitement en accord avec les études faites sur des vésicules composées de lipides du SC, céramides/acide palmitique/Chol, montrant que le calcium conduit à la fusion des vésicules puis à leur éclatement et à la formation de feuillet lamellaires (Abraham et al., 1987 ; Hatfield et Fung, 1999 ; Zellmer et al., 1998). Les différents auteurs

suggèrent que ceci est dû à une association entre l'acide gras et le calcium et possiblement à une séparation de phase.

L'ajout de calcium dans le mélange permet en effet la séparation de phase des lipides d'abord à basse température. Les distributions larges des paramètres $A_{V_{CD}} / (A_{V_{CH}} + A_{V_{CD}})$ et $I_{V_{2850}} / (I_{V_{2850}} + I_{V_{2935}})$ soulignent une hétérogénéité du même ordre de grandeur que dans le cas du mélange sans calcium à la même température. Malgré les indications en spectroscopie infrarouge suggérant que les empilements ne sont pas orthorhombiques, les domaines définis par les différentes fractions molaires ainsi que la valeur de l'entropie topographique montre que le calcium influence peu la distribution spatiale des composantes lipidiques dans le mélange à basse température. De même, les paramètres d'ordre $\Delta v_s CD_2$ et I_{2880} / I_{2850} montrent une hétérogénéité semblable à ce qui est observé pour le mélange sans calcium.

Avec l'augmentation de la température, la spectroscopie infrarouge révèle que la rigidité des chaînes alkyles de l'acide palmitique est maintenue, reflétant aussi le maintien de la séparation de phase dans le mélange. Plus particulièrement, le paramètre $A_{V_{CD}} / (A_{V_{CH}} + A_{V_{CD}})$ permet de suivre l'hétérogénéité visible sur les histogrammes (figure 4.9) et sur les images (figure 4.11), jusqu'aux hautes températures. On peut remarquer dans le coin inférieur gauche de la région sondée qu'il existe un domaine appauvri en acide gras (figure 4.11.A-F) où les chaînes subissent une augmentation de l'ordre conformationnel avec l'augmentation de la température, jusqu'à atteindre une phase fluide désordonnée à 75 °C

(figure 4.17.G-L). À partir des informations recueillies par spectroscopie infrarouge, on peut supposer qu'il s'agit là de la fraction d'acide palmitique non complexée au calcium. Le fait que la région d'intérêt soit bleue, souligne que l'acide palmitique est en faible proportion dans la phase lo, en accord avec ce qui est observé par spectroscopie infrarouge où il a été proposé que la composition de la phase lo s'approche d'un mélange CER III/Chol.

Cependant, le thermotropisme moyen et local des céramides III et du cholestérol n'est que peu affecté par la présence de calcium. Le paramètre d'ordre I_{2880}/I_{2850} , autant par l'hétérogénéité de sa distribution (figure 4.15), que par l'entropie topographique des cartes qui en résultent, évolue de façon comparable avec ou sans calcium. De même, le paramètre définissant la distribution des céramides en rapport au cholestérol, $I_{v2850}/(I_{v2850} + I_{v2935})$, quoi que systématiquement supérieur d'un point de vue entropique, subit une transition entre 45 et 55 °C suivant la perte de structure d'orthorhombique. Ces résultats sont aussi en accord avec le comportement moyen du mélange discuté dans la section 4.2.

Puisqu'il n'existe pas actuellement d'information quant à la concentration locale de Ca^{2+} dans le SC, le choix de la concentration utilisée pour cette étude est arbitraire. Les mesures de concentration publiées sont rapportées en calcium total par masse d'épiderme incluant à la fois le calcium intra et extra cellulaire. De plus, si les profils de gradients dans l'épiderme sont semblables (Forslind, 1987 ; Menon et al., 1985 ; Tanojo et Maibach, 1999), les valeurs absolues de calcium présent dans le SC varient de 800 mg/kg (Tanojo et

Maibach, 1999), à 400 mg/kg (Forslind, 1987), et 160 mg/kg (Elias et al., 1998). Il est possible que la concentration en calcium dans cette étude soit de beaucoup supérieure à ce qui est réellement présent dans les structures lamellaires du SC. Ce choix permet cependant l'amplification des phénomènes en jeux et leur identification, ce qui pourrait être difficile autrement. Lors de l'extrapolation des conclusions vers des implications dans les systèmes réels, il est important de garder en tête qu'il s'agit d'un modèle dont la portée est limitée notamment par ce choix.

En conclusion, on peut retenir des résultats de microscopie Raman sur le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol avec et sans calcium que :

- a) Il a été possible d'observer une séparation de phase dont les domaines sont de l'ordre du μm . Cependant, la morphologie des domaines est un paramètre sensible qui semble être influencé notamment par les longueurs de chaînes des céramides.
- b) À basse température, il y a une séparation de phase semblable à ce qui est observé pour le mélange sans Ca^{2+} malgré l'absence d'empilement orthorhombique de PA-d₃₁.
- c) La présence de Ca^{2+} affecte grandement la distribution de PA-d₃₁ dans le mélange et induit une séparation de phase sur une plus grande plage de température.
- d) Une faible fraction de PA-d₃₁ non complexé au calcium semble se mélanger aux CER III et Chol pour former un mélange passant par une phase lo puis fluide-

désordonnée, excluant la fraction majoritaire d'acide palmitique complexé à l'ion et très ordonné.

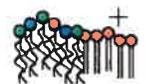
CER III/PA- d_{31} /	45 60 T (°C) →		
Chol	Séparation de phase Domaines cristallins orthorhombique (μm) 	Confirmation de la fonte concertée de PA et CER	Mélange homogène Désordre conformationnel 
L'acide gras reste protoné sur toute la gamme de température			
Chol/ Ca^{2+}	Séparation de phase Domaines cristallins 	Fonte de CER	Conservation de l'ordre conformationnel de PA Mélange non-homogène 
Complexation des ions calcium à l'acide gras			

Tableau VIII : Résumé des différentes phases et organisation du mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) avec et sans calcium en fonction de la température.

5. ÉTUDE DE L'EFFET DU SULFATE DE CHOLESTÉROL SUR LE THERMOTROPISME DES MÉLANGES MODÈLES DU SC PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET MICROSCOPIE RAMAN

Dans le chapitre qui suit, nous nous sommes attardés à l'impact de la partie polaire du stérol dans le comportement des mélanges modèles du SC en remplaçant le cholestérol par du sulfate de cholestérol. Le sulfate de cholestérol est un précurseur du cholestérol dont le groupement sulfate est clivé enzymatiquement pour être remplacé par un groupement hydroxyle (Duindam et al., 1995 ; Yarkley et Summerly, 1981 ; Öhman et Vahlquist, 1998). De la même façon que précédemment, le thermotropisme global des lipides est caractérisé par le biais de la spectroscopie infrarouge et les hétérogénéités locales au moyen de la microscopie Raman.

5.1. Thermotropisme par spectroscopie infrarouge

5.1.1. Résultats

La variation de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des céramides et de l'acide gras est rapportée à la figure 5.1 pour les mélanges CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) sans et en présence de calcium. Le choix des échelles permet une comparaison directe avec les résultats obtenus pour des mélanges contenant du cholestérol (figure 4.1).

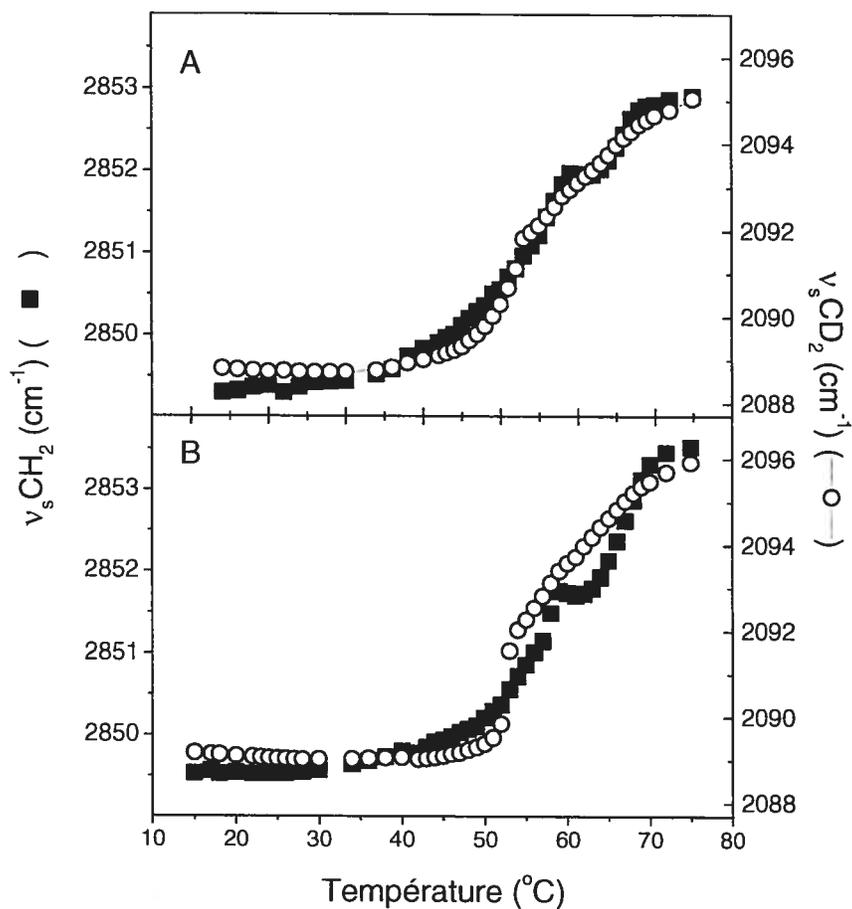


Figure 5.1 : Variation de la position de la bande $\nu_s\text{CH}_2$ (■) et $\nu_s\text{CD}_2$ (○) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A) et en présence de calcium (B).

Les résultats de la figure 5.1.A pour le mélange ternaire CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) sans calcium sont similaires aux résultats obtenus précédemment par Velkova (Velkova, 2000). À basse température, les fréquences $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ se trouvent sous 2850 et 2090 cm^{-1} respectivement, ce qui est caractéristique d'une phase cristalline (Moore et al., 1997a ; Moore et al., 1997b). À mesure que la température augmente, on observe une augmentation simultanée des fréquences. Dans le cas des céramides, une première transition a lieu à 45 °C, suivie à 58 °C d'un plateau à une fréquence de 2851,8 cm^{-1} s'étendant sur une plage de près de 5 °C. Cette valeur est de l'ordre de celle obtenue pour la phase identifiée comme étant la phase lo dans le mélange ternaire équimolaire CERIII/PA-d₃₁/Chol en absence de calcium (chapitre précédent et (Lafleur, 1998). Puis une seconde transition débute à 63 °C, menant à 75 °C, à une fréquence de 2853 cm^{-1} , signifiant une phase fluide désordonnée (Mantsch et McElhaney, 1991). L'acide palmitique subit quant à lui une première transition autour de 45 °C, telle qu'observée pour le mélange CERIII/PA-d₃₁/Chol sans calcium (figure 4.1.A). Cependant, la présence d'un plateau associé à la phase lo n'est pas observable, laissant place à un déplacement en pente douce jusqu'à 2095 cm^{-1} , typique d'une phase fluide désordonnée (Mantsch et McElhaney, 1991). L'ajout de calcium au mélange (figure 5.1.B), affecte peu le thermotropisme du mélange CER III/PA-d₃₁/Schol. Les seules différences significatives sont les fréquences des $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ à haute température qui sont supérieures à celles du mélange précédent à 2853,5 et 2096,0 cm^{-1} , traduisant un désordre plus important des chaînes alkyles dans le mélange en présence de calcium à 75 °C.

Les figures 5.2.A et 5.2.B montrent les spectres de la région des δCH_2 associée aux céramides, à 30 et 75 °C respectivement. La déconvolution des bandes ne permet pas d'obtenir un doublet aux deux températures. La variation de la largeur de la bande δCH_2 à 95 % de sa hauteur, sensible à la présence d'éclatement de bande, est rapportée à la figure 5.3.A et comparée aux valeurs obtenues dans le cas du mélange CERIII/PA-d₃₁/Chol. Les valeurs à basses températures des mélanges contenant du sulfate de cholestérol, de 4,5 à 3,1 cm^{-1} , indiquent une composante unique pour un empilement non orthorhombique (Moore et al., 1997a). L'augmentation de la largeur pour la plage de température allant de 55 à 75 °C est due au changement de la forme de la bande avec la fluidification des chaînes. La présence de calcium conduit aux mêmes conclusions, soit l'absence de l'empilement orthorhombique des chaînes des céramides sur toute la plage de températures observées.

Les figures 5.4.A et 5.4.B montrent les bandes δCD_2 à 30 et 75 °C pour le mélange équimolaire CERIII/PA-d₃₁/Schol. En absence de calcium, à basse température, on observe un dédoublement à 1091 et 1085 cm^{-1} , indiquant un empilement orthorhombique de l'acide gras deutéré (Philippot et al., 1995 ; Snyder et al., 1992). Une troisième composante, à 1089 cm^{-1} , signifiant un empilement hexagonal ou une phase fluide, est visible sur toute la gamme de températures observées. La simulation de bande est utilisée pour déterminer la contribution des bandes associées à l'empilement orthorhombique comparativement à la composante centrale. Les contraintes imposées pour la simulation sont celles décrites au chapitre précédent. La figure 5.5 permet de suivre l'évolution de rapport A_M/A_T en fonction de l'augmentation de la température. Les deux tracés, pour les mélanges avec et sans

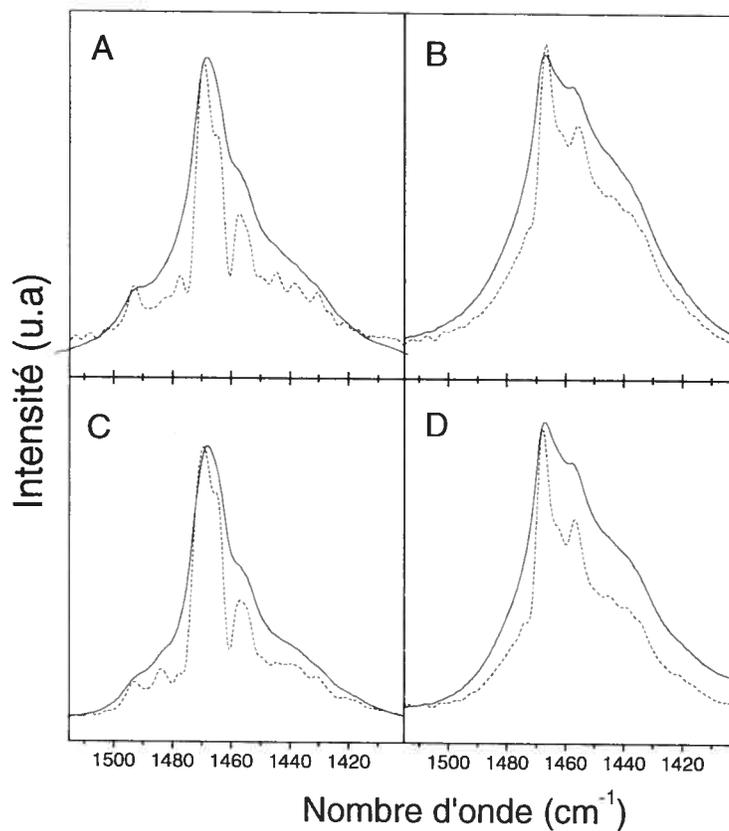


Figure 5.2 : Spectres infrarouges de la région δCH_2 (—) pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A-B), en présence de calcium (C-D), à 30 °C (A-C) et 75 °C (B-D). Résultat de la déconvolution du spectre brut (...).

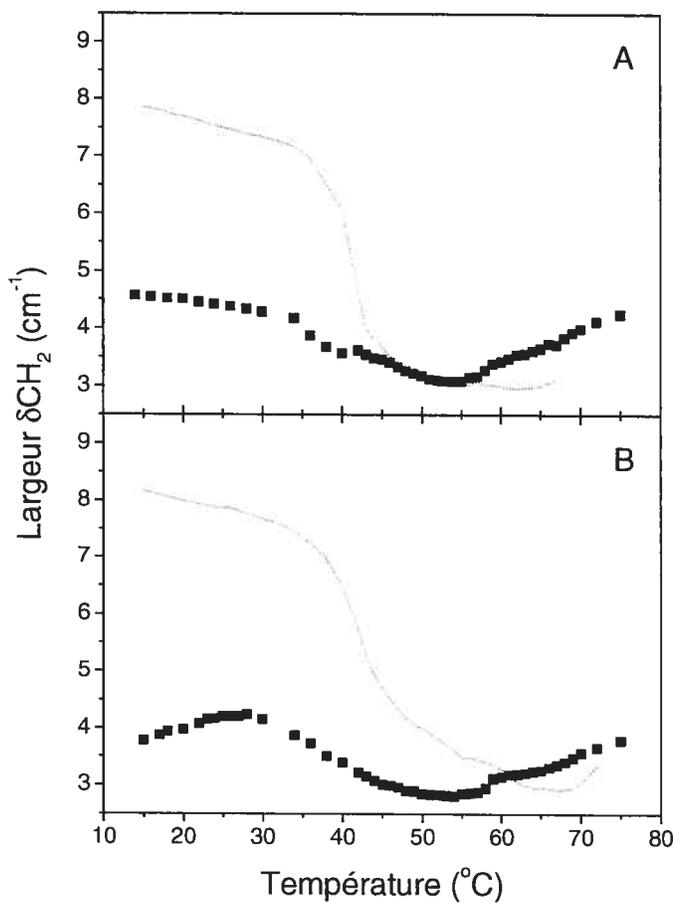


Figure 5.3 : Variation de la largeur de la bande δCH_2 à 95% de sa hauteur en fonction de la température pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A) et en présence de calcium (B). Comparaison avec le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol (1/1/1) dans les mêmes conditions (...).

calcium, sont superposables. À basse température, le rapport est de 0,25. Entre 50 et 60 °C, la valeur de A_M/A_T augmente subitement pour atteindre 0,92 lors de la perte de l'empilement orthorhombique.

Les régions spectrales comprenant les modes ν_{COOH} de l'acide palmitique et Amide I' des céramides, de 1750 à 1500 cm^{-1} , à 30 et 75 °C, sont présentées à la figure 5.6. On remarque, à basse température, la présence des trois composantes Amide I' attribuées à divers patrons de liens hydrogène impliquant la tête polaire des céramides (Lafleur, 1998). Pour les mélanges contenant du sulfate de cholestérol, avec et sans calcium, l'augmentation de la température donne lieu à la disparition de cette structure de bande pour laisser place à une seule composante large vers 1620 cm^{-1} telle qu'observée pour le mélange équimolaire contenant du cholestérol. À toutes les températures, on remarque aussi la présence d'une bande à 1700 cm^{-1} attribuable au mode ν_{COOH} de l'acide protoné. Cette bande est toujours visible après l'ajout de calcium signifiant que la grande majorité de l'acide reste sous forme protonée et ne sert pas de site de complexation. Cette bande s'accompagne de très faibles contributions $\nu_{\text{COO-Ca}}$ à 1568, 1543 et 1531 cm^{-1} (figure 5.6.C), représentant moins de 12 % de l'aire combinée ν_{COOH} et $\nu_{\text{COO-Ca}}$. Il semble qu'une petite quantité seulement d'acide se complexe au calcium. À haute température, ces bandes sont remplacées par une seule contribution large à 1544 cm^{-1} (figure 5.6.D) contrairement au mélange contenant du cholestérol pour lequel la formation d'un complexe PA-Ca conduit à trois composantes dans la région $\nu_{\text{COO-Ca}}$ jusqu'à 75 °C.

