

2m 11.2440.9

Université de Montréal

Étude des interactions lipide/lipide  
du stratum corneum par spectroscopie  
infrarouge par transformée de Fourier

par

Danielle Bonenfant

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)  
en chimie

Février 1996

©Danielle Bonenfant, 1996



QD

3

U54

1996

V.008

**Page d'identification du jury**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Étude des interactions lipide/lipide  
du stratum corneum par spectroscopie  
infrarouge par transformée de Fourier

présenté par:

Danielle Bonenfant

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Julian Zhu	président-rapporteur
Michel Lafleur	directeur de recherche
Christian Reber	membre du jury

Mémoire accepté le:.....

## SOMMAIRE

Une étude a été entreprise dans le but de déterminer les interactions pouvant survenir entre certains lipides impliqués dans les fonctions de barrière de perméabilité et de desquamation du stratum corneum. Cette étude a consisté à étudier le thermotropisme de diverses dispersions composées de sphingomyéline, céramide 3, acide palmitique perdeutééré, cholestérol et sulfate de cholestérol en proportions variées, par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier. Cette étude a été également effectuée aux pH 5.2 et 7.4 afin d'estimer l'influence de l'environnement ionique sur l'interaction de ces lipides. Le thermotropisme des dispersions de céramide 3 et de sphingomyéline a indiqué que le céramide 3 adopte un empilement plus serré que la sphingomyéline aux deux pH. Les résultats ont également indiqué que l'acide palmitique rigidifie la bicouche de sphingomyéline et fluidifie la dispersion de céramide 3, et que la miscibilité de cet acide gras est plus élevée avec la sphingomyéline qu'avec le céramide 3. Toutefois, la miscibilité de l'acide palmitique et du céramide 3 est augmentée par le cholestérol et le sulfate de cholestérol à pH 5.2, ce qui semble affecter leur thermotropisme en induisant la formation d'une phase très ordonnée à 37 °C. Par contre, le cholestérol et le sulfate de cholestérol semblent accentuer la déprotonation de l'acide palmitique en présence du céramide 3 à pH 7.4, ce qui semble provoquer une séparation de phase de l'acide gras et du céramide 3. Le cholestérol induit également la formation de la phase liquide ordonnée au sein de la bicouche de sphingomyéline en présence de l'acide palmitique aux pH 5.2 et 7.4. Toutefois, le sulfate de cholestérol semble être moins efficace que le cholestérol à abolir la transition de phase de la sphingomyéline et de l'acide palmitique.

L'analyse des résultats nous a permis de déterminer que l'acide palmitique, le cholestérol et le sulfate de cholestérol interagissent avec la sphingomyéline et le céramide 3 par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes et de van der Waals impliquant leurs portions hydrophobes, et de liaisons hydrogène qui impliquent leurs groupements d'interface et de tête

polaire. Il ressort également que les implications de ces lipides et du pH dans les fonctions de barrière de perméabilité et de desquamation pourraient être purement structurales. En fait, la structure de la tête polaire du céramide 3 permet l'empilement serré des lipides ainsi que l'imperméabilité des membranes, le cholestérol et le sulfate de cholestérol augmentent la miscibilité de l'acide palmitique et du céramide 3 à pH 5.2, et l'environnement à pH 5.2 semble être nécessaire au maintien de l'intégrité du stratum corneum.

## TABLE DES MATIÈRES

	Page
SOMMAIRE.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	xviii
REMERCIEMENTS.....	xix

### CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Structure, composition et fonctions de l'épiderme.....	1
1.1.1 Fonction de barrière de perméabilité de l'épiderme.....	1
1.1.2 Fonction de desquamation de l'épiderme.....	7
1.2 Les membranes modèles.....	7
1.2.1 Généralités.....	7
1.2.2 Modèle des principales interactions régissant les bicouches de sphingolipides..	10
1.2.3 Modèle des interactions régissant les bicouches de sphingolipides et de cholestérol .....	10
1.2.4 Modèle décrivant les interactions entre l'acide palmitique, le cholestérol et le sulfate de cholestérol.....	12
1.3 Hydratation et thermotropisme des lipides membranaires.....	12
1.3.1 Hydratation des bicouches lipidiques.....	14
1.3.2 Thermotropisme des lipides membranaires....	14
1.4 Présentation de nos travaux.....	17
1.4.1 Technique utilisée.....	17
1.4.2 Nature des travaux effectués.....	20

### CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Provenance et pureté des produits.....	21
--	----

2.2 Préparation des échantillons et acquisition des spectres infrarouges.....	21
2.3 Attribution des bandes d'absorption.....	23
2.3.1 Modes de vibration des chaînes acyles.....	23
2.3.2 Modes de vibration du groupement amide.....	23
2.3.3 Modes de vibration des groupements des têtes polaires.....	24
2.4 Traitement des spectres infrarouges.....	24
2.4.1 Corrections des contributions de la vapeur d'eau, du tampon HEPES, du cholestérol et du sulfate de cholestérol.....	24
2.4.2 Détermination de la position et de la largeur des bandes d'absorption.....	26

### CHAPITRE 3. ÉTUDE DU THERMOTROPISME DES DISPERSIONS DE SPHINGOMYÉLINE ET DE CÉRAMIDE 3

3.1 Résultats.....	27
3.1.1 Région des modes d'élongation C-H.....	27
3.1.2 Région du mode de déformation des CH <sub>2</sub> .....	30
3.1.3 Région des modes de vibration du groupement amide.....	30
3.1.4 Région des modes d'élongation du groupement phosphate.....	35
3.2 Discussion.....	35

### CHAPITRE 4. ÉTUDE DE L'INTERACTION DE L'ACIDE PALMITIQUE PERDEUTÉRÉ AVEC LA SPHINGOMYÉLINE ET LE CÉRAMIDE 3

4.1 Résultats.....	43
4.1.1 Régions des modes des élongations symétriques C-H et C-D.....	43
4.1.2 Région du mode de déformation des CH <sub>2</sub> .....	45
4.1.3 Région des modes de vibration des groupements carboxyle et amide.....	45
4.1.4 Région des modes d'élongation du groupement phosphate.....	49
4.2 Discussion.....	49

CHAPITRE 5. ÉTUDE DE L'INTERACTION DU CHOLESTÉROL ET DU  
SULFATE DE CHOLESTÉROL AVEC LA SPHINGOMYÉLINE  
ET LE CÉRAMIDE 3

5.1 Résultats.....	56
5.1.1 Région du mode d'élongation symétrique C-H.....	56
5.1.2 Région du mode de déformation des CH <sub>2</sub> .....	56
5.1.3 Région des modes de vibration du groupement amide.....	59
5.1.4 Région des modes d'élongation du groupement phosphate.....	63
5.2 Discussion.....	63

CHAPITRE 6. ÉTUDE DE L'INTERACTION DU CHOLESTÉROL ET DU  
SULFATE DE CHOLESTÉROL AVEC LA SPHINGOMYÉLINE  
EN PRÉSENCE D'ACIDE PALMITIQUE PERDEUTÉRÉ

6.1 Résultats.....	70
6.1.1 Régions des modes des élongations symétriques C-H et C-D.....	70
6.1.2 Région du mode de déformation des CH <sub>2</sub> .....	70
6.1.3 Région des modes de vibration des groupements carboxyle et amide.....	72
6.1.4 Région des modes d'élongation du groupement phosphate.....	76
6.2 Discussion.....	76

CHAPITRE 7. ÉTUDE DE L'INTERACTION DU CHOLESTÉROL ET DU  
SULFATE DE CHOLESTÉROL AVEC LE CÉRAMIDE 3 EN  
PRÉSENCE D'ACIDE PALMITIQUE PERDEUTÉRÉ

7.1 Résultats.....	83
7.1.1 Régions des modes des élongations symétriques C-H et C-D.....	83
7.1.2 Région du mode de déformation des CH <sub>2</sub> .....	85
7.1.3 Région des modes de vibration des groupements carboxyle et amide.....	85
7.2 Discussion.....	90

CHAPITRE 8. CONCLUSION.....	98
BIBLIOGRAPHIE.....	101
ANNEXE I. Températures médianes des transitions de phase des dispersions de sphingomyéline, SPM/PA-d <sub>31</sub> , SPM/Chol, SPM/S.Chol, SPM/PA-d <sub>31</sub> /Chol, SPM/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol, céramide 3, CER3/PA-d <sub>31</sub> , CER3/Chol, CER3/S.Chol, CER3/PA-d <sub>31</sub> /Chol et CER3/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol évaluées à l'aide des bandes d'élongation symétriques C-H et C-D	
ANNEXE II. Position des bandes d'élongation C-H, C-D, carbonyle, phosphate et des vibrations amide I et amide II des sphingomyéline, céramide 3 et acide palmitique perdeutééré mesurée dans le KBr	
ANNEXE III. Positions des bandes des élongations antisymétrique et symétrique des groupements phosphates des dispersions de sphingomyéline, SPM/PA-d <sub>31</sub> , SPM/Chol, SPM/S.Chol, SPM/PA-d <sub>31</sub> /Chol et SPM/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol	
ANNEXE IV. Effet de la température sur la largeur de: A) la bande amide I et B) la bande amide II de la dispersion de sphingomyéline à pH 5.2 et pH 7.4; C) la bande amide I et D) la bande amide II de la dispersion de céramide 3 à pH 5.2 et pH 7.4.	
ANNEXE V. Effet de la température sur la largeur de la bande: a) amide I et B) amide II de la dispersion de SPM/PA-d <sub>31</sub> à pH 5.2 et pH 7.4; C) amide I et D) amide II de la dispersion de CER3/PA-d <sub>31</sub> à pH 5.2 et pH 7.4.	
ANNEXE VI. Effet de la température sur la largeur de: A) la bande amide I et B) la bande amide II des dispersions de SPM/Chol à pH 5.2 et pH 7.4 et de SPM/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4; C) la bande amide I et D) la bande amide II des dispersions de	

CER3/Chol à pH 5.2 et pH 7.4 et de CER3/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4.

ANNEXE VII. Effet de la température sur la largeur de: A) la bande amide I et B) la bande amide II de la dispersion de SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 et pH 7.4; C) amide I et D) amide II de la dispersion de SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4.

ANNEXE VIII. Effet de la température sur la largeur de: A) la bande amide I et B) la bande amide II de la dispersion de CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 et pH 7.4; C) la bande amide I et D) la bande amide II de la dispersion de CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4.

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau I: Composition lipidique des diverses couches cellulaires de l'épiderme abdominal humain...	2
Tableau II: Description des dispersions lipidiques étudiées.....	22

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1: Représentation schématique de l'épiderme.....	2
Figure 2: Modèle briques et mortier représentant le stratum corneum.....	3
Figure 3: Schéma qui illustre: A) la formation de la barrière de perméabilité de la peau. B) Micrographie électronique des structures lamellaires lipidiques de l'épiderme de souris néonatales.....	4
Figure 4: Structures représentatives des céramides du stratum corneum humain.....	5
Figure 5: Arrangement moléculaire proposé d'une unité de Landmann, décrivant l'association des lamelles lipidiques intercellulaires présentes entre les enveloppes de deux cornéocytes.....	6
Figure 6: Représentation schématique de la structure de: A) cholestérol; B) sulfate de cholestérol; C) sphingomyéline et D) céramide 3 de cerveau de bovin; E) acide palmitique perdeutééré.....	9
Figure 7. Schéma montrant: A) la position adoptée par le cholestérol dans une bicouche lipidique; B) l'arrangement du cholestérol et des phospholipides dans une membrane cellulaire; C) la liaison hypothétique du groupement $3\beta$ -OH du cholestérol avec le groupement carbonyle d'un phospholipide et l'eau.....	11
Figure 8: Modèle qui montre les différences pouvant survenir dans la liaison hydrogène suite aux différentes interactions moléculaires du cholestérol versus sulfate de cholestérol avec les acides gras membranaires du stratum	

corneum.....	13
Figure 9: Représentation schématique du mécanisme d'hydratation d'une bicouche lipidique.....	15
Figure 10: Représentation schématique d'une bicouche lipidique subissant une transition de la phase gel à la phase liquide cristalline.....	16
Figure 11: Modes vibrationnels d'un groupement H-C-H: A) élongation symétrique; B) élongation antisymétrique; C) balancement; D) rotation plane; E) torsion et F) cisaillement dans le plan.....	18
Figure 12: Spectres infrarouges mesurés à 20 °C de: A) vapeur d'eau; B) tampon HEPES (HEPES 100 mM, NaCl 100 mM, 5 mM) à pH 5.2; C) dispersion de SPM/PA-d <sub>31</sub> (2:1 mole) dans le tampon HEPES à pH 5.2; D) Spectre C corrigé pour les contributions du tampon HEPES et de la vapeur d'eau.....	25
Figure 13: Spectres infrarouges de la région des modes d'élongation C-H de la dispersion de sphingomyéline à pH 5.2 mesurés à 0 et 75 °C.....	28
Figure 14: Effet de la température sur: A) la position; B) la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H des dispersions de sphingomyéline à pH 5.2 et pH 7.4 et de céramide 3 à pH 5.2 et pH 7.4.....	29
Figure 15: Spectres infrarouges de la région du mode de déformation des CH <sub>2</sub> de la dispersion de: A) sphingomyéline à pH 5.2; B) céramide 3 à pH 5.2, mesurés à 0 et 75 °C. Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de:	

C) sphingomyéline à pH 5.2; D) céramide 3 à pH 5.2.....	31
Figure 16: Effet de la température sur la position des composantes de la bande de déformation des CH <sub>2</sub> de la dispersion de: A) sphingomyéline à pH 5.2 et pH 7.4; B) céramide 3 à pH 5.2 et pH 7.4....	32
Figure 17: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration amide I et amide II de la dispersion de: A) sphingomyéline à pH 5.2; B) sphingomyéline à pH 7.4; C) céramide 3 à pH 5.2; D) céramide 3 à pH 7.4, mesurés à 0 et 75 °C. Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) sphingomyéline à pH 5.2; F) sphingomyéline à pH 7.4; G) céramide 3 à pH 5.2; H) céramide 3 à pH 7.4.....	33
Figure 18: Effet de la température sur la position de: A) la bande amide I et B) la bande amide II de la dispersion de sphingomyéline à pH 5.2 et pH 7.4; C) la bande amide I D) la bande amide II de la dispersion de céramide 3 à pH 5.2 et pH 7.4.....	34
Figure 19: Spectres infrarouges de la région des modes d'élongation phosphate mesurés à 0 et 75 °C, de la dispersion de sphingomyéline à pH 5.2....	36
Figure 20: Effet de la température sur: A) la position et B) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 et pH 7.4 et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 et pH 7.4 du mélange SPM/PA-d <sub>31</sub> ; C) la position et B) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 et pH 7.4 et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 et pH 7.4 du mélange CER3/PA-d <sub>31</sub> ..	44

- Figure 21: Effet de la température sur la position des composantes de la bande de déformation des  $\text{CH}_2$  de la dispersion de: A) SPM/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 5.2 et pH 7.4; B) CER3/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 5.2 et pH 7.4..... 46
- Figure 22: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration du groupement carboxyle, amide I et amide II de la dispersion de: A) SPM/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 5.2 et B) SPM/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 7.4; C) CER3/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 5.2; D) CER3/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 7.4 mesurés à 0 et 75 °C. Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) SPM/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 5.2; F) SPM/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 7.4; G) CER3/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 5.2; H) CER3/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 7.4..... 47
- Figure 23: Effet de la température sur la position de la bande: A) de l'élongation du groupement carboxyle, B) amide I et C) amide II de la dispersion de SPM/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 5.2 et pH 7.4; D) de l'élongation du groupement carboxyle, E) amide I et F) amide II de la dispersion de CER3/PA- $\text{d}_{31}$  à pH 5.2 et pH 7.4..... 48
- Figure 24: Effet de la température sur: A) la position et B) la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H des dispersions de SPM/Chol à pH 5.2 et pH 7.4 et de CER3/Chol à pH 5.2 et pH 7.4, et sur: C) la position et D) la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H des dispersions de SPM/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4 et de CER3/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4..... 57
- Figure 25: Effet de la température sur la position de la composante de la bande de déformation des  $\text{CH}_2$  de la dispersion de: A) SPM/Chol à pH 5.2 et pH 7.4 et SPM/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4; B) CER3/Chol à pH 5.2 et pH 7.4 et CER3/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4..... 25

- Figure 26: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration amide I et amide II de la dispersion de: A) SPM/Chol à pH 5.2; B) SPM/Chol à pH 7.4; C) CER3/Chol à pH 5.2; D) CER3/Chol à pH 7.4, mesurés à 0 et 75 °C. Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) SPM/Chol à pH 5.2; F) SPM/Chol à pH 7.4; G) CER3/Chol à pH 5.2; H) CER3/Chol à pH 7.4..... 60
- Figure 27: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration amide I et amide II de la dispersion de: A) SPM/S.Chol à pH 5.2; B) SPM/S.Chol à pH 7.4; C) CER3/S.Chol à pH 5.2; D) CER3/S.Chol à pH 7.4, mesurés à 0 et 75 °C. Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) SPM/S.Chol à pH 5.2; F) SPM/S.Chol à pH 7.4; G) CER3/S.Chol à pH 5.2; H) CER3/S.Chol à pH 7.4..... 61
- Figure 28: Effet de la température sur la position de: A) la bande amide I et B) la position de la bande amide II des dispersions de SPM/Chol à pH 5.2 et pH 7.4 et de SPM/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4; D) la bande amide I et B) la bande amide II des dispersions de CER3/Chol à pH 5.2 et pH 7.4 et de CER3/S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4..... 62
- Figure 29: Effet de la température sur: A) la position et B) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 et pH 7.4 et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 et pH 7.4 du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol; C) la position et D) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 et pH 7.4 et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 et pH 7.4 du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol..... 71

- Figure 30: Effet de la température sur la position de la bande de déformation des  $\text{CH}_2$  de la dispersion de: A) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /Chol à pH 5.2 et pH 7.4; B) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4..... 73
- Figure 31: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration du groupement carboxyle, amide I et amide II de la dispersion de: A) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /Chol à pH 5.2; B) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /Chol à pH 7.4; C) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /S.Chol à pH 5.2; D) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /S.Chol à pH 7.4, mesurés à 0 et 75 °C. Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /Chol à pH 5.2; F) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /Chol à pH 7.4; G) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /S.Chol à pH 5.2; H) SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /S.Chol à pH 7.4..... 74
- Figure 32: Effet de la température sur la position de la bande: A) de l'élongation du groupement carboxyle, B) amide I et C) amide II de la dispersion de SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /Chol à pH 5.2 et pH 7.4; D) de l'élongation du groupement carboxyle, E) amide I et F) amide II de la dispersion de SPM/PA- $\text{d}_{31}$ /S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4..... 75
- Figure 33: Effet de la température sur: A) la position et B) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 et pH 7.4 et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 et pH 7.4 du mélange CER3/PA- $\text{d}_{31}$ /Chol, et sur: C) la position et B) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 et pH 7.4 et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 et pH 7.4 du mélange CER3/PA- $\text{d}_{31}$ /S.Chol..... 84
- Figure 34: Effet de la température sur la position de la bande de déformation des  $\text{CH}_2$  de la dispersion de: A) CER3/PA- $\text{d}_{31}$ /Chol à pH 5.2 et pH 7.4; B) CER3/PA- $\text{d}_{31}$ /S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4..... 86

Figure 35: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration du groupement carboxyle, amide I et amide II de la dispersion de:	
A) CER3/PA-d <sub>31</sub> /Chol à pH 5.2; D) CER3/PA-d <sub>31</sub> /Chol à pH 7.4; C) CER3/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol à pH 5.2; D) CER3/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol à pH 7.4, mesurés à 0 et 75 °C. Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de:	
E) CER3/PA-d <sub>31</sub> /Chol à pH 5.2; F) CER3/PA-d <sub>31</sub> /Chol à pH 7.4; G) CER3/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol à pH 5.2; H) CER3/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol à pH 7.4.....	87

Figure 36: Effet de la température sur la position de la bande: A) de l'élongation du groupement carboxyle, B) amide I et C) amide II de la dispersion de CER3/PA-d <sub>31</sub> /Chol à pH 5.2 et pH 7.4; D) de l'élongation du groupement carboxyle, E) amide I et F) amide II de la dispersion de CER3/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol à pH 5.2 et pH 7.4.....	89
---	----

## LISTE DES SYMBOLES ET DES ABRÉVIATIONS

CER3:	Céramide 3
Chol:	Cholestérol
DMPC:	Dimyristoylphosphatidylcholine
DPPC:	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPG:	Dipalmitoylphosphatidylglycérol
DTGS:	Sulfate de triglycine perdeutééré
EDTA:	Acide éthylènediaminetétraacétique
FTIR:	Spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier
HEPES:	Acide N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique]
lo:	Phase liquide ordonnée
MCT:	Tellurure de mercure et cadmium
PA-d <sub>31</sub> :	Acide palmitique perdeutééré
PC:	Phosphatidylcholine
POPC:	1-palmitoyl-2-oléoyl-phosphatidylcholine
POPE:	1-palmitoyl-2-oléoyl-phosphatidyléthanolamine
PPetPC:	1-palmitoyl-2-petroselinoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
RMN:	Résonance magnétique nucléaire
S.Chol:	Sulfate de cholestérol
SPM:	Sphingomyéline
T <sub>m</sub> :	Température de transition
$\bar{\nu}$ :	Nombre d'onde
$\bar{\nu}_{as}$ :	Nombre d'onde du mode d'élongation antisymétrique
$\bar{\nu}_s$ :	Nombre d'onde du mode d'élongation symétrique

**REMERCIEMENTS**

Je désire remercier mon directeur de recherche, le professeur Michel Lafleur pour l'aide qu'il m'a apportée au cours de ma recherche.

Je tiens également à remercier sincèrement madame Murielle Mimeault pour avoir accepté de superviser la rédaction des derniers correctifs qui ont été apportés à ce mémoire de maîtrise. Ses conseils et ses idées ont été très appréciés lors de cette rédaction.

## **CHAPITRE 1. INTRODUCTION**

### **1.1 Structure, composition et fonctions de l'épiderme**

De manière générale, les membranes biologiques sont constituées d'un assemblage de lipides et de protéines régi par des interactions non covalentes. La nature et la distribution de ces lipides et de ces protéines s'avèrent être d'une très grande importance car elles figurent au nombre des facteurs qui confèrent les fonctions spécifiques attribuées à une membrane (1). Parmi les membranes biologiques existant chez les mammifères, la plus grande est la peau. Celle-ci mesure environ 20 000 cm<sup>2</sup> chez l'homme et recouvre la totalité du corps (2). La peau cumule de multiples fonctions, dont certaines dépendent spécifiquement de la structure et de la composition de l'épiderme. Le schéma de la figure 1 montre que l'épiderme possède une structure complexe composée de quatre couches cellulaires formant un épithélium stratifié. Chacune de ces strates cellulaires contient une vaste gamme de lipides. À titre d'exemple, la concentration des lipides de l'épiderme abdominal humain est donnée au tableau I. Ces couches cellulaires diffèrent principalement par leur contenu en phospholipides, acides gras et céramides. Ces différences dérivent du processus de différenciation cellulaire de l'épiderme, au cours duquel les acides gras et les céramides sont synthétisés suite à l'hydrolyse enzymatique des glycosylcéramides et des phospholipides incluant la sphingomyéline. Cette hydrolyse est accompagnée de la migration des lipides de la couche basale vers le stratum corneum (4,7-9).

Parmi les fonctions qui sont assumées par l'épiderme, on compte la barrière de perméabilité, la desquamation et plusieurs rôles protecteurs contre toutes sortes d'agresseurs tels que les rayons nocifs et les bactéries (2). Dans notre travail, nous étudierons les propriétés de mélange de certains lipides du stratum corneum. Ces propriétés peuvent avoir une influence sur deux de ces fonctions, soit la barrière de perméabilité et la desquamation.

#### **1.1.1 Fonction de barrière de perméabilité de l'épiderme**

La barrière de perméabilité est la fonction qui permet

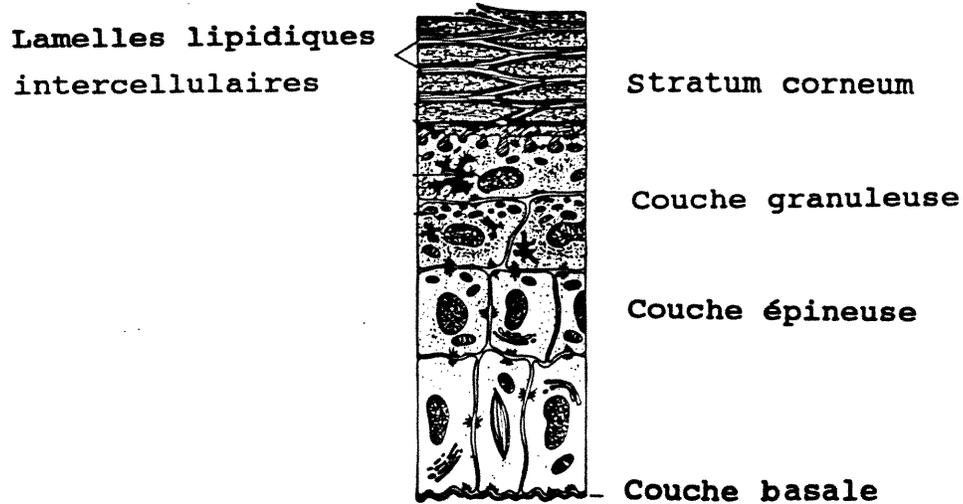


Figure 1: Représentation schématique de l'épiderme (3).

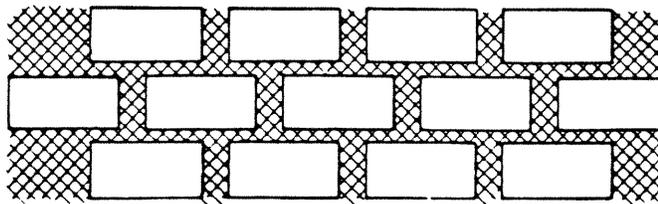
Tableau I

Composition lipidique des diverses couches cellulaires de l'épiderme abdominal humain

Composition	Basale/Épineuse	Granuleuse	Stratum corneum
<b>Phospholipides</b>	44.5 ± 3.4	25.3 ± 2.6	6.6 ± 2.2
<b>Sulfate de cholestérol</b>	2.6 ± 3.4	5.5 ± 1.3	2.0 ± 0.3
<b>Lipides neutres</b>			
stérois libres	11.2 ± 1.7	11.5 ± 1.1	18.9 ± 1.5
acides gras	7.0 ± 2.1	9.2 ± 1.5	26.0 ± 5.0
triglycérides	12.4 ± 2.9	24.7 ± 4.0	variable
stérois/esters	5.3 ± 1.3	4.7 ± 0.7	7.3 ± 1.2
squalènes	4.9 ± 1.1	4.6 ± 1.0	6.6 ± 2.7
n-alcanes	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.8	8.2 ± 3.5
<b>Sphingolipides</b>			
glucosylcéramides	3.5 ± 0.3	5.8 ± 0.2	trace
céramides	3.8 ± 0.2	8.8 ± 0.2	24.4 ± 3.8
<b>Total</b>	99.1	101.1	99.9

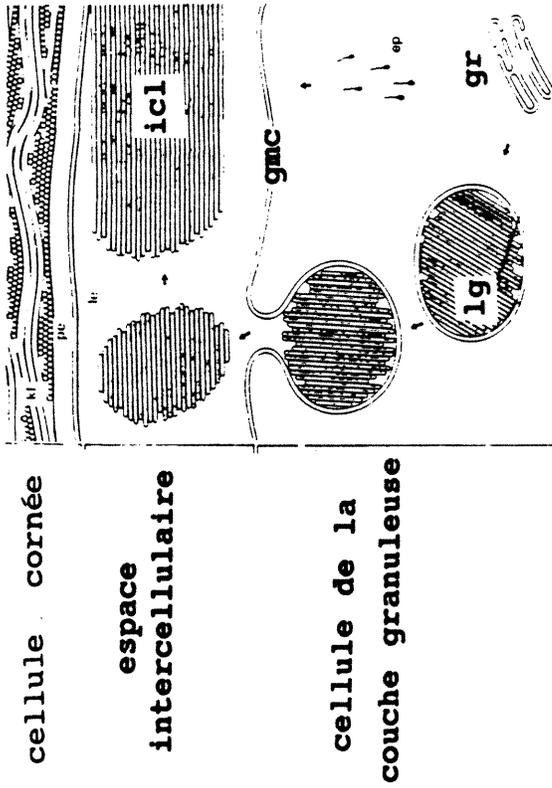
De Elias et coll. (4). Les valeurs sont données en % poids. Les lipides sont classés selon la nomenclature établie dans la littérature (5,6).

à l'épiderme de régulariser la pénétration de l'eau et des drogues à travers la peau et de protéger l'organisme de la dessiccation lorsqu'il est exposé à un environnement sec (7,10-13). Cette fonction a été associée à la structure et à la composition lipidique du stratum corneum (14,15). De manière générale, le stratum corneum est entièrement composé de cellules plates et mortes chargées de kératine qui sont nommées soit cornéocytes ou kératinocytes selon les auteurs (2,4,16). Ces cellules kératinisées sont encastrées dans une matrice intercellulaire constituée de feuilletts multilamellaires dérivant de la fusion d'un ensemble de disques lamellaires de lipides (13,17,18). La structure de cette couche cornée a été illustrée à l'aide du modèle briques et mortier présenté à la figure 2. Dans ce modèle, les cornéocytes sont représentés par les briques, et la matrice lipidique par le mortier (19). Une représentation schématique de la formation de la barrière de perméabilité ainsi qu'une représentation de la structure en disques lamellaires lipidiques de l'épiderme de souris obtenue par microscopie électronique sont également montrées à la figure 3.