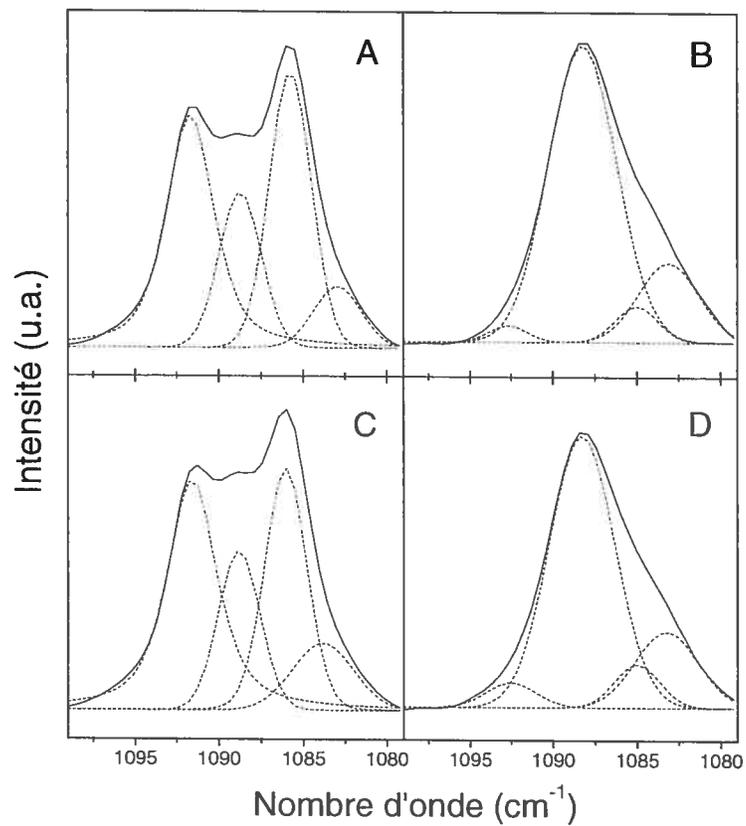


Figure 5.4 : Spectres infrarouges de la région δCD_2 pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A-B), en présence de calcium (C-D), à 30 °C (A-C) et 75 °C (B-D).

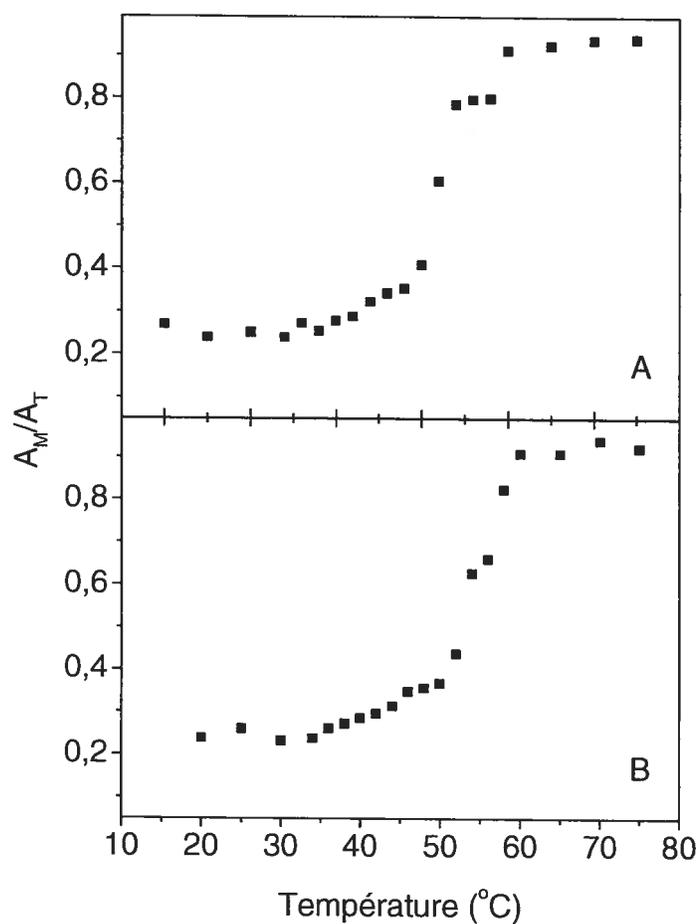


Figure 5.5 : Variation du rapport d'aire de la bande centrale δCD_2 (A_M) et de l'intensité totale des trois composante (A_T) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A) et en présence de calcium (B).

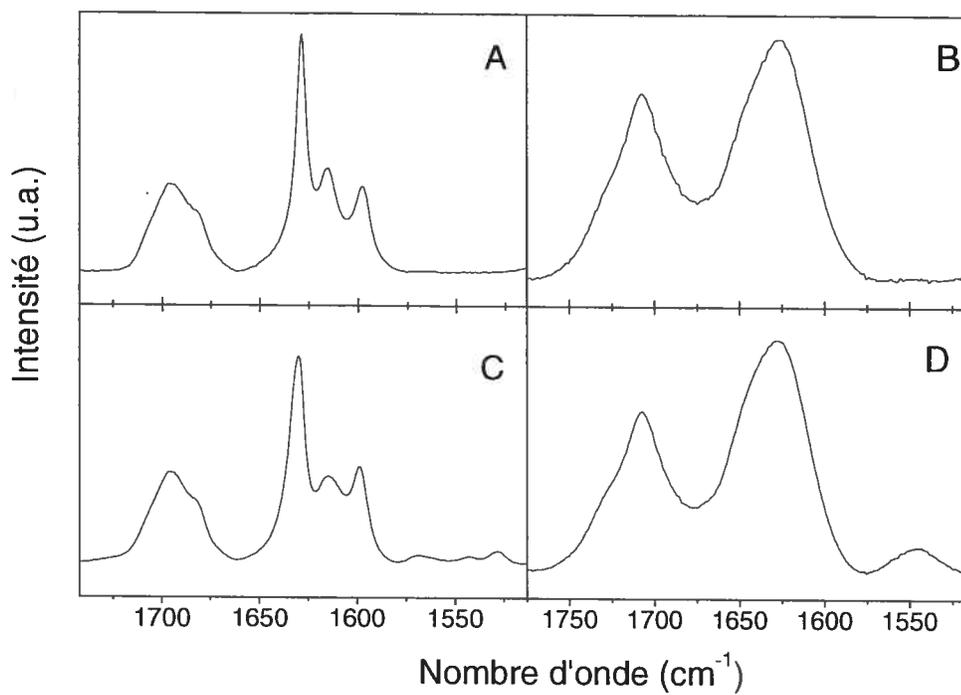


Figure 5.6 : Spectres infrarouges de la région amide I' et ν_{COO^-} en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/SChol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A-B) et en présence de calcium (C-D), à 30 °C (A-C) et 75 °C (B-D).

En résumé, le thermotropisme du mélange CER III/PA-d₃₁/Schol, est semblable à celui de CER III/PA-d₃₁/Chol. Les profils $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ du mélange contenant du sulfate de cholestérol sont similaires à ceux observés pour le mélange contenant du cholestérol (figure 4.1.A et 5.1.A). De plus, le comportement du mélange est peu affecté par le calcium. Ceci pourrait être dû au fait qu'en présence de sulfate de cholestérol, l'acide palmitique n'est pas le site de complexation des ions calcium. Il est possible que l'association du groupement sulfate avec l'ion divalent soit plus forte que pour le groupement carboxylique de l'acide palmitique. À basse température, les céramides et l'acide palmitique deutéré sont très ordonnés, tels qu'illustrés par les bandes $\nu_s\text{CH}_2$, $\nu_s\text{CD}_2$, ν amide I' et ν_{COOH} . La séparation de phase de l'acide gras dans un empilement orthorhombique est indiquée par la bande δCD_2 (figure 5.4). Cependant, une fraction ne possède pas un empilement orthorhombique, ce que souligne le rapport A_M/A_T . Dans le cas des céramides, la bande δCH_2 (figure 5.2 et 5.3), indique l'absence d'un empilement orthorhombique à basse température. À la manière du cholestérol, le sulfate de cholestérol semble permettre la promotion d'une phase de type lo à 60 °C comme le suggère le plateau des fréquences $\nu_s\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CD}_2$ (Lafleur, 1998). À haute température, le mélange atteint finalement une phase désordonnée.

5.2. Thermotropisme par microscopie Raman

5.2.1. Résultats

5.2.1.1. Étude de la distribution spatiale en fonction de la température

Comme précédemment, les cartes obtenues sont d'une dimension de $40 \times 40 \mu\text{m}$ pour des sauts de $3 \mu\text{m}$ entre deux acquisitions spectrales successives pour un total de 196 spectres (chapitre 4). Le spectre du sulfate de cholestérol n'étant pas différent de celui du cholestérol dans la région νCH , le traitement spectral développé au chapitre 4 est appliqué.

La figure 5.7 montre l'enrichissement et l'appauvrissement local par rapport aux moyennes dans l'échantillon composé de CER III/PA- d_{31} /Schol sans calcium par le biais des paramètres $A_{\nu\text{CD}} / (A_{\nu\text{CH}} + A_{\nu\text{CD}})$ et $I_{\nu 2850} / (I_{\nu 2850} + I_{\nu 2935})$. Les histogrammes de ces paramètres montrent à basse température des distributions larges de plus de 1,5 et 0,3 unité à la base. Ces valeurs témoignent d'une séparation de phase entre l'acide deutéré et les deux autres lipides du mélange (figure 5.7.A), ainsi que de domaines enrichis en céramides en regard de la concentration en cholestérol (figure 5.7.G). Ces enrichissements sont de l'ordre de grandeur de ce qui est observé pour le mélange CER III/PA- d_{31} /Chol. Avec l'augmentation de la température, on assiste à une décroissance de la largeur des distributions signifiant une homogénéisation du mélange. Il y a un

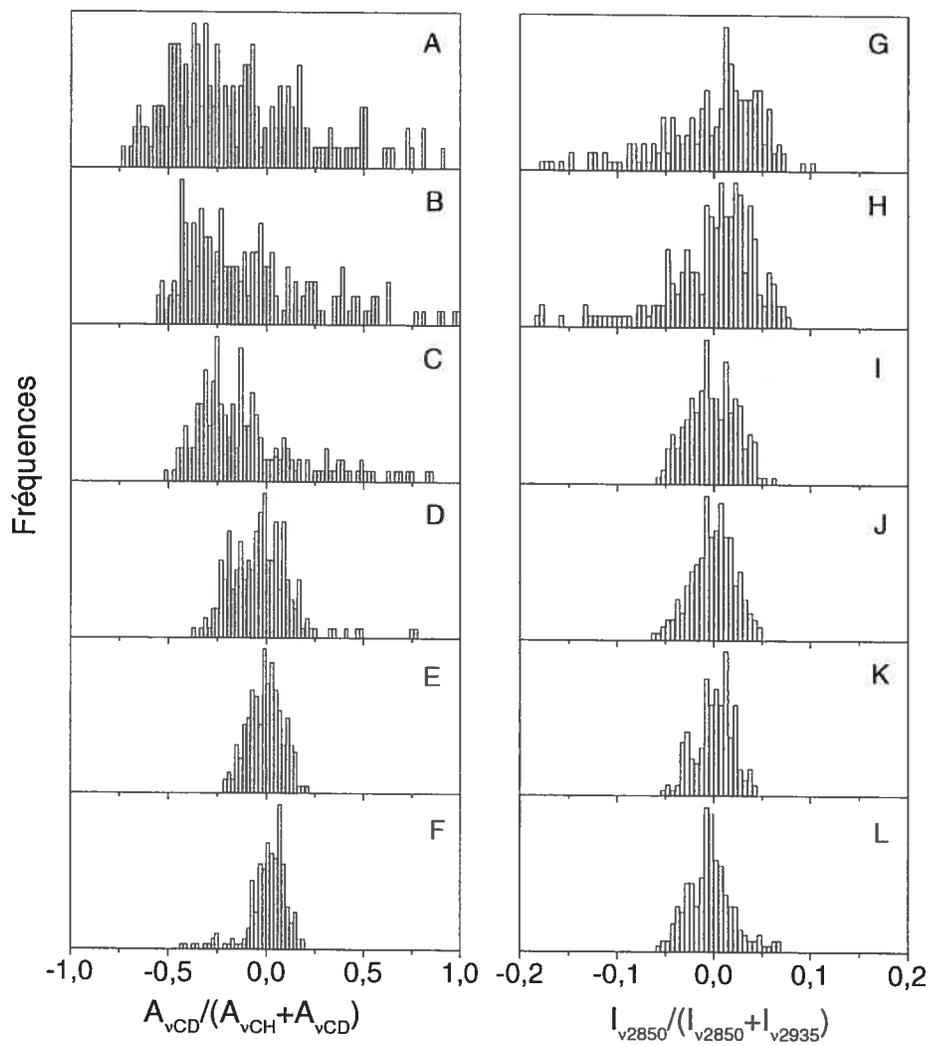


Figure 5.7 : Distributions de PA-d₃₁ (A-F) et des CER III/Chol (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L).

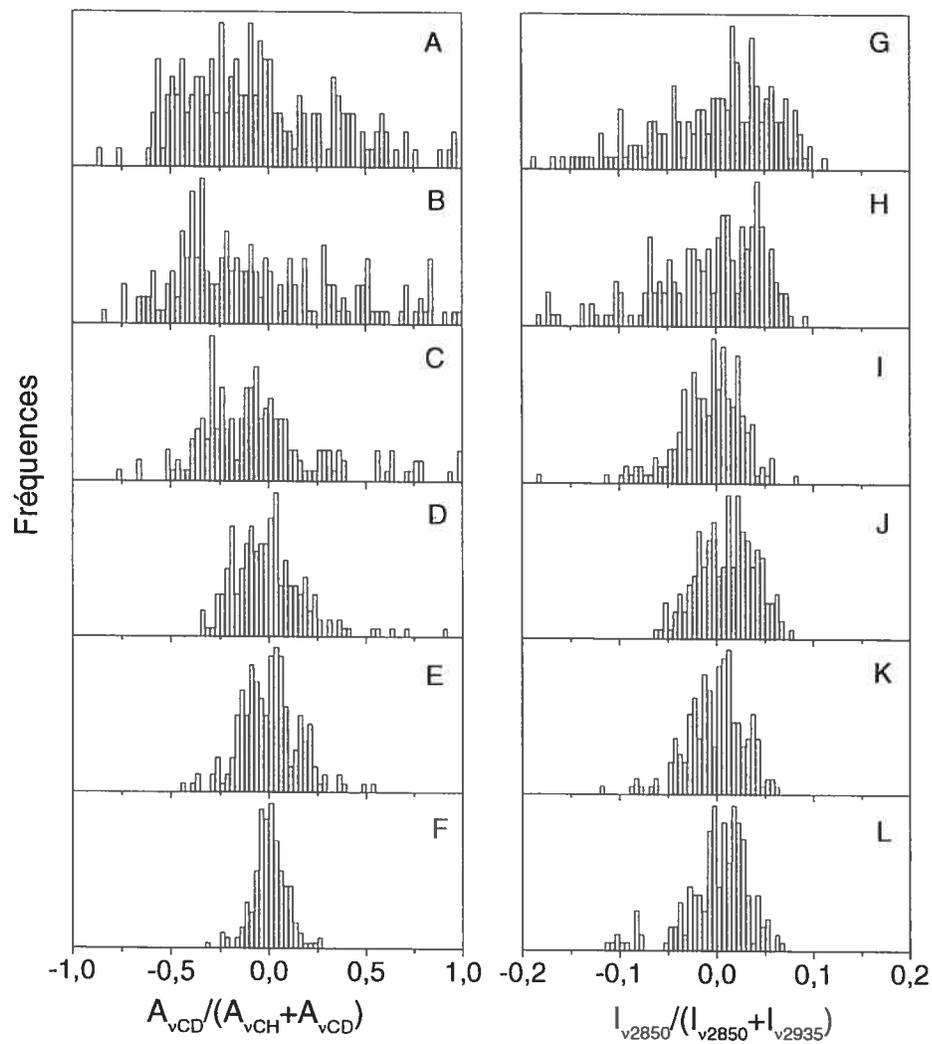


Figure 5.8 : Distributions de PA-d₃₁ (A-F) et des CER III/Chol (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en présence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L).

changement plus important de la largeur de l'histogramme entre 45 et 55 °C pour PA-d₃₁ (figure 5.7.C-D), alors que l'homogénéisation des céramides et du cholestérol semble être plus importante entre 35 et 45 °C (figure 5.7.H-I). La présence de calcium ne change pas de manière significative la distribution des lipides et les histogrammes résultants sont semblables (figure 5.8).

Les figures 5.9 et 5.10 montrent la distribution dans l'espace des enrichissements et appauvrissements discutés ci-haut. Les échelles de couleurs sont celles utilisées pour les figures 4.16 et 4.17. Les images à basses températures montrent des points enrichis représentant les séparations de phase pour l'acide palmitique (figure 5.9.A-F) et les céramides par rapport au cholestérol (figure 5.9.G-L). Les domaines semblent de tailles réduites en comparaison du mélange avec cholestérol, de l'ordre de quelques μm seulement. Ces domaines restent visibles avec l'augmentation de la température pour ensuite laisser place à un mélange homogène à partir de 65 °C, tel que décrit par le paramètre $A_{V_{CD}} / (A_{V_{CH}} + A_{V_{CD}})$. Une hétérogénéité plus importante semble cependant être conservée dans le cas du paramètre $I_{V_{2850}} / (I_{V_{2850}} + I_{V_{2935}})$. Les résultats obtenus pour le mélange en présence de calcium sont similaires (figure 5.10).

L'entropie topographique (figure 5.11) confirme que les mélanges avec et sans calcium suivent le même profil avec l'augmentation de la température, avec un désordre légèrement supérieur lorsque l'ion divalent est présent. Bien que les valeurs absolues ne

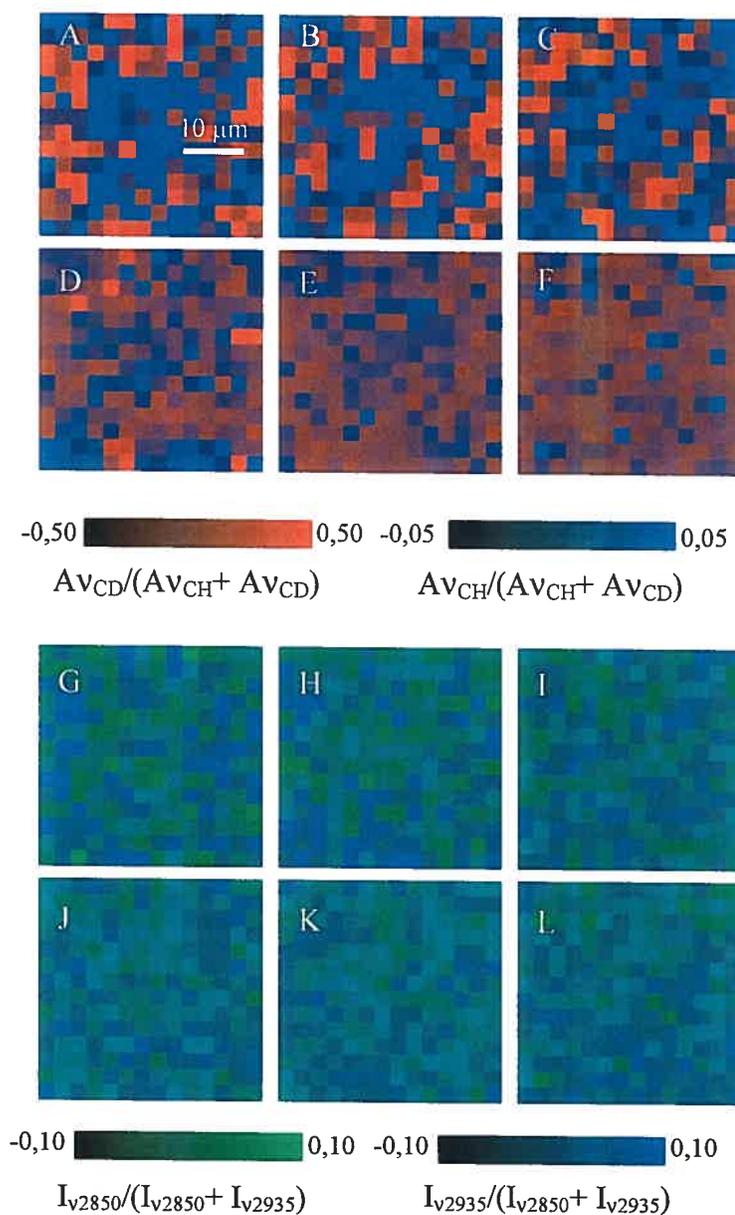


Figure 5.9 : Cartes de la distribution de PA-d₃₁ par rapport à la moyenne (A-F) et des CER III/ Chol par rapport à la moyenne (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L). Images de 40 × 40 μm pour des sauts de 3 μm.

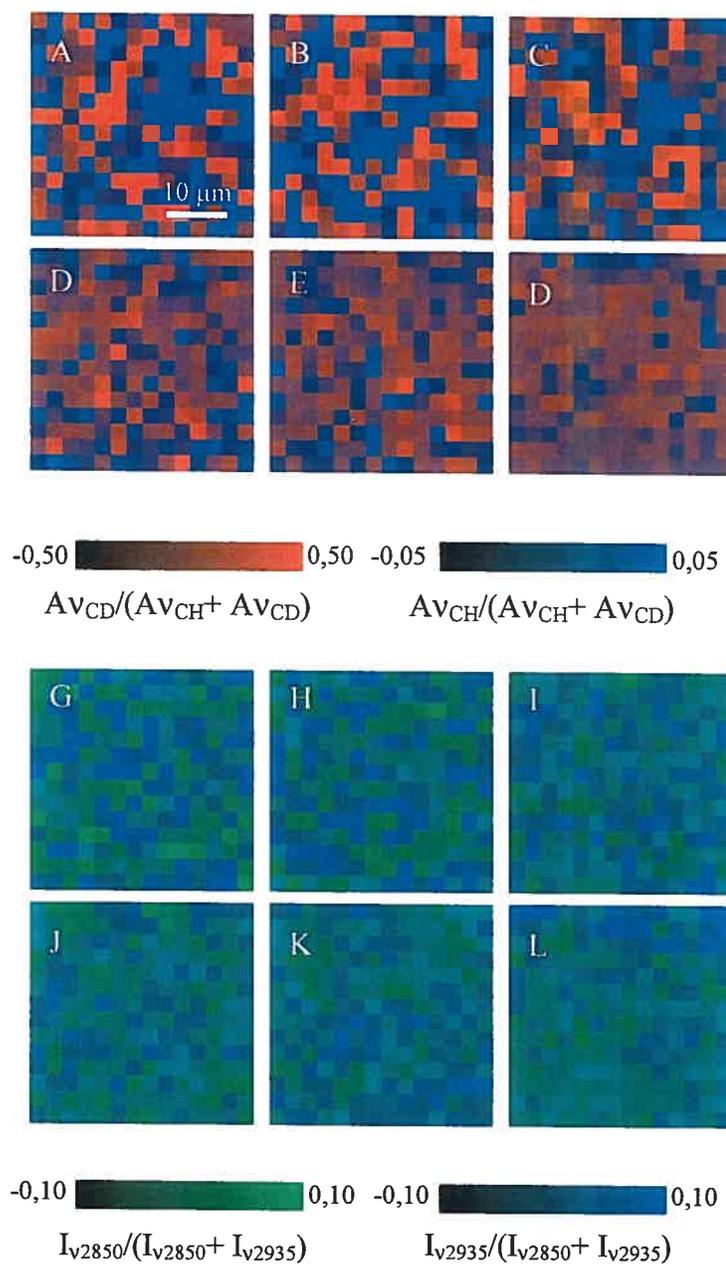


Figure 5.10 : Cartes de la distribution de PA-d₃₁ par rapport à la moyenne (A-F) et des CER III/ Chol par rapport à la moyenne (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en présence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L). Images de 40 × 40 μm pour des sauts de 3 μm.

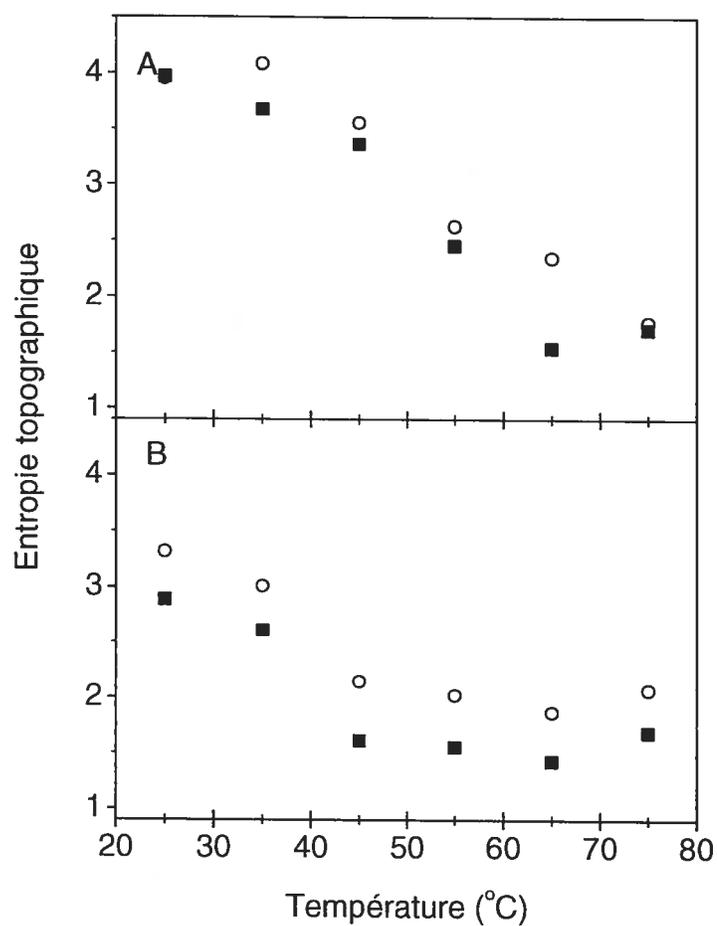


Figure 5.11 : Variation de l'entropie topographique de PA-d₃₁ (A) et des céramides sur le cholestérol (B) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence (■) et en présence de calcium (○) (n=1).

peuvent être comparées directement entre ces deux paramètres, on peut remarquer une variation d'entropie différente pour les paramètres $A_{\nu_{CD}} / (A_{\nu_{CH}} + A_{\nu_{CD}})$ et $I_{\nu_{2850}} / (I_{\nu_{2850}} + I_{\nu_{2935}})$. En effet, si l'acide gras s'homogénéise, les cartes de distribution des céramides en rapport au cholestérol montrent une chute d'entropie entre 35 et 45 °C pour ensuite conserver une valeur élevée autour de 1,8 unité, et ce, jusqu'à 75 °C.

5.2.1.2. Étude de l'ordre conformationnel en fonction de la température

L'évolution du $\Delta\nu_{sCD_2}$, et du rapport I_{2850}/I_{2880} sur les spectres moyens en fonction de la température est rapportée à la figure 5.12. Les échelles sont celles utilisées précédemment et permettent une comparaison directe entre les deux paramètres et les résultats décrits plus tôt. Le thermotropisme obtenu est conforme aux résultats obtenus par spectroscopie infrarouge, les deux mélanges, avec et sans calcium, se comportant de manière similaire. À basse température, les valeurs de $\Delta\nu_{sCD_2}$, de 17,5 et 15 cm^{-1} pour les deux mélanges, sont la signature d'une phase ordonnée. Les considérations se rapportant à l'influence de la contribution spectrale du cholestérol sur le rapport de bande I_{2880}/I_{2850} s'appliquent aussi pour le sulfate de cholestérol puisque la contribution dans la région ν_{CH} est la même. Ainsi, les rapports I_{2850}/I_{2880} bruts de 1,33 et 1,41 deviennent 1,47 et 1,58 lorsque la contribution du stérol est soustraite. Ces dernières valeurs sont caractéristiques d'une phase cristalline (Bunow et Levin, 1977). À partir de 45 °C, on peut observer une transition de phase conduisant à un état fluide désordonné à 75 °C avec des largeurs de

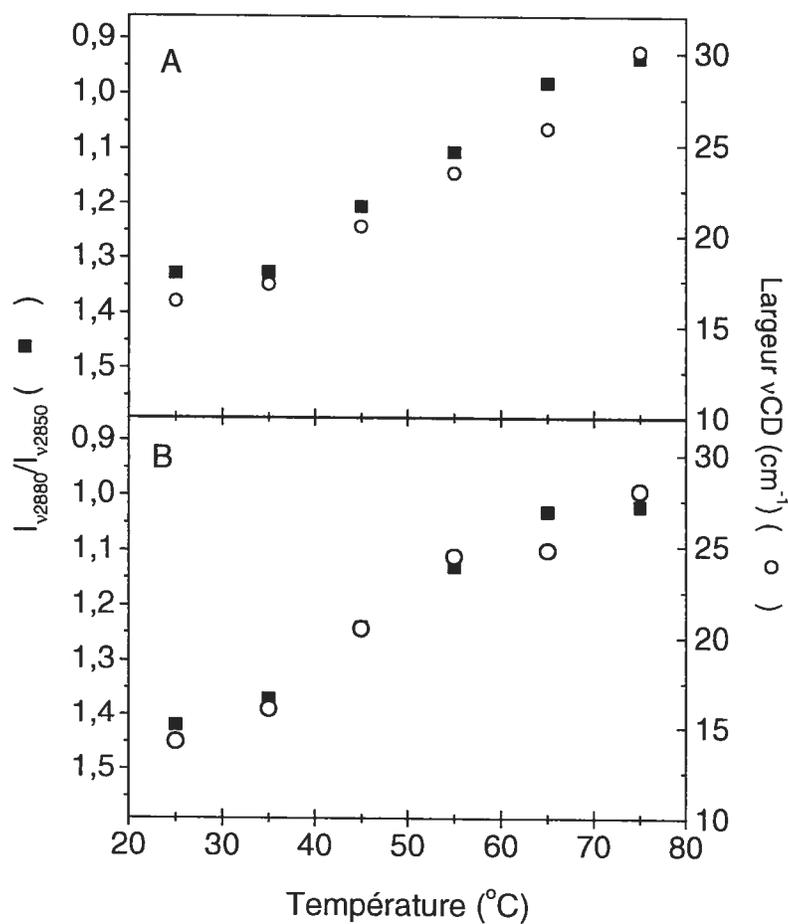


Figure 5.12 : Variation du rapport d'intensité des bandes ν_{CH} 2880 et 2850 cm^{-1} (■) et de la largeur de bande ν_{CD} à 2096 cm^{-1} (○) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃I/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (A) et en présence de calcium (B).

bandes entre 27 et 30 cm^{-1} pour l'acide gras, et un rapport de bande entre 1,35 et 1,45 pour les céramides, tels qu'observés pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol.

Les histogrammes permettent de connaître la distribution autour des moyennes. Ainsi, les figures 5.13 et 5.14 illustrent l'évolution de l'hétérogénéité de l'ordre conformationnel des chaînes lipidiques en fonction de la température pour les mélanges CER III/PA-d₃₁/Schol avec et sans calcium respectivement. Pour le mélange sans calcium, les distributions du rapport I_{2850}/I_{2880} sont constantes avec une largeur à la base d'environ 0,2 unité pour toutes les températures autour des moyennes. Les moyennes des histogrammes coïncident avec les valeurs obtenues pour le comportement global du mélange (figure 5.13.A-F).

Pour ce qui est de l'ordre conformationnel de l'acide palmitique, la largeur de bande vCD à 2096 cm^{-1} montre une distribution qui n'est pas une distribution normale autour de la moyenne à 25 et 35 °C. Quelques pixels possèdent un ordre plus grand allant jusqu'à des valeurs approchant 27 cm^{-1} . À 45, 55 et 65 °C les distributions sont d'environ 10 cm^{-1} à la base de part et d'autre de la moyenne. Puis à 75 °C, on remarque que la grande majorité des points est située à 30 cm^{-1} , suggérant un mélange homogène de lipides fluides.

La présence du calcium ne modifie pas le profil des distributions d'ordre conformationnel en fonction de la température des lipides (figure 5.14). Pour les céramides III, la largeur des distributions varie peu, de 0,3 à 0,2 unité entre 25 et 75 °C. De même,

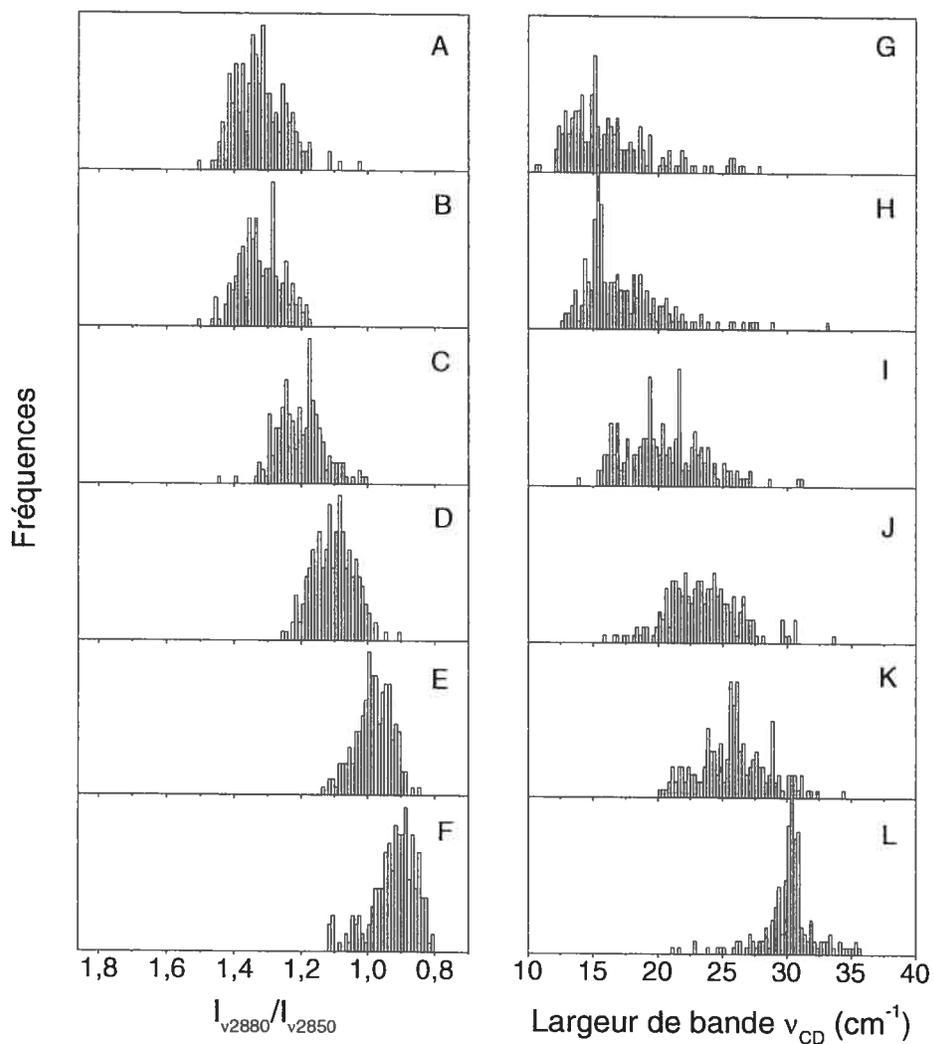


Figure 5.13 : Distributions de l'ordre conformationel des chaînes alkyles des CER III (A-F) et de PA-d₃₁ (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L).

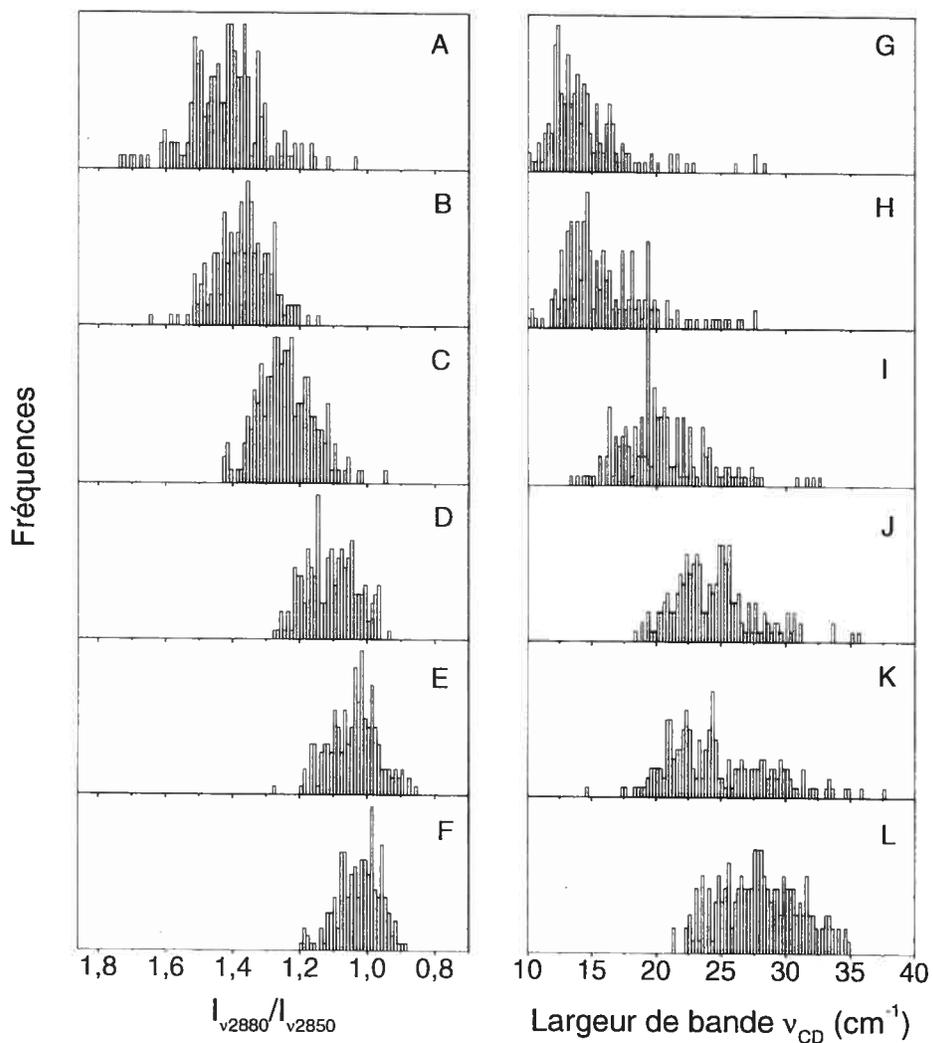


Figure 5.14 : Distributions de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III (A-F) et de PA-d₃₁ (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en présence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L).

dans le cas de l'acide palmitique, pour 25 et 35 °C, les distributions de la bande vCD sont légèrement asymétriques autour des moyennes, avec quelques valeurs élevées allant jusqu'à 27 cm^{-1} . Par la suite, les distributions sont normales autour des valeurs caractérisant le comportement moyen du mélange avec une hétérogénéité de $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$ tel qu'observé pour le mélange sans calcium. Seule la distribution à 75 °C diffère avec une distribution principalement regroupée autour de 30 cm^{-1} .