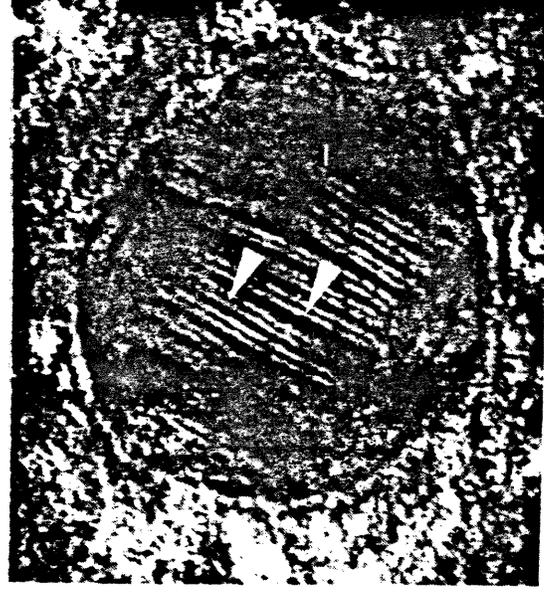


**Figure 2: Modèle briques et mortier représentant le stratum corneum (19). Les cornéocytes sont représentés par les rectangles vides et les lipides par les espaces hachurés.**

La matrice intercellulaire du stratum corneum est caractérisée par son haut contenu en cholestérol, acides gras et céramides (tableau I). Ces trois constituants, en plus du sulfate de cholestérol, sont réputés pour jouer des rôles critiques dans le maintien de la barrière de perméabilité (21-23). Toutefois, les lipides les plus essentiels au maintien de cette fonction sont les céramides, dû à leur structure. Les céramides du stratum corneum, à l'exception du céramide 1, sont



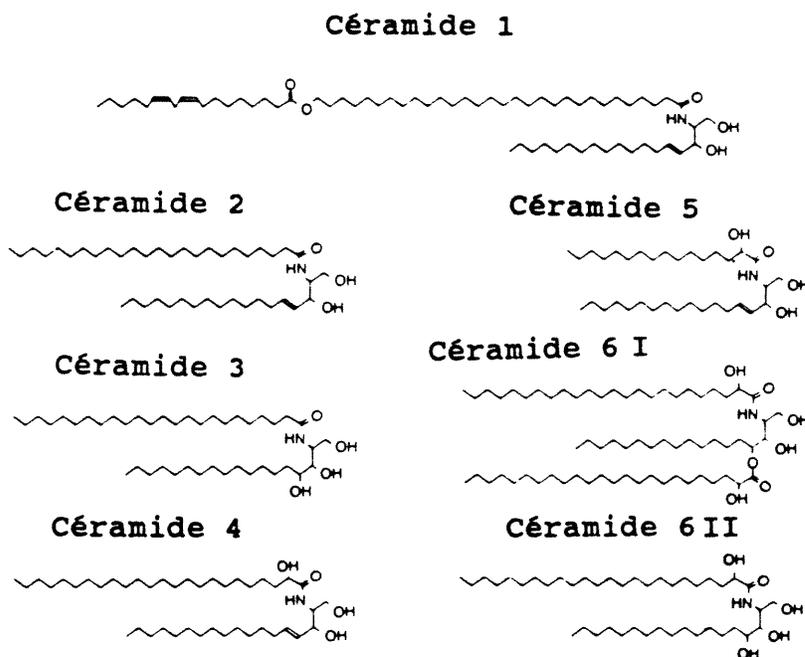
A



B

Figure 3: Schéma qui illustre: A) la formation de la barrière de perméabilité de la peau. Ce schéma montre la formation d'un granule lamellaire (lg) possiblement dans l'appareil de Golgi (gr) d'une cellule de la couche granuleuse (gmc), l'excrétion du contenu (disques lamellaires lipidiques) de ce granule dans l'espace intercellulaire et la fusion côte-à-côte de ces disques lamellaires menant à la formation des lamelles intercellulaires (icl) qui constituent la barrière de perméabilité. B) Micrographie électronique des structures lamellaires lipidiques de l'épiderme de souris néonatales montrant la membrane entourant les granules lamellaires lipidiques dans une cellule de la couche granuleuse (les disques lamellaires y apparaissent sous la forme de bandes lumineuses et de bandes denses en alternance) (7,20).

des lipides dont les chaînes acyles sont saturées (7,24,25). Cette particularité leur permet d'adopter un empilement très serré et de former une structure hautement imperméable et résistante à l'oxydation (7). De plus, les céramides sont les seuls lipides à servir de charpente lors de la formation de la structure lamellaire de la matrice (26). Cette structure lamellaire est indispensable au maintien de la barrière de perméabilité car elle assure la rétention de l'eau au niveau du stratum corneum (27). Les céramides du stratum corneum sont de six types dont les structures et concentrations varient selon l'espèce animale et la région corporelle où la peau est située (7,24,26). À titre d'exemple, la structure des six types de céramide retrouvés dans le stratum corneum humain est montrée à la figure 4. Ces six types de céramide sont tous impliqués dans le maintien de la barrière de perméabilité (28-30). Toutefois, le céramide 1 sert également de rivet entre les disques lipidiques de la matrice, ce qui en assure la fusion et stabilise les feuilletts multilamellaires qui en résultent (figure 5) (24,31).



**Figure 4: Structures représentatives des céramides du stratum corneum humain (7).**

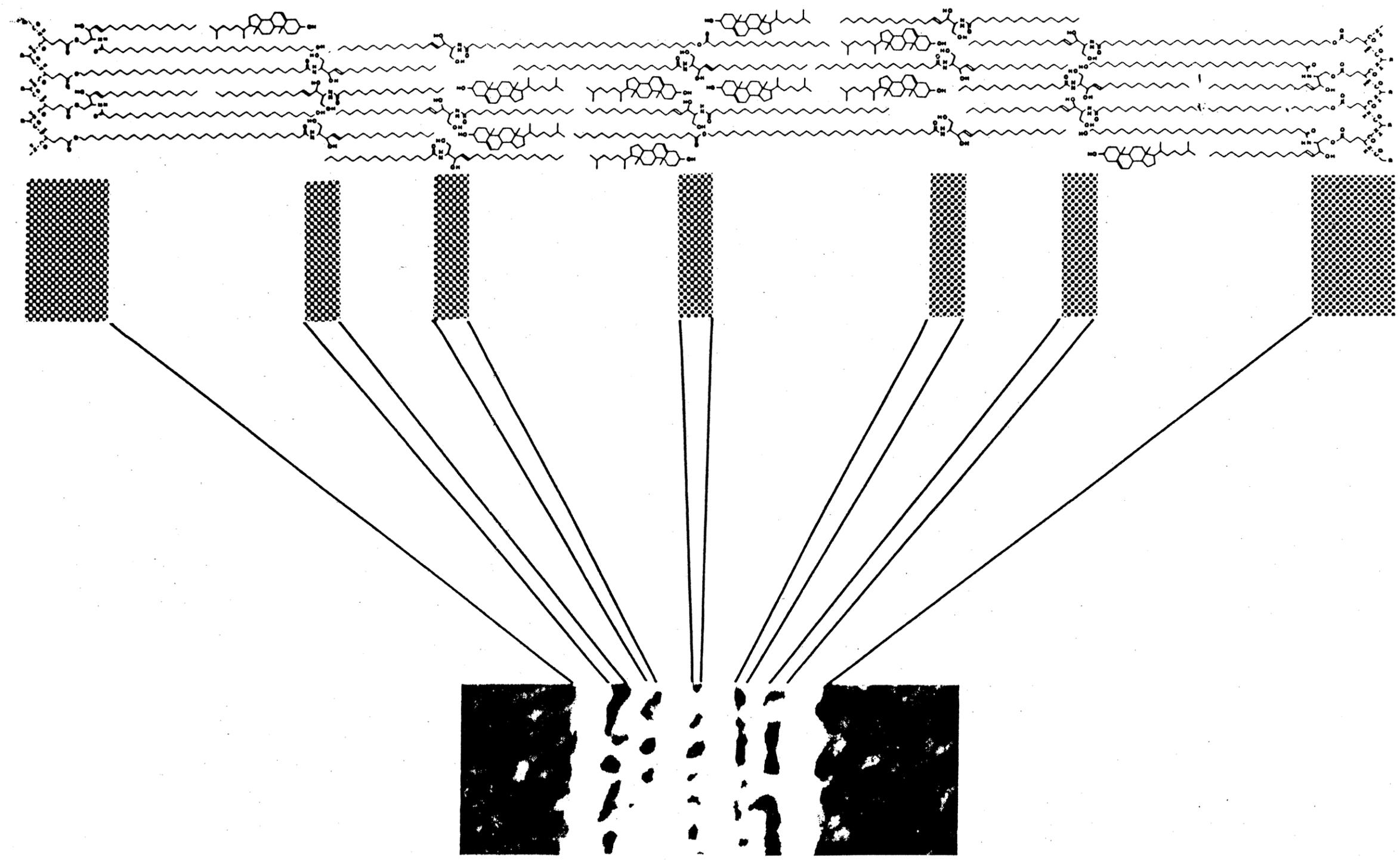


Figure 5: Arrangement moléculaire proposé d'une unité de Landmann, décrivant l'association des lamelles lipidiques intercellulaires présentes entre les enveloppes de deux cornéocytes. Les lamelles lipidiques intercellulaires y sont représentées par les bandes lumineuses (31).

Le cholestérol, les acides gras et le sulfate de cholestérol ont pour rôle d'assurer le maintien de l'intégrité du stratum corneum. Le cholestérol et le sulfate de cholestérol sont des constituants impliqués dans la cohésion entre les cornéocytes (32,33). Pour leur part, les acides gras participent au maintien de la structure des feuilletts multilamellaires de la matrice (25). Les acides gras du stratum corneum sont d'une grande diversité, leurs chaînes varient de 12 à 24 carbones et les plus abondants sont les acides linoléique et palmitique (32).

### **1.1.2 Fonction de desquamation de l'épiderme**

La desquamation est le processus durant lequel les cornéocytes morts se détachent de la matrice du stratum corneum pour être éliminés à la surface de la peau. Plusieurs constituants du stratum corneum sont impliqués dans la desquamation, toutefois les plus importants sont les lipides de la matrice qui jouent un rôle majeur dans la cohésion intercellulaire, soit le cholestérol et le sulfate de cholestérol (34,35). Il a été notamment proposé que le processus de la desquamation se produirait lorsque le sulfate de cholestérol est hydrolysé (36-38). En effet, il a été postulé que le sulfate de cholestérol peut être impliqué dans l'adhésion interlamellaire des feuilletts lipidiques, et que son hydrolyse conduirait à la diminution des interactions existant entre les cornéocytes et la matrice du stratum corneum (20).

## **1.2 Les membranes modèles**

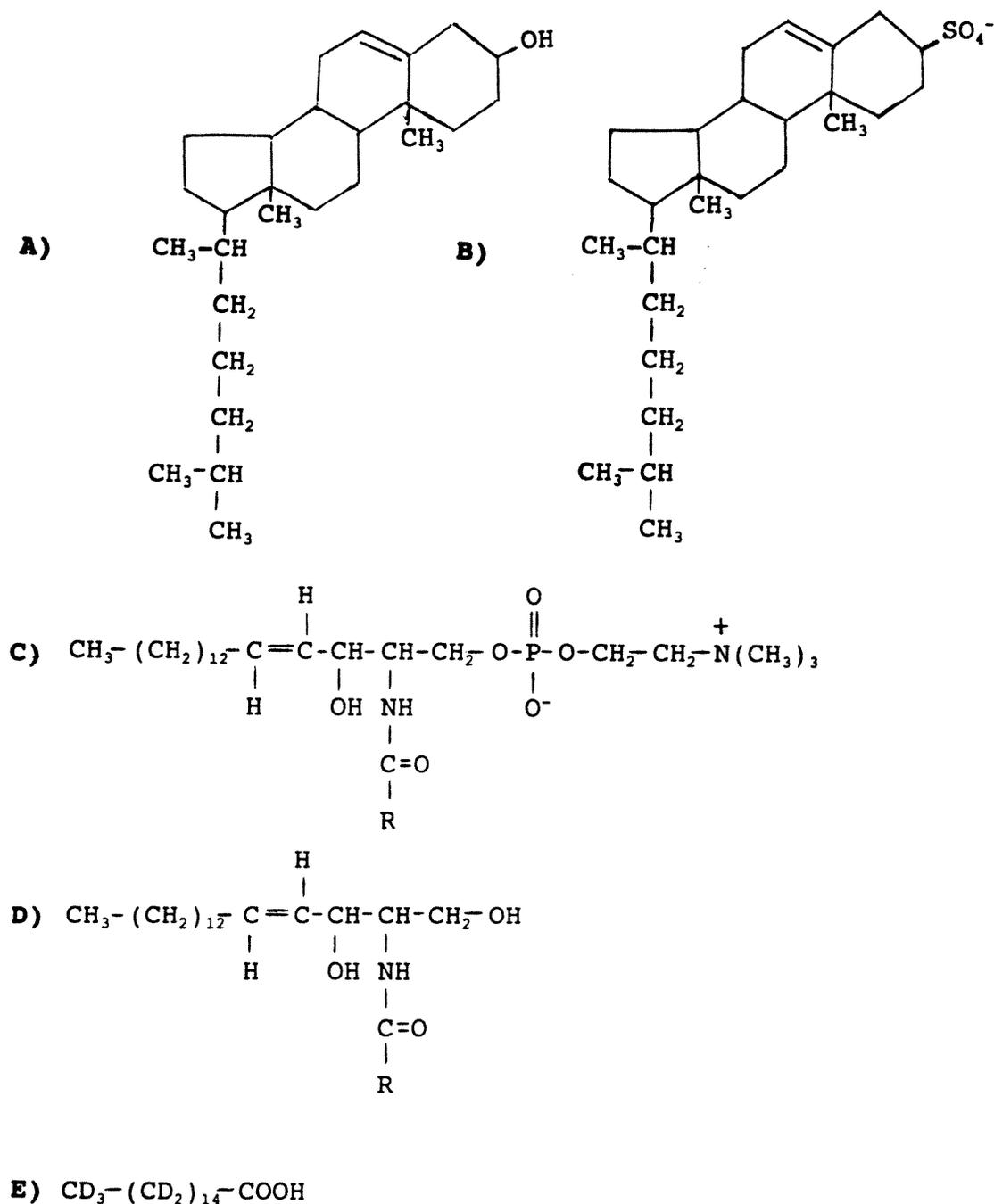
Cette section portera sur les membranes modèles formées à partir des lipides impliqués dans notre étude. D'abord, nous donnerons une définition générale de la membrane modèle qui sera suivie de quelques exemples de modèles pouvant être utiles à la compréhension de nos travaux.

### **1.2.1 Généralités**

Une membrane modèle est une structure synthétique qui imite une biomembrane, mais dont la composition est plus simple. Cette structure synthétique est composée d'une matrice de lipides où d'autres composantes membranaires telles que les protéines, peuvent être incorporées (39). De manière générale, un lipide est une molécule amphipathique constituée d'une queue

hydrophobe et d'une tête hydrophile. La queue hydrophobe est constituée d'une ou de plusieurs chaînes acyles reliées de façon covalente à la tête hydrophile. En particulier, parmi les lipides étudiés lors de nos travaux, le cholestérol et le sulfate de cholestérol sont caractérisés par une tête polaire qui est constituée respectivement par un groupement  $3\beta\text{-OH}$  et  $\text{SO}_4^-$  ainsi que par une partie hydrophobe comprenant plusieurs structures cycliques. Pour leur part, les sphingolipides dont la sphingomyéline et le céramide ont une tête polaire composée respectivement d'un groupement  $-\text{CH}_2\text{-O-PO}_2^-\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$  et  $-\text{CH}_2\text{-OH}$  qui est lié à deux chaînes acyles par l'intermédiaire d'un petit segment hydrophile qui constitue la région d'interface et qui contient des groupements amide et hydroxy allylique (figure 6) (40-42). On doit noter ici que les sphingolipides que nous avons étudiés provenaient de cerveau de bovin, ce qui implique que les différences structurales existant entre les céramide 3 des figures 4 et 6 pourraient être dues simplement à des différences d'espèces.

La structure amphipathique des lipides en font des molécules peu solubles dans l'eau de telle sorte que lorsqu'ils sont hydratés, ils s'agrègent de manière à diminuer les interactions hydrophobes défavorables survenant entre leur queue hydrophobe et l'eau. Les lipides forment des agrégats pouvant être stabilisés par des forces hydrophobes, de van der Waals et électrostatiques ainsi que par des liaisons hydrogènes (39). Ces agrégats sont construits de manière à ce que les têtes polaires des lipides soient exposées à l'eau, tandis que leurs chaînes acyles sont orientées vers l'intérieur. Ils peuvent également adopter diverses géométries (sphérique, cylindrique, bicouche) dont la stabilité dépend de plusieurs facteurs incluant le volume et la largeur maximale de la portion hydrophobe du lipide ainsi que l'aire optimale de la surface occupée par ce lipide à l'interface (39). Plusieurs modèles théoriques ou découlant de résultats expérimentaux ont été proposés pour décrire les principales interactions intra- et intermoléculaires existant au sein des lipides de membranes modèles (42). Parmi ces interactions, on compte des liaisons hydrogène qui impliquent d'une part des groupements sur les molécules de lipide qui agissent comme des donneurs de proton tels que les  $\text{COOH}$ ,  $\text{COH}$  ainsi que la portion  $\text{N-H}$  du groupement



**Figure 6:** Représentation schématique de la structure de: A) cholestérol; B) sulfate de cholestérol; C) sphingomyéline et D) céramide 3 de cerveau de bovin; E) acide palmitique perdeutééré. Le radical R des sphingomyéline et céramide 3 est un mélange des chaînes acyles des acides stéarique (18:0), nervonique (24:1) et lignocérique (24:0) (40,41).

amide et d'autre part des groupements agissant comme des accepteurs de protons dont les  $\text{PO}^-$ ,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{COC}$  et la portion  $\text{C=O}$  du groupement amide (43,44). Certaines de ces interactions qui ont été décrites par des modèles membranaires, surviennent notamment entre les lipides que nous avons étudiés.

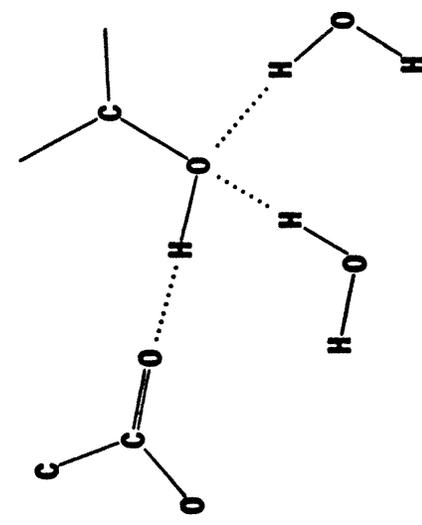
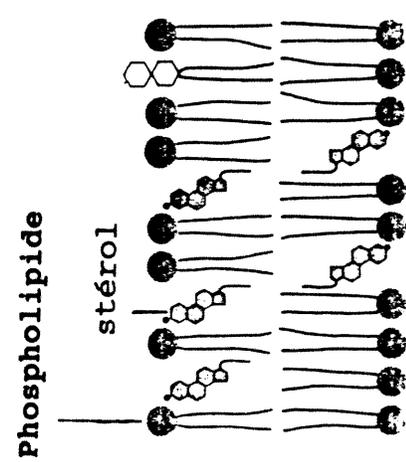
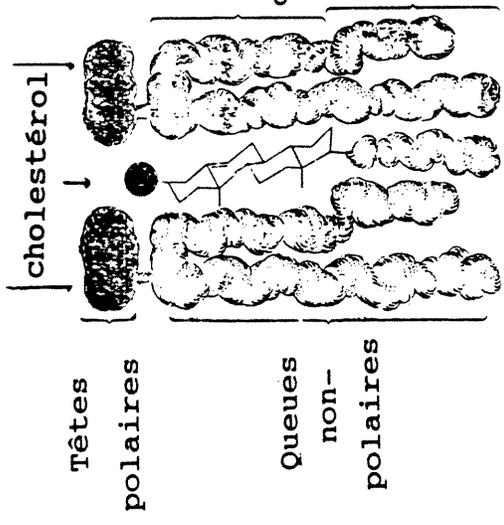
### **1.2.2 Modèle des principales interactions régissant les bicouches de sphingolipides**

Les sphingolipides, dont la sphingomyéline et les céramides, sont des lipides qui forment des bicouches stabilisées par des interactions de van der Waals et par des liaisons hydrogène (43,45,46). Ces lipides présentent un aspect particulier, ils possèdent des groupements amide et hydroxyle libres qui peuvent former des liaisons hydrogène inter- et intramoléculaires (43,47-54). Selon plusieurs auteurs, les liaisons hydrogène intermoléculaires se forment entre les molécules de sphingomyéline ainsi qu'entre les molécules de céramide surviendraient entre la portion  $\text{C=O}$  ou la portion  $\text{N-H}$  de leurs groupements amide et leurs groupements hydroxyle libres (47,53,54). Toutefois, la portion  $\text{N-H}$  du groupement amide et le groupement hydroxyle pourraient former également des liaisons intramoléculaires avec le groupement phosphate de la sphingomyéline, tandis que les liaisons intramoléculaires se formeraient plutôt entre les portions  $\text{C=O}$  et  $\text{N-H}$  du groupement amide et le groupement hydroxyle dans le céramide (47,49).

### **1.2.3 Modèle des interactions régissant les bicouches de sphingolipides et de cholestérol**

La sphingomyéline est un sphingolipide ayant comme particularité d'être capable de se combiner avec le cholestérol pour former des bicouches mixtes. De manière générale, le cholestérol s'insère dans les bicouches de phospholipides telle que la sphingomyéline, de façon à ce que son groupement  $3\beta\text{-OH}$  soit exposé à l'eau et que son corps hydrophobe soit enfoui dans la bicouche (figure 7A et B). Le cholestérol exerce habituellement un effet ambivalent sur les bicouches de phospholipides, qui lui est particulier (1,43,44,55-76). Cet effet réside d'une part dans le fait que la présence du corps hydrophobe du cholestérol qui est un système de noyaux condensés non polaire et rigide, rend la membrane plus fluide en altérant l'interaction intermoléculaire des chaînes acyles

phospholipide phospholipide



A

B

C

Figure 7. Schéma montrant: A) la position adoptée par le cholestérol dans une bicouche lipidique; B) l'arrangement adopté par le cholestérol et les phospholipides dans une membrane cellulaire; C) la liaison hypothétique du groupement 3 $\beta$ -OH du cholestérol avec le groupement carbonyle d'un phospholipide et l'eau (1,41,44).

des phospholipides. Par contre, le cholestérol rend également la bicouche moins fluide dû à sa position qui permet la formation de liaisons de van der Waals entre son corps hydrophobe et les chaînes acyles des phospholipides.

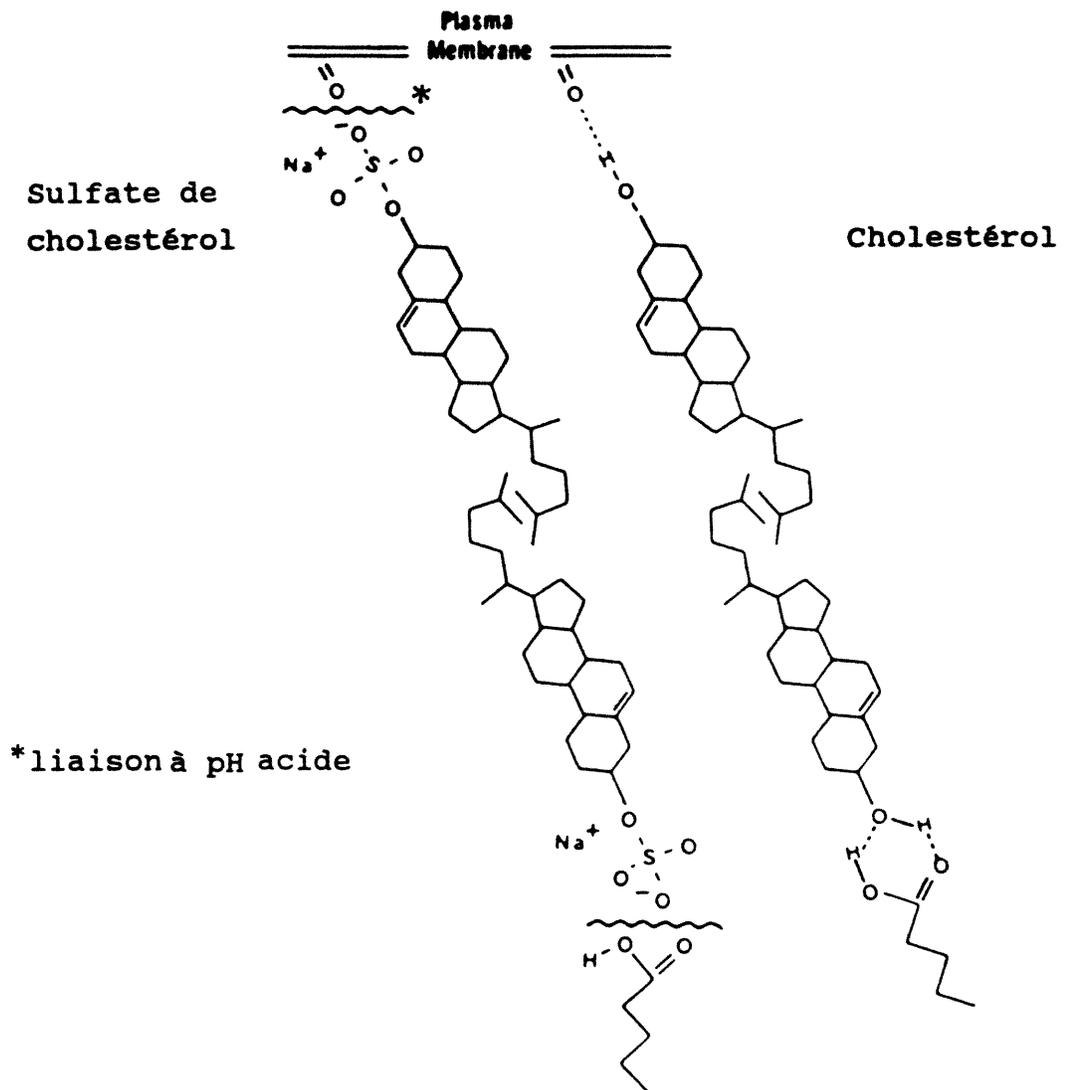
La position adoptée par le cholestérol semble lui permettre également de se lier aux groupements d'interface des phospholipides. En effet, il a été proposé que le groupement  $3\beta$ -OH du cholestérol pourrait être lié par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène à la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline (44,77). C'est notamment le cas de Brokerhoff (44) qui a développé un modèle pour décrire les liaisons hydrogène formées entre le groupement carbonyle d'un phospholipide, le groupement  $3\beta$ -OH du cholestérol et l'eau (figure 7C). Dans ce modèle, le groupement  $3\beta$ -OH du cholestérol est impliqué dans une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle du phospholipide et deux molécules d'eau interagissent simultanément avec l'oxygène du groupement  $3\beta$ -OH du cholestérol. De plus, le carbone C<sub>3</sub> est situé à une latitude intermédiaire à celles du groupement carbonyle et du premier groupement CH<sub>2</sub> du phospholipide.

#### **1.2.4 Modèle décrivant les interactions entre l'acide palmitique, le cholestérol et le sulfate de cholestérol**

Rehfeld et coll. (78) ont développé un modèle décrivant les interactions de l'acide palmitique avec le cholestérol et le sulfate de cholestérol dans le stratum corneum (figure 8). Selon ces auteurs, l'acide palmitique et le cholestérol du stratum corneum se lient par l'intermédiaire de deux liaisons hydrogène. Ces liaisons intermoléculaires surviendraient entre les groupements hydroxyle et carbonyle composant la tête polaire de l'acide palmitique et le groupement  $3\beta$ -OH du cholestérol. Dans le cas du sulfate de cholestérol, la situation est très différente. En effet, il semblerait que l'acide palmitique n'ait pas d'affinité pour le sulfate de cholestérol, sauf à pH acide (78,79).

### **1.3 Hydratation et thermotropisme des lipides membranaires**

Tel que nous l'avons vu à la section 1.1, les fonctions de barrière de perméabilité et de desquamation de l'épiderme dépendent grandement des constituants lipidiques du stratum



**Figure 8: Modèle qui montre les différences pouvant survenir dans la liaison hydrogène suite aux différentes interactions moléculaires du cholestérol versus sulfate de cholestérol avec les acides gras membranaires du stratum corneum (78).**

corneum. Toutefois, ces fonctions peuvent être influencées également par des changements de température et d'hydratation. Plusieurs études effectuées à l'aide de techniques biophysiques ont été entreprises afin d'élucider l'influence qu'exercent de tels changements sur la structure et le comportement des lipides. Dans la présente section, nous nous appliquerons à décrire, d'une manière générale, l'hydratation et le thermotropisme des lipides membranaires. De plus, cette description s'accompagnera d'exemples appliqués à certains lipides du stratum corneum impliqués dans les fonctions de barrière de perméabilité et de desquamation.

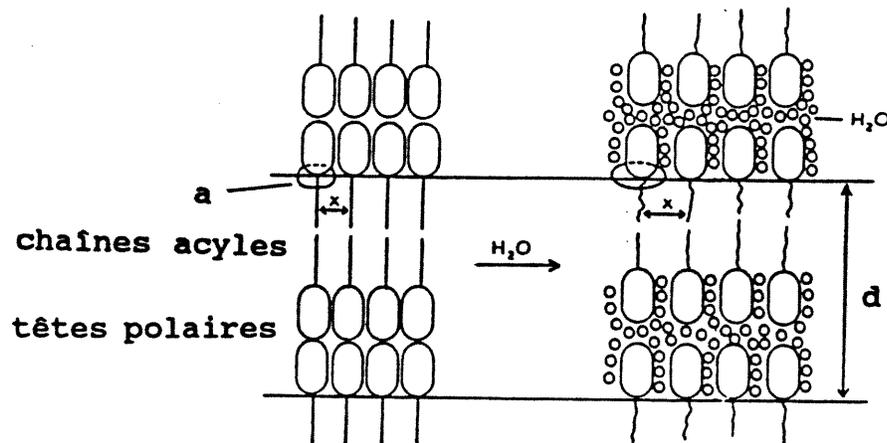
### **1.3.1 Hydratation des bicouches lipidiques**

L'hydratation des bicouches lipidiques se traduit par la formation de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau environnantes et les groupements hydrophiles des lipides (80). Pour un grand nombre de phospholipides dont la dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) par exemple, les sites potentiels pour la liaison aux molécules d'eau sont les groupements phosphate ( $\text{PO}_2^-$ ) et choline ( $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$ ) de la tête polaire ainsi que le groupement carbonyle de l'interface (81). Toutefois, en plus de ces sites ( $\text{PO}_2^-$  et choline), la sphingomyéline possède également d'autres sites pour la liaison aux molécules d'eau qui sont ses groupements amide et hydroxyle libre (43,78). Les mêmes sites de liaison sont présents sur les céramides, à la différence que les groupements choline et phosphate y sont absents.

De manière générale, le phénomène de l'hydratation des bicouches lipidiques implique l'intercalation de molécules d'eau entre les têtes polaires des lipides, comme montré à la figure 9. Cette intrusion des molécules d'eau provoque des augmentations de l'aire interfaciale par lipide et de la distance interchaîne, ce qui contribue à rendre l'empilement des chaînes acyles moins serré (10).

### **1.3.2 Thermotropisme des lipides membranaires**

Lorsque les lipides sont hydratés, ils peuvent adopter diverses phases dont la nature est déterminée partiellement par la structure moléculaire des lipides impliqués. Toutefois, la nature de ces phases peut être affectée par la température, de



**Figure 9: Représentation schématique du mécanisme d'hydratation d'une bicouche lipidique: aire moléculaire à l'interface (a), distance entre les deux bicouches (d), distance entre deux chaînes acyles (x) (10).**

telle sorte que des changements de température peuvent induire des transitions de phase. Le thermotropisme est la partie de la biophysique qui traite de ces transitions de phase en fonction de la température. Chacune de ces transitions de phase survient habituellement à une température médiane de transition ( $T_m$ ) qui représente la température médiane du domaine où a lieu la transition de phase, et caractérise un lipide donné. La largeur de ce domaine de température reflète la coopérativité de la transition de phase, un domaine étroit caractérisant une transition hautement coopérative (82,83).