Les images permettent de caractériser la disposition spatiale des hétérogénéités en terme d'ordre des chaînes alkyles (figure 5.15 et 5.16). Les échelles de couleurs sont choisies de telle façon que les lipides d'un point sombre sont dans une phase ordonnée alors que les lipides d'un point de couleur vive sont dans une phase fluide. Les deux mélanges montrent la même évolution en fonction de la température. Avec l'augmentation de la température, les cartes deviennent globalement plus colorées, donc des lipides plus désordonnés, sans qu'aucune structure particulière ne se forme comme dans le cas du mélange CER III/Pa-d₃₁/Chol en présence et en absence d'ions calcium.

L'entropie topographique indique que les deux mélanges possèdent une entropie constante pour ce qui a trait au paramètre d'ordre de l'acide palmitique deutéré avec une valeur autour de 3,5. Dans le cas du paramètre I_{2880}/I_{2850} , l'entropie topographique diminue de façon constante pour les deux mélanges avec des valeurs supérieures en présence de calcium.

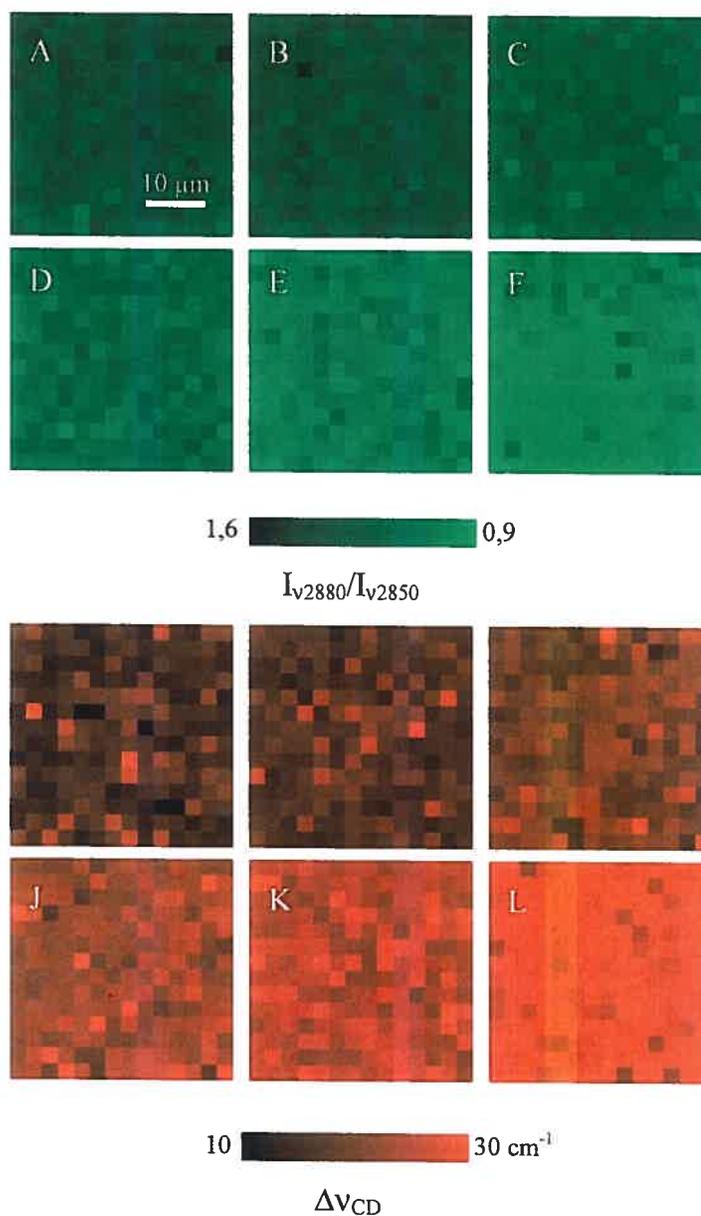


Figure 5.15 : Cartes de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III (A-F) et de PA-d₃₁ (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L). Images de 40 × 40 μm pour des sauts de 3 μm.

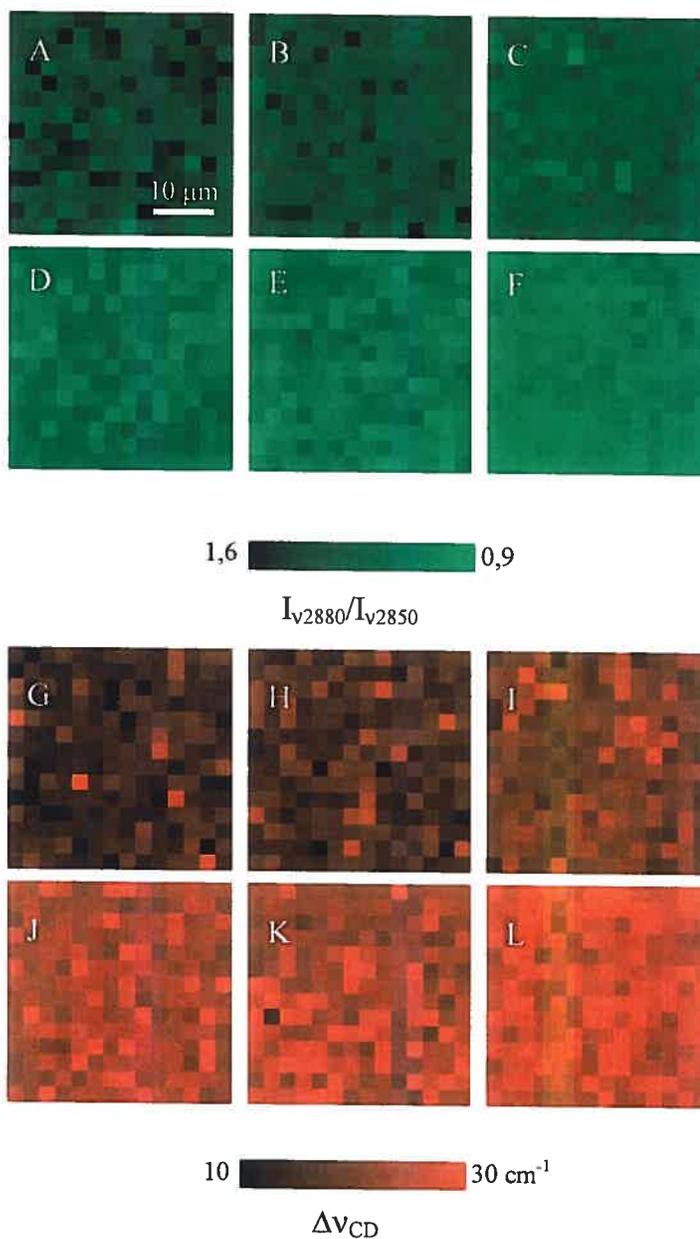


Figure 5.16 : Cartes de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles des CER III (A-F) et de PA-d₃₁ (G-L) pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1: :1) à pH 5,2 en présence de calcium à 25 (A,G), 35 (B,H), 45 (C,I), 55 (D,J), 65 (E,K), 75 °C (F,L). Images de 40 × 40 μm pour des sauts de 3 μm.

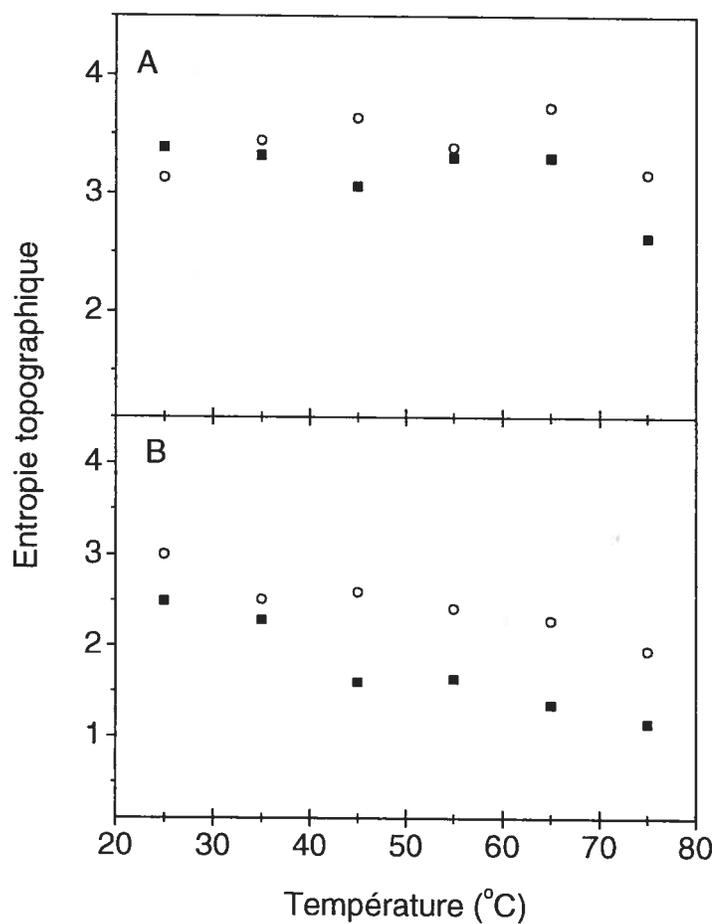


Figure 5.17 : Variation de l'entropie topographique de l'ordre conformationnel des chaînes alkyles de PA-d₃₁ (A) et des CER III (B) en fonction de la température pour le mélange CER III/PA-d₃₁/Schol (1/1/1) à pH 5,2 en absence de calcium (■) et en présence de calcium (○).

En résumé, la microscopie Raman confirme que le thermotropisme des lipides des mélanges CER III/PA-d₃₁/Schol n'est pas influencé par la présence de calcium. Il est aussi possible de confirmer la présence d'une séparation de phases des trois composantes du mélange à basse température, et ce, par le biais des paramètres $A_{VCD} / (A_{VCH} + A_{VCD})$ et $I_{V2850} / (I_{V2850} + I_{V2935})$ (figure 5.7 à 5.10).

5.3. Discussion

À la lumière de nos résultats, le comportement du mélange CER III/PA-d₃₁/Schol sans calcium est semblable à celui du mélange CER III/PA-d₃₁/Chol décrit au chapitre 4. Ce résultat a déjà été publié par Velkova (Velkova, 2000) à la différence qu'il y est rapporté que les céramides possèdent un empilement orthorhombique à basse température. Ceci n'est pas observé pour nos mélanges. Il est possible que la distribution des longueurs de chaînes soit, cette fois encore, responsable de cette différence. Comme le montrent les résultats de Kwak et Lafleur (Kwak et Lafleur, communication personnelle), il semble que la formation de domaines cristallins de céramides soit plus importante dans le cas de céramides synthétique dont la chaîne alkyle est de même longueur. Il est possible qu'une grande hétérogénéité des chaînes conduise à l'incapacité du mélange à former un empilement compact orthorhombique.

Le sulfate de cholestérol permet la formation de la phase lo dans le mélange équimolaire CER III/PA-d₃₁/Schol. Le sulfate de cholestérol agit comme le cholestérol sur

des mélanges de phospholipides (Grimelec et al., 1984) et de sphingolipides (Kitson et al., 1992), en réduisant l'ordre conformationnel en deçà de T_m , mais augmentant l'ordre au-delà de T_m et permet la formation de phase l_0 (Kitson et al., 1992). Pour des phases l_0 ou L_α , on rapporte que l'augmentation de l'ordre conformationnel est cependant moins importante dans le cas des mélanges contenant du sulfate de cholestérol comparativement au cholestérol. Selon nos observations, l'impact du sulfate de cholestérol sur l'ordre conformationnel de la phase l_0 est difficilement qualifiable puisque le thermotropisme des céramides dans le mélange CER III/PA-d₃₁/Chol est différent et ne montre pas clairement la présence d'un plateau comme dans le cas du mélange CER III/PA-d₃₁/Schol.

Le calcium a aussi pour effet de réduire l'ordre conformationnel des chaînes des céramides de la phase identifiée de type l_0 , entre 60 et 65 °C, d'environ 0,3 cm⁻¹. Précédemment, il a été proposé que la baisse de l'ordre conformationnel des céramides dans la phase l_0 est induite par une réduction de la fraction d'acide palmitique impliquée. Or, on remarque justement, en présence de calcium, trois composantes à 1568, 1543 et 1531 cm⁻¹ représentant environ 10 % de l'aire combinée des modes de vibrations associées au groupement carboxylique, ν_{COOH} et $\nu_{\text{COO-Ca}}$. En se rapportant aux conclusions précédentes, il est probable que cette fraction n'adopte pas un empilement orthorhombique et conserve un ordre conformationnel plus grand sur une plus grande plage de température. De même, on peut observer que l'acide gras possède d'une transition plus abrupte vers 52 °C comparativement à celle vers 50 °C dans le cas du mélange sans calcium (figure 5.1).

L'effet le plus remarquable du sulfate de cholestérol est que l'acide palmitique dans le mélange reste sous une forme protonée en présence de calcium. Ceci suggère que le sulfate de cholestérol devient le site de complexation de l'ion divalent par le biais d'une constante d'affinité plus grande. De plus, le thermotropisme du mélange CER III/PA-d₃₁/Schol est semblable en présence comme en absence de calcium. Ceci étaye l'idée selon laquelle le rôle du sulfate de cholestérol serait intimement lié à la présence d'ion calcium tel que proposée par le groupe d'Elias (Elias, 1983 ; Elias et al., 2004 ; Epstein et al., 1981 ; Rehfeld et al., 1986 ; Williams et al., 1983). Selon ce modèle simple, le calcium augmenterait la cohésion du SC en pontant les groupements sulfates chargés négativement présents à la surface des structures lamellaires contenant du sulfate de cholestérol. Ceci expliquerait le retard de desquamation dans le cas de l'ichtyose récessif lié à l'X. Parmi les résultats supportant ce mécanisme, Menon et al. (Menon et al., 1985) ont localisé par cytochimie la présence plus importante de Ca²⁺ dans les domaines intercellulaires du *stratum conjunctum* dans le cas d'ichtyose récessif lié à l'X que dans le cas de SC normaux.

Plusieurs travaux se sont penchés sur le rôle du sulfate de cholestérol dans le retardement du processus de desquamation (Elias et al., 2004 ; Strott et Higashi, 2003). Du point de vue de l'organisation lipidique, Bouwstra et al. ont montré que l'introduction de 10 % de sulfate de cholestérol dans un mélange CER/acide gras/Chol/Schol (Bouwstra et al., 2001 ; Bouwstra et al., 1999) conduit à la disparition du cholestérol cristallin ainsi qu'une modification des structures lamellaires. À cette concentration en sulfate de cholestérol, l'ajout de calcium permet de retrouver la structure lamellaire initiale, mais non

la même quantité de cholestérol cristallin. Les conclusions tirées de ces travaux sont que le sulfate de cholestérol augmente la solubilité du cholestérol dans le mélange. Le sulfate de cholestérol, dans le cas de l'ichtyose récessif lié à l'X, atteint plus de 10 % des lipides totaux du SC, dans un rapport Chol/Schol approchant (1/1) (Elias, 1983 ; Williams et al., 1983). La présente étude est une amplification de ce déséquilibre afin d'isoler l'influence du sulfate de cholestérol sur le thermotropisme et la formation de domaines. L'association du calcium au sulfate de cholestérol, en réduisant la rigidité des structures lamellaires, principalement de l'acide gras, pourrait possiblement rendre moins friables les structures lipidiques. Ce phénomène, en parallèle avec le pontage des groupements SO_4^- par les ions calcium, permettraient une plus grande cohésion du SC.

Il est à noter en dernier lieu que le sulfate de cholestérol augmente l'hydratation des mélanges. Bien que le phénomène n'a pas pu être quantifié, l'observation macroscopique des échantillons montre clairement un comportement différent, non cireux dans le cas des mélanges contenant du sulfate de cholestérol. Faure et Dufourc ont relevé que l'épaisseur et l'ordre conformationnel des bicouches d'un mélange d'un phosphatidylcholine et de sulfate de cholestérol, contrairement au mélange avec du cholestérol, était sensible à l'hydratation (Faure et Dufourc, 1997). Une investigation plus approfondie dans cette direction serait nécessaire afin de bien caractériser l'influence des stérols sur les mélanges modèles du SC.

CER III/PA-d ₃₁ /		50		65		T (°C) →
Schol	Séparation de phase Domaines cristallins orthorhombiques (μm)	Fonte concertée de PA et CER		Mélange homogène Désordre conformationnel		
Schol/Ca ²⁺						
L'acide gras reste protoné sur toute la gamme de température						

Tableau IX : Résumé des différentes phases et organisation du mélange CER III/PA-d31/Schol (1/1/1) avec et sans calcium en fonction de la température.

6. MICROSCOPIE RAMAN DE L'ÉPIDERME HUMAIN *IN VITRO*

La microscopie confocale Raman a été utilisée pour la mesure du profil de pénétration de divers agents transdermiques sur l'épiderme humain *in vitro* (Caspers et al., 2000 ; Caspers et al., 1998 ; Caspers et al., 2002 ; Edwards, 1998). Notre méthode s'inspire de ces développements récents dans l'usage de la spectroscopie confocale Raman pour caractériser l'épiderme et la pénétration transdermale. Les résultats ci-dessous ont pour objet de démontrer la faisabilité et la portée de la méthode développée.

6.1. Résultats

6.1.1. Spectres Raman de l'épiderme humain

La figure 6.1.A rapporte un spectre Raman d'un échantillon de peau humaine *in vitro* dans les régions d'intérêt, corrigé pour la fluorescence. L'intensité et la position de ces bandes correspondent à ce qui est rapporté dans la littérature pour un spectre de l'épiderme (Barry et al., 1992 ; Gniadecka et al., 1998 ; Williams et Barry, 1999 ; Williams et al., 1993). Entre 3100 et 2750 cm^{-1} , la région νCH permet d'observer des bandes intenses et étroites à 2880 et 2854 cm^{-1} correspondant aux modes $\nu_a\text{CH}_2$ et $\nu_s\text{CH}_2$ respectivement, ainsi qu'une bande associée aux groupements méthyles $\nu_s\text{CH}_3$ à 2930 cm^{-1} . Deux bandes plus faibles, de part et d'autre du massif, sont dues aux modes

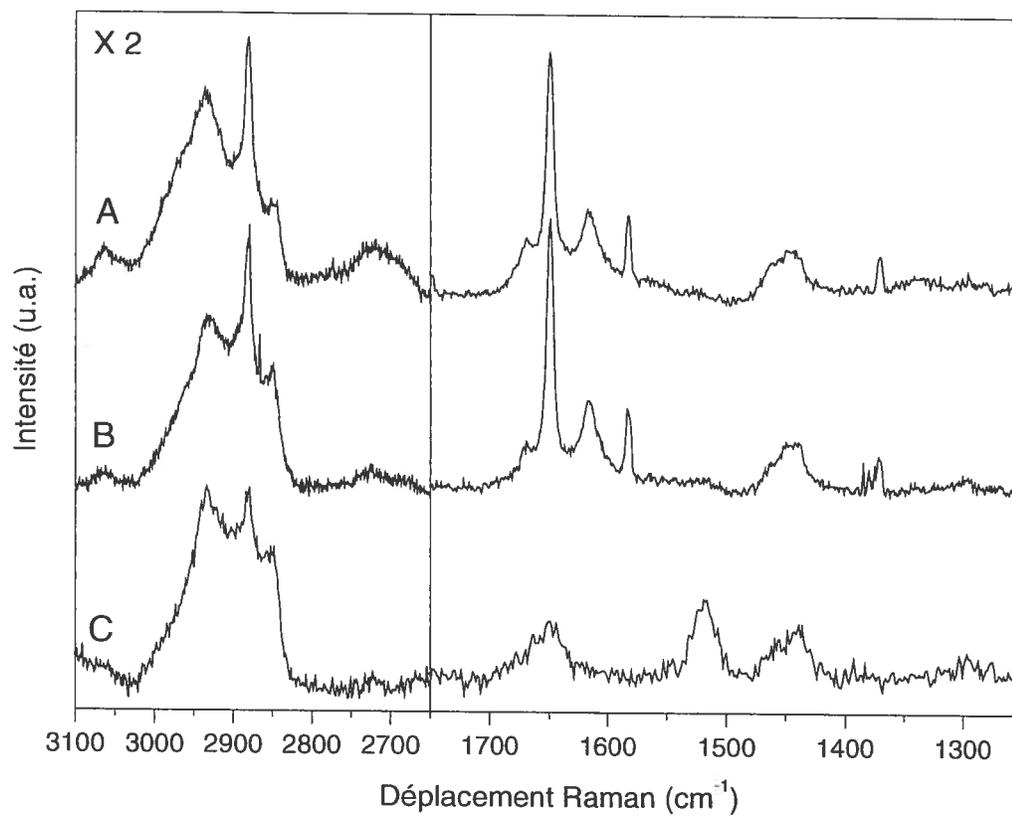


Figure 6.1 : Spectres Raman de peau (A) et d'épiderme humain (B-C) sur gel d'Agar. La longueur d'onde d'excitation est de 633 nm (A-B) et 514 nm (C).

ν CH oléfinique, à 3070 cm^{-1} . La seconde région du spectre, allant de 1750 à 1250 cm^{-1} , comporte une bande de grande intensité à 1649 cm^{-1} . Celle-ci est inhabituellement intense et étroite pour une bande Amide I. Cependant, il semble, comme discuté plus bas, que cette bande inclut en partie une contribution associée à de la résonance. De plus, cette bande s'avère très sensible aux traitements que subit l'échantillon de peau. De moindre intensité, on observe une bande étroite à 1582 cm^{-1} due au mode d'élongation $\nu\text{C}=\text{C}$ oléfinique, ainsi que deux bandes de déformation δCH_2 à 1448 et 1299 cm^{-1} . La bande à 1615 cm^{-1} pourrait être associée aux acides aminés tryptophane et tyrosine dont l'intensité serait amplifiée par une faible absorption de la lumière incidente à 633 nm . Cette bande n'est pas visible sur les spectres Raman enregistrés avec une source dans le proche infrarouge à 1064 nm (Edwards, 1998 ; Gniadecka et al., 1998 ; Osafa et al., 2004 ; Williams et al., 1993). Cette composante est présente dans le spectre de la laine, principalement formée de kératine dans une structure secondaire de type hélice- α (Parker, 1983). Faria et al. ont publié des spectres Raman de la peau obtenus avec une source laser de 633 nm sur lesquels cette bande n'est pas visible (Faria et Souza, 1999). Comme il sera discuté plus tard, cette bande est particulièrement sensible au mode de conservation de l'échantillon et particulièrement à l'hydratation. Or, ces résultats ont été obtenus pour un épiderme séché et ne permettent donc pas une comparaison directe avec nos résultats pour lesquels la conservation de l'hydratation de l'état natif des échantillons a été assurée.

Le spectre de la figure 6.1.A est obtenu sur un échantillon de peau fixé sur un gel d'Agar sans autre préparation. La présence de vaisseaux sanguins dans le derme et la

présence de gras rend la manipulation de la peau complète non aisée. Pour cette raison, plusieurs travaux sont faits sur l'épiderme thermiquement retiré du derme (Barry et al., 1992 ; Faria et Souza, 1999 ; Williams et al., 1993). Il s'agit de placer la peau dans un bain d'eau à 65 °C pour 45 s puis de peler l'épiderme (Kligman et Christophers, 1963). La figure 6.1.B montre que cette opération ne modifie pas le spectre Raman. L'épaisseur de l'épiderme est estimée à environ 100 µm (Schaefer et Redelmeier, 1996). La profondeur d'échantillonnage par microscopie Raman est quant à elle estimée à 100 µm selon l'opacité plus ou moins grande de l'échantillon (Fredericks, 2002). Ceci explique la similitude entre les spectres de peau complète et d'épiderme. Des mesures ont aussi été faites pour différents donneurs (n = 18) sans que des différences significatives dans les rapports d'intensité soient observables. Un constat similaire a été fait par Williams et al. (Williams et al., 1993). Cette similitude entre les spectres provenant d'individus différents peut s'expliquer en partie par le fait que les échantillons de peau proviennent de seins de femmes, permettant d'éviter les différences observées en spectroscopie Raman pour des parties du corps distinctes (Caspers et al., 1998 ; Darvin et al., 2005 ; Hata et al., 2000). La reproductibilité spectrale de la peau selon les individus a permis de distinguer les signatures spectroscopiques de certaines maladies de la peau comme le psoriasis (Osafa et al., 2004) ou les structures verruqueuses (Lawson et al., 1998).

Le choix de la longueur d'onde d'excitation influence l'aspect des spectres Raman selon que des phénomènes de résonance sont présents ou non. Ainsi, la figure 6.1.C illustre ceci avec un spectre de l'épiderme humain pour une source de 514 nm. On remarque que la

région amide I comprend une bande à 1651 cm^{-1} plus large et relativement moins intense que lorsque le spectre est enregistré avec le laser à 633 nm. En revanche, on peut voir une bande à 1520 cm^{-1} associée à la β -carotène présente dans la peau (Darvin et al., 2005 ; Hata et al., 2000). Le rapport I_{2880}/I_{2850} est aussi modifié, de 1,48 pour le spectre à 514 nm, une valeur caractéristique de conformères *trans* pour des chaînes alkyles (Mantsch et McElhaney, 1991) (voir section 4.2.1.2), et de 2,72 dans le cas du spectre à 633 nm. Cette différence est probablement expliquée par la présence d'une bande de résonance dans la région vCH dans le cas de spectres obtenus avec la source laser à 633 nm.

6.1.2. Effet du mode de conservation

Une attention particulière a été apportée au maintien de l'hydratation de l'épiderme tout au long des mesures spectroscopiques, tout en conservant la face extérieure exposée à l'air. Pour ce faire, un gel d'Agar à 1,5 % (p/v) est utilisé comme derme de remplacement. Placé dans un moule de Téflon perforé pour assurer un soutien mécanique, le gel est maintenu hydraté et permet un apport constant en eau par la base de l'épiderme qu'il soutient (figure 2.1.B et 2.2). Il a ainsi été possible de suivre par le biais de la bande d'eau en Raman, que l'hydratation des échantillons peut être maintenue durant plus de 48 heures (figure 6.2). Aucun changement macroscopique ou spectroscopique de l'épiderme n'est visible durant cette période.

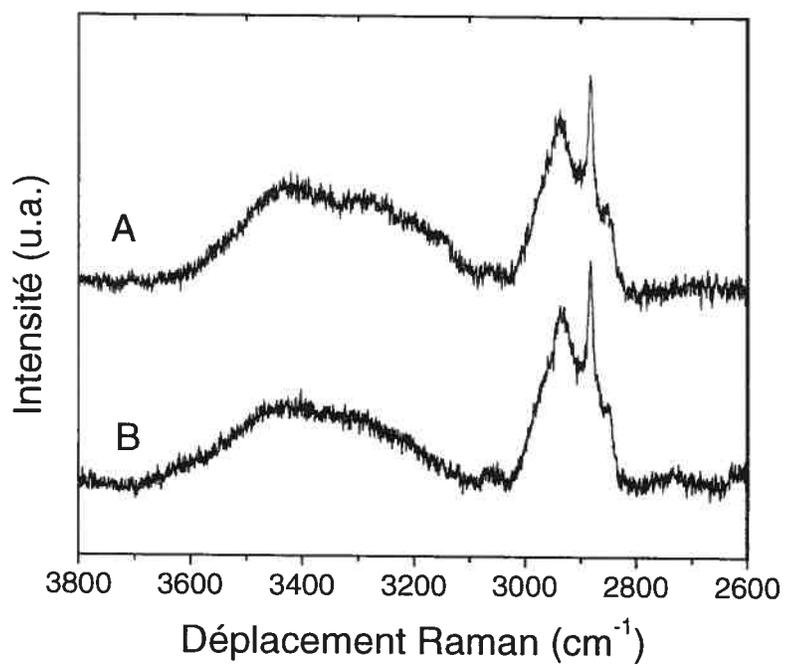


Figure 6.2 : Spectres Raman de l'épiderme sur gel d'Agar, 1 (A) et 48 heures (B) après le retrait du derme.

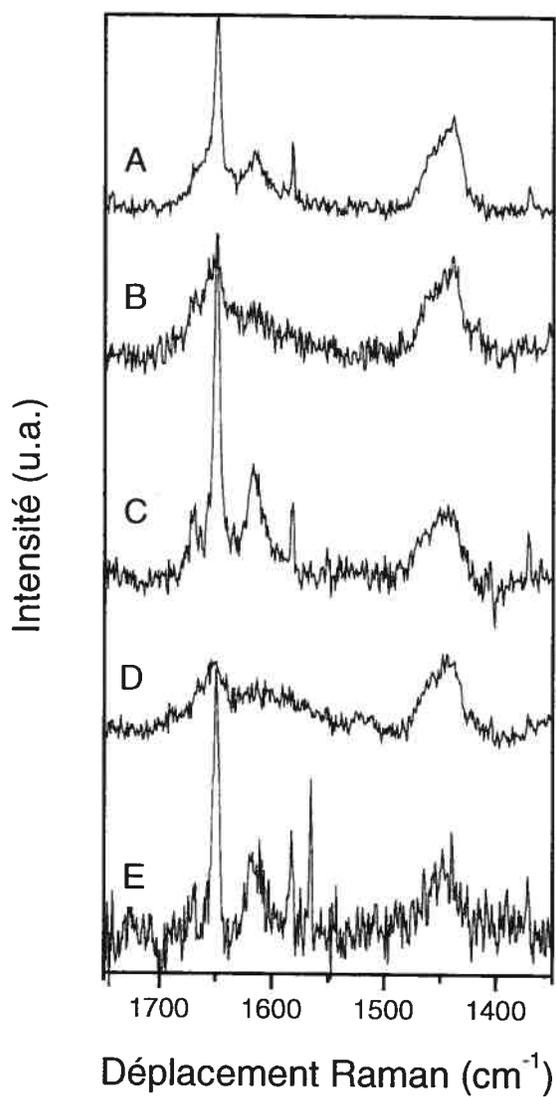


Figure 6.3 : Spectres Raman d'un épiderme hydraté (A), séché (B), réhydraté (C), sec et décongelé (D) puis réhydraté après la congélation (E). Excitation à 633 nm.

Il a été trouvé que la région de la bande amide I est particulièrement sensible à l'hydratation de l'échantillon. La figure 6.3 montre l'évolution de cette région selon le traitement de l'épiderme. L'intensité des spectres est normalisée en utilisant la bande δCH_2 à 1448 cm^{-1} comme standard interne. À la figure 6.3.A, on reconnaît le spectre décrit plus tôt pour un épiderme hydraté déposé sur un gel d'Agar. Lorsqu'il est séché à l'air libre (figure 6.3.B), les raies fines à 1650 , 1615 et 1582 cm^{-1} ne sont plus visibles ; on observe une seule composante large dont le maximum est à 1654 cm^{-1} . Le spectre 6.3.C montre le résultat de la réhydratation de l'épiderme qu'on a laissé baigner dans l'eau ultrapure plus de 12 heures. L'allure du spectre obtenu sur l'épiderme fraîchement isolé est retrouvée. Plusieurs groupes de recherches proposent l'entreposage des échantillons secs sous vide à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (Akomeah et al., 2004 ; Barry et al., 1992 ; Caspers et al., 1998 ; Hartmann et al., 2004). Pour reproduire ces travaux, un échantillon a donc été séché sous vide puis gelé. Le spectre 6.3.D est obtenu sur l'échantillon dégelé ramené à température de la pièce. La signature Raman est semblable à l'épiderme sec montré en 6.3.B. La figure 6.3.E illustre finalement le résultat lorsque l'épiderme décongelé est réhydraté de la même manière que précédemment. Le signal Raman est plus faible, supposant une structure poreuse. Les bandes fines sont visibles, mais on remarque l'affaissement du massif de la bande amide I. Il est probable que les structures secondaires des protéines sont affectées par le gel de l'épiderme, et que la simple réhydratation ne permette pas de retrouver les structures natives détruites. Macroscopiquement l'épiderme est modifié par le gel et il est plus difficile à manipuler sans risquer de l'endommager.

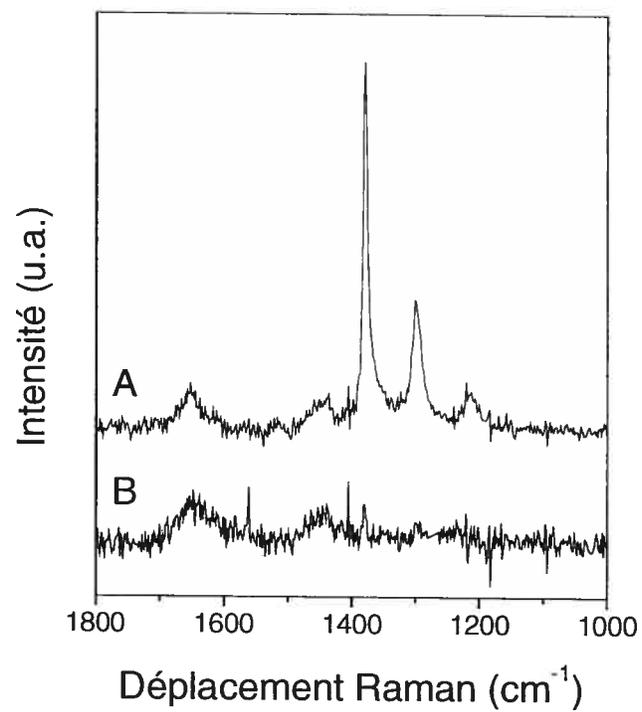


Figure 6.4 : Spectres Raman en mode confocal d'un film de téflon à 0 μm (position du point focal relative à la surface du film) déposé sur un épiderme sec (A), et de l'épiderme à travers le film de téflon à 40 μm (B) pour un objectif 50 \times longue distance et une longueur d'onde d'excitation de 633 nm.

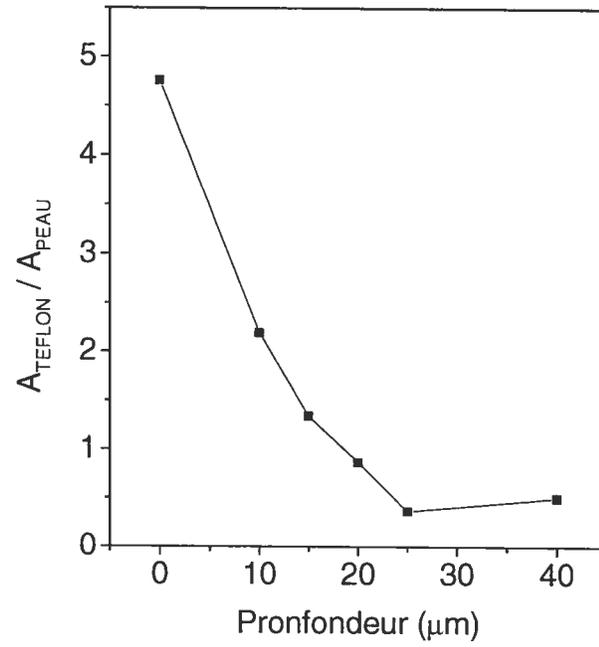


Figure 6.5 : Variation du rapport d'aire des bandes associées au film de téflon sur l'aire des bandes de peau en fonction de la profondeur du point focal.

6.1.3. Résolution spatiale

La résolution axiale a été évaluée à l'aide d'un film de téflon de 5 μm d'épaisseur placé à la surface d'un épiderme sec. La figure 6.4 montre deux spectres dans la région allant de 1800 à 1000 cm^{-1} . On reconnaît à 1654 et 1448 cm^{-1} les bandes associées aux modes ν amide I et δCH_2 de l'épiderme. Les bandes à 1378, 1296 et 1214 cm^{-1} sont dues au téflon (Cardona et al., 2002). La figure 6.4.A montre le spectre obtenu lorsque le point focal est à la surface du film de polymère. À mesure que le point focal est déplacé vers l'intérieur de l'échantillon par le déplacement de la platine du microscope, l'intensité des bandes du téflon décroît. Le rapport de l'aire des bandes du Téflon sur l'aire de la bande amide I ($A_{\text{Téflon}}/A_{\text{peau}}$) décroît en fonction de la profondeur (figure 6.5). À quelques 20 μm , un spectre de l'épiderme sans contribution du téflon est observable (figure 6.4.B). Cette expérience simple permet de définir la résolution axiale du montage. On remarque que le spectre à 0 μm , sur la surface du film de polymère, n'est pas exempt d'une contribution des bandes de l'épiderme.

6.1.4. Effet de la variation de la température

Le montage développé permet de varier la température de l'échantillon. Il possède un thermocouple placé, dans le gel d'Agar, directement sous l'échantillon de peau (figure 2.2.B). Une circulation d'eau en circuit fermé, dans la base de métal entourant le bain

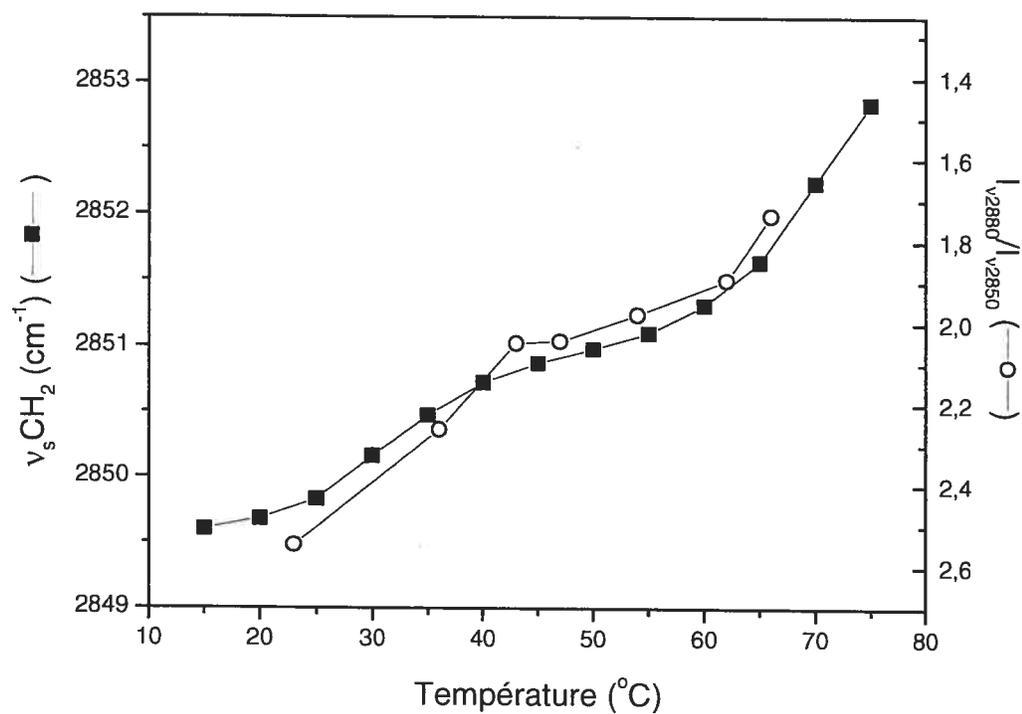


Figure 6.6 : Variation de la position de la bande $\nu_s\text{CH}_2$ (■) par spectroscopie infrarouge et du rapport I_{2880}/I_{2850} (○) par spectroscopie Raman d'un épiderme humain en fonction de la température.

servant à l'hydratation du gel d'Agar, permet de chauffer ou refroidir l'échantillon. Lorsque le gel a atteint la température désirée, 20 minutes sont allouées pour assurer que l'épiderme est en équilibre thermique avec le gel. La figure 6.6 présente l'évolution du rapport I_{2880}/I_{2850} en fonction de l'augmentation de la température sur la plage étudiée pour les mélanges modèles de lipides (chapitre 4 et 5).