Les bicouches de phospholipides exhibent habituellement une transition de la phase gel ( $L_\beta$  ou  $P_\beta$ ) à la phase liquide cristalline ( $L_\alpha$ ) (39,82). La transition de la phase gel liquide cristalline est caractérisée par une augmentation du nombre d'isomères gauche dans les chaînes acylées des lipides au-dessus de la  $T_m$  (figure 10) (83). En effet, une bicouche en phase gel est constituée de lipides dont les chaînes acyles sont hautement ordonnées et adoptent une conformation presque

toute trans, tandis qu'en phase liquide cristalline, ces chaînes sont désordonnées et contiennent un grand nombre de conformères gauches (39,83). Cette augmentation du désordre dans les chaînes acyles est accompagnée de l'expansion latérale de la bicouche lipidique (39,82,83,84).

Le thermotropisme des bicouches lipidiques peut être perturbé par l'ajout de certains agents. Notamment, l'incorporation du cholestérol dans les bicouches de phospholipides (incluant la bicouche de sphingomyéline) affecte leur thermotropisme (39,85). En effet, l'incorporation du cholestérol désordonne les chaînes acyles des phospholipides en y augmentant le nombre de conformères gauches sous la  $T_m$  (39,57,58,83,85-87). Ce phénomène serait associé à l'effet ambivalent du corps hydrophobe du cholestérol qui conduirait à l'augmentation de la fluidité des chaînes acyles des phospholipides en phase gel (1). Par contre, l'incorporation du cholestérol altère l'empilement des chaînes acyles des phospholipides qui sont adjacentes à son corps hydrophobe, de telle sorte qu'il ordonne ces chaînes acyles en y causant une réduction du nombre de conformères gauches au-dessus de la  $T_m$  (39,59). Lorsque le cholestérol est présent en hautes concentrations, ses effets résultent à l'abolition de la transition de phase des phospholipides et à la formation d'une phase liquide ordonnée (10) (57,60,88,89). Cette nouvelle phase 10 est définie comme étant une phase pour laquelle la diffusion latérale des lipides est semblable à celle de la phase liquide cristalline, mais dont l'ordre dans les chaînes acyles se rapproche de celui de la phase ordonnée (gel) (61,88).

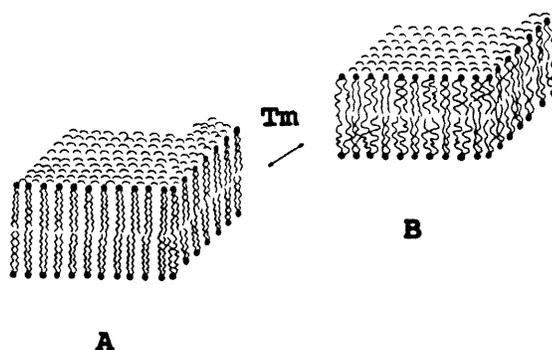


Figure 10: Représentation schématique d'une bicouche lipidique subissant une transition de la phase gel (A) à la phase liquide cristalline (B) (57).

## 1.4 Présentation de nos travaux

### 1.4.1 Technique utilisée

La spectroscopie infrarouge est une technique qui fait appel aux radiations électromagnétiques. D'une manière générale, l'absorption de radiations électromagnétiques par des composés dans la région centrale de l'infrarouge se situant à des nombres d'ondes de 625 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ , peut mener à des transitions entre les niveaux d'énergie associés aux vibrations moléculaires (90-94). En fait, l'absorption de radiation infrarouge par une molécule peut résulter à des excitations vibrationnelle et rotationnelle pouvant entraîner des modifications au niveau des distances et des angles interatomiques de la molécule. Chacune des fréquences d'absorption qui correspondent aux différentes vibrations survenant au niveau des liaisons chimiques formées entre les atomes d'une molécule, dépend entre autre de la masse des atomes et de la constante de force de la liaison entre ces atomes (90,93,94). En outre, pour les molécules diatomiques, l'élongation de la liaison présente entre les deux atomes est la seule vibration possible. Cette vibration consiste en un changement de la longueur de la liaison entre les deux atomes de la molécule, et sa fréquence peut être calculée à l'aide de l'équation suivante:

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad [1]$$

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

où  $\nu$  est la fréquence de la vibration,  $c$  est la vitesse de la lumière,  $k$  est la constante de force de la liaison et  $\mu$  est la masse réduite des deux atomes de masse  $m_1$  et  $m_2$  (91-93).

Les molécules plus complexes et non linéaires comportant  $n$  atomes ont  $3n-6$  modes de vibration qui peuvent être regroupés en deux types de mode de vibration, soit les modes d'élongation et les modes de déformation (90,92,94). Par exemple, les modes de vibration possibles d'un groupement méthylène sont montrés à la figure 11. On distingue d'abord les modes d'élongation symétrique et antisymétrique où deux atomes (H) s'éloignent et

se rapprochent d'un atome central (C), sans qu'il y ait changement d'angle entre ces atomes. Le deuxième type de mode est celui des vibrations de déformation (rotation, cisaillement, balancement, torsion) qui correspondent à des modifications de l'angle de liaison interatomique (93,94).

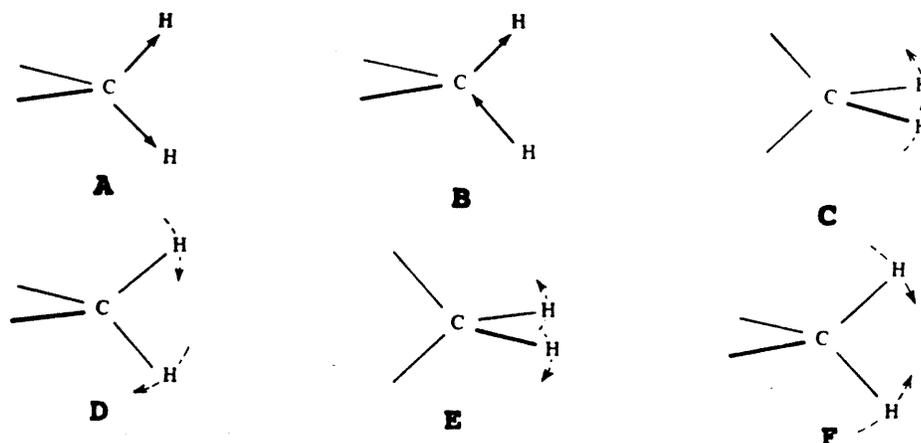


Figure 11: Modes vibrationnels d'un groupement H-C-H: A) élongation symétrique; B) élongation antisymétrique; C) balancement; D) rotation plane; E) torsion et F) cisaillement dans le plan (91).

D'autre part, l'intensité des bandes d'absorption dans l'infrarouge dépend entre autre de la variation du moment dipolaire de la molécule qui se produit lors de la vibration (91-94). Généralement, les vibrations des liaisons de groupements très polaires mènent à des variations plus importantes du moment dipolaire de la molécule et produisent des bandes d'absorption plus intenses que les vibrations des liaisons impliquant des groupements moins polarisés (93). Puisque l'intensité et la fréquence des bandes d'absorption qui caractérisent les différents groupements fonctionnels peuvent changer selon la structure de la molécule et selon leur environnement (90-93), la spectroscopie infrarouge est très utile dans l'étude des lipides membranaires. En effet, les vibrations associées à chaque groupement fonctionnel des lipides peuvent servir de sondes intrinsèques pour étudier

l'organisation des lipides au sein de membranes modèles (89). Par exemple, les variations observées au niveau des fréquences des bandes associées au mode de vibration d'élongation symétrique et antisymétrique C-H et au mode de déformation des  $\text{CH}_2$  en fonction de la température peuvent servir à caractériser l'ordre et la symétrie d'empilement des chaînes acyles des lipides ainsi que leurs transitions de phase (57,58,83). De plus, les variations des fréquences des bandes amides I et amide II associées respectivement aux vibrations des portions C=O et N-H du groupement amide ainsi que les variations des fréquences des bandes d'élongation du groupement phosphate, peuvent permettre d'estimer le degré de liaison hydrogène impliquant ces groupements (57,58,83). D'autre part, la spectroscopie infrarouge peut aussi permettre d'établir s'il y a déprotonation du groupement carboxyle des acides gras présents au sein d'un mélange lipidique en fonction du pH. En effet, puisque la déprotonation d'un groupement carboxyle des acide gras conduit à la formation d'un groupement carboxylate, il est donc possible de percevoir cette déprotonation par la diminution d'intensité de la bande d'élongation carboxyle et l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption infrarouge associée à l'élongation antisymétrique du groupement carboxylate qui est située dans les environs de la bande amide II (95).

Enfin, un autre aspect important de la spectroscopie infrarouge est qu'elle permet l'utilisation de sondes moléculaires qui peuvent servir à caractériser le thermotropisme d'une composante particulière au sein d'un mélange lipidique complexe. L'utilisation de molécules deutérées tel que l'acide palmitique deutéré ( $\text{PA-d}_{31}$ ) permet notamment de caractériser le thermotropisme de cet acide gras au sein d'un mélange lipidique. En effet, la substitution isotopique qui se produit lors de la deutérioration de l'acide palmitique, est accompagnée d'un changement de masse (voir l'équation 1 précédente) qui entraîne un déplacement des fréquences des bandes d'absorption associées aux modes de vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique C-D du  $\text{PA-d}_{31}$  dans des régions spectrales où elles n'interfèrent pas avec celles associées aux modes de vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique C-H des lipides non deutérés du

mélange (57,83).

#### **1.4.2 Nature des travaux effectués**

Lors de notre travail, nous mettrons l'emphase sur les interactions existant entre certains lipides du stratum corneum. Notre étude portera sur une variété de membranes modèles composées de sphingomyéline (SPM) ou céramide 3 (CER3) de cerveau de bovin, d'acide palmitique perdeutééré (PA-d<sub>31</sub>), de cholestérol (Chol) et de sulfate de cholestérol (S.Chol), et sera effectuée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier. Cette étude comportera plusieurs volets. Dans un premier temps, nous étudierons le thermotropisme de ces différentes membranes modèles afin de déterminer si la structure du céramide 3 influence son hydratation et l'empilement de ses chaînes acyles dans les membranes lipidiques. Par la suite, nous étudierons les changements que l'acide palmitique perdeutééré et le cholestérol peuvent induire dans le thermotropisme et l'hydratation de la sphingomyéline et du céramide 3. Nous étudierons également les interactions se formant entre ces différents lipides ainsi que leurs changements lors du chauffage. De plus, nous essaierons de déterminer si ces interactions sont influencées par la substitution du cholestérol par le sulfate de cholestérol, et si cette substitution affecte le thermotropisme et l'hydratation de ces mélanges lipidiques. Finalement, nous étudierons les effets induits par un changement de pH allant du pH du stratum corneum (pH 5.2) au pH physiologique (pH 7.4), sur les interactions et le thermotropisme des constituants des dispersions lipidiques.

## **CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1 Provenance et pureté des produits**

La sphingomyéline et le céramide 3 de cerveau de bovin ainsi que le cholestérol et le sulfate de cholestérol proviennent de la compagnie Sigma Chemical Co (St-Louis, MO) et ont été utilisés sans purification supplémentaire. L'acide palmitique perdeutééré a été obtenu par deutériation catalytique avec du palladium suivant la méthode de Hsiao et coll. (96). Cette synthèse a été faite par M. Lafleur.

### **2.2 Préparation des échantillons et acquisition des spectres infrarouges**

Pour chaque échantillon, environ 5 mg du lipide pur (sphingomyéline ou céramide 3) ou de l'un des mélanges de lipides décrits au tableau II, ont été suspendus dans un tampon HEPES à 100 mM contenant 100 mM de NaCl et 5 mM d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) en solution dans l'eau à pH 5.2 ou 7.4, de manière à obtenir une concentration finale en sphingomyéline ou céramide 3 de 14% (poids/volume). Les mélanges de lipides secs ayant servis à la préparation de ces suspensions ont été obtenus préalablement en mélangeant les quantités appropriées de chaque lipide dissous dans un mélange de benzène/méthanol 95/5 (volume/volume) pour obtenir les proportions indiquées au tableau II. Ces solutions organiques ont été lyophilisées pendant environ 12 heures. Toutes ces suspensions lipidiques ont été ensuite incubées de 20 à 30 minutes dans un bain mari à des températures supérieures d'environ 10 °C à la  $T_m$  pour les dispersions contenant la sphingomyéline et à environ 80 °C pour les dispersions contenant le céramide 3 puis agitées mécaniquement, afin d'en assurer l'hydratation complète. Par la suite, ces échantillons ont été refroidis à la température de la pièce et déposés entre deux fenêtres de  $\text{CaF}_2$  séparées par un espaceur en Teflon de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Finalement, cet assemblage a été inséré à l'intérieur d'une cellule thermostatée en laiton. Pour enregistrer les spectres, un spectromètre Nicolet 5DXB FTIR équipé d'un détecteur DTGS ou un spectromètre BioRad FTS-25 muni d'un détecteur MCT ont été utilisés. Chaque spectre a été recueilli suite à la coaddition de 250 balayages avec une

**Tableau II**  
**Description des dispersions lipidiques étudiées**

Dispersion lipidique	Composition	Proportion (% mole)
Sphingomyéline	sphingomyéline	100
SPM/PA-d <sub>31</sub>	sphingomyéline	67
	PA-d <sub>31</sub>	33
SPM/Chol	sphingomyéline	67
	cholestérol	33
SPM/S.Chol	sphingomyéline	67
	sulfate de cholestérol	33
SPM/PA-d <sub>31</sub> /Chol	sphingomyéline	33
	PA-d <sub>31</sub>	33
	cholestérol	33
SPM/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol	sphingomyéline	33
	PA-d <sub>31</sub>	33
	sulfate de cholestérol	33
Céramide 3	céramide 3	100
CER3/PA-d <sub>31</sub>	céramide 3	67
	PA-d <sub>31</sub>	33
CER3/Chol	céramide 3	67
	cholestérol	33
CER3/S.Chol	céramide 3	67
	sulfate de cholestérol	33
CER3/PA-d <sub>31</sub> /Chol	céramide 3	33
	PA-d <sub>31</sub>	33
	cholestérol	33
CER3/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol	céramide 3	33
	PA-d <sub>31</sub>	33
	sulfate de cholestérol	33

résolution de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

## **2.3 Attribution des bandes d'absorption**

### **2.3.1 Modes de vibration des chaînes acyles**

Dans notre travail, nous avons étudié trois régions associées aux vibrations de chaînes acyles, soit les régions des modes d'élongations symétrique C-H et C-D ainsi que du mode de déformation des  $\text{CH}_2$ . Les vibrations d'élongation C-H donnent naissance à des bandes d'élongation antisymétrique et symétrique qui sont associées aux groupements méthylènes et situées respectivement à environ 2920 et 2850  $\text{cm}^{-1}$ , ainsi qu'à des bandes d'élongations antisymétrique et symétrique qui sont associées aux groupements  $\text{CH}_3$  terminaux et positionnées vers 2956 et 2870  $\text{cm}^{-1}$  (57,83,97). Les vibrations d'élongation C-D des groupements  $\text{CD}_2$  et  $\text{CD}_3$  donnent également lieu à des bandes d'élongation antisymétrique et symétrique C-D qui sont situées à environ 2194 et 2089  $\text{cm}^{-1}$  pour les groupements  $\text{CD}_2$ , et à des bandes d'élongation présentant des centres de gravité vers 2212, 2169 et 2070  $\text{cm}^{-1}$  pour les groupements  $\text{CD}_3$  (57,83).

La région spectrale où apparaît la bande d'absorption associée au mode de la déformation des  $\text{CH}_2$  est comprise entre 1350 et 1500  $\text{cm}^{-1}$  (57). Cette bande d'absorption peut être constituée d'une ou de deux composantes selon la symétrie de l'empilement adopté par les chaînes acyles. Ainsi, lorsque les chaînes acyles adoptent un empilement hexagonal, la bande de déformation des  $\text{CH}_2$  ne comporte qu'une seule composante située à 1468  $\text{cm}^{-1}$  (98-100). Par contre, lorsque l'empilement des chaînes acyles est de symétrie orthorhombique ou monoclinique, la bande de déformation des  $\text{CH}_2$  se dédouble et les deux composantes qui en résultent sont généralement situées vers 1465 et 1474  $\text{cm}^{-1}$  (101).

### **2.3.2 Modes de vibration du groupement amide**

Les groupements amide situés aux interfaces de la sphingomyéline et du céramide 3 sont à l'origine de l'apparition de bandes d'absorption associées aux vibrations amide I et amide II des lipides. Les vibrations amide I et amide II sont principalement attribuées à l'élongation du

groupement C=O et à la déformation CNH du groupement amide (102). Pour la sphingomyéline hydratée avec l'eau, les bandes amide I et amide II sont situées à 1645 et 1553  $\text{cm}^{-1}$  (97,103). Dans le cas du céramide 3, une deuxième bande amide I de plus faible intensité que la première, apparaît à environ 1620  $\text{cm}^{-1}$ . Cette deuxième bande amide I peut être associée à des groupements carbonyles liés par des liaisons hydrogène plus fortes, telles que les liaisons hydrogène intramoléculaires (100).

### 2.3.3 Modes de vibration des groupements des têtes polaires

Les groupements de tête polaire auxquels nous nous sommes intéressés, sont le groupement carboxyle de l'acide palmitique perdeutééré et le groupement phosphate de la sphingomyéline. La vibration du groupement carboxyle de l'acide gras donne lieu à une bande d'absorption qui est située généralement entre 1700 et 1720  $\text{cm}^{-1}$  (104). Pour leur part, les vibrations du groupement phosphate sont à l'origine de l'apparition des bandes d'absorption des modes des élongations antisymétrique et symétrique  $\text{PO}_2^-$  vers 1223 et 1085  $\text{cm}^{-1}$  pour la sphingomyéline pure hydratée dans l'eau (97).

## 2.4 Traitement des spectres infrarouges

### 2.4.1 Corrections des contributions de la vapeur d'eau, du tampon HEPES, du cholestérol et du sulfate de cholestérol

Tous les spectres des dispersions lipidiques ont été corrigés pour les contributions du tampon HEPES et de la vapeur d'eau. Un exemple des spectres de l'une des dispersions de SPM/PA- $\text{d}_{31}$  (2:1 mole) avant et après la correction de ces contributions, est montré à la figure 12. Les bandes d'absorption de l'eau qui sont dues à l'élongation O-H ( $\bar{\nu}\text{OH}$ ), à un mode de combinaison et à la déformation ( $\delta\text{H}_2\text{O}$ ) sont situées respectivement à 3400, 2100 et 1640  $\text{cm}^{-1}$  (57,79,80,94, 105). Les bandes d'élongation O-H et de déformation de l'eau (vers 3400 et 1640  $\text{cm}^{-1}$ ) sont très intenses et chevauchent celles qui sont associées aux lipides. La correction visant à éliminer la contribution de la bande  $\delta\text{H}_2\text{O}$  de nos spectres consiste à minimiser la bande d'absorption de l'eau située vers 2100  $\text{cm}^{-1}$  en soustrayant un spectre du tampon correspondant

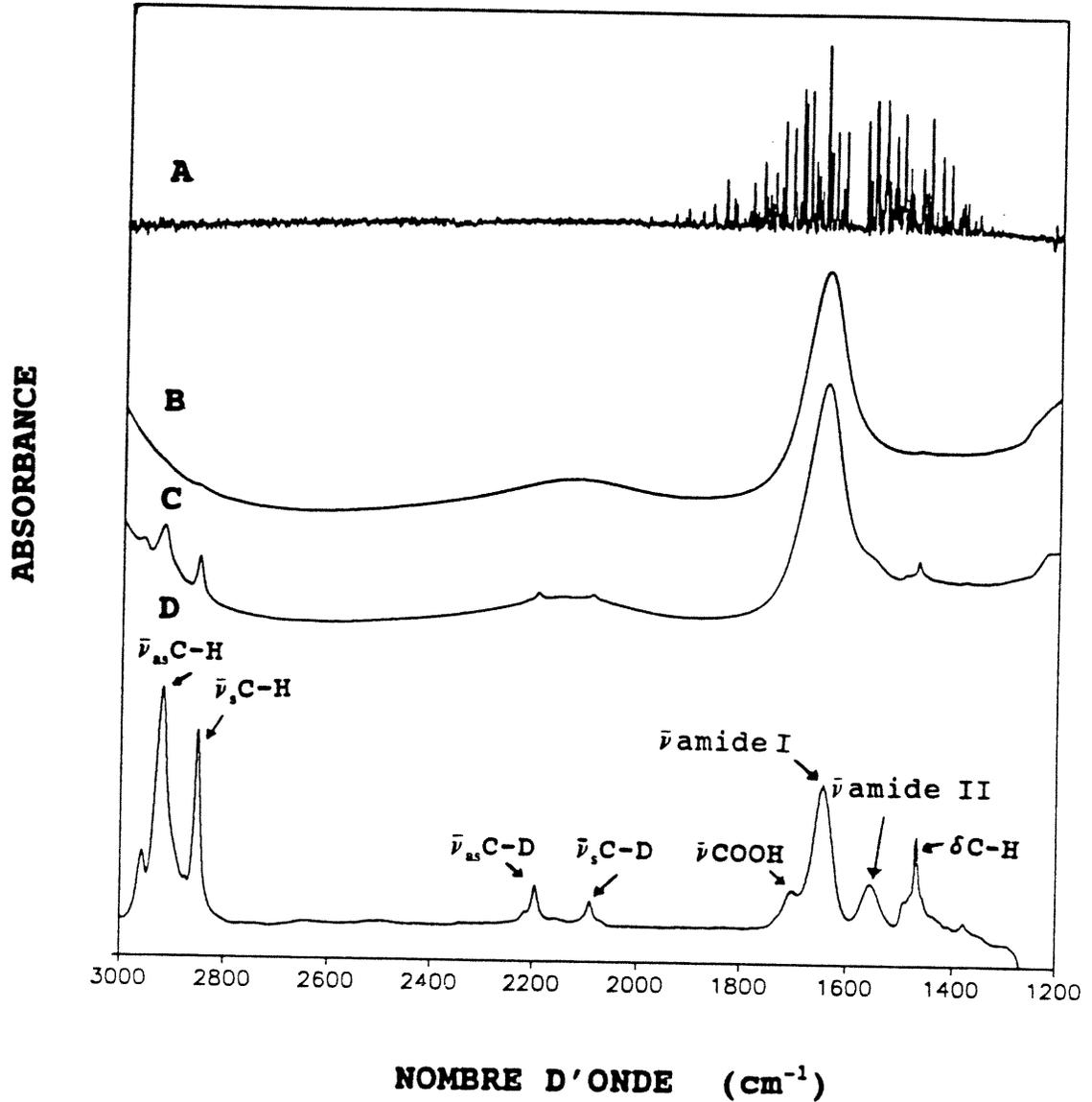


Figure 12: Spectres infrarouges mesurés à 20 °C de: A) vapeur d'eau; B) tampon HEPES (HEPES 100 mM, NaCl 100 mM, 5 mM) à pH 5.2; C) dispersion de SPM/PA- $d_{31}$  (2:1 mole) dans le tampon HEPES à pH 5.2; D) Spectre C corrigé pour les contributions du tampon HEPES et de la vapeur d'eau.

(106,107). La correction pour la contribution de la vapeur d'eau est effectuée d'une manière analogue, mais en soustrayant un spectre de la vapeur d'eau.

Les spectres des dispersions contenant du cholestérol ou du sulfate de cholestérol ont été également corrigés pour la contribution de ces constituants. La contribution du cholestérol a été corrigée selon la méthode décrite par Kodati et coll. (108). Cette méthode consiste principalement à minimiser les trois bandes d'absorption du cholestérol situées à 1333, 1365 et 1388  $\text{cm}^{-1}$  en soustrayant un spectre du cholestérol. La correction pour la contribution du sulfate de cholestérol est effectuée de la même façon, mais en minimisant les bandes d'absorption dues au sulfate de cholestérol situées à 1335, 1367, 1384  $\text{cm}^{-1}$ . Les spectres qui ont été utilisés pour faire ces corrections ont été obtenus du cholestérol et du sulfate de cholestérol anhydres dans le KBr.

#### **2.4.2 Détermination de la position et de la largeur des bandes d'absorption**

La position des bandes d'élongation symétrique C-H et C-D a été déterminée à partir du centre de gravité de la partie supérieure des pics (au-dessus de 85% de la hauteur) tandis que la largeur des bandes d'élongation symétriques C-H et C-D et des bandes d'élongation carboxyle, amide I et amide II a été mesurée à 75% de leur hauteur, à l'aide des algorithmes proposés par Cameron et coll. (109). Par contre, la position des bandes d'élongation phosphate, d'élongation carboxyle, amide I, amide II et de déformation des  $\text{CH}_2$  a été mesurée au maximum de ces bandes, en raison de leur asymétrie. La mesure de la position de ces bandes a nécessité préalablement une déconvolution de Fourier qui a été effectuée à l'aide de l'option "Deconvolve" du programme Spectra Calc. Ce traitement consiste à rendre artificiellement les bandes d'absorption infrarouge plus étroites selon la méthode décrite par Griffiths et coll. (110), permettant d'augmenter la résolution des bandes mal résolues. L'utilisation de la déconvolution de Fourier nous a permis d'évaluer la position de ces bandes.

## CHAPITRE 3. ÉTUDE DU THERMOTROPISME DES DISPERSIONS DE SPHINGOMYÉLINE ET DE CÉRAMIDE 3

Dans ce chapitre, nous aurons pour but de déterminer l'influence des structures différentes de la tête polaire de la sphingomyéline et du céramide 3 sur leur thermotropisme. Afin d'atteindre ce but, nous étudierons les régions des chaînes acyles, de l'interface et de la tête polaire de dispersions de sphingomyéline et de céramide 3.

### 3.1 Résultats

#### 3.1.1 Région des modes d'élongation C-H

La figure 13 illustre la région 2700-3100  $\text{cm}^{-1}$  des spectres infrarouges de la dispersion de sphingomyéline à pH 5.2, mesurés à 0 et 75 °C. Le spectre de cette dispersion lipidique mesuré à 0 °C montre que les deux bandes d'absorption associées aux modes des élongations antisymétrique ( $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{CH}_2$ ) et symétrique ( $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{CH}_2$ ) des groupements méthylènes de la sphingomyéline, se situent respectivement à 2919.1 et 2850.9  $\text{cm}^{-1}$ . Ces valeurs sont typiques de la phase gel (58,102-104). Après chauffage, ces bandes se déplacent à des  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{CH}_2$  et  $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{CH}_2$  de 2924.5 et 2854.1  $\text{cm}^{-1}$  à 75 °C, qui correspondent à la phase liquide cristalline (100). La variation des  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{CH}_2$  et  $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{CH}_2$  ainsi observée suggère que la sphingomyéline subit une transition de phase.

Le thermotropisme des dispersions de sphingomyéline et de céramide 3 aux pH 5.2 et 7.4 peut être décrit à partir de la variation de  $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{CH}_2$  en fonction de la température (figure 14). D'une part, le  $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{CH}_2$  de la sphingomyéline subit une augmentation brusque d'environ 2  $\text{cm}^{-1}$  entre 20 et 41 °C aux deux pH. Cette augmentation de  $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{CH}_2$  peut être associée à la transition de phase gel-liquide cristalline de la sphingomyéline. La température médiane ( $T_m$ ) de cette transition de phase évaluée à partir des courbes de la figure 14A, est de 33 °C à pH 5.2 et de 31 °C à pH 7.4. Pour sa part, le  $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{CH}_2$  du céramide 3 n'augmente pas de façon importante de 0 à 72 °C, ce qui semble indiquer que ses chaînes acyles demeurent dans la phase ordonnée jusqu'à 72 °C. Pour ce qui est de la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H, la figure 14B montre que celle de la sphingomyéline augmente brusquement lors de la

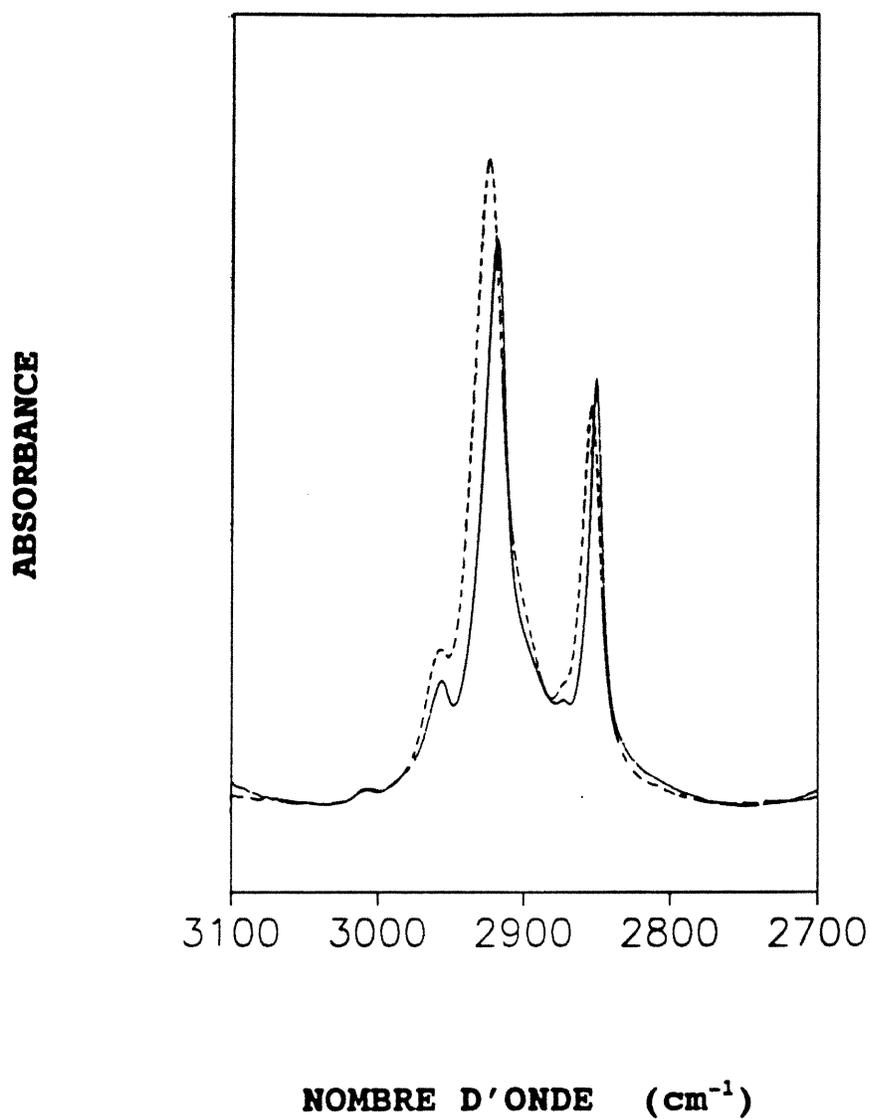


Figure 13: Spectres infrarouges de la région des modes d'élongation C-H de la dispersion de sphingomyéline à pH 5.2 mesurés à 0 °C (-) et 75 °C (--).