Comme il a déjà été souligné dans le cas des mélanges de lipides, ce paramètre est sensible à l'ordre conformationnel des chaînes alkyles (Mantsch et McElhaney, 1991). Cependant, plusieurs composantes autres que les lipides contribuent dans la région νCH , notamment les protéines présentes dans les cellules kératinisées. Comme il en a déjà été fait mention (section 6.1.1), il est possible qu'il existe dans cette région des bandes associées à un phénomène de résonance lors de l'utilisation du laser à 633 nm comme source. Il s'ensuit que les valeurs absolues ne peuvent pas être directement comparées à celles obtenues avec des lipides pour estimer l'ordre conformationnel des chaînes alkyles dans l'épiderme. En fonction de la température, une variation de ce paramètre est quand même observée pour l'épiderme (figure 6.6). Cette variation est cohérente avec celle obtenue pour la position de la bande $\nu_s\text{CH}_2$ en spectroscopie infrarouge (voir la section 2.4 pour la description du montage). Ce montage n'est pas parfaitement étanche, cependant sur toute la plage de température observée, les bandes νOH sont au-delà de la limite supérieure de détection signifiant une concentration importante en eau. La variation observée en fonction de l'augmentation de la température est cohérente avec les résultats publiés pour les lipides isolés du SC (Bouwstra et al., 1992 ; Golden et al., 1987 ; White et al., 1988). Les deux

expériences ont été effectuées à partir de l'épiderme d'un même individu. La superposition des deux courbes confirme que le montage développé pour la spectroscopie Raman permet bien d'augmenter ou de réduire la température de l'épiderme.

6.1.5. Suivi de la pénétration du DMSO

Un avantage du développement d'une technique de mesure la perméabilité *in vitro* est la possibilité d'étudier des agents toxiques qui seraient autrement dangereux pour les volontaires d'études *in vivo*. Largement étudié, le DMSO est un exemple d'agent transdermique avec une grande capacité à augmenter la perméabilité de la peau (Blank, 1985 ; Hadgraft, 1999). Cependant, il est mutagène chez la souris et possiblement tératogène chez l'humain (MSDS Sigma).

Notre approche permet de caractériser *in vitro* la pénétration du DMSO dans l'épiderme. Pour ce faire, 5 μL de DMSO ont été déposés sur un épiderme sur gel d'Agar. La figure 6.7.A montre le spectre, 5 minutes après l'addition du DMSO, obtenu en mode non confocal à la surface de l'épiderme. Préalablement, un spectre de cet épiderme sans DMSO a été enregistré (figure 6.7.B). La soustraction de ces deux spectres (figure 6.7.C) permet de retrouver la signature du DMSO pur (figure 6.7.D). On remarque que le résultat de la soustraction présente une bande d'eau positive autour de 3000 cm^{-1} , signifiant une augmentation de l'hydratation de l'épiderme induite par l'ajout du DMSO.

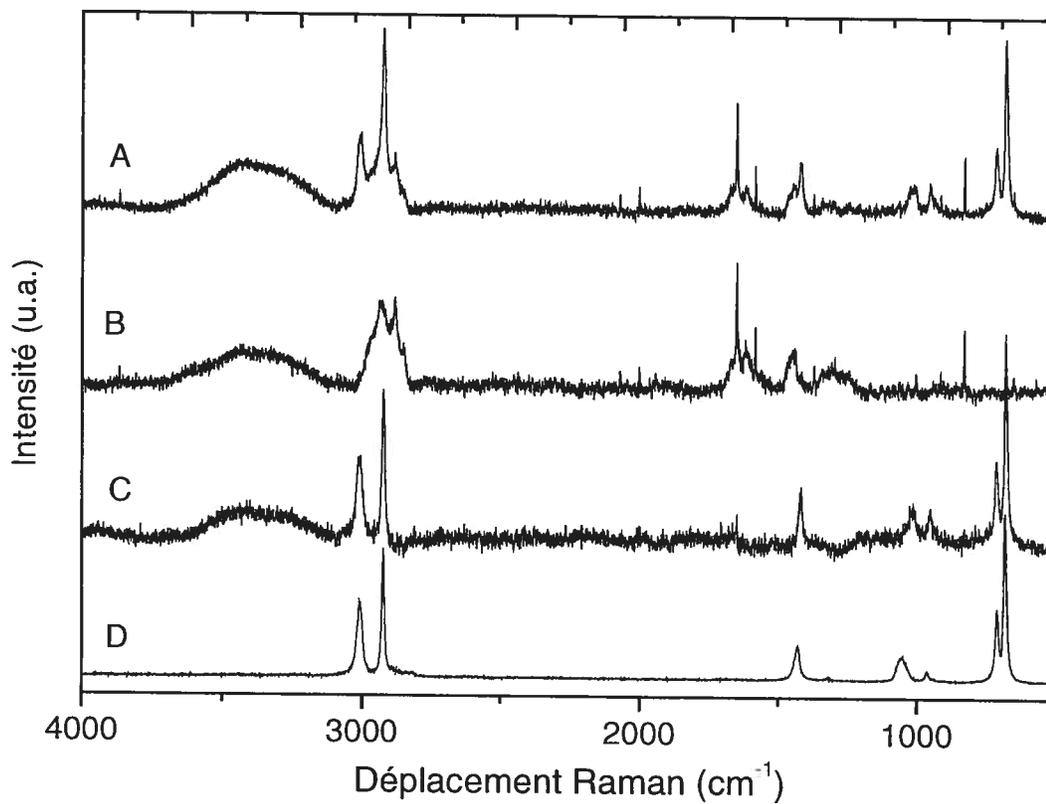


Figure 6.7 : Spectre Raman d'épiderme humain après l'ajout de DMSO (A) et avant (B), résultat de la soustraction des spectres (C). Spectre Raman du DMSO pur (D). Excitation à 633 nm.

6.2. Discussion

Bien que le SC soit très peu hydraté en regard des épithéliums inférieurs de la peau (Caspers et al., 2000), l'hydratation est un paramètre important pour la conservation de propriétés de la peau tel que la régularisation enzymatique ou la desquamation (Sund et al., 1989). Des études sur l'épiderme montrent notamment que la déshydratation peut conduire à la rupture mécanique de la peau (Rawlings et al., 1994). Il est aussi connu que l'eau peut modifier la barrière épidermique (Blank, 1985 ; Hadgraft, 1999 ; Kanikkannan et al., 2000). Étonnamment, plusieurs mesures de perméabilité *in vitro* ne tiennent pas compte de ce paramètre. L'utilisation répandue des cellules de Franz en est un exemple, dans lesquelles la peau est tendue entre deux solutions aqueuses. Les mesures faites à partir de ces montages considère la peau comme une membrane régulant les potentiel chimique de part et d'autre de la cellule. Le profil de concentration en eau dans l'épiderme, déterminé *in vivo* par Caspers et al. (Caspers et al., 2000), montre que le gradient de concentration d'eau dans le SC peut être grandement modifié simplement par l'application d'un bandage humide déposé sur la peau. Les SC ainsi hydratés voient leur concentration en eau à la surface du SC passer d'environ 25 % (p/p) à 55 %. Pour ces raisons, la méthode développée est une approche qui favorise une conservation de l'hydratation de l'épiderme tout en conservant la face extérieure à l'air libre, reproduisant les conditions *in vivo* le mieux possible, et ce, pendant plusieurs heures (figure 6.2).

Les résultats montrent que le retrait thermique de l'épiderme du derme ne modifie pas le spectre Raman de l'épiderme. Selon l'opacité de l'échantillon, la profondeur de champ maximale est de quelques 100 μm , ce qui est à l'intérieur de l'épiderme. Le retrait du derme a l'avantage de permettre la manipulation d'une membrane mince épousant une surface plane comme le gel d'Agar, tout en excluant les risques de contamination par le sang que contiennent le derme et l'hypoderme. Ce montage de l'épiderme sur gel d'Agar constitue la principale différence par rapport à d'autres approches utilisant la spectroscopie Raman pour suivre la pénétration transdermique.

Plusieurs études spectroscopiques sont faites sur des échantillons séchés qui sont par la suite réhydratés. Des conclusions contradictoires sont rapportées dans la littérature quant à l'effet de la congélation de la peau, à des fins de conservations, sur la perméabilité mesurée *in vitro*. Alors que certaines études montrent que la congélation sur des périodes prolongées n'affecte pas les mesures de perméabilité (Astley et Levine, 1976 ; Harrison et al., 1984), des travaux plus récents soulignent que la perméabilité peut être modifiée pour certains composés (Babu et al., 2003 ; Kasting et Bowman, 1990 ; Yazdanian, 1994). Les changements de perméabilité induits par le gel seraient différents selon les propriétés physico-chimiques des agents étudiés et de leur mode d'action sur la peau. L'impossibilité de retrouver une signature spectrale dans la région $\nu_{\text{Amide I}}$ typique d'un échantillon frais montre que le gel modifie probablement les structures protéiniques. Pour cette raison, il semble préférable de procéder à des mesures de perméabilité sur des échantillons le jour

même de l'opération chirurgicale sans procéder à un séchage ou une congélation de l'épiderme pour utilisation future.

La résolution spatiale est un enjeu important pour le développement d'une méthode de mesure de perméabilité. Le montage utilisé permet d'enregistrer des spectres Raman en mode confocal par le biais de deux fentes perpendiculaires (figure 2.3). La résolution latérale est principalement définie par la taille du faisceau laser focalisé sur l'échantillon. Dans le cas présent, cette résolution de l'ordre de $2 \mu\text{m}^2$, ce qui est inférieur à ce que permet l'imagerie infrarouge avec une résolution latérale d'environ $6 \mu\text{m}^2$ (Coutts-Lendon et al., 2003 ; Mendelsohn et al., 2003), et la taille du faisceau infrarouge de synchrotron de $3 \mu\text{m}^2$ (Cotte et al., 2004). La résolution axiale quant à elle a été évaluée par le profil de la peau à travers un film de téflon (figure 6.4 et 6.4). La résolution ainsi déterminée semble être de l'ordre de $20 \mu\text{m}$. Williams et al. ont montré, pour la même optique, que ce montage permet une résolution axiale de $2 \mu\text{m}$ (Williams et al., 1994). Pour un échantillon polymère, Tabaksblat et al. obtiennent, pour une lentille à grande distance focale d'un grossissement de $\times 50$ et une ouverture ponctuelle de $100 \mu\text{m}$, une résolution en profondeur de $3,0 \mu\text{m}$ (Tabaksblat et al., 1992). Nos mauvaises performances en comparaison de ces dernières sont en partie dues au maintien de l'hydratation uniquement par la face inférieure de l'épiderme. En effet, la conservation d'une face exposée à l'air, si elle permet de maintenir des conditions d'hydratation s'approchant de celles *in vivo*, conduit à une perte de résolution spatiale. Les travaux de Everall (Everall, 2000a ; Everall, 2000b) démontrent clairement l'effet du changement d'indice de réfraction entre la couche

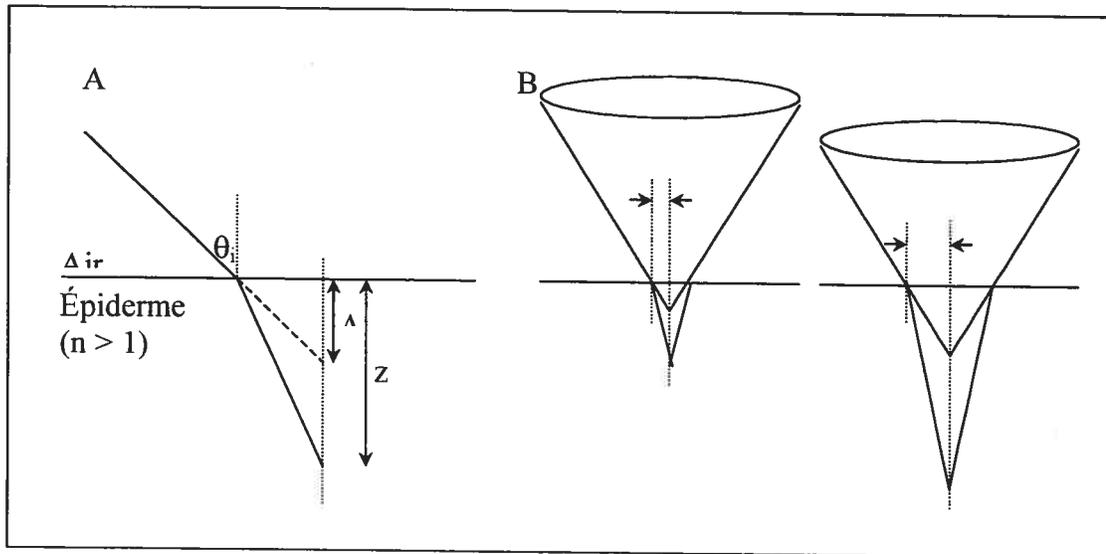


Figure 6.8 : Schémas de l'effet du changement d'indice de réfraction du milieu sur le point focal (A) en fonction de la profondeur (B) (Everall, 2004)

d'air et de l'échantillon. La figure 6.8.A schématise la perte de résolution causée par le changement de milieu de la lumière incidente. Un rayon entrant avec un angle de θ_i dans un milieu dont l'indice de réfraction est supérieur à 1 est dévié selon la loi de Snell. Le foyer, qui aurait été autrement à une distance Δ sous la surface, est déplacé vers le bas à une distance z . Le ratio z/Δ est minimal lorsque θ_i est nul, et augmente avec l'augmentation de l'angle d'entrée des rayons incidents. Ceci implique qu'une lentille à grande distance focale, qui crée un cône de lumière large conduit, pour une même profondeur de point focal théorique, Δ , à un point focal plus profond, z , et surtout plus large, qu'une lentille de même grossissement mais avec une ouverture de l'objectif réduite. Le constat le plus important est cependant que la résolution spatiale est grandement affectée par la profondeur à laquelle est focalisé le laser. La figure 6.8.B montre l'impact sur le rapport z/Δ en fonction de la profondeur du cône de lumière focalisée dans l'échantillon. Le point focal donc est toujours

plus bas que ce que l'échelle du microscope indique lors du déplacement de la plateforme, et cet écart augmente avec la profondeur dans l'échantillon. Les travaux de Everall montrent aussi qu'il y a une perte de résolution de plus en plus importante avec l'augmentation de la profondeur du point focal. Bien que ceci soit inévitable si une surface d'air veut être conservée au-dessus de l'épiderme, il est possible d'améliorer la résolution axiale dans le cas présent en utilisant une lentille à courte distance focale d'ouverture réduite. Pour ce faire, il faudrait cependant parvenir à couper le gel d'Agar de façon à obtenir une surface plane à l'échelle du micromètre. En effet, l'utilisation d'une lentille à grande distance focale $\times 50$ est due à la difficulté d'approche que présente la surface non plane de l'épiderme sur Agar, à l'échelle du μm .

L'avantage d'une technique *in vitro* tient notamment du fait qu'il est possible de moduler certains paramètres expérimentaux qui ne peuvent être modifiés *in vivo*. La température est un paramètre difficile, sinon impossible, à contrôler *in vivo*. L'intérêt de pouvoir faire des mesures de perméabilité à différentes températures est d'accéder à différentes informations structurales, notamment dans le cas des lipides, afin d'élucider les mécanismes de pénétration d'agents exogènes dans le SC et les facteurs qui les influencent. La variation de la perméabilité en fonction de la température a notamment été mesurée à partir de cellules de Franz (Akomeah et al., 2004), permettant d'obtenir des énergies d'activation en utilisant une relation d'Arrhenius. Les résultats présentés dans cette thèse montrent qu'il est possible de faire varier la température de l'échantillon et de suivre les modifications induites au niveau moléculaire. La figure 6.6 illustre la variation de deux

paramètres, en spectroscopie infrarouge et Raman, associés principalement à l'ordre conformationnel des chaînes lipidiques.

À l'instar de différentes méthodes Raman *in vitro*, cette approche n'implique pas de microtomer l'échantillon, par opposition aux approches en spectroscopie infrarouge. En imagerie comme en cartographie, la spectroscopie infrarouge à transmission est limitée par l'absorptivité des échantillons qui doivent être microtomés pour une épaisseur variant entre 4 et 8 μm (Cotte et al., 2004 ; Coutts-Lendon et al., 2003 ; Garidel, 2003 ; Mendelsohn et al., 2003). Le fait de microtomer implique une lecture statique, contrairement à l'approche proposée qui permet de suivre *in situ* l'évolution dans le temps des échantillons et de déterminer des cinétiques de pénétration. Cependant, la coupe transversale des échantillons, à la différence de la spectroscopie confocale, permet l'obtention d'une image en deux dimensions de la distribution d'un composé et d'établir rapidement s'il existe une hétérogénéité latérale. En ce sens, les deux approches d'échantillonnage sont complémentaires.

La pénétration du DMSO a été suivie à toutes les minutes pendant 10 min. Aucune modification de la concentration à 15 μm de profondeur n'a été observée. Ceci implique de la pénétration de l'agent transdermique est particulièrement rapide et se produit en deçà d'une minute. Nos résultats sont cohérents avec les travaux de Caspers et al. (Caspers et al., 2002) qui montrent *in vivo* que le profil de concentration du DMSO dans l'épiderme reste constant jusqu'à 4 heures après l'application. Leur observation sur une période de 48 heures

semble montrer que l'élimination du DMSO implique la diffusion de l'agent transdermique à travers le derme pour être drainé par le flux lymphatique et sanguin. Un suivi sur une plage de temps équivalente devra être fait afin de pouvoir comparer les mesures *in vitro* sur l'épiderme retiré du derme et déposé sur gel d'Agar à celles faites *in vivo*. L'expérience préliminaire permet de mettre en lumière l'augmentation de l'hydratation induite par la présence du DMSO, à partir du spectre de différence (figure 6.7C.) qui possède une bande ν_{OH} dont la contribution est positive. Les mesures *in vivo* de Casper et al. soulignent une modification des modes de vibration du DMSO mettant en évidence une interaction entre l'agent transdermique et l'eau présente dans l'épiderme (Caspers et al., 2002). Cette même observation peut être faite entre le spectre du DMSO pur (figure 6.7.D) et le résultat de la soustraction donnant accès au spectre du DMSO dans la peau (figure 6.7.C) pour les bandes ν_{CSC} autour de 700 cm^{-1} . Le déplacement enregistré est de 5 cm^{-1} . La possibilité de retrouver la contribution du DMSO en profondeur dans la peau par soustraction spectrale montre la possibilité de suivre un composé exogène dans l'épiderme. Cette approche a déjà été utilisée avec succès afin de déterminer la pénétration de composés exogènes dans des structures microbiennes (Marcotte et al., 2004).

La détection d'un composé peut être limitée par l'intensité du signal Raman ou par la fluorescence masquant le signal Raman. Au cours de ces travaux, il a été possible d'observer de façon qualitative qu'il existe une relation entre l'intensité de la fluorescence et la teinte de l'épiderme des individus. Pour une peau plus claire, la fluorescence est moindre, alors que dans le cas de peau foncée, l'auto-fluorescence de la peau peut conduire

à un signal de fond qui correspond à près de 5 fois l'intensité des bandes vibrationnelles. Ceci implique une correction de la ligne de base et un temps d'acquisition plus important pour obtenir un rapport signal/bruit satisfaisant. Les temps d'acquisition sont de l'ordre de dizaines de minutes et varient selon les individus. Il a été montré qu'il est possible de réduire significativement la fluorescence dans le cas des échantillons de peau en utilisant une source d'excitation dans la région du proche infrarouge, à 1064 nm (Barry et al., 1992 ; Caspers et al., 1998 ; Gniadecka et al., 1998 ; Osafa et al., 2004). Cependant, l'augmentation de la longueur d'onde a pour effet de réduire l'intensité de l'effet Raman et doit être compensée, par l'augmentation de la puissance à l'échantillon par exemple. Dans le même ordre d'idées, Caspers et al. (Caspers et al., 2003 ; Caspers et al., 2002) utilisent des lasers de 720 et 850 nm, avec une puissance à l'échantillon de 100 mW, pour un temps d'acquisition de spectres en mode confocal *in vivo* de la peau de l'ordre de 20 s. Ce temps se compare avantageusement au temps d'acquisition dans le cadre de nos travaux. L'utilisation d'un laser de cette puissance aux plus grandes longueurs d'onde s'avérerait certainement une bonne amélioration pour les performances de notre système.

En conclusion, la méthode proposée peut être considérée comme une approche complémentaire aux mesures *in vivo* pour les mesures de la perméabilité dans l'épiderme. Le traitement simple de la peau, limité au retrait du derme, et la possibilité de conserver une hydratation reproduisant les conditions natives devraient conduire à des mesures extrapolables à des systèmes *in vivo*. Cette approche *in vitro* possède l'avantage de ne pas utiliser de sonde et de permettre la variation de paramètres extérieurs tels que la

température. La sensibilité de la méthode reposant sur la puissance de la lumière incidente, celle-ci devrait être augmentée pour réduire le temps d'acquisition nécessaire. L'enjeu principal est cependant la qualité de la résolution spatiale qui pourra être atteinte par cette méthode. Pour ce faire, les prochains travaux devront être faits avec des lentilles à courte distance focale et possiblement de plus grand grossissement. Néanmoins, la résolution axiale, même améliorée à quelques 5 μm , ne permettrait pas de distinguer la route de pénétration et de confirmer l'hypothèse selon laquelle les agents transdermiques progressent dans le labyrinthe intercellulaire lipidique.

Conclusion

Les présents travaux mettent en lumière l'effet des charges sur l'organisation des lipides du SC. Dans le mélange ternaire équimolaire CER III/PA-d₃₁/Chol, le calcium forme un complexe avec l'acide gras qui est alors déprotoné. Ceci induit la rigidification des chaînes alkyles de l'acide gras et la perte de la symétrie orthorhombique à basse température. Le thermotropisme global du mélange est ainsi affecté et la composition de la phase lo semble être modifiée. Ce résultat est important considérant qu'il existe un gradient de concentration de calcium dans le SC lui-même. Il est possible que la présence ou l'absence de d'ions divalents joue un rôle dans le processus de desquamation, en modifiant la friabilité des lipides du SC. Chez les individus atteints de psoriasis, on observe une augmentation de la concentration extracellulaire en calcium (Menon et Elias, 1991). Outre un rôle dans le contrôle de la différenciation cellulaire qui conduit à une prolifération des cornéocytes dans le cas du psoriasis, à la lumière de nos résultats, il est possible que l'augmentation en calcium soit à l'origine de l'augmentation de la perméabilité (Tagami et Kohdo, 1985) et la desquamation anormale de ce type de peau.

La présence du sulfate de cholestérol dans le mélange ternaire équimolaire CER III/PA-d₃₁/Schol montre que l'association des ions calcium avec le stérol est favorisée par rapport à la formation de complexe avec l'acide gras. Le sulfate de cholestérol entraîne un thermotropisme semblable en présence et en absence de calcium. L'association du sulfate de cholestérol et du calcium dans les lipides du SC a été proposée depuis longtemps (Elias,

1983 ; Williams et al., 1983). Cependant, à la lumière des résultats avec le cholestérol, il est possible que le rôle du stérol chargé ne se limite pas à un rôle de pontage entre les bicouches. Il est possible en effet de penser que l'organisation lipidique soit influencée par la balance fragile entre le nombre de sites de complexation que représente le sulfate de cholestérol et la concentration de calcium intercellulaire. Dans le cas d'une augmentation du sulfate de cholestérol, les ions calcium se complexeront moins avec la fonction carboxylique des acide gras, réduisant l'ordre conformationel des chaînes alkyles sans réduire la cristallinité à basse température, mais en modifiant la morphologie des domaines lipidiques. Pour étayer cette hypothèse, des études sur des mélanges pour divers rapport Chol/Schol seraient nécessaires.

Des mesures par titration calorimétrique isotherme devraient permettre de caractériser les paramètres thermodynamique de l'association entre le calcium et les trois protagonistes, soit l'acide palmitique, le sulfate de cholestérol et le cholestérol. Les premiers résultats obtenus par ITC sur des membranes de POPC/POPG ont révélé qu'il s'agit d'une méthode sensible notamment au mode de préparation des vésicules. L'utilisation de vésicules obtenues par sonication, conduisant à la formation de vésicules de rayon de courbure très petit, introduit des contributions énergétiques dues à la réorganisation des membranes en présence d'ions. La mise en évidence de ce phénomène nous a permis de rectifier certains travaux à ce sujet dans la littérature. Par le biais de l'augmentation de la force ionique et de la densité de charge de la membrane il a été possible de montrer que l'association des ions aux membranes lipidiques est principalement

dictée par des interactions électrostatiques. Les résultats préliminaires (non-rapportés dans la thèse) du titrage de vésicules composées de POPC/Schol et POPC/Chol par une solution de CaCl_2 abondent dans ce sens : l'énergie d'association du calcium aux membranes de POPC/Chol est pratiquement nulle, comparativement une contribution exothermique importante dans le cas des membranes de POPC/Schol.

La cartographie Raman des mélanges modèles avait pour but de caractériser les domaines lipidiques et les facteurs qui en régissent la formation. L'hétérogénéité de la composition chimique, au niveau spatial, ainsi que son évolution en fonction de la température sont maintenant caractérisés. Bien que l'observation directe de domaines ait été possible, leurs tailles et leurs formes se sont avérées être très variables d'un échantillon à l'autre. Il est suggéré que cette variabilité soit due à des différences dans la distribution des longueurs de chaînes pour les différents lots de CER III. Certains travaux tendent à montrer que la longueur des chaînes est un paramètre important dans le comportement des mélanges du SC (Ouimet et al., 2003); Kwak et Lafleur, communication personnelle). L'utilisation de céramides de longueur de chaînes définie, maintenant disponibles commercialement, ainsi que de divers acide gras, devrait permettre de caractériser l'influence de ce paramètre sur la morphologie des domaines.

Finalement, la microscopie Raman pour la mesure de la perméabilité *in vitro* de la peau humaine est une méthode qui présente un grand potentiel dont plusieurs groupes de recherche tirent déjà profit. La contribution de ces travaux se trouve au niveau du porte-

échantillon développé. Comparativement aux autres approches *in vitro*, celle-ci est simple et permet la conservation de l'hydratation originale de l'épiderme. Des mesures sur une plus grande période de temps de la diffusion du DMSO devraient permettre une comparaison avec les résultats *in vivo* en microscopie Raman déjà publiés (Caspers et al., 2002). Des mesures à différentes températures devraient aussi permettre de mieux caractériser le mode d'action de cet agent transdermique. Les différentes composantes du spectre de la peau permettront de suivre l'impact de l'agent transdermique sur les protéines, les lipides ainsi que sur le profil d'hydratation de l'épiderme. La comparaison avec l'impact du DMSO sur les mélanges modèles sera particulièrement importante pour la compréhension des mécanismes en jeux. Toutes ces mesures ne pourront cependant être faites sans une amélioration importante de la résolution spatiale sur laquelle repose la portée de cette approche.

Bibliographie

- Abraham W, Wertz PW, Landmann L, Downing DT. *Journal of Investigative Dermatology* (1987);**88**:212-214.
- Ahn SK, Jiang SJ, Hwang SM, Choi EH, Lee JS, Lee SH. *Archives of Dermatological Research* (2001);**293**:308-318.
- Akomeah F, Nazir T, Martin GP, Brown MB. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2004);**21**:337-345.
- Altenback C, Seelig J. *Biochemistry* (1984);**23**:3913-3920.
- Alvarez-Roman R, Naik A, Kalia YN, Fessi H, Guy RH. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2004);**58**:301-316.
- Astley JP, Levine M. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1976);**65**:210-215.
- Babu RJ, Kanikkannan N, Kikwai L, Ortega C, Andega S, Ball K, Yim S, Singh M. *Journal of Controlled Release* (2003);**86**:49-57.
- Barry BW, Edwards HGM, Williams AC. *Journal of Raman Spectroscopy* (1992);**23**:641-654.
- Benachir T, Lafleur M. *Biochimica et Biophysica Acta* (1995);**1235**:452-460.
- Beschiaschvili G, Seelig J. *Biochemistry* (1990);**29**:52-58.
- Binder H, Zschörnig O. *Chemistry and Physics of Lipids* (2002);**115**:39-61.
- Blank IH. dans: *Percutaneous Absorption*, Bronaugy RL, Maibach HI, éditeurs. New York: Marcel Dekker, (1985):97-105.
- Bommannan D, Potts RO, Guy RH. *Journal of Investigative Dermatology* (1990);**95**:403-408.
- Bouwstra JA, Dubbelaar FER, Gooris GS, Weerheim AM, Ponec M. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999);**1419**:127-136.
- Bouwstra JA, Dubbelaar FER, Ponec M, Gooris GS. *Journal of Lipid Research* (2001);**42**:1759-1770.
- Bouwstra JA, Gooris GS, Cheng K, Weerheim AM, Bras W, Ponec M. *Journal of Lipid Research* (1996);**37**:999-1011.

- Bouwstra JA, Gooris GS, Dubbelaar FER, Ponec M. *Journal of Lipid Research* (1999);**40**:2303-2312.
- Bouwstra JA, Gooris GS, van der Spek J, Lavvrijsen S, Bras W. *Biochimica et Biophysica Acta* (1994);**1212**:183-192.
- Bouwstra JA, Gooris GS, Salomons-de Vries MA, van der Spek JA, Bras W. *International Journal of Pharmaceutics* (1992);**84**:205-216.
- Bouwstra JA, Gooris GS, van der Spek J, Bras W. *Journal of Investigative Dermatology* (1991);**97**:1005-1012.
- Bouwstra JA, Grooris GS, Dubbelaar FER, Ponec M. *Cellular and Molecular Biology* (2000);**46**:979-992.
- Bouwstra JA, Thewalt J, Gooris GS, Kitson N. *Biochemistry* (1997);**36**: 7717-7725.
- Brancaleon L, Bamberg MP, Sakamaki T, Kollias N. *Journal of Investigative Dermatology* (2001);**116**:380-386.
- Breukink E, Ganz P, de Kruijff B, Seelig J. *Biochemistry* (2000);**39**: 10247-10254.
- Bronaugh RL. dans: Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration, Shaw VP, Maibach HI, éditeurs. Plenum Press New York: (1993):117-125.
- Bunow M, Levin IW. *Biochimica et Biophysica Acta* (1977);**487**:388-394.
- Cameron DG, Kauppinen JK, Moffatt DJ, Mantsch HH. *Applied Spectroscopy* (1982);**36**:245-250.
- Cardona F, George GA, Hill DJT, Rasoul F, Maeji J. *Macromolecules* (2002);**35**:355-364.
- Casal HL, Mantsch HH. *Biochimica et Biophysica Acta* (1984);**779**:381-401.
- Caspers PJ, Lucassen GW, Bruining HA, Puppels GJ. *Journal of Raman Spectroscopy* (2000);**31**:813-818.
- Caspers PJ, Lucassen GW, Puppels GJ. *Biophysical Journal* (2003);**85**:572-580.
- Caspers PJ, Lucassen GW, Wolthuis R, Bruining HA, Puppels GJ. *Biospectroscopy* (1998);**4**:S31-S39.
- Caspers PJ, Williams AC, Carter EA, Edwards HGM, Barry BW, Bruining HA, Puppels GJ. *Pharmaceutical Research* (2002);**19**:1577-1580.

- Cevc G. *Biochimica et Biophysica Acta* (1990);**1031-3**:311-382.
- Chen H-C, Mendelsohn R, Rerek ME, Moore DJ. *Biochimica et Biophysica Acta* (2000);**1468**:293-303.
- Chen Y-L, Wiedmann TS. *Journal of Investigative Dermatology* (1996);**107**:15-19.
- Corcuff P, Bertrand C, Leveque JL. *Archives of Dermatological Research* (1993);**285** :475-481.
- Cotte M, Dumas P, Besnard M, Tchoreloff P, Walter P. *Journal of Controlled Release* (2004);**97**:269-281.
- Coutts-London CA, Wright NA, Mieso EV, Koenig JL. *Journal of Controlled Release* (2003);**93**:223-248.
- Darvin ME, Gersonde I, Albercht H, Gonchukov SA, Sterry W, Lademann J. *Laser Physics* (2005);**15**:295-299.
- De Kruijff B, Cullis PR, Radda GK. *Biochimica et Biophysica Acta* (1975);**406**:6-20.
- Duindam HJ, Vrensen GFJM, Otto C, Puppels G, Greve J. *Journal of Lipid Research* (1995);**36**:1139-1146.
- Edwards C. *Current Problems in Dermatology* (1998);**26**:20-26.
- El Mashak EM, Lakhdar-Ghazal F, Tocanne JF. *Biochimica et Biophysica Acta* (1982);**688**:465-474.
- Elias PM. *Journal of Investigative Dermatology* (1983);**80**:44s-49s.
- Elias PM, Brown BE, Fritsch P, Goerke J, Gray GM, White RJ. *Journal of Investigative Dermatology* (1979);**73**:339-348.
- Elias PM, Crumrine D, Rassner U, Hachem J-P, Menon GK, Man W, Choy MHW, Feingold KR, Williams ML. *Journal of Investigative Dermatology* (2004);**122**:314-319.
- Elias PM, Menon GK. *Advances in Lipid Research* (1991);**24**:1-26.
- Elias PM, Menon GK, Grayson S, Brown BE. *Journal of Investigative Dermatology* (1988);**91**:3-10.
- Elias PM, Nau P, Hanley K, Cullander C, Crumrine D, Bench G, Sideras-Haddad E, Mauro TM, Williams ML, Feingold KR. *Journal of Investigative Dermatology* (1998);**110**:399-404.

- Epstein EH, Williams ML, Elias PM. *Archives of Dermatology* (1981);**117**:761-763.
- Everall N. *Spectroscopy* (2004);**19**:20-27.
- Everall NJ. *Applied Spectroscopy* (2000a);**54**:1515-1519.
- Everall NJ. *Applied Spectroscopy* (2000b);**54**:773-782.
- Faria DLA, Souza MA. *Journal of Raman Spectroscopy* (1999);**30**:169-171.
- Faure C, Dufourc EJ. *Biochimica et Biophysica Acta* (1997);**1330**:248-252.
- Fenske DB, Thewalt JL, Bloom M, Kitson N. *Biophysical Journal* (1994);**67**:1562-1573.
- Findlay EJ, Barton PG. *Biochemistry* (1978);**17**:2400-2405.
- Fiske CH, Subbarow Y. *Journal of Biological Chemistry* (1925);**66**:375-400.
- Forslind B. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum* (1987);**134**:1-8.
- Forslind B. *Acta Dermato-Venereologica* (1994);**74**:1-6.
- Fredericks PM. dans:Handbook of Vibrational Spectroscopy, Chalmers JM, Griffiths PR, éditeurs. Wiley (2002):1497-1507.
- Freinkel RK, Aso K. *Journal of Investigative Dermatology* (1969);**52**:148-154.
- Garidel P. *Physical chemistry and chemical physics* (2003);**5**:2673-2679.
- Garidel P, Blume A. *Langmuir* (1999);**15**:5526-5534.
- Garidel P, Blume A, Hübner W. *Biochimica et Biophysica Acta* (2000);**1466**:245-259.
- Gennis, RB, Biomembranes Molecular Structure and Function, ed. Springer-Verlag, New York:(1989).
- Gniadecka M, Nielsen OF, Christensen DH, Wulf HC. *Journal of Investigative Dermatology* (1998);**110**:393-398.
- Golden GM, Guzek DB, Kennedy AH, McKie JE, Potts RO. *Biochemistry* (1987);**26**:2382-2388.
- Gray GM, White RJ. *Journal of Investigative Dermatology* (1978);**70**:336-341.
- Gray GM, Yardley HJ. *Journal of Lipid Research* (1975);**16**:441-447.

- Grimelec CL, Daigneault A, Bleau G, Robert KD. *Lipids* (1984);**19**: 474-477.
- Grotenhuis Et, Demel RA, Ponec M, Boer DR, van Miltenburg JC, Bouwstra JA. *Biophysical Journal* (1996);**71**:1389-1399.
- Hadgraft J. *International Journal of Pharmaceutics* (1999);**184**:1-6.
- Hadgraft J. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2004);**58**:291-299.
- Harlos K, Eibl H. *Biochemistry* (1980);**19**:895-899.
- Harrison SM, Barry BW, Dugard PH. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (1984);**36**:261-262.
- Hartmann M, Hanh BD, Podhaisky H, Wensch J, Bodzenta J, Wartewig S, Neubert RHH. *The Analyst* (2004);**129**:902-905.
- Hata TR, Scholz TA, Ermakov IV, McClane RW, Khachik F, Gellermann W, Pershing LK. *Journal of Investigative Dermatology* (2000);**115**:441-448.
- Hatfield RM, Fung LWM. *Biochemistry* (1999);**38**:784-791.
- Hatta I, Ohta N, Ban S, Tanaka H, Nakata S. *Biophysical Chemistry* (2001);**89**:239-242.
- Hauser H. *Chemistry and Physics of Lipids* (1991);**57**:309-325.
- Hauser H, Guyer W, Howell K. *Biochemistry* (1979);**18**:3285-3291.
- Heerklotz H, Seelig J. *Biochimica et Biophysica Acta* (2000);**1508**:69-85.
- Heerklotz H. *Journal of Physics: Condensed Matter* (2004);**16**:R441-R467.
- Hill JR, Wertz PW. *Biochimica et Biophysica Acta* (2003);**1616**:121-126.
- Hou SYE, Mitra AK, White SH, Menon GK, Ghadially R, Elias PM. *Journal of Investigative Dermatology* (1991);**96**:215-223.
- Huang C, Mason JT, Levin IW. *Biochemistry* (1983);**22**:2775-2780.
- Humbert P. *Pathologie Biologie* (2003);**51**:271-274.
- Huster D, Arnold K, Gawrisch K. *Biophysical Journal* (2000);**78**: 3011-3018.
- Jacobi U, Weigmann HJ, Ulrich J, Sterry W, Lademann J. *Skin Research and Technology* (2005);**11**:91-96.