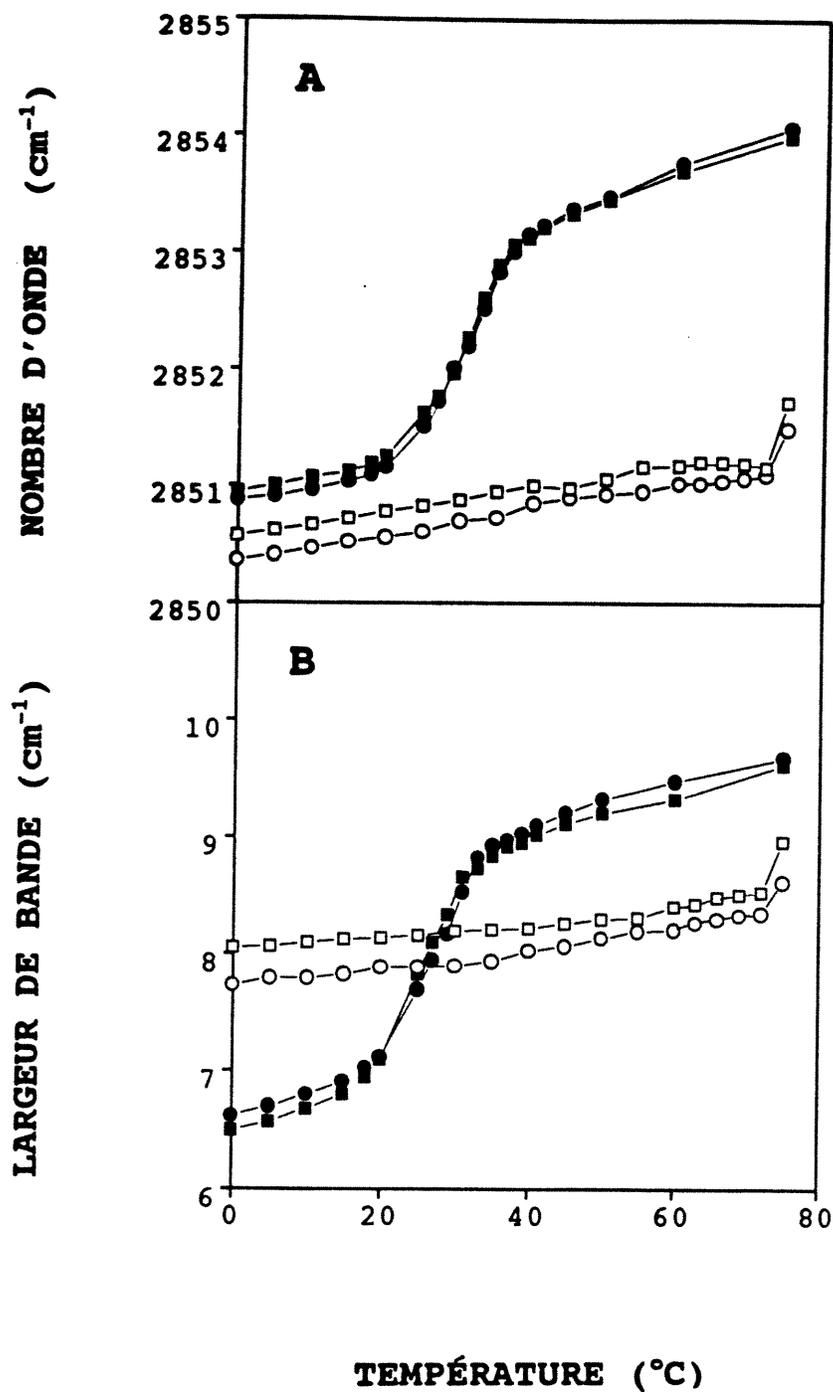


Figure 14: Effet de la température sur: A) la position; B) la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H des dispersions de sphingomyéline à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■) et de céramide 3 à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□).

transition de phase, tandis que celle du céramide 3 n'augmente pas de manière importante entre 0 et 72 °C aux pH 5.2 et 7.4.

### 3.1.2 Région du mode de déformation des CH<sub>2</sub>

La région 1350-1500 cm<sup>-1</sup> associée au mode de déformation des CH<sub>2</sub> des dispersions de sphingomyéline et de céramide 3 à pH 5.2 enregistrée à 0 et 75 °C est montrée à la figure 15. Ces spectres indiquent que la bande de déformation des CH<sub>2</sub> de la sphingomyéline ne comporte qu'une composante à 0 et 75 °C. Par contre, la bande de déformation des CH<sub>2</sub> du céramide 3 est constituée de deux composantes à 0 °C alors qu'elle ne comporte qu'une seule composante à 75 °C. Ces résultats sont similaires aux pH 5.2 et 7.4. D'autre part, la figure 16 montre la variation de la position de la bande de déformation des CH<sub>2</sub> de la sphingomyéline et du céramide 3 en fonction de la température. La position de cette bande passe de 1467.9 à 1467.0 cm<sup>-1</sup> entre 41 et 45 °C pour la dispersion de sphingomyéline (figure 16A). Par contre, dans le cas du céramide 3, les deux composantes observées à 0 °C et situées à 1469.9 et 1466.0 cm<sup>-1</sup> se combinent à 25 °C pour ne former qu'une seule bande située à 1467.9 cm<sup>-1</sup> qui est observée jusqu'à 75 °C (figure 16B). Ce phénomène est observable aux deux pH étudiés.

### 3.1.3 Région des modes de vibration du groupement amide

La figure 17 montre la région des modes de vibration amide I et amide II des dispersions de sphingomyéline et de céramide 3 aux pH 5.2 et 7.4 et à des températures de 0 et 75 °C. Cette région comporte une bande amide I dont la position ( $\bar{\nu}$ amide I) est environ 1645 cm<sup>-1</sup> et une bande amide II située à une position ( $\bar{\nu}$ amide II) d'environ 1550 cm<sup>-1</sup>. La région associée aux vibrations du groupement amide du céramide 3 montre également une troisième bande située à environ 1617 cm<sup>-1</sup> qui est attribuée à une deuxième bande de vibration amide I.

Les variations de la position des bandes amide I et amide II de la sphingomyéline et du céramide 3 en fonction de la température, sont illustrées à la figure 18. Premièrement, nous pouvons remarquer que le  $\bar{\nu}$ amide I de la sphingomyéline à pH 5.2 et 7.4 augmente brusquement à partir d'environ 20 °C jusqu'à la T<sub>m</sub> et diminue ensuite jusqu'à 75 °C (figure 18A) tandis que le

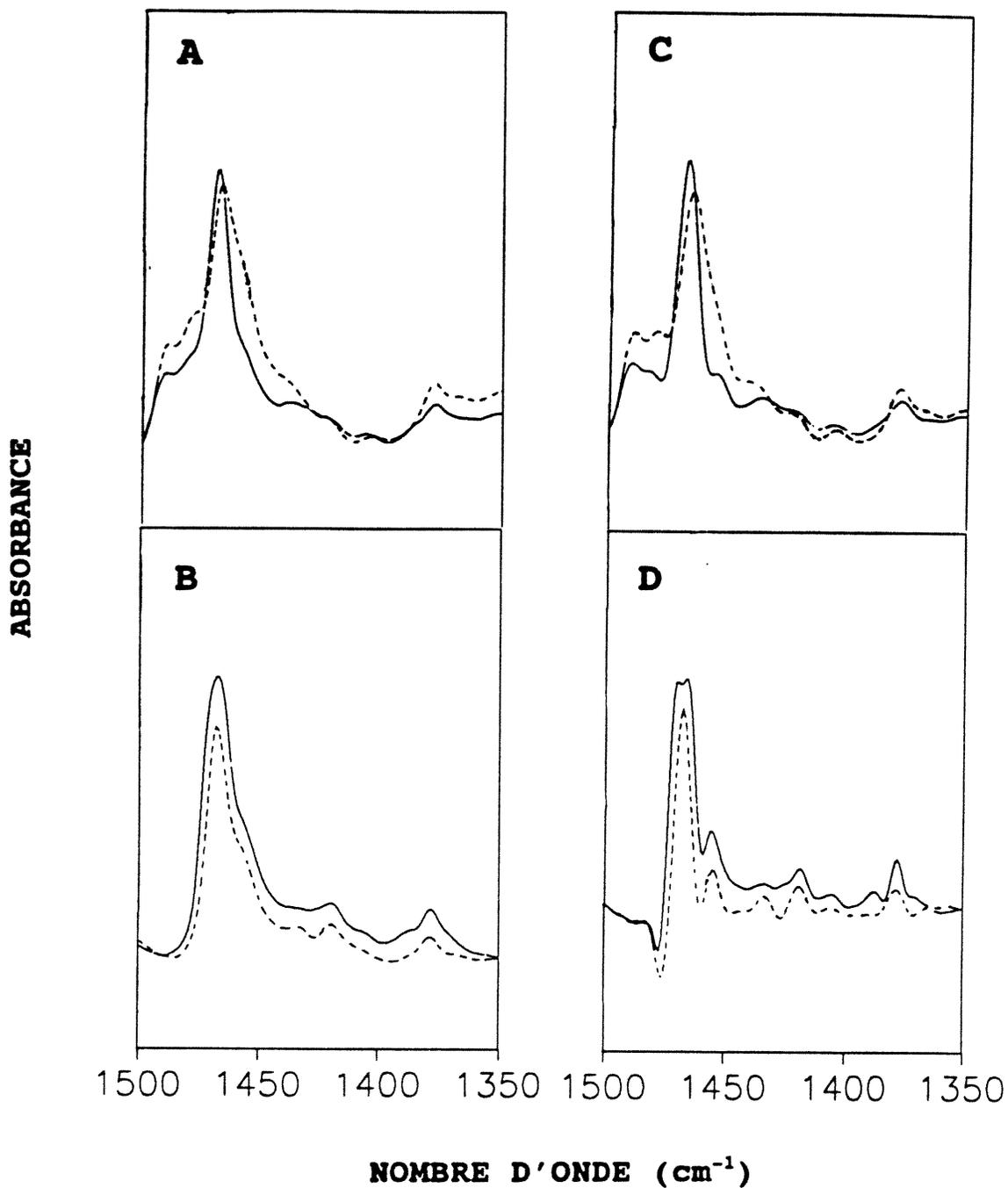


Figure 15: Spectres infrarouges de la région du mode de déformation des  $\text{CH}_2$  de la dispersion de: A) sphingomyéline à pH 5.2; B) céramide 3 à pH 5.2, mesurés à 0 °C (-) et 75 °C (--). Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: C) sphingomyéline à pH 5.2; D) céramide 3 à pH 5.2.

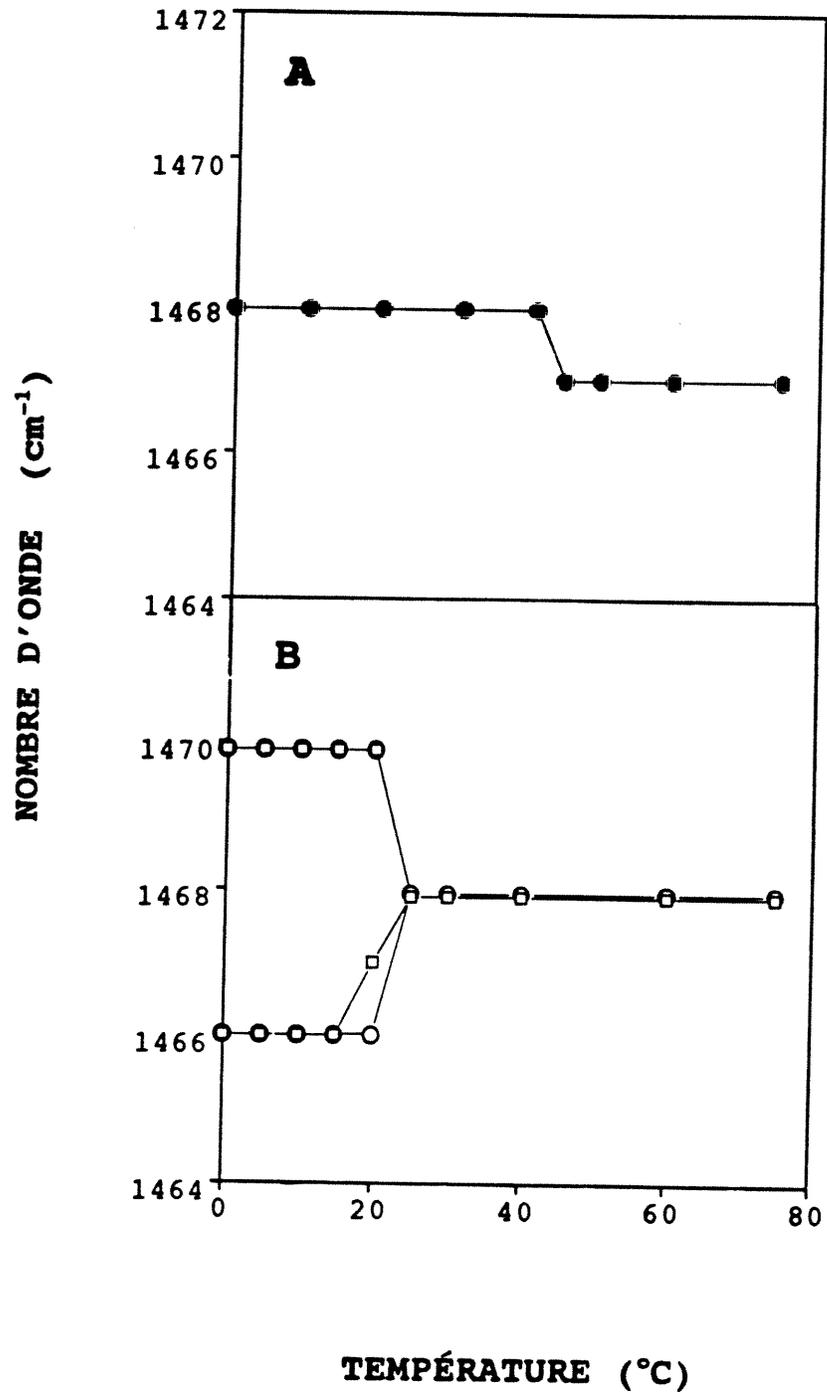


Figure 16: Effet de la température sur la position des composantes de la bande de déformation des CH<sub>2</sub> de la dispersion de: A) sphingomyéline à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■); B) céramide 3 à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□).

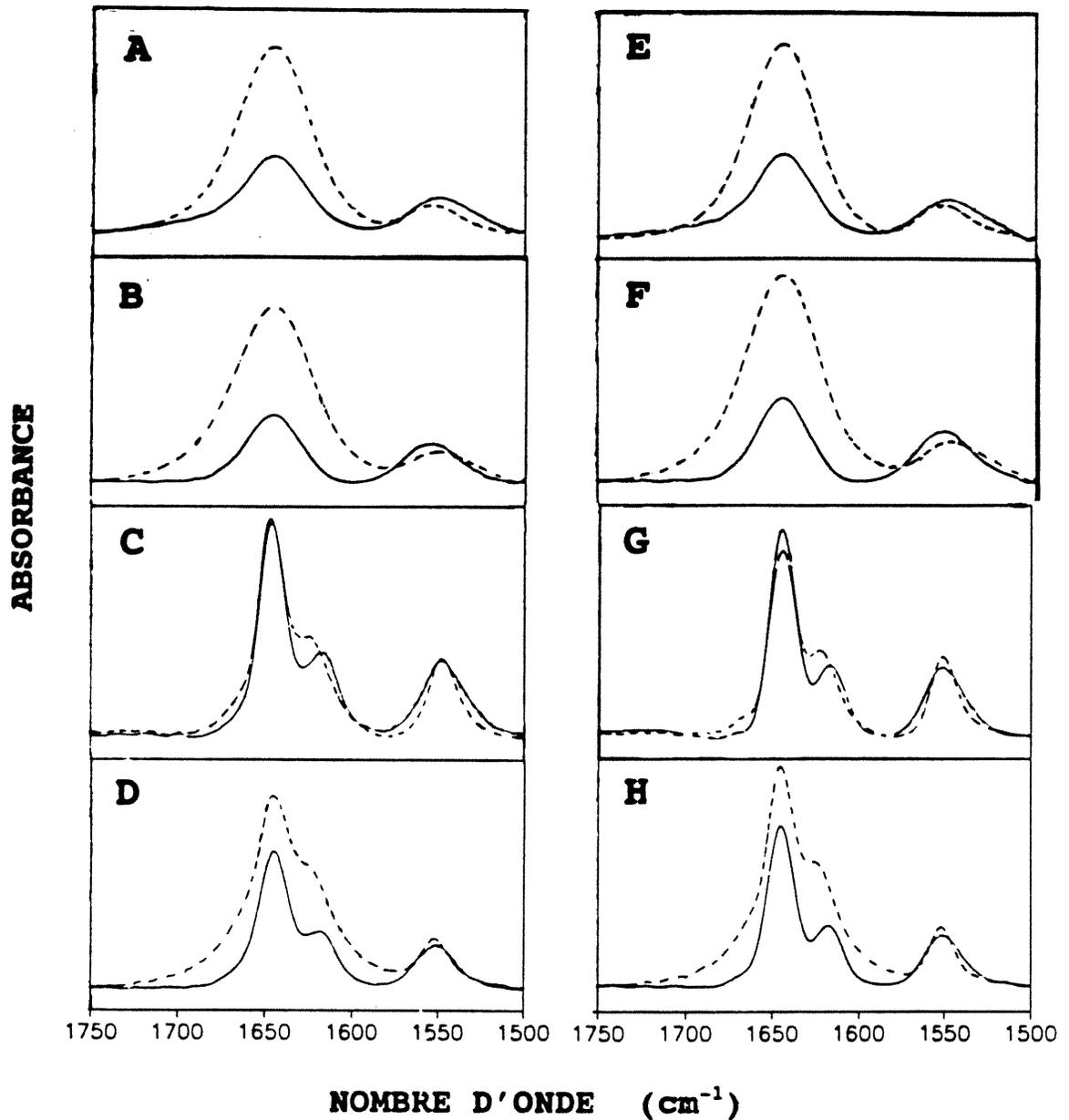


Figure 17: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration amide I et amide II de la dispersion de: A) sphingomyéline à pH 5.2; B) sphingomyéline à pH 7.4; C) céramide 3 à pH 5.2; D) céramide 3 à pH 7.4, mesurés à 0 °C (-) et 75 °C (--). Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) sphingomyéline à pH 5.2; F) sphingomyéline à pH 7.4; G) céramide 3 à pH 5.2; H) céramide 3 à pH 7.4.

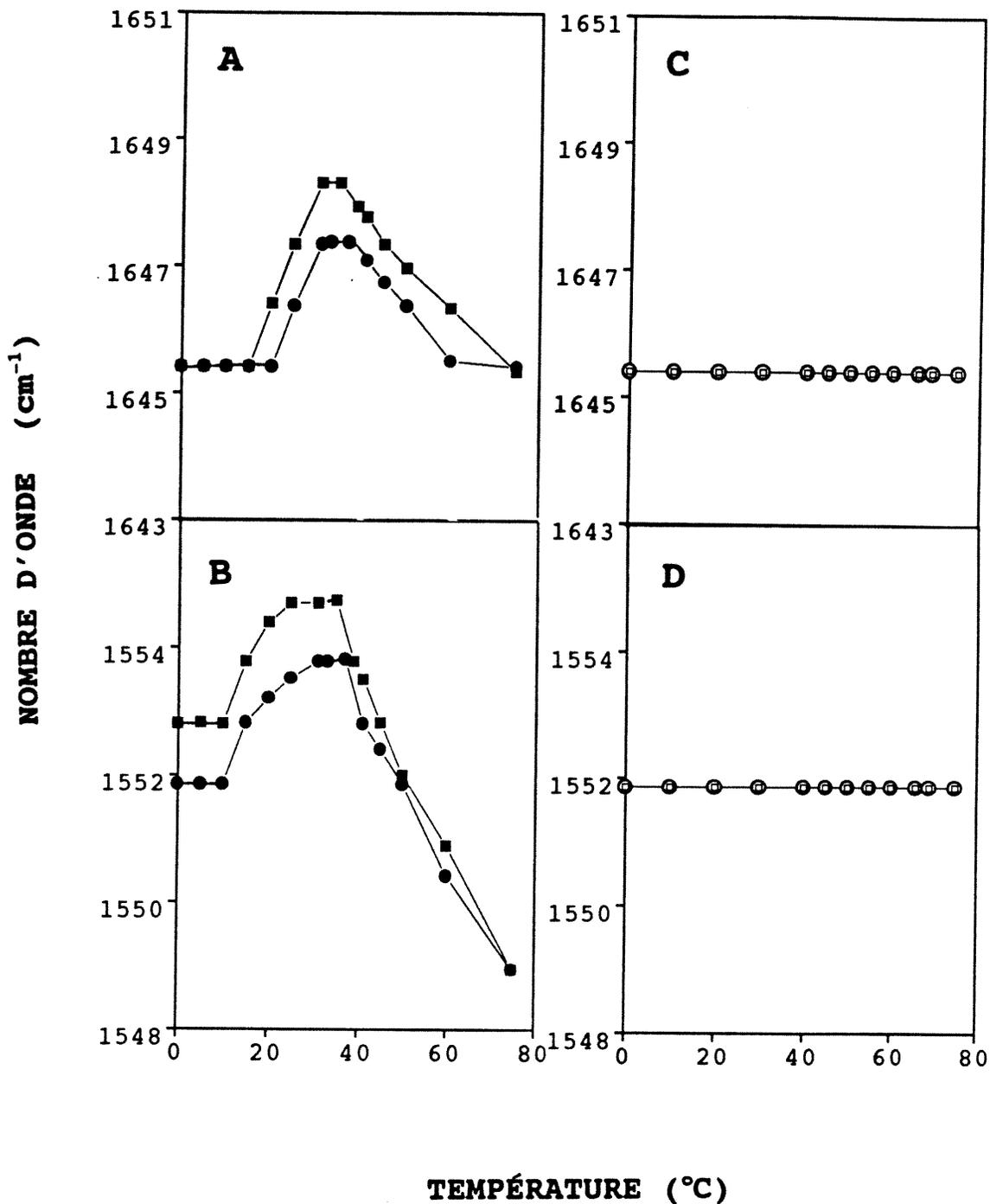


Figure 18: Effet de la température sur la position de: A) la bande amide I et B) la bande amide II de la dispersion de sphingomyéline à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■); C) la bande amide I D) la bande amide II de la dispersion de céramide 3 à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□).

$\bar{\nu}$ amide II augmente à partir de 10 °C jusqu'à environ 30 °C aux pH 5.2 et 7.4 et chute par la suite jusqu'à 75 °C (figure 18B). De plus, nous pouvons aussi noter que les valeurs du  $\bar{\nu}$ amide I et du  $\bar{\nu}$ amide II mesurées pour la sphingomyéline hydratée à 0 °C sont inférieures et supérieures respectivement d'environ 12 et 6  $\text{cm}^{-1}$  par rapport à celles de la sphingomyéline anhydre (SPM/KBr) (annexe II). Par ailleurs, on peut remarquer que la position des bandes amide I et II du céramide 3 situées vers 1645 et 1550  $\text{cm}^{-1}$ , reste constante entre 0 et 75 °C (figure 18C et D) et que les positions de ces bandes mesurées pour le céramide 3 hydratée à 0 °C sont peu différentes de celles observées pour le céramide 3 anhydre (CER3/KBr) (annexe II).

#### 3.1.4 Région des modes d'élongation du groupement phosphate

Les bandes des élongations antisymétrique et symétrique des groupements phosphates de la dispersion de sphingomyéline mesurées à 0 et 75 °C à pH 5.2, sont montrées à la figure 19. Ces bandes sont situées à des positions respectives ( $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  et  $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{PO}_2^-$ ) de 1224.9 et 1085.0  $\text{cm}^{-1}$  à 0 °C et se déplacent lors du chauffage à 1222.0 et 1085.0  $\text{cm}^{-1}$  à 75 °C. Des valeurs très similaires sont aussi obtenues pour ces bandes à pH 7.4 (annexe III). On remarque à partir de ces résultats que le  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  de la sphingomyéline diminue de 2.9  $\text{cm}^{-1}$  tandis que le  $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{PO}_2^-$  ne varie pas de 0 à 75 °C. De plus, on peut également noter que les  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  et  $\bar{\nu}_{\text{s}}\text{PO}_2^-$  de la dispersion de sphingomyéline mesurés à 0 °C diminuent d'environ 10 et 6  $\text{cm}^{-1}$  comparativement à ceux de la sphingomyéline anhydre (annexe II).

### 3.2 Discussion

Les résultats obtenus dans la région du mode d'élongation symétrique C-H ont indiqué que la dispersion de sphingomyéline de cerveau de bovin subit une transition de la phase gel à la phase liquide cristalline aux pH 5.2 et 7.4 qui est caractérisée par une  $T_m$  d'environ 31-33 °C (figure 14). Ceci supporte les résultats de plusieurs études effectuées par spectroscopie RMN, FTIR, Raman, fluorescence, calorimétrie, diffraction des rayons X et microscopie qui ont révélé que les sphingomyélines des membranes de mammifères subissent une transition de phase gel-liquide cristalline près de la température physiologique (43,54,63,73,75,85,103,111-125). En

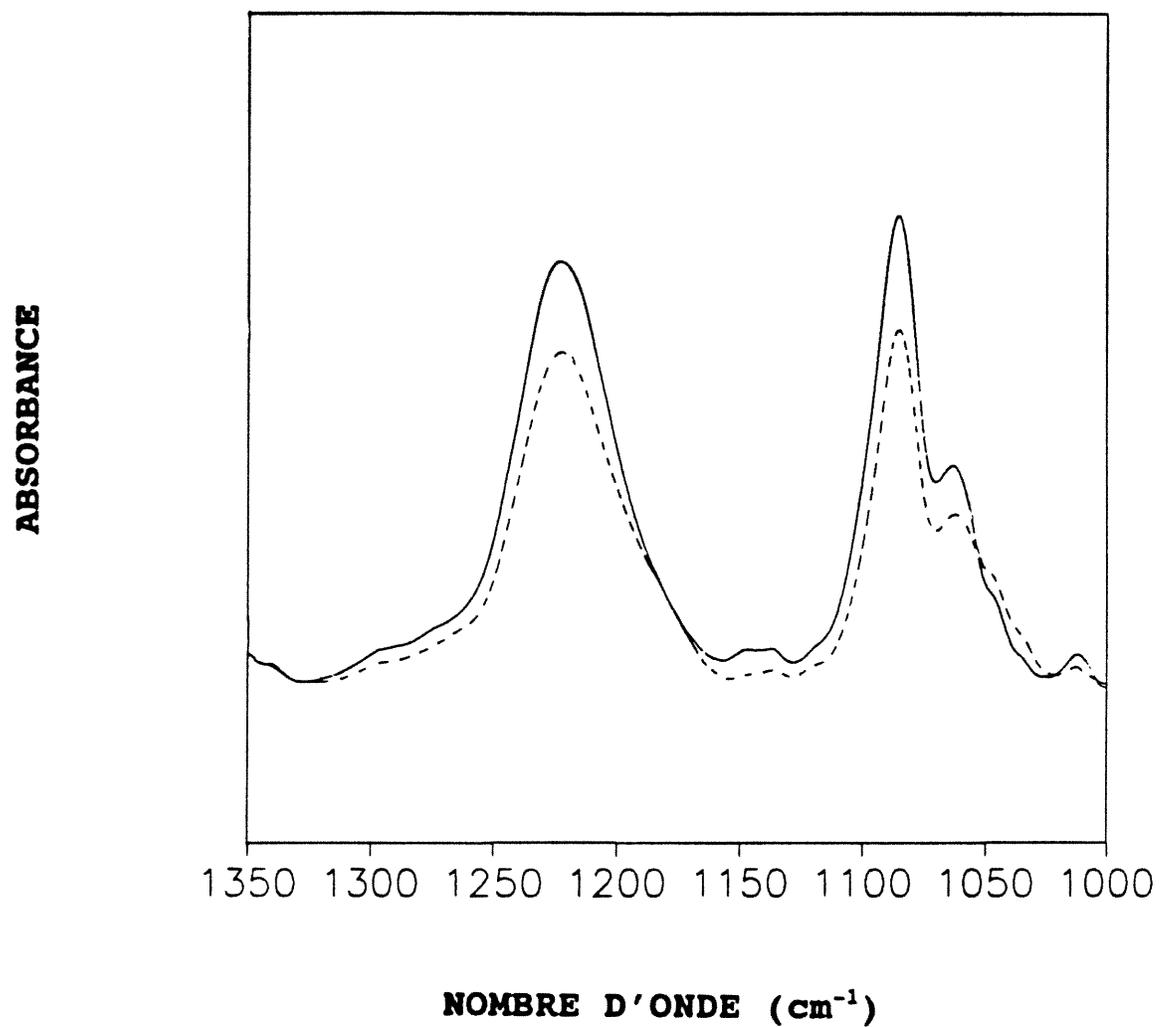


Figure 19: Spectres infrarouges de la région des modes d'élongation phosphate mesurés à 0 °C (-) et 75 °C (--), de la dispersion de sphingomyéline à pH 5.2.

particulier, il a été rapporté suite à des travaux de fluorescence que la sphingomyéline de cerveau de bovin subirait une transition de phase gel-liquide cristalline à une  $T_m$  d'environ 32 °C (54). Toutefois, certaines différences entre le thermotropisme de la dispersion de sphingomyéline de cerveau de bovin et le thermotropisme d'autres types de sphingomyéline ont aussi été remarquées lors de ces travaux (43,85,103,113,114,116,119-122,125). Ces variations ont été associées aux différences qui existent entre la composition des chaînes acyles des sphingomyélines analysées. En rapport avec ceci, il est intéressant de noter que le domaine de température où s'effectue la transition de phase de notre dispersion de sphingomyéline apparaît plus large que celui qui est habituellement observé pour un lipide pur. Ceci pourrait découler du fait que la préparation de sphingomyéline que nous avons utilisée est une fraction extraite de cerveau de bovin et que ses chaînes acyles sont hétérogènes (figure 6).

La transition de phase de la sphingomyéline est aussi marquée par une augmentation abrupte de la valeur du  $\bar{\nu}_s\text{CH}_2$  d'environ 2  $\text{cm}^{-1}$  (figure 14A). Cette variation pourrait être due à l'isomérisation trans/gauche dans les chaînes acyles de la sphingomyéline lors de la transition de phase tel qu'il a été suggéré pour plusieurs autres lipides dont la dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) qui subissent aussi une transition de phase gel-liquide cristalline (57,58,83,111). D'ailleurs, les résultats obtenus lors d'études de spectroscopie FTIR et Raman ont aussi été expliqués par l'introduction de conformères gauches dans les chaînes acyles de la sphingomyéline durant sa transition de phase (85,103,115,119). D'autre part, une augmentation d'environ 2  $\text{cm}^{-1}$  de la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H accompagne aussi la transition de phase gel-liquide cristalline de la sphingomyéline (figure 14B). Ce changement de la largeur de la bande d'élongation C-H est difficile à interpréter au niveau moléculaire puisqu'il a été suggéré que ce paramètre spectral est sensible à de multiples phénomènes dont la libration des chaînes acyles des lipides ainsi qu'à plusieurs facteurs intramoléculaires incluant l'isomérisation trans/gauche des chaînes acyles, la mobilité librotorsionnelle et la

distribution de fréquence le long des chaînes acyles des lipides (58,86,103,126). Toutefois, étant donné qu'un changement de phase gel-liquide cristalline provoque l'élargissement des bandes d'élongation C-H d'autres lipides (57,83,99) et de la sphingomyéline, nous croyons que ce paramètre est utile pour suivre le thermotropisme des systèmes lipidiques.

Les résultats de la région du mode d'élongation symétrique C-H de la dispersion de céramide 3 de cerveau de bovin aux pH 5.4 et 7.2, ont indiqué que les molécules de céramide 3 demeurent dans la phase gel entre 0 et 72 °C (figure 14) (58,97-99). Toutefois, puisque nous avons observé une augmentation de  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  et de la largeur de bande survenant à environ 75 °C, il semble que le céramide 3 pourrait subir une transition de phase à une  $T_m$  supérieure à 72 °C. Ceci est supporté par les résultats d'une étude de calorimétrie effectuée par Wiedmann et coll. (127) qui ont indiqué que la dispersion de céramide de cerveau de bovin hydratée subit une transition de phase gel-liquide cristalline à une  $T_m$  d'environ 75 °C. De plus, on remarque une différence d'au moins 40 °C entre les  $T_m$  du céramide 3 et de la sphingomyéline qui peut être due aux différences structurales existant entre ces lipides, et plus précisément aux différentes taille et structure de leur tête polaire (figure 6). En fait, il est possible que la taille inférieure de la tête polaire du céramide 3 cause une diminution de son volume effectif comparativement à celui qu'occupe la tête polaire de la sphingomyéline, ce qui pourrait avoir comme conséquence de rendre l'empilement des têtes polaires et des chaînes acyles de la dispersion de céramide 3 plus serré que celui de la dispersion de sphingomyéline. De tels ressètements pourraient amener une augmentation des interactions de van der Waals entre les chaînes acyles de la bicouche de céramide 3, ce qui aurait pour effet de stabiliser ce lipide dans la phase gel et de déplacer sa transition de phase vers les hautes températures (43). D'ailleurs, une hypothèse semblable a déjà été émise pour d'autres lipides (43,128-130). Par exemple, Lafleur et coll. ont proposé que la diminution de la taille de la tête polaire de la 1-palmitoyl-2-oléoyl-phosphatidyléthanolamine (POPE) par rapport à celle de la 1-palmitoyl-2-oléoyl-phosphatidylcholine

(POPC), mènerait à une compression latérale des chaînes acyles du lipide (129,130). D'autre part, la formation de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyle et amide des molécules de céramide adjacentes tel qu'il a été proposé par certains auteurs (47,48,62), pourrait aussi contribuer à une stabilisation additionnelle au sein de la bicouche de céramide 3 comparativement à celle de la sphingomyéline et ainsi augmenter sa  $T_m$  (43,127).

La différence d'empilement entre les chaînes acyles de la sphingomyéline et du céramide 3 est également visible à partir de la région de la déformation des  $CH_2$ . En effet, l'observation d'une seule bande vers  $1468\text{ cm}^{-1}$  dans la région de la déformation des  $CH_2$  de la dispersion de sphingomyéline en phase gel (figure 15A et C), a indiqué que les chaînes acyles de la sphingomyéline adoptent un empilement hexagonal à basse température (58,100). Ceci est en accord avec les résultats obtenus lors d'études effectuées par diffraction des rayons X qui ont indiqué que des dispersions constituées de sphingomyéline du cerveau de bovin, de palmitoylsphingomyéline ainsi que de stéaroylsphingomyéline adopteraient une symétrie d'empilement hexagonale en phase gel (112,122,125). Par contre, le dédoublement de la bande de déformation des  $CH_2$  de la dispersion de céramide 3 ainsi que la position des deux composantes à  $0\text{ }^\circ\text{C}$  (figure 15B et D), indiquent plutôt que les chaînes acyles de la céramide 3 s'organisent selon un empilement orthorhombique ou monoclinique à basse température (98-101,106). Ceci semble rejoindre les résultats obtenus lors d'une étude de diffraction des rayons X qui ont indiqué que la portion céramide des cérébrosides provenant de cerveau de bovin adopterait une structure orthorhombique (131). La ressemblance qui existe entre ces lipides et le céramide 3 de cerveau de bovin nous amène donc à proposer que la symétrie de l'empilement des chaînes acyles du céramide 3 serait orthorhombique à basse température. Or, puisque l'empilement orthorhombique requiert un empilement plus serré des chaînes acyles des lipides que l'empilement hexagonal (99), ceci vient corroborer notre discussion précédente portant sur l'empilement des chaînes acyles de la sphingomyéline et du céramide 3 en rapport avec la taille de leur tête polaire.

La position de la bande de déformation des  $\text{CH}_2$  observée pour la dispersion de sphingomyéline entre 0 et 75 °C (figure 16A), indique également que la symétrie d'empilement des chaînes acyles de la sphingomyéline demeure hexagonale sur tout le domaine thermique examiné (58,100). Toutefois, dans le cas du céramide 3, la fusion des deux composantes à 25 °C indique plutôt que ses chaînes acyles passent de la symétrie d'empilement orthorhombique à hexagonale à cette température (figure 16B) (58,98-101,106). Le passage de la symétrie hexagonale à la symétrie orthorhombique ayant été associé à une augmentation des interactions interchaînes dérivant probablement de restrictions dans la liberté de mouvement des chaînes acyles de plusieurs lipides (60,132), le changement de la symétrie d'empilement de orthorhombique à hexagonale des chaînes acyles du céramide 3 pourrait par conséquent être dû à un affaiblissement des interactions interchaînes. Ceci pourrait dériver de l'agitation thermique des molécules de céramide 3 qui entraînerait une perturbation de la compacité de l'empilement des chaînes acyles du céramide 3 et conduirait à un changement de leur symétrie d'empilement tel qu'il a été observé pour d'autres lipides (101).

Il semble y avoir également des différences entre les réseaux de liaisons hydrogène formés au niveau des groupements amide situés aux interfaces de la sphingomyéline et du céramide 3, à 0 °C. Notamment, nous avons observé une diminution prononcée du  $\bar{\nu}_{\text{amide I}}$  et une augmentation du  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  de la sphingomyéline hydratée par rapport à ceux obtenus pour la sphingomyéline anhydre, tandis que les bandes amide I et amide II de la dispersion de céramide 3 ne semblent se déplacer que faiblement par rapport à celles du céramide 3 anhydre (figure 17, annexe II). Puisqu'il a été établi que la formation de liaison hydrogène avec un groupement carbonyle amène un affaiblissement du lien  $\text{C}=\text{O}$ , elle conduit au déplacement de la bande d'élongation  $\text{C}=\text{O}$  vers les bas nombres d'onde. De manière similaire, une rupture des liaisons hydrogène formées avec la portion  $\text{N}-\text{H}$  d'un amide secondaire conduit à un déplacement de la bande amide II vers les bas nombres d'onde (81,102,133-135). Considérant ces interprétations, il semblerait que la présence d'eau renforce les liaisons hydrogène qui sont formées au

niveau des portions C=O et N-H du groupement amide de la sphingomyéline. Par contre, le déplacement faible des bandes amide I et II du céramide 3 par rapport à celles du céramide 3 anhydre, suggère que le réseau de liens hydrogène qui existe entre les molécules de céramide 3 est fort et que l'eau a de la difficulté à entrer en compétition dans la participation aux liaisons hydrogène impliquant les groupements amide des molécules de céramide 3 en phase gel. Ceci pourrait être dû à l'empilement serré des groupements de tête de la dispersion de céramide 3 qui défavoriserait l'insertion des molécules d'eau entre les têtes polaires et par le fait même, leur interaction avec le groupement amide du céramide 3. Cependant, puisque la pleine hydratation du céramide 3 de cerveau de bovin ne requiert que de faibles concentrations d'eau (136) et que nous avons pris soins de préparer et de faire l'acquisition des spectres de nos échantillons en présence d'un excès d'eau, nous croyons que notre dispersion de céramide 3 est hydratée au maximum de sa capacité en phase gel.

Les changements de  $\bar{\nu}$ amide I et de  $\bar{\nu}$ amide II que nous avons observés pour la sphingomyéline lors du chauffage ont révélé qu'il se produit aussi des variations considérables au niveau du réseau de liaisons hydrogène impliquant les portions C=O et N-H du groupement amide de la sphingomyéline durant sa transition de phase (figure 18). Ces variations de la force des liaisons hydrogène à l'interface de la sphingomyéline en fonction de la température, peuvent être dues d'une part à un changement dans l'hydratation du groupement amide de la sphingomyéline et d'autre part à une réorganisation des liaisons hydrogène intermoléculaires qui sont formées entre les portions C=O et N-H du groupement amide et le groupement hydroxy allylique de la sphingomyéline (52,53,124). Par contre, la position constante des bandes amide I et amide II observée pour le céramide 3 lors du chauffage (figure 18), semble indiquer qu'il se produit peu de changement au niveau du réseau de liaisons hydrogène à l'interface du céramide 3 sur tout le domaine thermique examiné.

Les diminutions de  $\bar{\nu}_{as}PO_2^-$  et de  $\bar{\nu}_sPO_2^-$  que nous avons observées pour la sphingomyéline en phase gel (annexe III) par

rapport à ceux de la sphingomyéline anhydre (annexe II), peuvent être associées à un renforcement des liaisons hydrogène au niveau de son groupement phosphate qui dériverait de son hydratation (57,58,81,83,137). En fait, puisqu'il a été rapporté que la bande d'élongation antisymétrique  $\text{PO}_2^-$  de la sphingomyéline pleinement hydratée dans l'eau ( $\text{H}_2\text{O}$ ) est située vers  $1220 \text{ cm}^{-1}$  (103), les valeurs de  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  que nous avons obtenues (annexe III) semblent indiquer que la tête polaire de la sphingomyéline est fortement hydratée en phase gel. De plus, l'abaissement du  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  observé entre 0 et  $75^\circ\text{C}$  suggère qu'il se produirait un renforcement des liaisons hydrogène au niveau du groupement phosphate de la sphingomyéline lors de la transition de phase gel-liquide cristalline, qui pourrait être associé également à son hydratation.

L'ensemble des résultats de cette étude tendent à indiquer que les différences structurales qui existent au niveau de la tête polaire de la sphingomyéline et du céramide 3 induisent des changements importants dans leur thermotropisme et leur hydratation. Premièrement, la diminution de la taille de la tête polaire du céramide 3 par rapport à celle de la sphingomyéline semble provoquer le ressèchement des chaînes acyles, qui passent d'un empilement hexagonal dans la dispersion de sphingomyéline à un empilement orthorhombique dans la dispersion de céramide 3 à basse température. L'empilement plus serré des chaînes acyles semble amener une augmentation considérable de la  $T_m$  du céramide 3 comparativement à celle de la sphingomyéline. De plus, la petite taille de la tête polaire du céramide 3 et/ou sa capacité de faire des liaisons hydrogène semblent l'amener lorsqu'elle est en phase gel, à adopter un arrangement qui restreindrait l'hydratation de son groupement amide. Finalement, une variation de pH 5.2 à pH 7.4 ne semble pas modifier le comportement de la sphingomyéline et du céramide 3.

## CHAPITRE 4. ÉTUDE DE L'INTERACTION DE L'ACIDE PALMITIQUE PERDEUTÉRÉ AVEC LA SPHINGOMYÉLINE ET LE CÉRAMIDE

### 3

Dans ce chapitre, nous étudierons l'effet de l'acide palmitique perdeutééré sur le thermotropisme de la sphingomyéline et du céramide 3. Nous tenterons également de déterminer si une variation du pH de 5.2 à 7.4 peut influencer les interactions existant entre ces lipides.

#### 4.1 Résultats

##### 4.1.1 Régions des modes des élongations symétriques C-H et C-D

Le thermotropisme des mélanges SPM/PA-d<sub>31</sub> (2:1 mole) et CER3/PA-d<sub>31</sub> (2:1 mole) aux pH 5.2 et 7.4, est illustré à la figure 20. Les courbes de la figure 20A et B montrent une augmentation brusque du  $\bar{\nu}_s\text{CH}_2$  et de la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> entre 30 et 60 °C, indiquant que la sphingomyéline subit une transition de phase dont la T<sub>m</sub> est de 48 °C à pH 5.2 et de 45 °C à pH 7.4. Cette figure montre également que le PA-d<sub>31</sub> subit aussi une transition de phase reflétée par une augmentation abrupte de  $\bar{\nu}_s\text{CD}_2$  et de la largeur de la bande d'élongation symétrique C-D entre 40 et 63 °C, la T<sub>m</sub> est respectivement de 51 et 46 °C aux pH 5.2 et 7.4. On peut remarquer que cette transition de phase du PA-d<sub>31</sub> survient à une T<sub>m</sub> voisine de celle de la sphingomyéline, mais semble couvrir un domaine de température plus étroit.

D'après la figure 20C, le  $\bar{\nu}_s\text{CH}_2$  du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> augmente brusquement à partir d'environ 60 °C. Cette augmentation de  $\bar{\nu}_s\text{CH}_2$  suggère que le céramide 3 subit une transition de phase au-dessus de 60 °C. Toutefois, puisque l'augmentation de  $\bar{\nu}_s\text{CH}_2$  semble se poursuivre au-dessus de 75 °C, il est impossible de déterminer la T<sub>m</sub> du céramide 3 avec exactitude. Le PA-d<sub>31</sub> de ce mélange subit aussi une transition de phase à une T<sub>m</sub> de 50 °C à pH 5.2 et de 60 °C à pH 7.4. On remarque ici que la T<sub>m</sub> du PA-d<sub>31</sub> est inférieure à celle du céramide 3 dans le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>, et augmente de 10 °C lors du changement du pH de 5.2 à 7.4. Des résultats comparables ont été aussi obtenus à partir de la largeur des bandes des élongations symétriques C-H et C-D du mélange

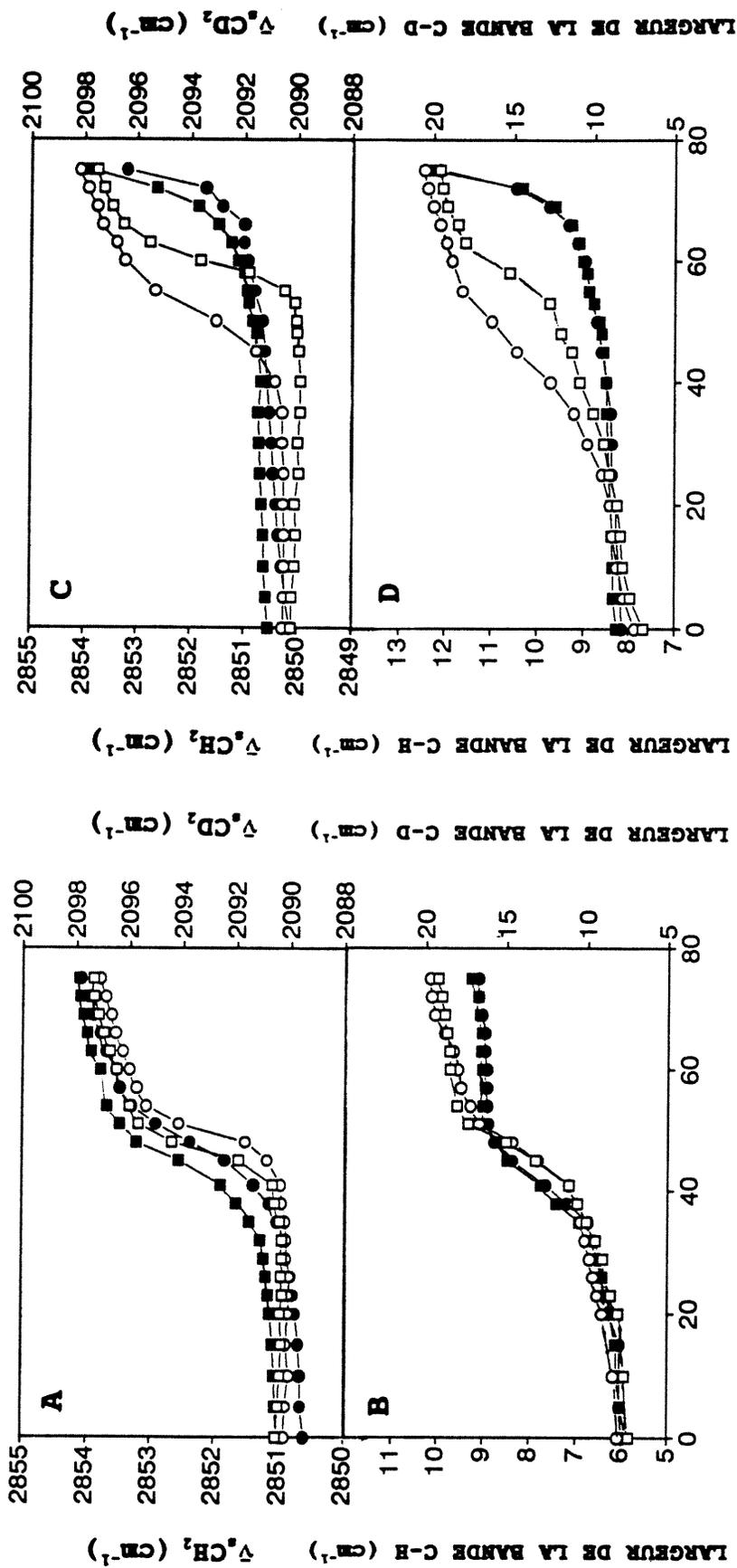


Figure 20: Effet de la température sur: A) la position et B) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■) et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□) du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>; C) la position et D) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■) et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□) du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>.

CER3/PA-d<sub>31</sub> (figure 20D).

#### 4.1.2 Région du mode de déformation des CH<sub>2</sub>

La bande de déformation des CH<sub>2</sub> du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> est constituée d'une seule composante située vers 1467 cm<sup>-1</sup> et la variation de sa position entre 0 et 75 °C aux pH 5.4 et 7.2, est montrée à la figure 21A. Par contre, la bande de déformation des CH<sub>2</sub> du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> comporte deux composantes aux pH 5.2 et 7.4 qui sont situées vers 1466 et 1470 cm<sup>-1</sup> à 0 °C. Celles-ci se combinent en une seule composante située à 1467.9 cm<sup>-1</sup> à partir de 20 °C (figure 21B).

#### 4.1.3 Région des modes de vibration des groupements carboxyle et amide

La région comprise entre 1800 et 1500 cm<sup>-1</sup> des spectres infrarouges des mélanges SPM/PA-d<sub>31</sub> et CER3/PA-d<sub>31</sub> aux pH 5.2 et 7.4 pour des températures de 0 et 75 °C, est présentée à la figure 22. Cette région comporte trois bandes d'absorption à 0 °C dont deux sont situées vers 1645 et 1552 cm<sup>-1</sup> et sont assignées aux vibrations amide I et amide II du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>, et une troisième bande associée à l'élongation du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> dont le nombre d'onde ( $\bar{\nu}$ COOH) est d'environ 1704 cm<sup>-1</sup>. Pour le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>, quatre bandes d'absorption sont présentes dans cette région à 0 °C. Ces bandes sont situées vers 1710, 1645, 1620 et 1553 cm<sup>-1</sup> à 0 °C et assignées respectivement au mode d'élongation carboxyle et aux vibrations amide I et amide II du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>. On note qu'à 0 et 75 °C, il se produit une augmentation de la largeur de la bande amide II (annexe V).

Les variations de la position des bandes d'élongation carboxyle, amide I et amide II des mélanges SPM/PA-d<sub>31</sub> et CER3/PA-d<sub>31</sub> en fonction de la température sont montrées à la figure 23. Pour le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>, nous pouvons voir que la valeur du  $\bar{\nu}$ COOH augmente à partir de 35 jusqu'à 75 °C aux pH 5.4 et 7.2 (figure 23A). De plus, la comparaison des résultats de la région des modes de vibration amide I et amide II du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> (figure 23B et C) avec ceux obtenus pour la dispersion de sphingomyéline aux pH 5.2 et 7.4 (figure 18), semble indiquer que la présence du PA-d<sub>31</sub> a peu d'influence.

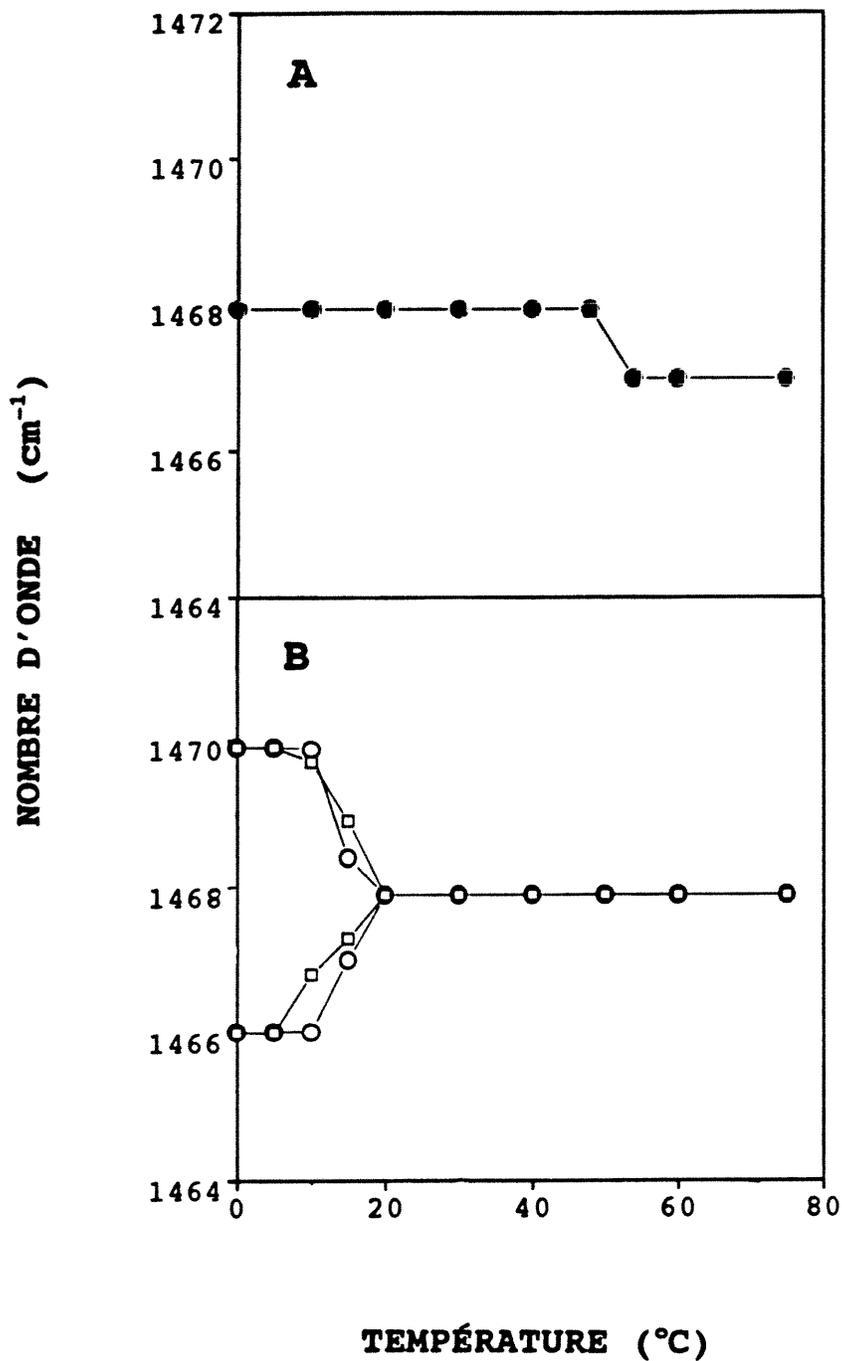


Figure 21: Effet de la température sur la position des composantes de la bande de déformation des CH<sub>2</sub> de la dispersion de: A) SPM/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■); B) CER3/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□).

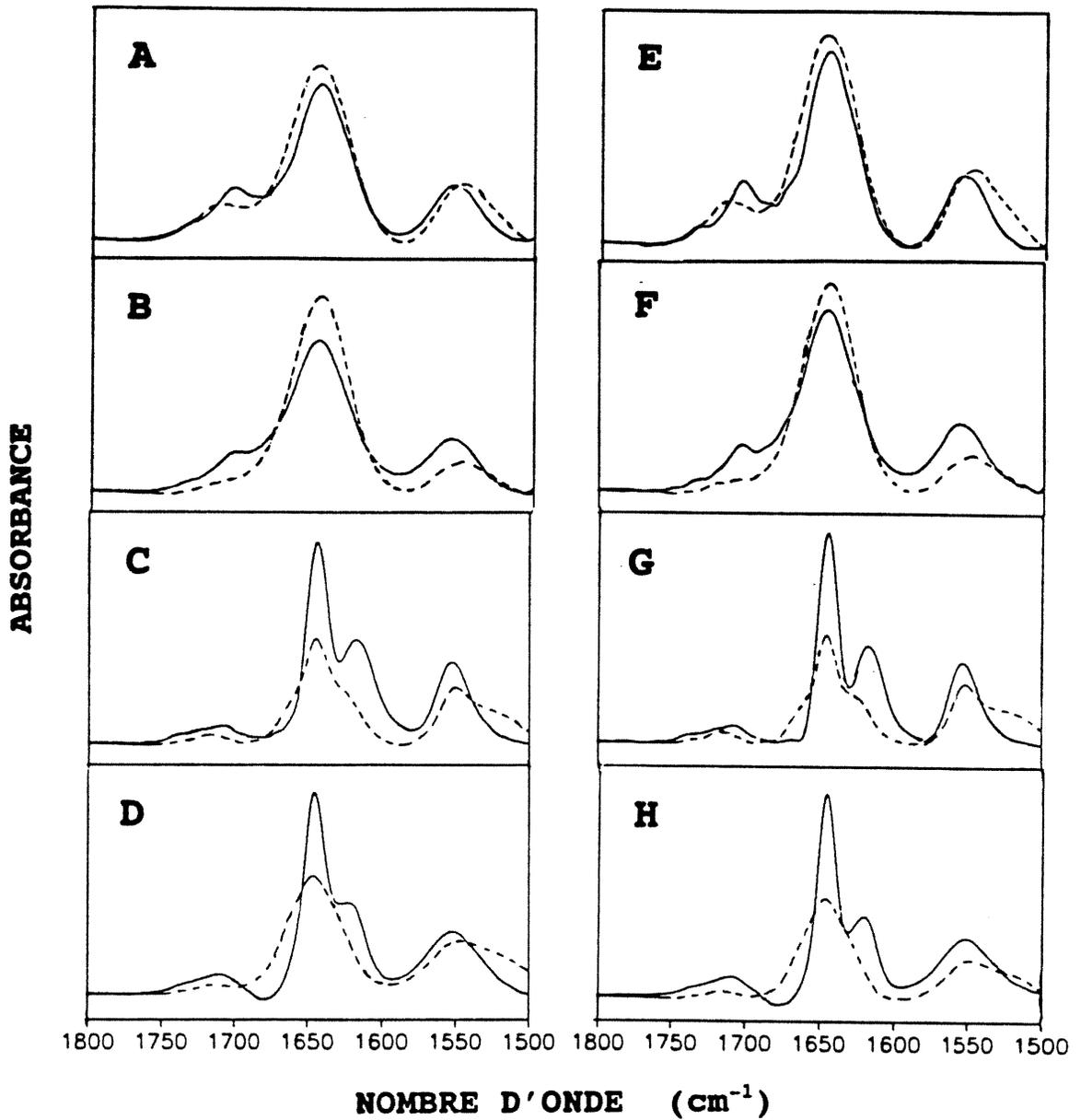


Figure 22: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration du groupement carboxyle, amide I et amide II de la dispersion de: A) SPM/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2 et B) SPM/PA-d<sub>31</sub> à pH 7.4; C) CER3/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2; D) CER3/PA-d<sub>31</sub> à pH 7.4 mesurés à 0 °C (-) et 75 °C (--). Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) SPM/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2; F) SPM/PA-d<sub>31</sub> à pH 7.4; G) CER3/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2; H) CER3/PA-d<sub>31</sub> à pH 7.4.

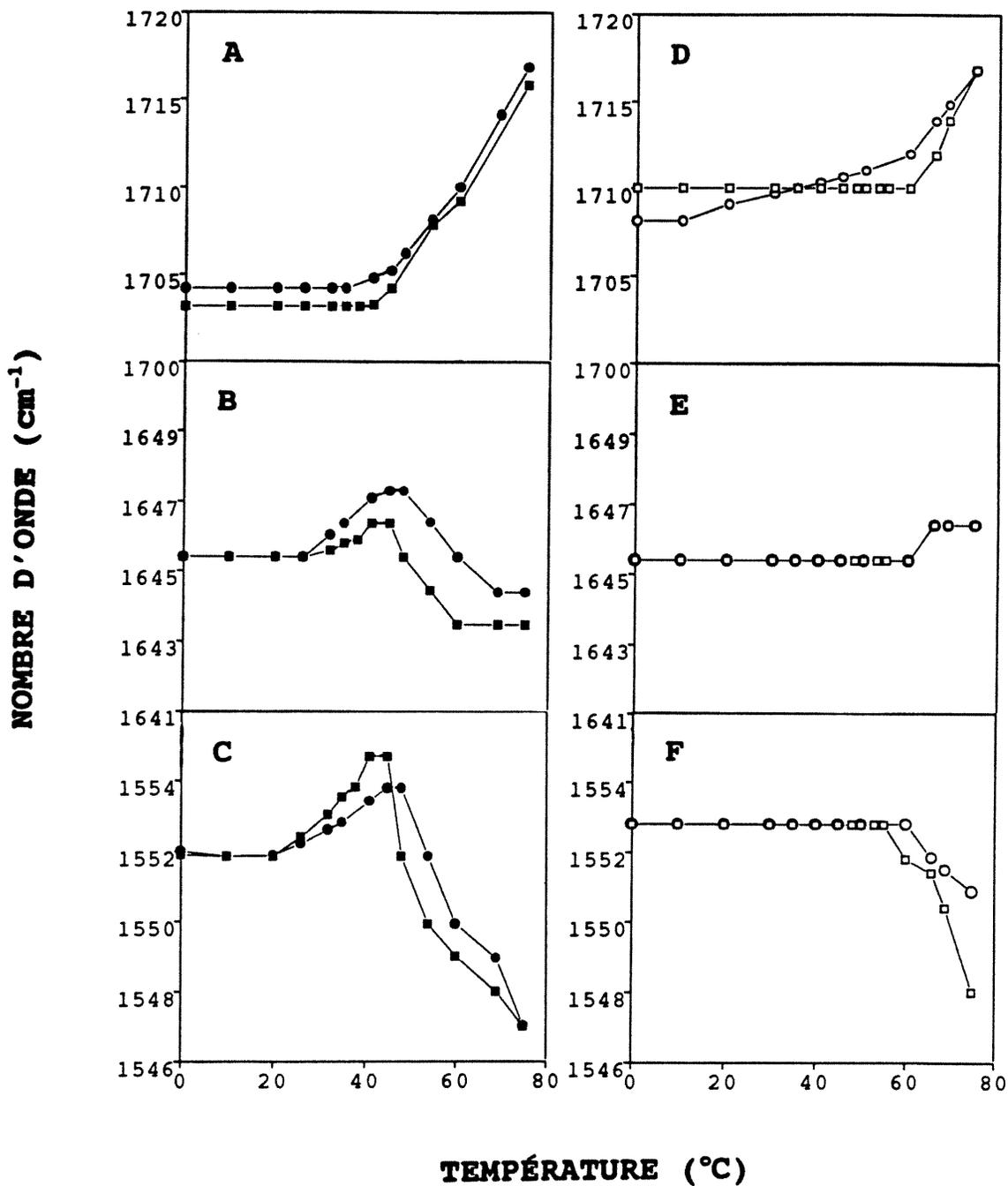


Figure 23: Effet de la température sur la position de la bande: A) de l'élongation du groupement carboxyle, B) amide I et C) amide II de la dispersion de SPM/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■); D) de l'élongation du groupement carboxyle, E) amide I et F) amide II de la dispersion de CER3/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□).