- Jager MW, Gooris GS, Dolbnya IP, Bras W, Ponec M, Bouwstra JA. *Journal of Lipid Research* (2004a);**45**.
- Jager MW, Gooris GS, Dolbnya IP, Ponec M, Bouwstra JA. *Biochimica et Biophysica Acta* (2004b);**1684**:132-140.
- Jähnig F, Harlos K, Vogel H, Eibl H. *Biochemistry* (1979);**18**:1459-1468.
- Kanikkannan N, Kandimalla K, Lamba SS, Singh M. *Current Medicinal Chemistry* (2000);**7**:593-608.
- Kasting GB, Bowman LA. *Pharmaceutical Research* (1990);**7**:1141-1146.
- Kitagawa S, Yokochi N, Murooka N. *International Journal of Pharmaceutics* (1995);**126**:49-56.
- Kitson N, Thewalt J. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum* (2000);**208**:12-15.
- Kitson N, Thewalt J, Lafleur M, Bloom M. *Biochemistry* (1994);**33**:6707-6715.
- Kitson N, Monck M, Wong K, Thewalt J, Cullis P. *Biochimica et Biophysica Acta* (1992);**1111**: 127-133.
- Kligman AM, Christophers E. *Archives of Dermatology* (1963);**88**: 702-705.
- Knutson K, Potts RO, Guzek DB, McKie JE, Lambert WJ, Higuchi WI. *Journal of Controlled Release* (1986);**2**:67-87.
- Kodati RV, Lafleur M. *Biophysical Journal* (1993);**64**:163-170.
- Kouaouci R, Silvius JR, Graham I, Pézolet M. *Biochemistry* (1985);**24**:7132-7140.
- Kuempel D, Swartzendruber DC, Squier CA, Wertz PW. *Biochimica et Biophysica Acta* (1998);**1372**:135-140.
- Lafleur M. *Canadian Journal of Chemistry* (1998);**76**:1501-1511.
- Lafleur M, Pigeon M, Pézolet M, Caillé J-P. *Journal of Physical Chemistry* (1989);**93**:1522-1526.
- Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, Elias PM. *Journal of Lipid Research* (1983);**24**:120-130.
- Lau A, McLaughlin A, McLaughlin S. *Biochimica et Biophysica Acta* (1981);**645**:279-292.

- Lawson EE, Edwards HGM, Barry BW, Williams AC. *Journal of Drug Targeting* (1998);**5**:343-351.
- Lee HS, Choi EH, Feingold KR, Jiang S, Ahn SK. *Journal of Investigative Dermatology* (1998);**111**:39-43.
- Lehrmann R, Seelig J. *Biochimica et Biophysica Acta* (1994);**1189**:89-95.
- Levin IW. *Advanced Infrared Raman Spectroscopy* (1984);**11**:1-48 .
- Macdonald PM, Seelig J. *Biochemistry* (1987);**26**:1231-1240.
- Madison KC, Swartzendruber DC, Wertz PW, Downing DT. *Journal of Investigative Dermatology* (1987);**88**:714-718.
- Mak VHW, Potts RO, Guy RH. *Pharmaceutical Research* (1990);**7**:835-841.
- Mantsch HH, McElhaney RN. *Chemistry and Physics of Lipids* (1991);**57**:213-226.
- Marcotte L, Barbeau J, Lafleur M. *Applied Spectroscopy* (2004);**58**:1295-1301.
- Marsh, D, Handbook of Lipid Bilayers, ed. CRC Press, Boston:(1990).
- Marshbanks TL, Franses EI. *Journal of Physical Chemistry* (1994);**98**:2166-2173.
- McLaughlin SA. *Current topics in membranes and transport* (1977);**9**:71-144.
- McMullen TPW, Lewis RNAH, McElhaney RN. *Biochemistry* (1993);**32**:516-522.
- Mendelsohn R, Chen H-C, Rerek ME, Moore DJ. *Journal of Biological Optics* (2003);**8**:185-190.
- Mendelsohn R, Koch CC. *Biochimica et Biophysica Acta* (1980);**598**:260-271.
- Mendelsohn R, Moore DJ. *Chemistry and Physics of Lipids* (1998);**96**: 141-157.
- Mendelsohn R, Moore DJ. *Sphingolipid Metabolism and Cell Signaling* (2000);**312**:228-247.
- Menon GK, Elias PM. *Archives of Dermatology* (1991);**127**:57-63.
- Menon GK, Grayson S, Elias PM. *Journal of Investigative Dermatology* (1985);**84**:508-512.
- Meyer JC, Grundmann HP, Knabenhans S. *Dermatologica* (1990);**180**:24-29.

- Mimeault M, Bonenfant D. *Talanta* (2002);**56**:395-405.
- Mizushima H, Fukasawa J-I, Suzuki T. *Journal of Lipid Research* (1996);**37**:361-367.
- Monger DJ, Williams ML, Feingold KR, Brown BE, Elias PM. *Journal of Lipid Research* (1988);**29**:603-612.
- Montagna, W, Parakkal, PF, The structure and function of skin, ed. Academic Press, New York:(1974).
- Moore DJ, Rerek ME. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum* (2000);**208**:16-22.
- Moore DJ, Rerek ME, Mendelsohn R. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1997a);**231**:797-801.
- Moore DJ, Rerek ME, Mendelsohn R. *Journal of Physical Chemistry B* (1997b);**101**:8933-8940.
- Mouritsen OG, Zuckermann MJ. *Lipids* (2004);**39**:1101-1113.
- Naik A, Pechtold LARM, Potts RO, Guy RH. *Journal of Controlled Release* (1995);**37**:299-306.
- Norlén L, Nicander I, Rozell BL, Ollmar S, Forslind B. *Journal of Investigative Dermatology* (1999);**112**:72-77.
- Odland GF. dans: The skin, Helwig EB, Mostofi FK, éditeurs. The Williams & Wilkins Compagny Baltimore: (1971).
- Öhman H, Vahlquist A. *Acta Dermato-Venereologica* (1994);**74**:375-379.
- Öhman H, Vahlquist A. *Journal of Investigative Dermatology* (1998);**111**:674-677.
- Ongpipattanakul B, Francoeur ML, Potts RO. *Biochimica et Biophysica Acta* (1994);**1190**:115-122.
- Onken HD, Moyer CA. *Archives of Dermatology* (1963);**87**:584-590.
- Osafa M, Gniadecka M, Wulf HC. *Experimental Dermatology* (2004);**13**:391-395.
- Ouimet J, Croft S, Paré C, Katsaras J, Lafleur M. *Langmuir* (2003);**19**:1089-1097.
- Ouimet J, Lafleur M. *Langmuir* (2004);**20**:7474-7481.
- Papahadjopoulos D, Poste G. *Biophysical Journal* (1975);**15**:945-948.

- Papahadjopoulos D, Vail WJ, Jacobson K, Poste G. *Biochimica et Biophysica Acta* (1975);**394**:483-491.
- Paré C, Lafleur M. *Langmuir* (2001);**17**:5587-5594.
- Paré C, Lafleur M. *Biophysical Journal* (1998);**74**:899-909.
- Parker, FS, Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in biochemistry, ed. Plenum Press, New York, USA:(1983).
- Percot A, Lafleur M. *Biophysical Journal* (2001);**81**:2144-2153.
- Philippot JR, Milhaud PG, Puyal CO, Wallach DFH. dans:Liposomes as Tools in Basic Research and Industry, Phillipot J.R., Schuber F., éditeurs. CRC press Boca Raton, FL: (1995):41-57.
- Pilgram GSK, Engelsma-van Pelt MA, Bouwstra JA, Koerten HK. *Journal of Investigative Dermatology* (1999);**113**:403-409.
- Potts RO, McNeill SC, Desbonnet CR, Wakshull E. *Pharmaceutical Research* (1989);**6**:119-123.
- Rawlings AV, Scott IR, Hardind CR, Bowser PA . *Journal of Investigative Dermatology* (1994);**103**:731-740.
- Rehfeld SJ, Williams ML, Elias PM. *Archives of Dermatological Research* (1986);**278**:259-263.
- Rex S, Schwarz G. *Biochemistry* (1998);**37**:2336-2345.
- Rougier A, Lotte C. dans:Topical drug bioavailability, bioequivalence and penetration, Shaw VP, Maibach HI, éditeurs. New York: Plenum Press, (1993):163-182.
- Rujoi M, Borchman D, DuPré DB, Yappert MC. *Biophysical Journal* (2002);**82**:3096-3104.
- Saboury AA. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (2003);**72**:93-103.
- Scatchard G. *Annals of the New York Academy of Sciences* (1949);**50**:660.
- Schaefer, H,Redelmeier, TE, Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption, ed. Karger AG., Basel:(1996).
- Schurer NY, Elias PM. *Advances in Lipid Research* (1991);**24**:27-56.
- Seelig J. *Biochimica et Biophysica Acta* (1997);**1331**:103-116.

- Smith WP, Christensen MS, Nacht S, Gans EH. *Journal of Investigative Dermatology* (1982);**78**:7-11.
- Snieder M, Hansen WG. *Mikrochim. Acta* (1997);(Suppl.) **14**:677-678.
- Snyder RG, Goh MC, Srivatsavoy VJP, Strauss HL, Dorset DL. *Journal of Physical Chemistry* (1992);**96**:10008-10019.
- Snyder RG, Srivatsavoy VJP, Cates DA, Strauss HL, White JW, Dorset DL. *Journal of Physical Chemistry* (1994);**98**:674-684.
- Sparr E, Eriksson L, Bouwstra JA, Ekelund K. *Langmuir* (2001);**17**:164-172.
- Strott CA, Higashi Y. *Journal of Lipid Research* (2003);**44**:1268-1278.
- Sund M-L, Branting C, Linder LE. *Caries Research* (1989);**23**:256-260.
- Susi H. *Chemistry and Physics of Lipids* (1981);**29**:359-368.
- Sweeney TM, Downing DT. *Journal of Investigative Dermatology* (1970);**55**:135-140.
- Tabaksblat R, Meier RJ, Kip BJ. *Applied Spectroscopy* (1992);**46**: 60-68.
- Tagami H, Kohdo Y. *Archives of Dermatology* (1985);**121**:642-645.
- Tagami H, Kanamaru Y, Inoue K, Suehisa S, Inoue F, Iwatsuki K, Yoshikuni K, Yamada M. *Journal of Investigative Dermatology* (1982);**78**:425-428.
- Tan A, Ziegler A, Steinbauer B, Seelig J. *Biophysical Journal* (2002);**83**:1547-1556.
- Tanojo H, Maibach H. dans:Percutaneous absorption: Drugs-cosmetics-mechanisms-methodology, Bronaugh RL, Maibach HI, éditeurs. New York: Dekker, (1999):939-950.
- Thewalt J, Kitson N, Araujo C, MacKay A, Bloom M. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1992);**188**:1247-1252.
- Thewalt JL, Bloom M. *Biophysical Journal* (1992);**63**:1176-1181.
- Thivolet J. dans:Précis de physiologie cutanée, Meynadier J, editor. Éditions de la Porte Verte Paris: (1980).
- Tilcock C.P.S, Cullis PR, Gruner SM. *Biochemistry* (1988);**27**:1415-1420.
- Tokudome Y, Sugibayashi K. *Journal of Controlled Release* (2004);**95**:267-274.

- Van Dijck PWM, De Kruijff B, Verkleij AJ, Van Deenen LLM, De Gier J. *Biochimica et Biophysica Acta* (1978);**512**:84-96.
- Van Dijck PWM, Ververgaert PHJTh, Verkleij AJ, Van Deenen LLM, De Gier J. *Biochimica et Biophysica Acta* (1975);**406**:465-478.
- Velkova V, Lafleur M. *Chemistry and Physics of Lipids* (2002);**117**:63-74.
- Velkova, V, Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, Montréal:(2000).
- Verkleij AJ, De Kruijff B, Ververgaert PHJT, Tocanne JF, Van Deenen LLM. *Biochimica et Biophysica Acta* (1974);**339**:432-437.
- Vicanova J, Boelsma E, Mommaas MA, Kempenaar JA, Forslind B, Pallon J, Elgerud T, Koerten HK, Ponec M. *Journal of Investigative Dermatology* (1998);**111**:97-106.
- Vist MR, Davis JH. *Biochemistry* (1990);**29**:451-464.
- Watts A, Harlos K, Marsh D. *Biochimica et Biophysica Acta* (1981);**645**:91-96.
- Weerheim A, Ponec M. *Archives of Dermatological Research* (2001);**293**:191-199.
- Wenk MR, Seelig J. *Journal of Physical Chemistry B* (1997);**101**:5224-5231.
- Wertz PW. *Acta Dermato-Venereologica* (2000);**Supplementum 208**:7-11.
- Wertz PW, Miethke MC, Long SA, Strauss JS, Downing DT. *Journal of Investigative Dermatology* (1985);**84**:410-412.
- Wertz PW, Downing DT. *Journal of Lipid Research* (1983);**24**:753-758.
- Wertz PW, Swartzendruber DC, Abraham W, Madison KC, Downing DT. *Archives of Dermatology* (1987);**123**:1381-1384.
- White SH, Mirejovsky D, King GI. *Journal of the American Chemical Society* (1988);**27**:3725-3732.
- Wieprecht T, Apostolov O, Seelig J. *Biophysical Chemistry* (2000);**85**:187-198.
- Wieprecht T, Beyermann M, Seelig J. *Biophysical Chemistry* (2002);**96**:191-201.
- Williams AC, Edwards HGM, Barry B.W. *International Journal of Pharmaceutics* (1992);**81**:R11-R12.
- Williams AC, Barry BW. dans:Percutaneous absorption; Drugs-cosmetics-mechanisms-

methodology, Bronaugh RL, Maibach HI, éditeurs. New York: Derek, (1999):499-513.

Williams AC, Barry BW, Edwards HGM, Farwell DW. *Pharmaceutical Research* (1993);**10**:1642-1647.

Williams KPJ, Pitt GD, Batchelder DN, Kip BJ. *Applied Spectroscopy* (1994);**48**:232-235.

Williams ML, Grayson S, Bonifas JN, Epstein EHJr, Elias PM. dans: Stratum Corneum, Marks R, Plewing G, éditeurs. Heidelberg: Springer-Verlag, (1983):79-84.

Williams ML. *Advances in Lipid Research* (1991);**24**:211-262.

Winsor T, Burch FE. *Archives of Internal Medicine* (1944);428-435.

Xiao C, Moore DJ, Rerek ME, Flach CR, Mendelsohn R. *Journal of Investigative Dermatology* (2005);**124**:622-632.

Xu X, London E. *Biochemistry* (2000);**39**:843-849.

Yang X, Beyenal H, Harkin G, Lewandowski Z. *Journal of Microbiological Methods* (2000);**39**:109-119.

Yarkley HJ, Summerly R. *Pharmacology & Therapeutics* (1981);**13**:357-383.

Yazdanian M. *International Journal of Pharmaceutics* (1994);**103**:93-96.

Zellmer S, Lasch J. *Journal of Chromatography B* (1997);**691**:321-329.

Zellmer S, Zimmermann I, Selle C, Sternberg B, Pohle W, Lasch J. *Chemistry and Physics of Lipids* (1998);**94**:97-108.

Zidovetzki R, Atiya AW, De Boeck H. *Membrane Biochemistry* (1989);**8**:177-186.

Annexe 1

CALCUL DE L'ENTROPIE TOPOGRAPHIQUE

L'entropie topographique est une mesure du caractère aléatoire de l'intensité des pixels d'une image monochromatique. Plus importante sera l'entropie topographique, plus importante sera l'hétérogénéité de l'échantillon cartographié.

Soit une image monochromatique dont les nuances de gris changent de 0 à 9, pour une échelle de 10 nuances, $P(a,b)$. On définit la matrice de dépendance horizontale G_h où $G_h(a,b)$ est la probabilité de passer horizontalement de la nuance de gris a vers b dans la matrice P .

$$G_h = \{G_h(a, b)\}$$

$$= \begin{pmatrix} G_h(0,0) & \dots & G_h(0,10) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ G_h(10,0) & \dots & G_h(10,10) \end{pmatrix}$$

$G_h(1,2)$ représente le nombre de fois où un pixel de couleur 1 est suivi d'un autre pixel de couleur 2, en allant de gauche à droite et de droite à gauche dans l'image. Pour éviter un effet de bord, on considère que le voisin immédiat du dernier point d'une ligne est le premier de cette même ligne. De la même façon la matrice de dépendance verticale G_v est donnée par :

$$G_v = \{G_v(a, b)\}$$

$$= \begin{pmatrix} G_v(0,0) & \dots & G_v(0,10) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ G_v(10,0) & \dots & G_v(10,10) \end{pmatrix}$$

où $G_v(a,b)$ est égal au nombre de fois où un pixel a est voisin d'un pixel b , du bas vers le haut et du haut vers le bas. La matrice de dépendance globale est alors définie comme la somme des matrices de dépendance horizontale et verticale :

$$G_{hv} = G_h + G_v = \{G_{hv}(a,b)\}$$

La normalisation de cette matrice est le résultat de la division de chaque élément de la matrice par la somme de celle-ci :

$$\begin{aligned} sum &= \sum_a \sum_b G_{hv}(a,b) \\ G_n &= G_{hv} / sum \end{aligned}$$

À partir de la matrice de dépendance normalisée, G_N , l'entropie topographique, TE est défini par la relation suivante :

$$TE = - \sum_{a,b} \sum_{G_n(a,b) \neq 0} G_n(a,b) \ln(G_n(a,b))$$

Les calculs ont été faits à partir du logiciel MathLab 7.0 (MathWorks, Inc). La routine utilisée est rapportée ci-dessous.

```

M = 14;
N = 14;
GM = 10;
GN = 10;

Gh = zeros(10,10);
Gv = zeros(10,10);
Ghv = zeros(10,10);

for i = 1:M
    for j = 1:N
        if (j == 1)
            Gh(P(i,j)+1,P(i,N)+1) = Gh(P(i,j)+1,P(i,N)+1) + 1;

```

```

    Gh(P(i,j)+1,P(i,j+1)+1) = Gh(P(i,j)+1,P(i,j+1)+1) + 1;
  else if (j == N)
    Gh(P(i,j)+1,P(i,1)+1) = Gh(P(i,j)+1,P(i,1)+1) + 1;
    Gh(P(i,j)+1,P(i,j-1)+1) = Gh(P(i,j)+1,P(i,j-1)+1) + 1;
  else
    Gh(P(i,j)+1,P(i,j-1)+1) = Gh(P(i,j)+1,P(i,j-1)+1) + 1;
    Gh(P(i,j)+1,P(i,j+1)+1) = Gh(P(i,j)+1,P(i,j+1)+1) + 1;
  end
end
end
end

```

```

for i = 1:M
  for j = 1:N
    if (i == 1)
      Gv(P(i,j)+1,P(M,j)+1) = Gv(P(i,j)+1,P(M,j)+1) + 1;
      Gv(P(i,j)+1,P(i+1,j)+1) = Gv(P(i,j)+1,P(i+1,j)+1) + 1;
    else if (i == M)
      Gv(P(i,j)+1,P(1,j)+1) = Gv(P(i,j)+1,P(1,j)+1) + 1;
      Gv(P(i,j)+1,P(i-1,j)+1) = Gv(P(i,j)+1,P(i-1,j)+1) + 1;
    else
      Gv(P(i,j)+1,P(i-1,j)+1) = Gv(P(i,j)+1,P(i-1,j)+1) + 1;
      Gv(P(i,j)+1,P(i+1,j)+1) = Gv(P(i,j)+1,P(i+1,j)+1) + 1;
    end
  end
end
end
end

```

$Ghv = Gh + Gv;$

$sum = 0;$

```

for i = 1:GM
  for j = 1:GN
    sum = sum + Ghv(i,j);
  end
end

```

$Gn = Ghv / sum;$

$TE = 0;$

```

for i = 1:GM
  for j = 1:GN
    if (Gn(i,j) == 0)
      continue;
    end
  end
end

```

```
end
TE = (TE + ( Gn(i,j) * log(Gn(i,j)) ) *) -1;
end
end
```