D'autre part, dans le cas du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>, nous pouvons voir que les  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  et  $\bar{\nu}_{\text{amide I}}$  augmentent à partir d'environ 60 °C tandis que le  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  diminue à partir de cette température aux deux pH (figure 23D, E et F). De plus, les positions des bandes amide I et amide II obtenues pour le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2 et 7.4 sont très voisines de celles qui ont été rapportées dans le chapitre précédent pour la dispersion de céramide 3 (figure 18).

#### 4.1.4 Région des modes d'élongation du groupement phosphate

Les  $\bar{\nu}_{\text{asPO}_2^-}$  et  $\bar{\nu}_{\text{sPO}_2^-}$  du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> aux pH 5.2 et 7.4 mesurés à 0 et 75 °C sont présentés à l'annexe III. On peut remarquer à partir de ces résultats et de ceux du chapitre 3, que l'ajout du PA-d<sub>31</sub> amène une diminution du  $\bar{\nu}_{\text{asPO}_2^-}$  de la sphingomyéline en phase gel ainsi qu'en phase liquide cristalline.

## 4.2 Discussion

Les résultats de la région des modes des élongations symétriques C-H et C-D du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> ayant indiqué que la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> subissent des transitions de phase à des T<sub>m</sub> très similaires et variant de 46 à 51 °C aux pH 7.4 et 5.2 (figure 20, annexe I), ceci suggère que ces lipides sont miscibles et qu'ils coexistent dans les phases gel et liquide cristalline à ces deux pH. Toutefois, étant donné que nous avons observé que l'ajout de 33% mole de PA-d<sub>31</sub> conduit à une augmentation d'environ 15 °C de la T<sub>m</sub> de la sphingomyéline et à un élargissement de l'intervalle de température où sa transition de phase se produit, il appert que l'incorporation d'acide palmitique perturbe la structure de la bicouche de sphingomyéline et augmente l'ordre dans ses chaînes acyles (138). Ce phénomène a déjà été observé pour d'autres phospholipides dont la DPPC et la DMPC en présence d'acide palmitique, lors d'études de calorimétrie, de fluorescence, de spectroscopie RMN et FTIR (139-142). Il a été alors proposé que la hausse de la T<sub>m</sub> serait due à l'habilité qu'a la longue chaîne hydrocarbonée de l'acide palmitique à remplir l'espace qui est créé dans la région hydrophobe des phospholipides lors de l'empilement de leurs têtes polaires. En fait, cet arrangement permettrait de diminuer l'effet déstabilisant exercé par les têtes polaires volumineuses de ces

phospholipides et augmenterait les forces de van der Waals entre les chaînes acyles des molécules de phospholipides. Or, la DPPC et la DMPC ayant une tête polaire identique à celle de la sphingomyéline, il est donc possible que l'introduction des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans la bicouche de sphingomyéline puisse également résulter à un arrangement moléculaire similaire à celui qui a été rapporté pour ces phospholipides en présence d'acide gras ayant une longue chaîne acyle (138-140,142).

D'autre part, l'élargissement de la région de la transition de phase de la sphingomyéline que nous avons observé en présence du PA-d<sub>31</sub> (figure 20A et B), pourrait être dû à l'hétérogénéité des chaînes acyles et des têtes polaires de ces lipides qui amènerait une diminution de la coopérativité de la transition de phase de la sphingomyéline tel qu'il a été suggéré par Mouristen (61). Toutefois, puisque la sphingomyéline utilisée était déjà hétérogène au niveau des chaînes acyles, il est probable que la diminution additionnelle de coopérativité de la transition de phase de la sphingomyéline puisse être due en grande partie à la différence existant entre la tête polaire de l'acide palmitique (groupement carboxyle) en rapport avec celle de la sphingomyéline (groupement phosphatidylcholine) (figure 6).

La transition de phase du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> semble être également marquée par des changements qui se répercutent sur le réseau de liaisons hydrogène formé au niveau des interfaces et des têtes polaires de la sphingomyéline et du PA-d<sub>31</sub>. En fait, l'augmentation de  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> survenant au-dessus de 35 °C (figure 23A), semble indiquer qu'il se produit un affaiblissement des liaisons hydrogène intermoléculaires au niveau du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> durant sa transition de phase. Parallèlement, les variations des positions des bandes amide I et amide II du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> qui surviennent au-dessus de 26 °C (figure 23B et C), pourraient être associées à une réorganisation des liaisons hydrogène intermoléculaires et à l'hydratation des groupements amide des molécules de sphingomyéline (53,81,102,133-135). Toutefois, la présence du PA-d<sub>31</sub> ne semble pas affecter considérablement les interactions qui ont lieu au niveau du groupement amide de la sphingomyéline. De plus, la faible

diminution du  $\bar{v}_{as}PO_2^-$  que nous avons observée pour le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> par rapport à celui de la dispersion de sphingomyéline (annexe III), semble indiquer que l'acide palmitique n'interagit pas spécifiquement avec le groupement phosphate de la sphingomyéline. Par contre, puisque nous avons observé des valeurs similaires du  $\bar{v}_{as}PO_2^-$  à 0 et 75 °C pour le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>, il semblerait que la présence du PA-d<sub>31</sub> puisse permettre la pleine hydratation du groupement phosphate de la sphingomyéline autant dans la phase gel que dans la phase liquide cristalline (53,81,137,140).

Par ailleurs, étant donné que nous n'avons pas observé de changement significatif au niveau de la bande d'absorption associé au groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> lors du passage du pH 5.2 à 7.4, il semble donc que l'incorporation des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans la bicouche de sphingomyéline puisse être accompagnée par une augmentation du pK<sub>a</sub> de leur groupement carboxyle. En fait, le pK<sub>a</sub> intrinsèque des groupements carboxyles des molécules d'acide gras à longue chaîne ayant été estimé à environ 4.7-5 dans l'eau distillée (142-146), nous aurions dû percevoir une certaine proportion d'acide palmitique sous forme déprotonée à pH 7.4 si celui-ci n'aurait pas été totalement incorporé dans la dispersion de sphingomyéline. Or, puisqu'il ne semble pas y avoir de déprotonation percevable du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> à pH 7.4 dans le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>, ceci suggère qu'il y a incorporation du 33% mole d'acide palmitique dans la bicouche de sphingomyéline à ce pH. D'ailleurs, ceci supporte nos conclusions précédentes selon lesquelles le PA-d<sub>31</sub> et la sphingomyéline formeraient un mélange homogène sur tout le domaine thermique examiné. De plus, il a été aussi observé que l'incorporation de l'acide palmitique dans des dispersions de DPPC ou de DMPC, conduirait à une augmentation importante du pK apparent du groupement carboxyle de cet acide gras qui peut varier de 8.7 à 10.2 selon les conditions expérimentales utilisées, et qu'ainsi, cet acide gras existerait essentiellement sous forme protonée dans ces bicouches au pH physiologique (142-144,147). Cette augmentation du pK<sub>a</sub> des groupements carboxyles des acides gras se produisant suite à leur incorporation dans une bicouche de phospholipide, a été associée notamment à un changement de la polarité autour du groupement carboxyle de l'acide gras dû à la présence de

lipides dans son environnement (43,140-144,147,149-151). Par conséquent, il est aussi probable que le pK apparent du PA-d<sub>31</sub> soit augmenté à une valeur supérieure à celle du pH physiologique lorsque cet acide gras est incorporé dans la bicouche de sphingomyéline, dû à un changement de la polarité de l'environnement de son groupement carboxyle résultant de la présence des molécules de sphingomyéline à sa proximité.

Les résultats de la région des modes des élongations symétriques C-H et C-D du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> (figure 20C et D), ont indiqué que le céramide 3 et le PA-d<sub>31</sub> ont des T<sub>m</sub> qui diffèrent d'au moins 10 °C (annexe I). Ceci peut être associé à la formation d'un mélange non homogène par les molécules de céramide 3 et de PA-d<sub>31</sub> due à leur faible miscibilité qui résulterait à une séparation de phase de ces lipides. En fait, cette séparation de phase pourrait dériver de l'empilement serré des chaînes acyles et des têtes polaires des molécules de céramide 3 qui nuirait à l'insertion des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans cette dispersion. Toutefois, puisque nous avons observé un abaissement significatif de la T<sub>m</sub> du céramide 3 lors de l'introduction de 33% mole PA-d<sub>31</sub>, il semble qu'il y ait incorporation d'une certaine fraction des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans la dispersion de céramide 3. D'ailleurs, ceci est supporté par les résultats de la région de la déformation des CH<sub>2</sub> qui ont révélé que le passage du céramide 3 de l'empilement orthorhombique à hexagonal se produirait à une température inférieure d'environ 5 °C en présence du PA-d<sub>31</sub> aux pH 5.2 et 7.4 (figures 16B et 21B). Cependant, puisque nous avons observé une séparation de phase entre les molécules de céramide 3 et de PA-d<sub>31</sub> au sein de ce mélange, il est donc possible que certaines des molécules de PA-d<sub>31</sub> incorporées puissent être regroupées sous forme de domaine au sein de cette dispersion, tel qu'il a été proposé suite à l'étude du thermotropisme d'autres lipides (43,111,148,149).

Par ailleurs, l'augmentation d'environ 10 °C de la T<sub>m</sub> du PA-d<sub>31</sub> que nous avons observée pour le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> lors du changement du pH 5.2 au pH 7.4 (annexe I), suggère également que les chaînes acyles des molécules de PA-d<sub>31</sub> sont plus ordonnées à pH 7.4 qu'à pH 5.2, sous la T<sub>m</sub> (136). Ceci pourrait être dû à la déprotonation partielle des groupements carboxyles

des molécules de PA-d<sub>31</sub> qui surviendrait à pH 7.4 dans ce mélange. Cette éventualité d'une déprotonation partielle des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> est suggérée par l'élargissement significatif de la bande amide II que nous avons observé pour ce mélange à 0 et 75 °C lors du changement du pH 5.2 au pH 7.4 (figure 22 et annexe V). En fait, l'élargissement de la bande amide II de ce mélange pourrait être le reflet de l'apparition d'une bande d'élongation antisymétrique attribuable au groupement carboxylate du PA-d<sub>31</sub> déprotoné. D'autre part, nos résultats sont aussi en accord avec ceux qui ont été obtenus par Kiston et coll. (136) lors d'une étude de <sup>2</sup>H-RMN et indiquant qu'il se produit effectivement une augmentation de la T<sub>m</sub> du PA-d<sub>31</sub> contenu dans le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> (2:1 mole) lors d'un changement de pH 6.2 à 7.4. De plus, ces auteurs ont également associé cette variation de la T<sub>m</sub> du PA-d<sub>31</sub> à la déprotonation partielle du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> du mélange à pH 7.4. Or, étant donné que le PA-d<sub>31</sub> ne semble pas être déprotoné dans le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> à pH 7.4 (figure 22B et F), il semblerait donc que la faible miscibilité des composantes du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> favorise la déprotonation d'une certaine quantité du PA-d<sub>31</sub> dans ce mélange à pH 7.4. Ceci pourrait être dû à la formation de domaines par les molécules de PA-d<sub>31</sub> au sein de la dispersion de céramide 3 tel que proposé précédemment, qui serait favorable à la déprotonation du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> (43,111,148,149). D'ailleurs, ceci est en accord avec la valeur du pK<sub>a</sub> interfacial des groupements carboxyles des acides gras qui a été évaluée à environ 7.7 lorsque les molécules d'acides gras sont incorporées dans des bicouches neutres (142, 144). De plus, puisqu'il a été rapporté qu'il y a possibilité de liaison hydrogène entre les formes ionisées et non ionisées des acides gras (43,144,146,149), il est donc concevable qu'à pH 7.4 l'augmentation des interactions intermoléculaires entre les molécules de PA-d<sub>31</sub> déprotonées et non déprotonées qui sont regroupées au sein d'une même région puisse être accompagnée par un ressèment au niveau de leurs chaînes acyles qui mènerait à une augmentation de leur T<sub>m</sub>.

Enfin, la comparaison des résultats obtenus dans la région des modes de vibration amide I et amide II du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> avec ceux rapportés antérieurement pour la dispersion de

céramide 3 (figures 18 et 23), semble indiquer que le PA-d<sub>31</sub> affecte peu le réseau de liaisons hydrogène qui est formé au niveau du groupement amide du céramide 3. Toutefois, l'augmentation de  $\bar{\nu}$ COOH observée lors de la transition de phase du PA-d<sub>31</sub> (figure 23D), suggère qu'il y a affaiblissement des liaisons hydrogène intermoléculaires et/ou déshydratation des groupements carboxyles des molécules de PA-d<sub>31</sub> de ce mélange lors du chauffage. De plus, l'augmentation du  $\bar{\nu}$ amide I et la diminution du  $\bar{\nu}$ amide II du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> observée lors du chauffage (figure 23E et F) peuvent être dues à une réorganisation des liaisons hydrogène impliquant les portions C=O et N-H des groupements amide des molécules de céramide 3. En fait, tous ces changements observés lors du chauffage du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> peuvent être expliqués par l'augmentation de l'agitation thermique des molécules du mélange ainsi que par le passage des lipides du mélange vers une phase plus désordonnée où le réseau de liaisons hydrogène s'affaiblirait aux interfaces du céramide 3 et du PA-d<sub>31</sub>.

En résumé, cette étude semble montrer que le PA-d<sub>31</sub> influence différemment le thermotropisme et l'organisation des dispersions de sphingomyéline et de céramide 3, et que ses effets dépendent principalement de sa miscibilité dans ces dispersions lipidiques. En particulier, la formation d'un mélange homogène avec la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> en phases gel et liquide cristalline semble indiquer une grande miscibilité pour les constituants de ce mélange. En fait, la tête polaire volumineuse de la sphingomyéline semble favoriser l'incorporation des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans la dispersion de sphingomyéline. Cette incorporation du PA-d<sub>31</sub> dans la bicouche de sphingomyéline conduirait au ressèchement des chaînes acyles de la sphingomyéline et déplacerait sa T<sub>m</sub> vers les hautes températures. Toutefois, la présence du PA-d<sub>31</sub> ne semble pas altérer significativement le réseau de liaisons hydrogène formé aux interfaces et têtes polaires des molécules de sphingomyéline. De plus, le changement du pH 5.2 au pH 7.4 n'influence pas le thermotropisme des constituants de ce mélange.

Par contre, les molécules de PA-d<sub>31</sub> et de céramide 3 semblent peu miscibles sur tout le domaine thermique examiné.

Ceci semble découler de la plus petite tête polaire du céramide 3 comparativement à celle de la sphingomyéline qui permettrait un empilement plus serré des chaînes acyles et des têtes polaires des molécules de céramides 3 et qui nuirait à la formation d'un mélange homogène contenant le céramide 3 et le PA-d<sub>31</sub>. En fait, il appert que les molécules de PA-d<sub>31</sub> qui sont incorporées dans la dispersion de céramide 3 pourraient être regroupées sous forme de domaines à cause de leur faible miscibilité avec les molécules de céramide 3. Cette incorporation du PA-d<sub>31</sub> semble également rendre l'empilement des chaînes acyles de la dispersion de céramide 3 moins serré en phase gel, et résulter à un abaissement de sa T<sub>m</sub>. Toutefois, la présence du PA-d<sub>31</sub> ne semble pas altérer significativement le réseau de liaisons hydrogène formé au niveau de l'interface et de la tête polaire du céramide 3. De plus, le thermotropisme du céramide 3 ne semble pas être modifié par un changement du pH 5.2 au pH 7.4 en présence du PA-d<sub>31</sub>, tandis qu'une déprotonation partielle du PA-d<sub>31</sub> et une augmentation de sa T<sub>m</sub> semblent être favorisées en présence du céramide 3 à pH 7.4.

## CHAPITRE 5. ÉTUDE DE L'INTERACTION DU CHOLESTÉROL ET DU SULFATE DE CHOLESTÉROL AVEC LA SPHINGOMYÉLINE ET LE CÉRAMIDE 3

Les travaux présentés dans ce chapitre visent à étudier les effets que le cholestérol et le sulfate de cholestérol exercent sur le thermotropisme et l'organisation des dispersions de sphingomyéline et de céramide 3.

### 5.1 Résultats

#### 5.1.1 Région du mode d'élongation symétrique C-H

Les courbes de la figure 24 illustrent le thermotropisme des dispersions de SPM/Chol (2:1 mole), SPM/S.Chol (2:1 mole), CER3/Chol (2:1 mole) et de CER3/S.Chol (2:1 mole) aux pH 5.2 et 7.4. On peut noter que l'ajout de 33% mole de cholestérol ou de sulfate de cholestérol augmente le  $\bar{\nu}_s\text{CH}_2$  et la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H de la sphingomyéline sous sa  $T_m$  et les diminue au-dessus de sa  $T_m$  (figure 24A et B). Ces résultats suggèrent que la présence de ces stérols induit l'abolition de la transition de phase de la sphingomyéline. Par contre, dans le cas des mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol, la région de l'élongation symétrique C-H indique une transition de phase qui semble se produire à une  $T_m$  inférieure à celle de la dispersion de céramide 3 (annexe I). De plus, on peut noter également que les valeurs du  $\bar{\nu}_s\text{CH}_2$  de ces mélanges (figure 24C) sont voisines de celle du céramide 3 anhydre (annexe II) et inférieures à celles du céramide 3 hydratée (figure 14A) jusqu'à environ 50 °C.

#### 5.1.2 Région du mode de déformation des $\text{CH}_2$

Les bandes de déformation des  $\text{CH}_2$  des mélanges SPM/Chol et SPM/S.Chol sont constituées d'une composante située vers 1467  $\text{cm}^{-1}$  et la variation de sa position entre 0 et 75 °C aux pH 5.2 et 7.4, est illustrée à la figure 25A. Par contre, les bandes de déformation des  $\text{CH}_2$  des mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol comportent deux composantes situées à 1470.6 et 1464.9  $\text{cm}^{-1}$  pour le mélange CER3/Chol ainsi qu'à 1470.6 et 1465.8  $\text{cm}^{-1}$  pour le mélange CER3/S.Chol à 0 °C (figure 25B). Ces composantes se fusionnent en une seule composante située à 1467.7  $\text{cm}^{-1}$  à partir de 35 °C. On peut remarquer aussi que les composantes de la bande de déformation des  $\text{CH}_2$  des mélanges CER3/Chol et

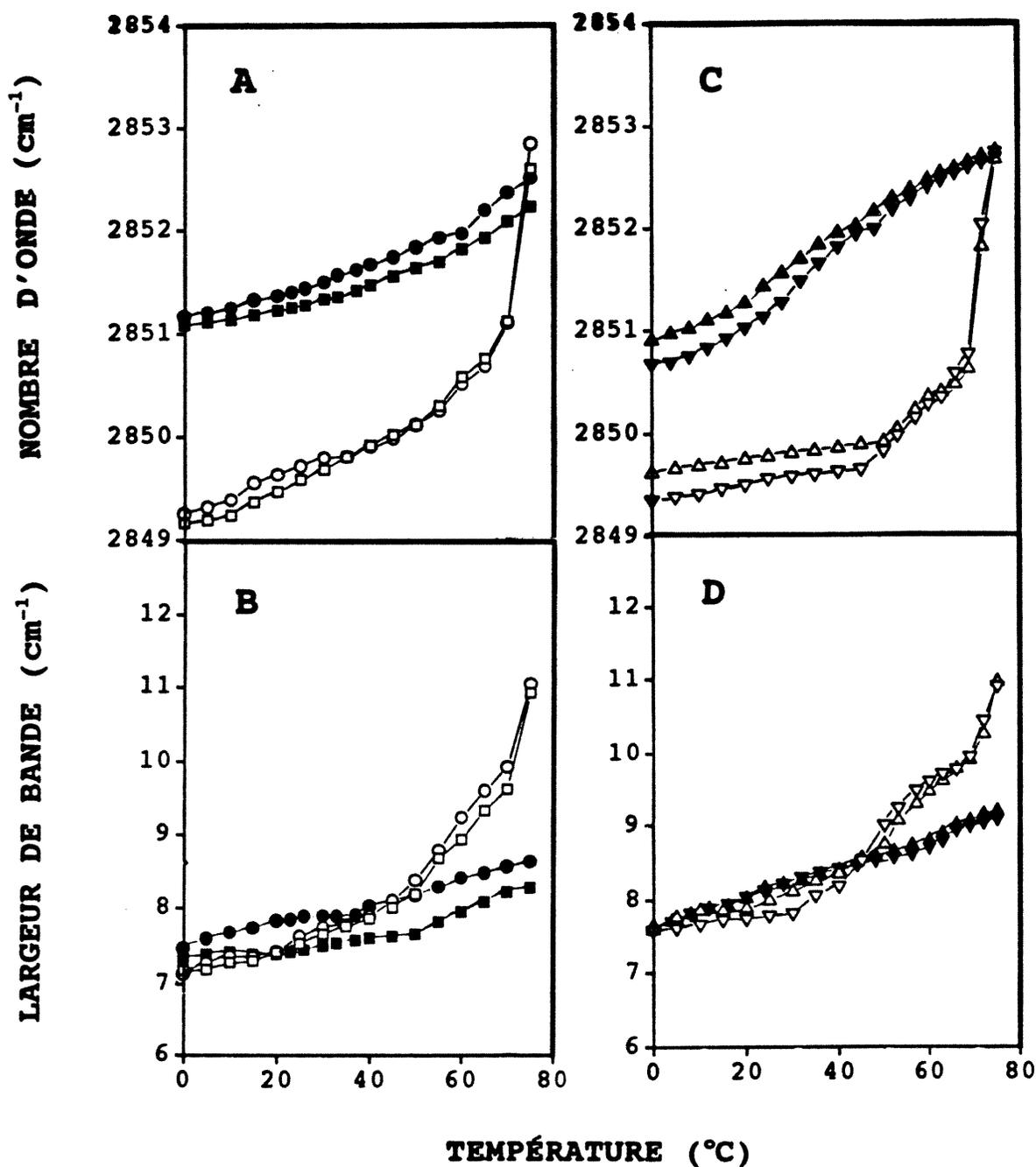


Figure 24: Effet de la température sur: A) la position et B) la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H des dispersions de SPM/Chol à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■) et de CER3/Chol à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□), et sur: C) la position et D) la largeur de la bande d'élongation symétrique C-H des dispersions de SPM/S.Chol à pH 5.2 (▲) et pH 7.4 (▼) et de CER3/S.Chol à pH 5.2 (△) et pH 7.4 (▽).

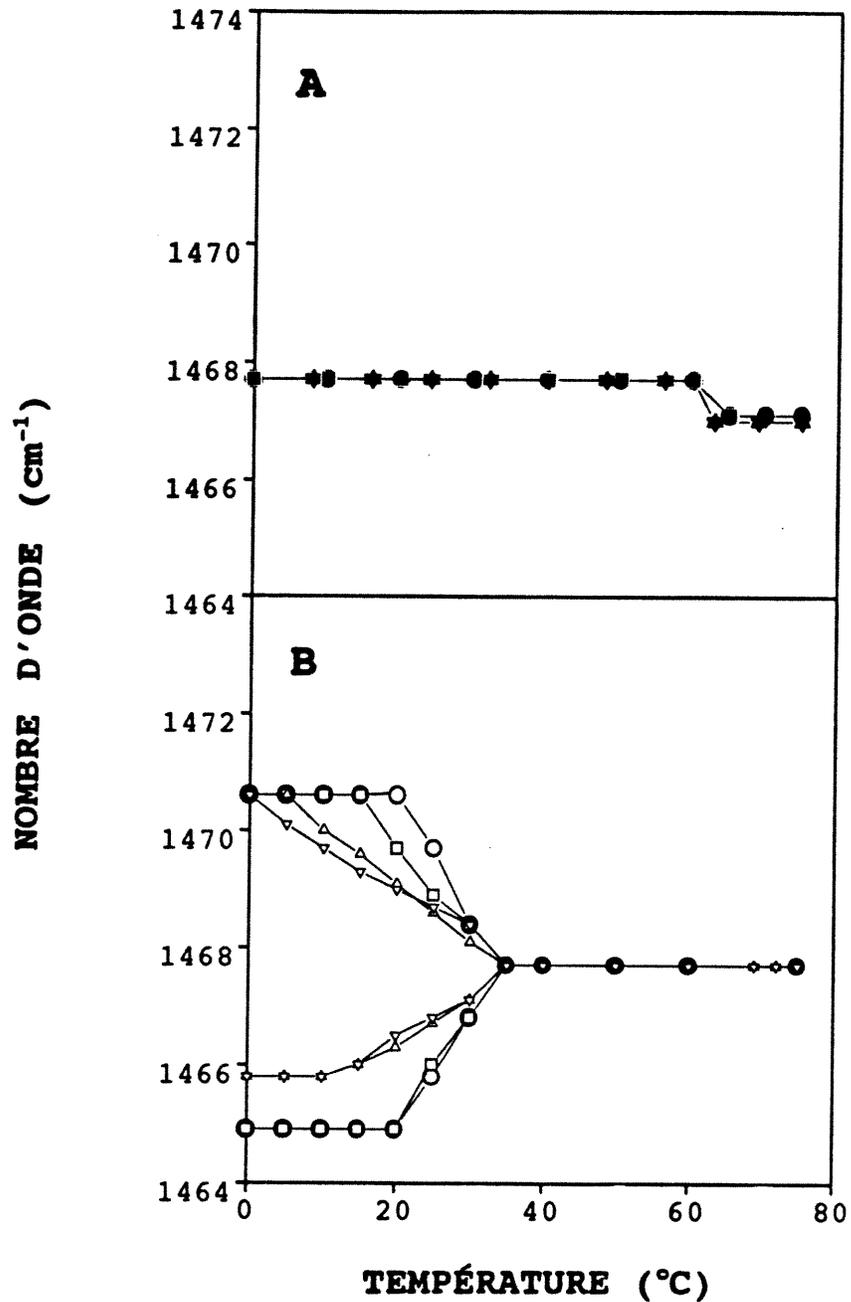


Figure 25: Effet de la température sur la position de la composante de la bande de déformation des CH<sub>2</sub> de la dispersion de: A) SPM/Chol à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■) et SPM/S.Chol à pH 5.2 (▲) et pH 7.4 (▼); B) CER3/Chol à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□) et CER3/S.Chol à pH 5.2 (△) et pH 7.4 (▽).

CER3/S.Chol se combinent à une température supérieure de 10 °C à celle de la dispersion de céramide 3 (figure 16B), et qu'à 0 °C l'amplitude de la séparation des deux composantes augmente de 1.8 et 0.9  $\text{cm}^{-1}$  en présence de cholestérol et de sulfate de cholestérol.

### 5.1.3 Région des modes de vibration du groupement amide

Les spectres de la région des modes de vibration amide I et amide II des dispersions de SPM/Chol, SPM/S.Chol, CER3/Chol et CER3/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4, sont illustrés aux figures 26 et 27. Les spectres mesurés à 0 et 75 °C montrent deux bandes situées vers 1640 et 1557  $\text{cm}^{-1}$  pour le mélange SPM/Chol et vers 1644 et 1557  $\text{cm}^{-1}$  pour le mélange SPM/S.Chol à 0 et 75 °C, assignées respectivement aux vibrations amide I et amide II de la sphingomyéline. Par contre, pour les mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol mesurés à 0 °C, les spectres comportent deux bandes vers 1644 et 1620  $\text{cm}^{-1}$  dans la région amide I et une bande amide II à environ 1553  $\text{cm}^{-1}$ .

Les variations de la position des bandes amide I et amide II des mélanges SPM/Chol, SPM/S.Chol, CER3/Chol et CER3/S.Chol en fonction de la température, sont présentées à la figure 28. Les valeurs du nombre d'onde de la bande amide I des mélanges SPM/Chol et SPM/S.Chol augmentent de 0 à 75 °C (figure 28A). Les valeurs du nombre d'onde de cette bande sont inférieures à celles de la bande amide I de la sphingomyéline (figure 18) jusqu'à environ 30 °C, tandis qu'elles leurs sont supérieures au-dessus de la  $T_m$ . Par contre, les  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  des mélanges SPM/Chol et SPM/S.Chol diminuent de 0 à 75 °C (figure 28B), où ils atteignent des valeurs respectivement équivalentes et supérieures à celles de la sphingomyéline au-dessus de sa  $T_m$ . D'autre part, le nombre d'onde de la bande amide I située vers 1644  $\text{cm}^{-1}$  augmente brusquement à partir de 65 °C pour le mélange CER3/Chol et à partir de 50 °C pour le mélange CER3/S.Chol (figure 28C). De plus, on peut noter également que la présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol diminue le nombre d'onde de la bande amide I du céramide 3 dans la phase ordonnée. Par contre, les valeurs de  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  des mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol diminuent au-dessus de 60 °C (figure 28D), mais les valeurs de  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  du mélange CER3/Chol

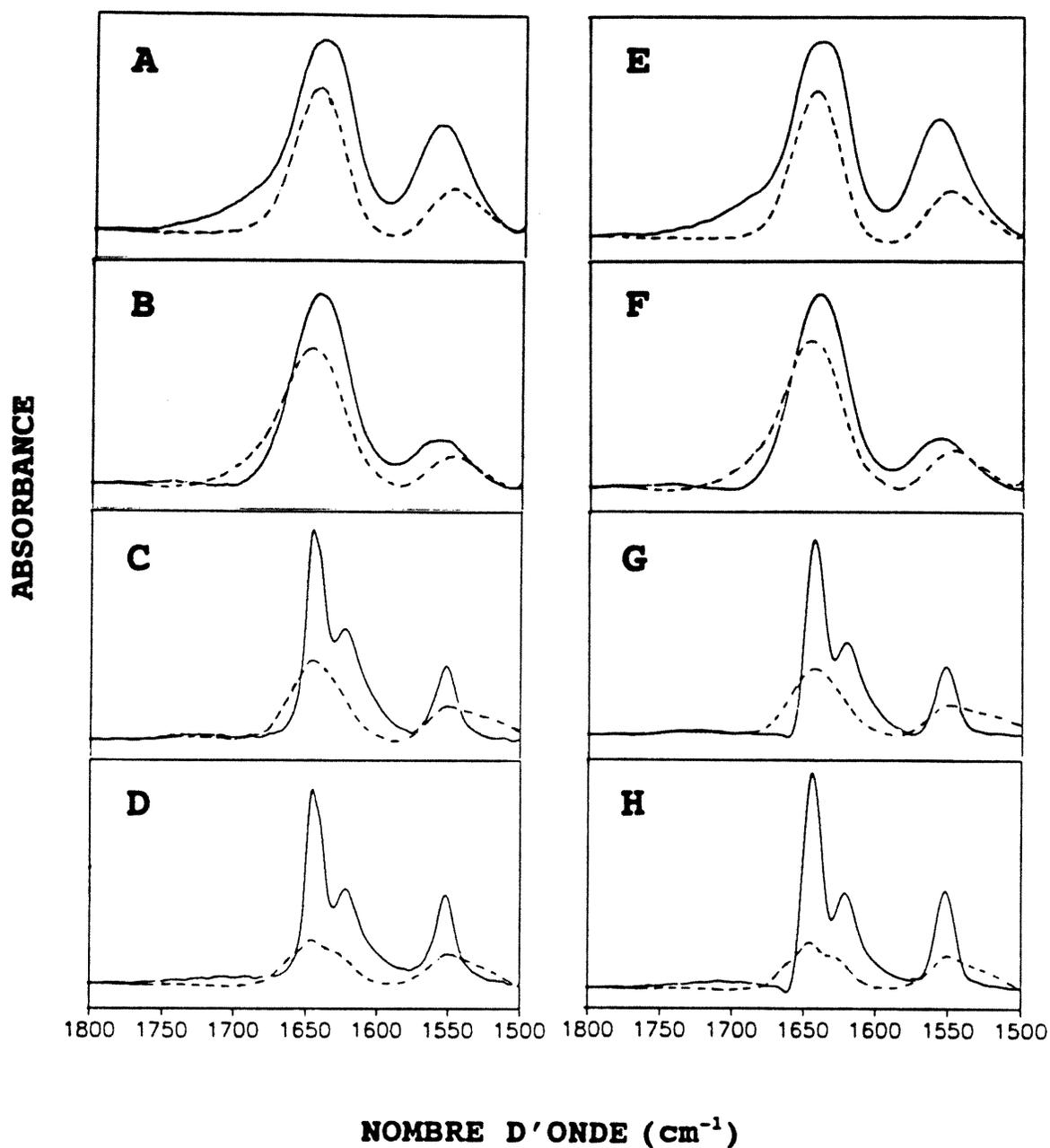


Figure 26: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration amide I et amide II de la dispersion de: A) SPM/Chol à pH 5.2; B) SPM/Chol à pH 7.4; C) CER3/Chol à pH 5.2; D) CER3/Chol à pH 7.4, mesurés à 0 °C (-) et 75 °C (--). Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) SPM/Chol à pH 5.2; F) SPM/Chol à pH 7.4; G) CER3/Chol à pH 5.2; H) CER3/Chol à pH 7.4.

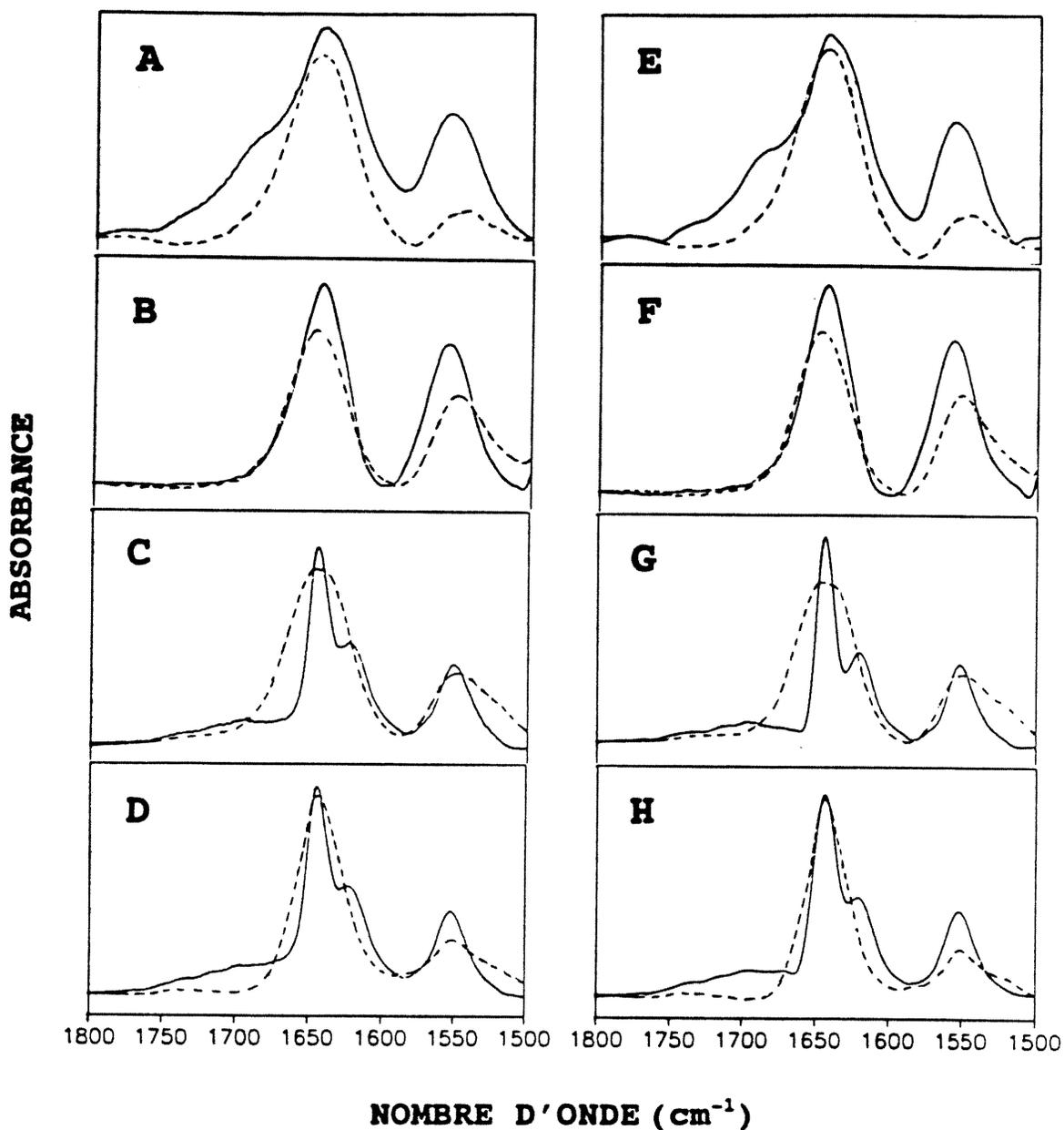


Figure 27: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration amide I et amide II de la dispersion de: A) SPM/S.Chol à pH 5.2; B) SPM/S.Chol à pH 7.4; C) CER3/S.Chol à pH 5.2; D) CER3/S.Chol à pH 7.4, mesurés à 0 °C (-) et 75 °C (--). Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) SPM/S.Chol à pH 5.2; F) SPM/S.Chol à pH 7.4; G) CER3/S.Chol à pH 5.2; H) CER3/S.Chol à pH 7.4.

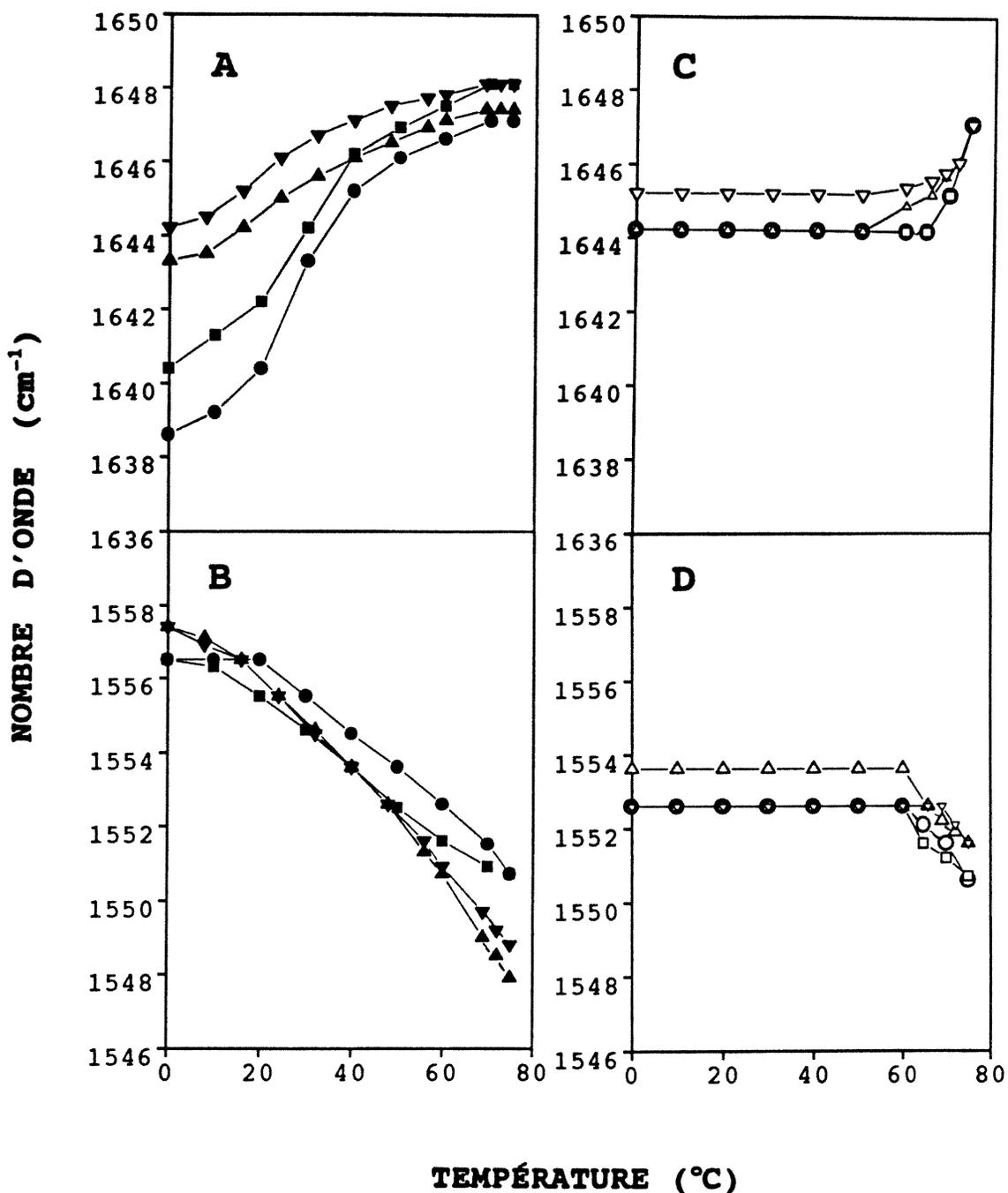


Figure 28: Effet de la température sur la position de: A) la bande amide I et B) la position de la bande amide II des dispersions de SPM/Chol à pH 5.2 (o) et pH 7.4 (■) et de SPM/S.Chol à pH 5.2 (▲) et pH 7.4 (▼); C) la bande amide I et D) la bande amide II des dispersions de CER3/Chol à pH 5.2 (o) et pH 7.4 (□) et de CER3/S.Chol à pH 5.2 (Δ) et pH 7.4 (▼).

demeurent inférieures à celles du mélange CER3/S.Chol à ces températures.

#### 5.1.4 Région des modes d'élongation du groupement phosphate

La présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol induit des diminutions significatives du  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  de la sphingomyéline à basse température (annexe III). Toutefois, la chute du  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  du mélange SPM/Chol à 0 °C par rapport au  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  de la sphingomyéline est plus prononcée que celle du mélange SPM/S.Chol. De plus, le  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  obtenu pour le mélange SPM/Chol augmente de 2.9  $\text{cm}^{-1}$  tandis que celui du mélange SPM/S.Chol diminue d'environ 1  $\text{cm}^{-1}$  sur l'intervalle 0-75 °C.

## 5.2 Discussion

Les résultats de la région du mode d'élongation symétrique C-H ont indiqué que l'ajout de 33% mole de cholestérol ou de sulfate de cholestérol provoque l'abolition de la transition de phase gel-liquide cristalline de la sphingomyéline aux pH 5.2 et 7.4 (figure 24). Ceci suggère donc qu'il y a incorporation de ces stérols dans la dispersion de sphingomyéline à ces deux pH et que leur présence pourrait être accompagnée par une augmentation du nombre de conformères gauches dans les chaînes acyles de la sphingomyéline sous sa  $T_m$  et de leur diminution au-dessus de cette température (58). Cet effet ambivalent de ces stérols est en accord avec les résultats d'un ensemble d'études de spectroscopie RMN, FTIR, Raman, diffraction des rayons X et de calorimétrie qui ont révélé que l'incorporation de cholestérol (25-60% mole) dans des dispersions constituées de sphingomyéline ainsi que de divers autres phospholipides dont la DPPC et la POPC entraîne l'abolition de leur transition de phase gel-liquide cristalline (39,57,58,60,64,66,68,70,74,75,83,85-87,121,125). Plus particulièrement, il a été observé par Kitson et coll. (63) lors de travaux de calorimétrie, que la présence de cholestérol ou du sulfate de cholestérol en haute concentration (50% mole) abolirait la transition de phase gel-liquide cristalline de la sphingomyéline. De plus, il a été précisé que cet effet de ces stérols pourrait être dû à leur corps hydrophobe composé de plusieurs noyaux condensés et rigides qui amènerait une diminution de l'ordre dans les chaînes acyles des

phospholipides en phase gel en altérant leurs interactions intermoléculaires, tandis qu'il augmenterait l'ordre dans les chaînes acyles des phospholipides en phase liquide-cristalline en formant des liaisons de van der Waals avec les chaînes acyles adjacentes (1,42,45,67,68,121). D'autre part, il a été également rapporté que l'abolition de la transition de phase induite suite à l'incorporation du cholestérol dans les bicouches de phospholipides, serait accompagnée par la formation d'une nouvelle phase liquide-ordonnée nommée la phase  $l_0$  (56,57,60,61,66,67,88,89). Or, étant donné que nous avons aussi observé une abolition de la transition de phase pour les mélanges SPM/Chol et SPM/S.Chol, il est donc probable qu'il y ait formation d'une telle phase  $l_0$  dans ces dispersions. Ceci est supporté par des travaux de RMN et de calorimétrie qui ont indiqué qu'il y a formation d'une phase fluide intermédiaire au sein de la bicouche de sphingomyéline de cerveau de bovin en présence de 50% mole de cholestérol entre 20 et 60 °C (74,121). Toutefois, l'ajout du cholestérol ou du sulfate de cholestérol dans la dispersion de sphingomyéline ne semble pas changer la symétrie de l'empilement de ses chaînes acyles puisque celle-ci est demeurée hexagonale même en présence de ces stérols sur tout le domaine thermique examiné (figure 25A) (58,100).

La présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol dans la dispersion de sphingomyéline semble également altérer le réseau de liaisons hydrogène formé à l'interface de la sphingomyéline. En effet, puisque nous avons observé une diminution des valeurs de  $\bar{\nu}$ amide I et une augmentation des valeurs de  $\bar{\nu}$ amide II des mélanges SPM/Chol et SPM/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 par rapport à ceux de la sphingomyéline à basse température (figures 18 et 28), il semble que l'incorporation de ces stérols puisse être accompagnée par un renforcement des liaisons hydrogène impliquant les portions C=O et N-H du groupement amide de la sphingomyéline (81,102,133-135). Ceci peut être dû d'une part à une augmentation de l'hydratation du groupement amide de la sphingomyéline et d'autre part à un renforcement des interactions intermoléculaires entre les molécules de sphingomyéline causé par une condensation de la bicouche de sphingomyéline due à la présence de ces stérols

(152). Toutefois, la chute du  $\bar{v}_{\text{amide I}}$  mesurée à 0 °C par rapport au  $\bar{v}_{\text{amide I}}$  de la sphingomyéline étant moins prononcée pour le mélange SPM/S.Chol que pour le mélange SPM/Chol, il semblerait que la présence du cholestérol affecte plus l'interface de la sphingomyéline à basse température que ne le fait la présence du sulfate de cholestérol. Cet effet particulier au cholestérol pourrait être dû à la formation de liaisons hydrogène entre la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline et le groupement 3 $\beta$ -OH du cholestérol tel qu'il a été proposé par Brockerhoff (44) et par Sankaram et coll. (77) qui ne pourrait avoir lieu avec le groupement SO<sub>4</sub><sup>-</sup> du sulfate de cholestérol. D'autre part, l'affaiblissement des liaisons hydrogène au niveau des portions C=O et N-H de la sphingomyéline que nous avons observé pour les mélanges SPM/Chol et SPM/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 lors du chauffage, pourrait être dû à l'agitation thermique.

Par ailleurs, puisque nous avons observé un abaissement significatif de  $\bar{v}_{\text{asPO}_2^-}$  des mélanges SPM/Chol et SPM/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 par rapport à ceux de la sphingomyéline à 0 °C, ceci suggère que le cholestérol et le sulfate de cholestérol induisent également un renforcement des liaisons hydrogène au niveau du groupement phosphate de la sphingomyéline à basse température. Cet effet de ces stérols sur la tête polaire de la sphingomyéline peut être associé à une augmentation de son hydratation (81,137). Toutefois, cette diminution de  $\bar{v}_{\text{asPO}_2^-}$  étant plus marquée pour le mélange SPM/Chol que pour le mélange SPM/S.Chol, il semblerait que la présence du cholestérol modifie plus le réseau de liaisons hydrogène au niveau de la tête polaire de la sphingomyéline que ne le fait le sulfate de cholestérol à basse température. Ceci pourrait être dû à la formation de liaisons hydrogène entre le groupement phosphate de la sphingomyéline et le groupement 3 $\beta$ -OH du cholestérol tel qu'il a été proposé pour d'autres phospholipides dont la DPPC (59,66). Toutefois, il est aussi possible que l'interaction du cholestérol avec la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline puisse mener à un changement conformationnel au niveau de la tête polaire de la sphingomyéline qui serait très favorable à l'hydratation du groupement phosphate. Par contre, l'augmentation de  $\bar{v}_{\text{asPO}_2^-}$  se produisant entre 0 et 75 °C pour le

mélange SPM/Chol, suggère que la présence du cholestérol induit plutôt une diminution des liaisons hydrogène au niveau du groupement phosphate de la sphingomyéline lors du chauffage. Ceci pourrait être dû d'une part à un bris des liaisons hydrogène formées entre le cholestérol et certains des groupements phosphates de la dispersion de sphingomyéline causé par l'agitation thermique ou d'autre part au bris des interactions existant entre le cholestérol et la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline qui mènerait à un changement conformationnel au niveau de son groupement phosphate diminuant ainsi son accessibilité à l'eau. Par contre, étant donné que nous avons observé un abaissement du  $\bar{v}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  pour le mélange SPM/S.Chol entre 0 et 75 °C, il semblerait que l'hydratation du groupement phosphate de la sphingomyéline soit peu affectée par la présence du sulfate de cholestérol lors du chauffage.

Dans le cas des mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4, la diminution du nombre d'onde de la bande d'élongation symétrique C-H observée par rapport à celui de la dispersion de céramide 3 (figures 14A et 24C), suggère que l'ajout de 33% mole de cholestérol ou de sulfate de cholestérol augmente l'ordre dans les chaînes acyles de la bicouche de céramide 3 aux températures inférieures à 50 °C. En fait, la proximité des valeurs de  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  des mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 et de celle du céramide 3 anhydre (annexe II), semble indiquer qu'il y a formation d'une phase plus ordonnée que la phase gel qui pourrait correspondre à une phase solide, au sein de ces mélanges à basse température. Ceci est supporté par la région de la déformation des  $\text{CH}_2$ . L'éclatement des composantes de la bande de déformation des  $\text{CH}_2$  des mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol étant supérieur à celui de la dispersion de céramide 3 à 0 °C (figures 16B et 25B), ceci suggère que la présence de cholestérol ou de sulfate de cholestérol augmente les interactions interchaînes dans la dispersion de céramide 3. De plus, l'augmentation de 10 °C de la température de passage de l'empilement orthorhombique à hexagonal observée pour les mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol par rapport à celle du céramide 3, suggère aussi la formation d'une phase très ordonnée à basse température. Ces résultats

semblent rejoindre ceux qui ont été obtenus lors d'une étude de diffraction des rayons X effectuée avec un mélange composé de céramide 2 de cerveau de bovin et de 27.2% mole de cholestérol, qui ont révélé que le céramide 2 et le cholestérol formeraient une structure hautement rigide *in vitro* (153). En fait, cette structure comprendrait une double bicouche constituée de deux sous-unités similaires et asymétriques où l'ordre dans les chaînes acyles du céramide 2 serait voisin de celui observé dans la phase solide aux environs de 50 °C.

Par contre, la présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol semble abaisser la  $T_m$  du céramide 3 (figures 14 et 24). Cet effet pourrait être attribuable à une diminution de la cohésion au niveau de l'interface du céramide 3. Ces observations semblent rejoindre les résultats obtenus lors d'une étude de calorimétrie, qui ont indiqué que l'augmentation du pourcentage en cholestérol dans la dispersion de céramide de cerveau de bovin serait accompagnée par une diminution de sa température de transition (127). De plus, l'analyse du thermotropisme du mélange de céramide 2 et de cholestérol a également révélé que ce mélange subit une transition de phase à environ 65 °C qui n'est pas accompagnée par une séparation de phase au sein des constituants de la bicouche (153).

Les effets du cholestérol et du sulfate de cholestérol semblent également se répercuter au niveau de l'interface du céramide 3. En effet, étant donné que nous avons observé une diminution du  $\bar{\nu}_{amide\ I}$  et une augmentation du  $\bar{\nu}_{amide\ II}$  des mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 par rapport à ceux observés pour la dispersion de céramide 3 à basse température (figures 18 et 28), il appert que l'ajout du cholestérol ou du sulfate de cholestérol amène des renforcements des liaisons hydrogène formées au niveau des portions C=O et N-H du groupement amide du céramide 3 en phase ordonnée (81,133-135). Ceci pourrait être dû d'une part à une augmentation de l'hydratation des groupements amide des molécules de céramide 3 due à la présence de ces stérols ou d'autre part à la condensation de la bicouche tel que l'ont indiqué les résultats discutés précédemment (102,152). Toutefois, puisque le renforcement des liaisons hydrogène au

niveau de la portion C=O du groupement amide du céramide 3 est plus marqué en présence du cholestérol que du sulfate de cholestérol, il est possible que cet effet particulier au cholestérol soit dû à l'interaction de son groupement  $3\beta$ -OH avec la portion C=O du groupement amide du céramide 3 (44, 77). Enfin, l'affaiblissement des liaisons hydrogène que nous avons observé pour les mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 lors de leur transition de phase, semble indiquer qu'il y a bris des interactions intermoléculaires impliquant les groupements amide des molécules de céramide 3 en présence de ces stérols lors du chauffage.

L'une des conclusions qui ressort de ce chapitre est que que l'incorporation de 33% mole de cholestérol ou de sulfate de cholestérol dans la bicouche de sphingomyéline abolit la transition de phase de ce sphingolipide en y induisant la formation d'une phase lo sur tout le domaine thermique examiné. Cet effet de ces stérols découlerait d'une augmentation du désordre dans les chaînes acyles des molécules de sphingomyéline à basse température et de sa diminution à haute température. De plus, la possibilité d'interaction de la portion C=O du groupement amide et du groupement phosphate de la sphingomyéline avec le groupement  $3\beta$ -OH du cholestérol semble être accompagnée par un renforcement plus prononcé des liaisons hydrogène au niveau des groupements amide et phosphate de la sphingomyéline que celui qui se manifeste en présence du sulfate de cholestérol à basse température. Par contre, l'incorporation de 33% mole de cholestérol ou de sulfate de cholestérol dans la bicouche de céramide 3 semble mener à la formation d'une phase très ordonnée au sein de cette dispersion aux températures inférieures à 50 °C. En fait, l'existence de cette phase très ordonnée pour les mélanges CER3/Chol et CER3/S.Chol est suggérée par l'augmentation de l'ordre dans les chaînes acyles des molécules de céramide 3 ainsi que par le renforcement des liaisons hydrogène au niveau de leur interface qui sont observés à basse température. Toutefois, la transition des lipides de ces mélanges vers une phase plus désordonnée semble perceptible aux environs de 60 °C, tant à partir des bandes d'élongation C-H sondant la zone hydrophobe que des bandes amide sondant l'interface des bicouches. Enfin,

l'ensemble des résultats ont indiqué que le thermotropisme des dispersions de sphingomyéline et de céramide 3 en présence de stérols n'est pas altéré suite à un changement du pH 5.2 au pH 7.4.

## CHAPITRE 6. ÉTUDE DE L'INTERACTION DU CHOLESTÉROL ET DU SULFATE DE CHOLESTÉROL AVEC LA SPHINGOMYÉLINE EN PRÉSENCE D'ACIDE PALMITIQUE PERDEUTÉRÉ

Dans ce chapitre, nous porterons notre intérêt sur les changements induits par la présence simultanée du cholestérol ou du sulfate de cholestérol avec l'acide palmitique perdeutééré sur le thermotropisme de la sphingomyéline, ainsi que sur l'influence de la variation du pH de 5.2 à 7.4 sur les interactions existant entre ces lipides.

### 6.1 Résultats

#### 6.1.1 Régions des modes des élongations symétriques C-H et C-D

Les courbes du thermotropisme des dispersions de SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol (1:1:1 mole) et de SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol (1:1:1 mole) aux pH 5.2 et 7.4 sont présentées à la figure 29. La figure 29A montre que les valeurs des  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  et  $\bar{v}_s\text{CD}_2$  du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol aux pH 5.2 et 7.4 augmentent progressivement entre 0 et 75 °C mais ne subissent pas de variation abrupte sur tout le domaine thermique examiné. Ceci semble indiquer qu'il y a abolition de la transition de phase de la sphingomyéline et du PA-d<sub>31</sub> en présence de cholestérol à ces deux pH. De plus, les valeurs des  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  observées pour le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 entre 0 et 75 °C (figure 29C) indiquent qu'il y a également abolition de la transition de phase de la sphingomyéline dans ce mélange. Toutefois, l'augmentation des valeurs de  $\bar{v}_s\text{CD}_2$  notée pour ce mélange entre 20 et 60 °C semble indiquer que le PA-d<sub>31</sub> subit une transition de phase à une T<sub>m</sub> de 44 °C en présence de sphingomyéline et de sulfate de cholestérol à pH 7.4. Par contre, dans le cas du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2, les augmentations respectives des  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  et  $\bar{v}_s\text{CD}_2$  de 1.2 et 3.5 cm<sup>-1</sup> qui se produisent 40 et 60 °C (figure 29C), indiquent que la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> de ce mélange subissent une transition de phase à une T<sub>m</sub> de 52 °C. Enfin, la variation de la largeur des bandes des élongations C-H et C-D des mélanges SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol et SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 est semblable à celle de leurs nombres d'onde (figure 29B et D).

#### 6.1.2 Région du mode de déformation des CH<sub>2</sub>

Les bandes de déformation des CH<sub>2</sub> des mélanges SPM/PA-

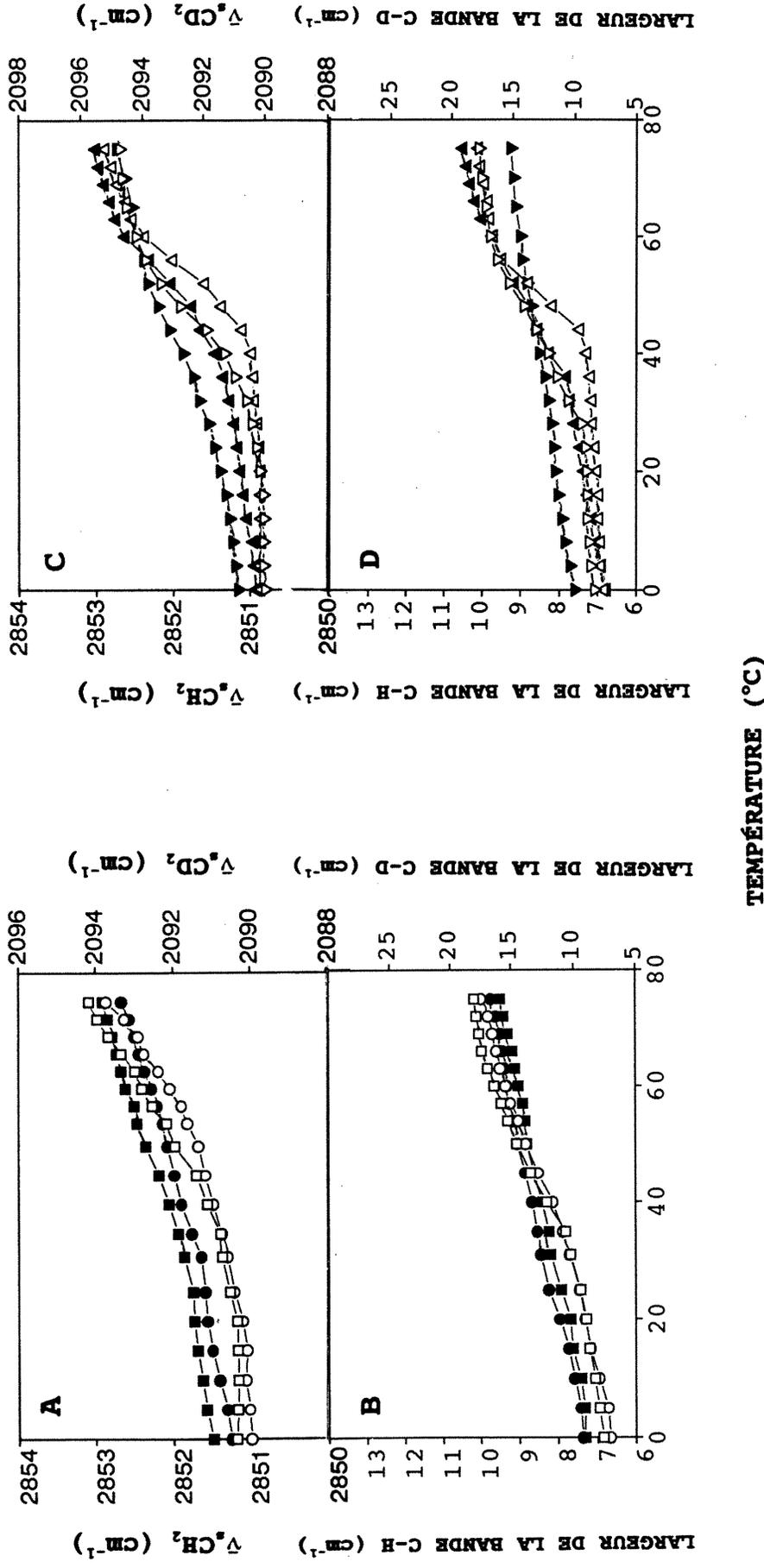


Figure 29: Effet de la température sur: A) la position et B) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■) et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□) du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol; C) la position et D) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 (▲) et pH 7.4 (▼) et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 (△) et pH 7.4 (▽) du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol.

$d_{31}$ /Chol et SPM/PA- $d_{31}$ /S.Chol sont constituées d'une seule composante située vers  $1468\text{ cm}^{-1}$  de 0 à  $75\text{ °C}$ , aux pH 5.2 et 7.4 (figure 30).

### 6.1.3 Région des modes de vibration des groupements carboxyle et amide

La figure 31 illustre la région des modes de vibration des groupements carboxyle et amide des dispersions de SPM/PA- $d_{31}$ /Chol et de SPM/PA- $d_{31}$ /S.Chol aux pH 5.2 et pH 7.4, à 0 et  $75\text{ °C}$ . Ces spectres montrent trois bandes à  $0\text{ °C}$  qui sont situées vers  $1708$ ,  $1630$  et  $1554\text{--}1558\text{ cm}^{-1}$  pour le mélange SPM/PA- $d_{31}$ /Chol et vers  $1708$ ,  $1640$  et  $1555\text{ cm}^{-1}$  pour le mélange SPM/PA- $d_{31}$ /S.Chol, et qui sont assignées respectivement au mode d'élongation carboxyle et aux modes de vibration amide I et amide II. La bande d'élongation carboxyle du mélange SPM/PA- $d_{31}$ /S.Chol à pH 5.2 semble également comporter un épaulement vers  $1730\text{ cm}^{-1}$  à  $0\text{ °C}$  pouvant correspondre à une deuxième composante moins importante que celle située vers  $1708\text{ cm}^{-1}$ . De plus, on peut noter également qu'il se produit une légère diminution de l'intensité de la bande d'élongation carboxyle de ce mélange à  $0\text{ °C}$  lors du passage du pH 5.2 au pH 7.4 qui est accompagnée d'une augmentation de la largeur de la bande amide II d'environ  $8\text{ cm}^{-1}$  (figure 31 et annexe VII).

Les courbes de variation de la position des bandes d'élongation carboxyle, amide I et amide II des mélanges SPM/PA- $d_{31}$ /Chol et SPM/PA- $d_{31}$ /S.Chol mesurées aux pH 5.2 et 7.4 en fonction de la température, sont présentées à la figure 32. Le  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  de ces mélanges est supérieur d'environ  $5\text{ cm}^{-1}$  à celui du mélange SPM/PA- $d_{31}$  à  $0\text{ °C}$  et augmente progressivement à partir d'environ  $20\text{ °C}$  jusqu'à  $75\text{ °C}$  (figure 32A et D). Toutefois, on peut noter que les valeurs du  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  du mélange SPM/PA- $d_{31}$ /S.Chol à pH 7.4 sont supérieures à celles obtenues pour ce même mélange à 5.2 sur l'intervalle 0 à environ  $50\text{ °C}$ . D'autre part, le  $\bar{\nu}_{\text{amide I}}$  du mélange SPM/PA- $d_{31}$ /Chol aux pH 5.2 et 7.4 augmente d'environ  $13\text{ cm}^{-1}$  de 0 à  $75\text{ °C}$ , tandis que le  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  diminue d'environ  $9\text{ cm}^{-1}$  lors du chauffage (figure 32B et C). Toutefois, le nombre d'onde de la bande amide I de ce même mélange est inférieur à ceux des mélanges SPM/PA- $d_{31}$  et SPM/Chol à  $0\text{ °C}$  (figures 23 et 28). Par contre, le  $\bar{\nu}_{\text{amide I}}$  du

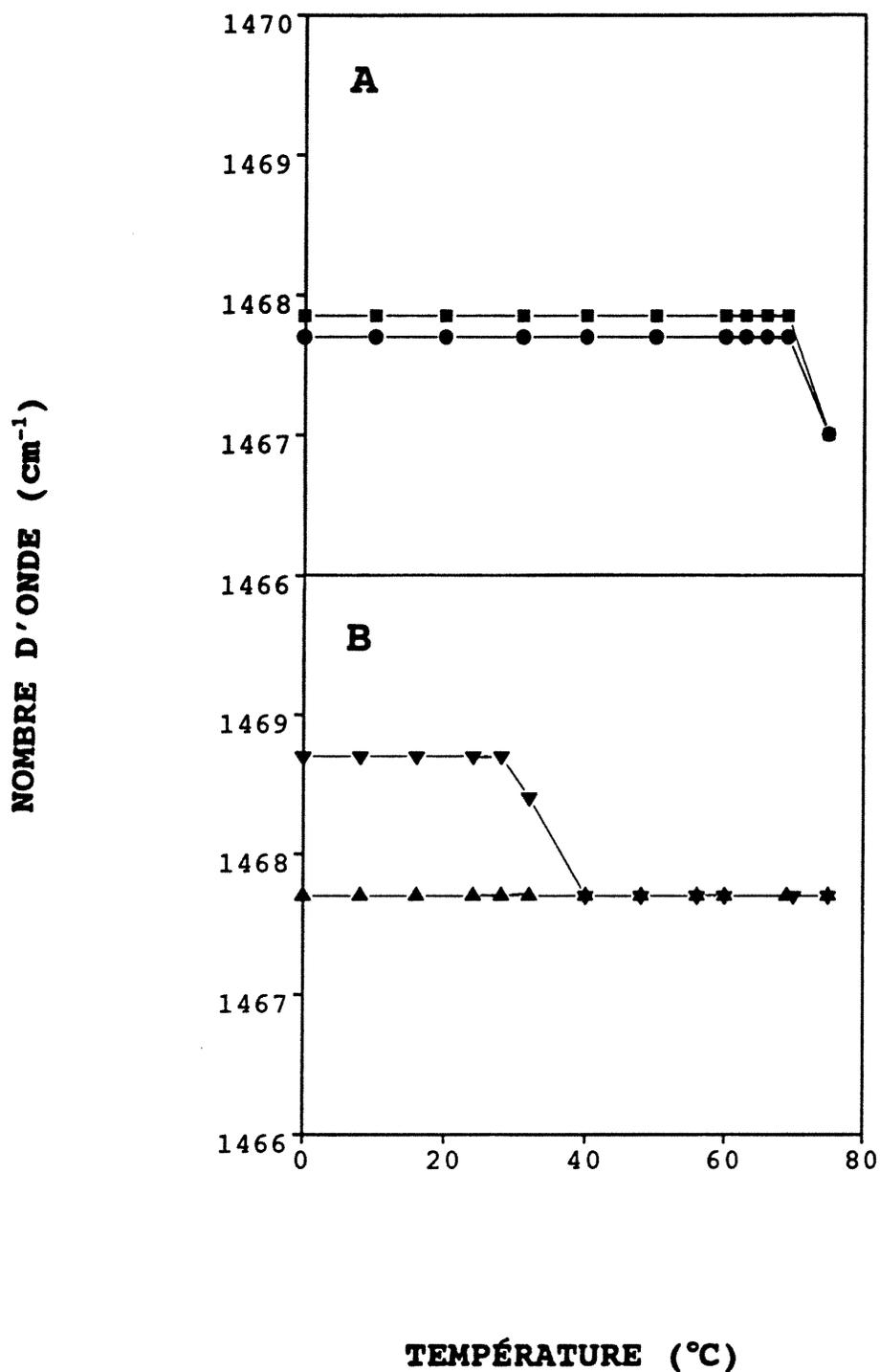


Figure 30: Effet de la température sur la position de la bande de déformation des CH<sub>2</sub> de la dispersion de:  
 A) SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (■);  
 B) SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 (▲) et pH 7.4 (▼).

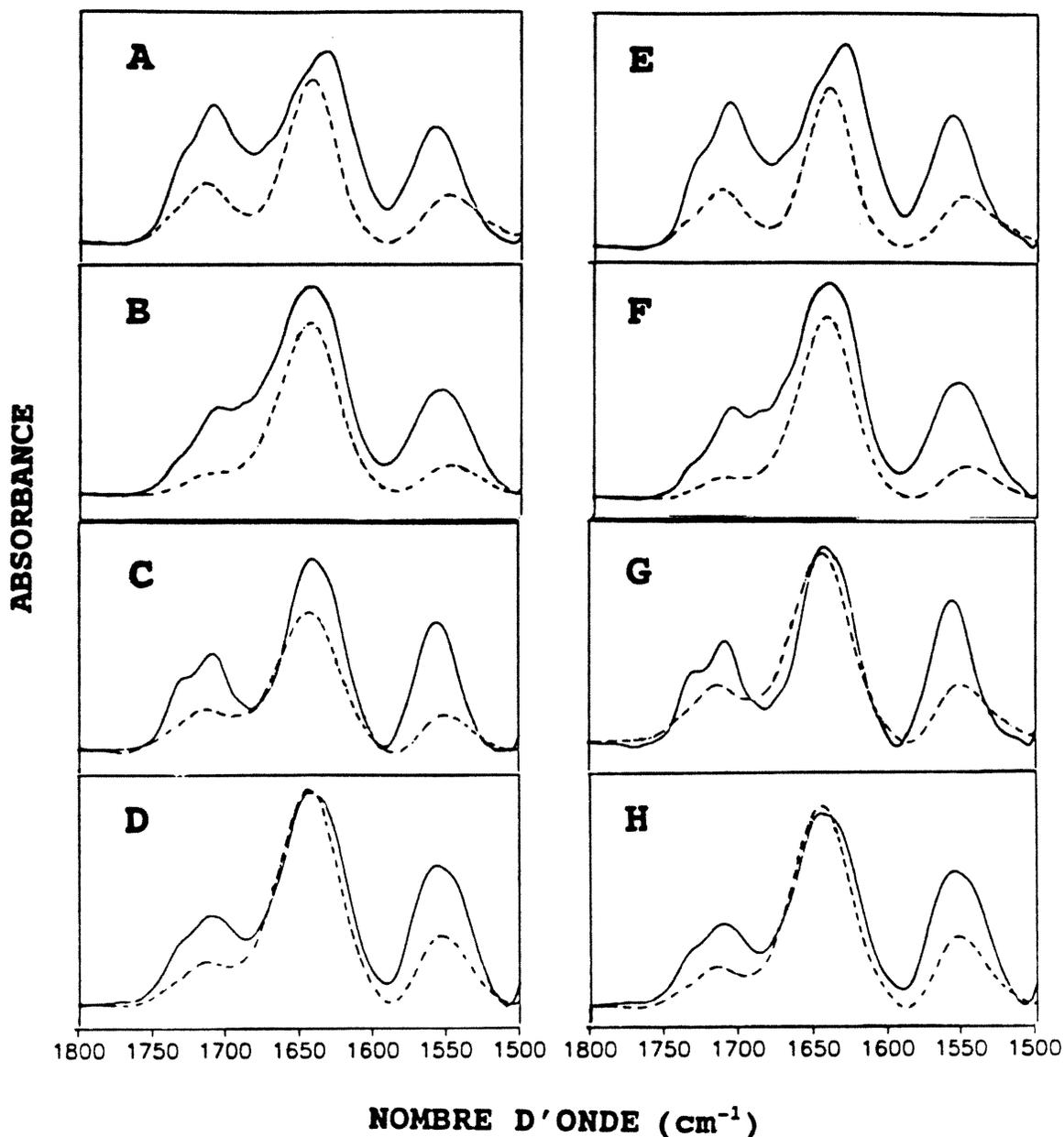


Figure 31: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration du groupement carboxyle, amide I et amide II de la dispersion de: A) SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2; B) SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 7.4; C) SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2; D) SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4, mesurés à 0 °C (-) et 75 °C (--). Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de : E) SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 ; F) SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 7.4; G) SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2; H) SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4.

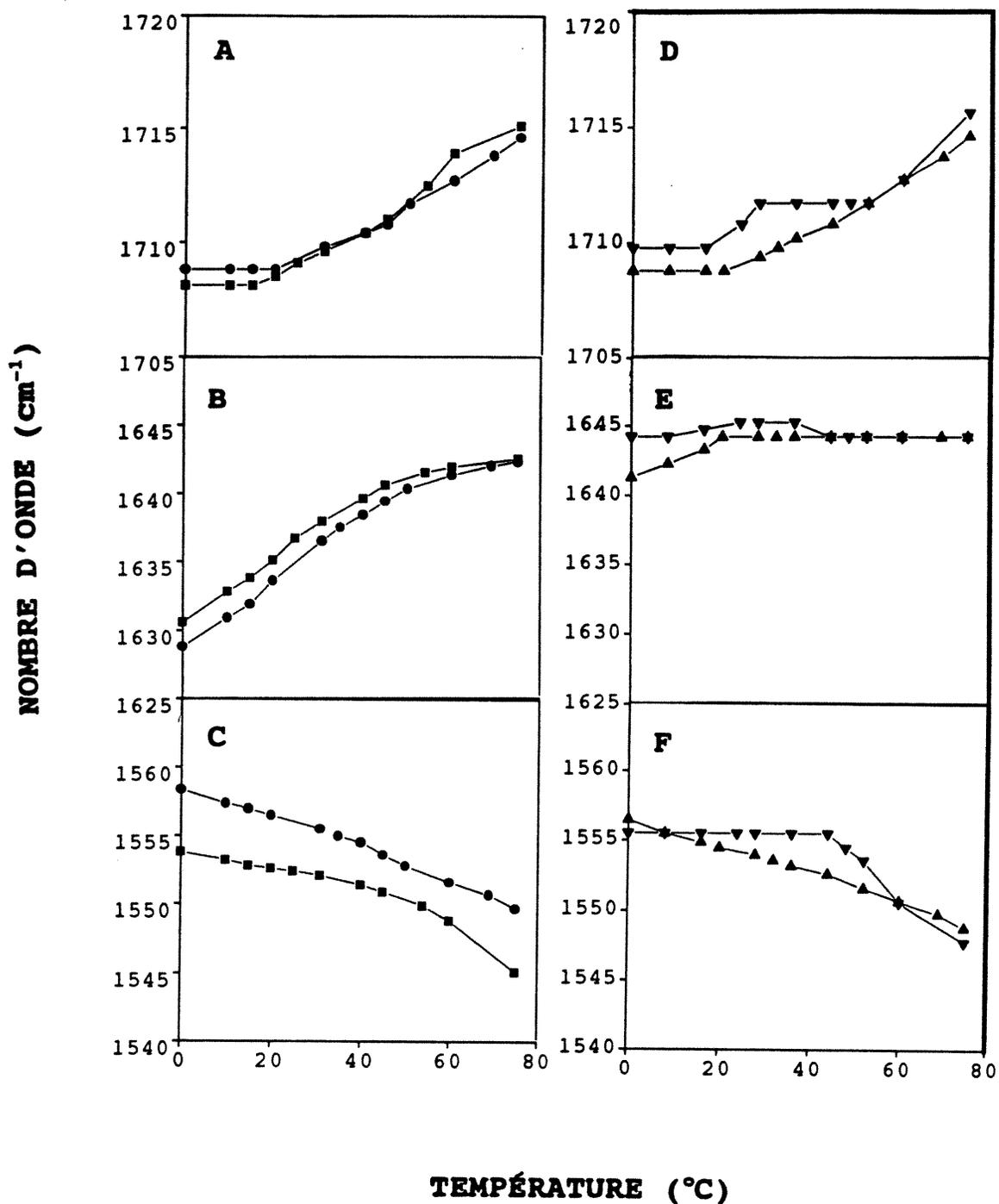


Figure 32: Effet de la température sur la position de la bande: A) de l'élongation du groupement carboxyle, B) amide I et C) amide II de la dispersion de SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■); D) de l'élongation du groupement carboxyle, E) amide I et F) amide II de la dispersion de SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 (▲) et pH 7.4 (▼).

mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 est supérieur à celui du mélange SMP/PA-d<sub>31</sub>/Chol à 0 °C et augmente jusqu'à environ 20 °C, tandis que le  $\bar{\nu}$ amide II diminue lors du chauffage (figure 32E et F). De plus, on peut noter que les valeurs du nombre d'onde de la bande amide I du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 sont supérieures à celles qui ont été obtenues pour ce même mélange à pH 5.2 de 0 à environ 40 °C.

#### 6.1.4 Région des modes d'élongation du groupement phosphate

L'ajout simultané du PA-d<sub>31</sub> et du cholestérol amène une chute de  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  à 0 °C par rapport au  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  de la sphingomyéline qui est plus importante que celles induites par leurs ajouts individuels ainsi que par l'ajout simultanée du PA-d<sub>31</sub> et du sulfate de cholestérol (annexe III). De plus, l'élévation de la température de 0 à 75 °C induit une diminution de  $\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$  d'environ 5 et 2 cm<sup>-1</sup> pour les mélanges SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol et SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol, respectivement.

## 6.2 Discussion

Les résultats des régions des élongations symétriques C-H et C-D ayant indiqué que la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> ne subissent pas de transition de phase en présence de 33% mole de cholestérol aux pH 5.2 et 7.4 (figure 29A et B), ceci suggère notamment que le cholestérol et le PA-d<sub>31</sub> sont incorporés dans la bicouche de sphingomyéline à ces deux pH et que ces trois lipides forment une phase homogène sur tout le domaine thermique examiné. En fait, cet effet du cholestérol pourrait résulter d'une diminution de l'ordre dans les chaînes acyles de la sphingomyéline et du PA-d<sub>31</sub> en-dessous de leurs T<sub>m</sub> et de son augmentation aux températures supérieures à leurs T<sub>m</sub>, tel qu'il a été suggéré antérieurement pour le mélange SPM/Chol ainsi que pour plusieurs autres mélanges de phospholipide et d'acides gras contenant des proportions variées de cholestérol (1,39,42,45,57,58,60,64,66-68,70,74,75,83,85,87,121,125). Cet effet ambivalent du cholestérol pourrait donc être accompagné par la formation d'une phase lo au sein des constituants de ces dispersions (56,57,60,61,66,67,88,89). D'ailleurs, ceci est aussi supporté par les résultats obtenus lors d'études de <sup>1</sup>H-RMN et de <sup>2</sup>H-RMN réalisées par Thewalt et coll. (154) et Kitson et coll. (136) qui ont indiqué qu'il y a formation d'une phase

lo au sein de la sphingomyéline et du PA-d<sub>31</sub> sur l'intervalle 20 à 75 °C lorsqu'ils forment un mélange équimolaire avec le cholestérol aux pH 5.2, 6.2 et 7.4. Par contre, puisque nous avons observé une transition de phase pour la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> dans le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 ainsi que pour le PA-d<sub>31</sub> dans ce même mélange à pH 7.4 (figure 29C et D), il semble que le sulfate de cholestérol serait moins efficace que le cholestérol à abolir la transition de phase et à induire une phase lo au sein des constituants de ce mélange. Ceci pourrait être dû à la différence existant entre la tête polaire du sulfate de cholestérol et celle du cholestérol. En effet, étant donné que le groupement 3β-OH du cholestérol est moins volumineux que le groupement SO<sub>4</sub><sup>-</sup> du sulfate de cholestérol et qu'il a été proposé que ce groupement 3β-OH pourrait être impliqué dans la formation de liaisons hydrogène avec la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline ainsi qu'avec le groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> (44,77,78), il est possible que l'influence exercée par la tête polaire du cholestérol sur ces lipides soit plus favorable à la formation de la phase lo que celle du sulfate de cholestérol. Toutefois, il est intéressant de noter que l'empilement des chaîne acyles des molécules de sphingomyéline demeure quand même hexagonal suite à l'ajout simultané du PA-d<sub>31</sub> et de chacun de ces stérols (58,100).

D'autre part, puisque nous avons observé que la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> contenus dans le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol ont une T<sub>m</sub> similaire de 52 °C à pH 5.2, la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> semblent former un mélange homogène en présence de sulfate de cholestérol au pH du stratum corneum. Toutefois, l'abolition de la transition de phase de la sphingomyéline ainsi que la diminution de la T<sub>m</sub> du PA-d<sub>31</sub> à 44 °C dans le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4, semble indiquer qu'il y aurait plutôt une distribution hétérogène de la sphingomyéline et du PA-d<sub>31</sub> dans cette dispersion au pH physiologique. Ces changements dans le thermotropisme des lipides de ce mélange lors du passage du pH 5.2 au pH 7.4 pourraient être dus à la déprotonation d'une certaine fraction des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans le mélange à pH 7.4. En effet, le pK<sub>a</sub> intrinsèque du groupement carboxyle des acides gras ayant

été évalué à environ 4.7-5 dans l'eau distillée (142-146), il est possible que le changement de polarité de l'environnement autour du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> causé par la présence de la sphingomyéline et du sulfate de cholestérol à leur proximité, puisse amener une augmentation significative du pK apparent du PA-d<sub>31</sub> qui permettrait la déprotonation d'une certaine quantité de PA-d<sub>31</sub> à pH 7.4 mais non à pH 5.2, tel qu'il a été observé pour le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> et pour plusieurs autres lipides (43,140-142,147). Ceci est aussi suggéré par les résultats des régions de l'élongation carboxyle et de la vibration amide II obtenus pour ce mélange à pH 7.4 et 0 °C qui semblent indiquer une diminution de l'intensité de la bande associée au groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> accompagnée par l'élargissement de la bande amide II probablement dû à l'apparition du groupement carboxylate du PA-d<sub>31</sub> (figure 31 et annexe VII). En fait, cette déprotonation partielle du PA-d<sub>31</sub> dans le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 pourrait conduire à une diminution des interactions formées entre la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> qui favoriserait l'incorporation du sulfate de cholestérol dans la dispersion et mènerait à l'abolition de la transition de phase de la sphingomyéline à ce pH. Toutefois, l'interaction entre la sphingomyéline et la forme protonée du PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2 pourrait nuire à l'incorporation du sulfate de cholestérol dans cette dispersion et ainsi atténuer l'efficacité de ce stérol à abolir la transition de phase de ces lipides. D'ailleurs, ceci semble rejoindre l'hypothèse proposée par Downing et coll. (155) suite à l'étude de mélanges de lipides de l'épiderme par chromatographie sur couche mince, et selon laquelle il se produirait une légère dissociation du complexe sphingosine/sulfate de cholestérol dans le stratum corneum où les acides gras sont présents en grande proportion et l'environnement est à pH 5.2.

Certaines particularités ont aussi été observées en ce qui a trait à l'influence qui résulte de l'ajout du cholestérol dans le mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> comparativement à celle du sulfate de cholestérol, sur les liaisons hydrogène formées au niveau du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub>. En effet, puisque nous avons observé que la valeur du  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  obtenue pour les mélanges SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol aux pH 5.2 et 7.4 sont supérieures à celle du

mélange SPM/PA-d<sub>31</sub> à 0 °C (figures 23 et 32), il semble que la présence du cholestérol dans ce mélange puisse être accompagnée par un affaiblissement des liaisons hydrogène au niveau de la tête polaire du PA-d<sub>31</sub>. Cet effet exercé par le cholestérol pourrait découler simplement de l'adoption de la phase lo par la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> à ces température et pH, due à la présence du cholestérol. En effet, étant donné qu'il a été rapporté que la phase lo qui est induite suite à l'ajout du cholestérol dans des dispersions formées de lipide et/ou d'acide gras serait plus désordonnée que la phase gel (56,57, 60,61,66,67,88,89), il est probable que l'augmentation de la mobilité des molécules de sphingomyéline et de PA-d<sub>31</sub>, dans la phase lo, puisse nuire à la formation de liaisons hydrogène impliquant la tête polaire du PA-d<sub>31</sub> à basse température. Toutefois, malgré le fait que le sulfate de cholestérol soit moins efficace que le cholestérol à induire la phase lo au sein de la sphingomyéline et du PA-d<sub>31</sub>, il semble que l'ajout du sulfate de cholestérol résulte également à un affaiblissement des liaisons hydrogène impliquant la tête polaire du PA-d<sub>31</sub>. Enfin, puisque nous avons observé un épaulement ( $\bar{\nu} \approx 1730 \text{ cm}^{-1}$ ) sur la bande d'élongation carboxyle du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 et 0 °C (figure 31), ceci suggère également que l'incorporation du sulfate de cholestérol dans cette dispersion pourrait favoriser la formation d'une deuxième population de molécules de PA-d<sub>31</sub> dont les groupements carboxyles seraient plus faiblement liés par des liaisons hydrogène que la population dont la composante est située à 1708 cm<sup>-1</sup>.

La comparaison des résultats de la région des modes de vibration amide I et amide II obtenus pour les mélanges SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol aux pH 5.2 et 7.4 à 0 °C avec ceux des mélanges SPM/PA-d<sub>31</sub> et SPM/Chol a suggéré que l'ajout simultané du cholestérol et du PA-d<sub>31</sub> amène un renforcement des liaisons hydrogène à l'interface de la sphingomyéline à basse température qui est plus prononcé au niveau de la portion C=O de son groupement amide (81,102,133-135). Ceci pourrait être dû à une augmentation de l'hydratation du groupement amide de la sphingomyéline suite à l'augmentation de son accessibilité à l'eau causée par la présence du cholestérol et/ou à une augmentation des interactions intermoléculaires impliquant les

portions C=O et N-H du groupement amide de la sphingomyéline de ce mélange. Par contre, puisque les résultats ont indiqué que le  $\bar{\nu}$ amide I du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol est supérieur à celui du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à 0 °C aux pH 5.2 et 7.4, il semblerait que la substitution du cholestérol par le sulfate de cholestérol induise un affaiblissement des liaisons hydrogène au niveau de la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline (81,133-135). Ceci pourrait être attribuable à une hydratation moindre de la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline en présence de sulfate de cholestérol qu'en présence de cholestérol et/ou à la formation de liaisons hydrogène entre la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline et le groupement 3 $\beta$ -OH du cholestérol qui ne pourrait avoir lieu avec le sulfate de cholestérol (44,77). De plus, une autre possibilité à considérer est que la plus grande taille de la tête polaire du sulfate de cholestérol comparativement à celle du cholestérol, pourrait également induire une augmentation de l'aire à l'interface lipide/eau (63) qui provoquerait un écartement entre les molécules de sphingomyéline et résulterait à un affaiblissement des interactions intermoléculaires impliquant la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline.

Par ailleurs, les résultats de la région des modes de vibration des groupements carboxyle et amide des dispersions de SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol et SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4, ont aussi suggéré qu'il se produit un affaiblissement des liaisons hydrogène au niveau du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> et du groupement amide de la sphingomyéline lors du chauffage (81,102,133-135). Ceci pourrait découler d'un bris des liaisons hydrogène intermoléculaires causé par l'agitation thermique. Toutefois, certaines différences ont été observées dans le thermotropisme du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol lors du passage du pH 5.2 au pH 7.4. Notamment, puisque nous avons observé des valeurs supérieures pour le  $\bar{\nu}$ amide I du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 entre 0 et 44 °C par rapport aux  $\bar{\nu}$ amide I de ce même mélange à pH 5.2 (figure 32E), il semblerait que le sulfate de cholestérol induise un affaiblissement plus prononcé des liaisons hydrogène au niveau de la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline au pH physiologique

(81,133-135). Ceci pourrait dériver comme il a été discuté précédemment, d'une meilleure incorporation du sulfate de cholestérol à pH 7.4 qu'à pH 5.2 résultant de la déprotonation d'une certaine fraction des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans la bicouche qui pourrait entraîner une diminution plus importante de l'hydratation et/ou des interactions intermoléculaires impliquant la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline au pH physiologique. De plus, les liaisons hydrogène formées au niveau du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> semblant plus faibles dans ce mélange à pH 7.4 qu'à pH 5.2 aux températures inférieures à sa T<sub>m</sub>, ceci supporte également le fait que l'incorporation du sulfate de cholestérol pourrait être favorisée à pH 7.4 et qu'il y aurait ainsi diminution des interactions entre le PA-d<sub>31</sub> et la sphingomyéline à ce pH.

L'ajout simultané du cholestérol ou du sulfate de cholestérol et du PA-d<sub>31</sub> à la dispersion de sphingomyéline semble amener aussi un renforcement des liaisons hydrogène au niveau du groupement phosphate de la sphingomyéline à basse température, qui pourrait être dû à une augmentation de son hydratation (52,103). Toutefois, puisque les valeurs du  $\bar{v}_{as}PO_2^-$  du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol aux pH 5.2 et 7.4 sont inférieures à celles du mélange SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à 0 °C (annexe III), il semble que la substitution du cholestérol par le sulfate de cholestérol serait accompagnée d'une diminution des liaisons hydrogène formées au niveau du groupement phosphate de la sphingomyéline en présence du PA-d<sub>31</sub>. Ceci pourrait découler de la formation de liaisons hydrogène entre le groupement phosphate de la sphingomyéline et le groupement 3β-OH du cholestérol qui n'aurait pas lieu avec le sulfate de cholestérol et/ou de l'interaction du groupement 3β-OH du cholestérol avec la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline qui mènerait à un changement conformationnel favorisant l'hydratation du groupement phosphate de la sphingomyéline. D'ailleurs, cette influence particulière au cholestérol a aussi été rapportée antérieurement pour le mélange SPM/Chol ainsi que pour le mélange DPPC/Chol (42,59). Enfin, l'augmentation du  $\bar{v}_{as}PO_2^-$  des mélanges SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol et SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 qui a été observée de 0 à 75 °C, suggère qu'il se produit un affaiblissement des liaisons

hydrogène au niveau de la tête polaire de la sphingomyéline lors du chauffage, qui pourrait être dû à sa déshydratation. Cette déshydratation de la tête polaire de la sphingomyéline peut dériver d'un changement dans la conformation de la sphingomyéline qui serait causé par l'agitation thermique et qui serait défavorable à l'hydratation de son groupement phosphate, tel qu'il a été proposé pour le mélange SPM/Chol.

Il ressort de ce chapitre que le cholestérol serait plus efficace que le sulfate de cholestérol à induire la formation d'une phase  $l_0$  au sein du PA-d<sub>31</sub> et de la sphingomyéline aux pH 5.2 et 7.4. De plus, l'influence du sulfate de cholestérol semble dépendre du pH. Notamment, au pH du stratum corneum, la sphingomyéline et le PA-d<sub>31</sub> subissent une transition de phase qui est seulement atténuée par la présence du sulfate de cholestérol. Par contre, la déprotonation d'une certaine fraction des molécules de PA-d<sub>31</sub> au pH physiologique semble être accompagnée d'une diminution des interactions intermoléculaires entre le PA-d<sub>31</sub> et la sphingomyéline, qui favoriserait l'incorporation du sulfate de cholestérol dans cette dispersion et mènerait à l'abolition de la transition de phase de la sphingomyéline. De plus, l'ajout du cholestérol ou du sulfate de cholestérol semble amener un affaiblissement des liaisons hydrogène impliquant le groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub>, tandis qu'il induirait plutôt un renforcement des liaisons hydrogène au niveau des groupements phosphate et amide de la sphingomyéline. Toutefois, la possibilité d'interaction du groupement phosphate et de la portion C=O du groupement amide de la sphingomyéline avec le cholestérol pourrait résulter à un renforcement plus important du réseau de liaisons hydrogène formé à l'interface et au niveau de la tête polaire de la sphingomyéline, que leur interaction avec le sulfate de cholestérol.

## CHAPITRE 7. ÉTUDE DE L'INTERACTION DU CHOLESTÉROL ET DU SULFATE DE CHOLESTÉROL AVEC LE CÉRAMIDE 3 EN PRÉSENCE D'ACIDE PALMITIQUE PERDEUTÉRÉ

Au cours de ce chapitre, nous étudierons les changements amenés par la présence simultanée du sulfate de cholestérol et du PA-d<sub>31</sub> sur le thermotropisme du céramide 3. De plus, nous établirons l'effet exercé par une variation de pH 5.2 à pH 7.4 sur les interactions de ces composantes lipidiques.

### 7.1 Résultats

#### 7.1.1 Régions des modes des élongations symétriques C-H et C-D

Les courbes du thermotropisme des dispersions de CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol (1:1:1 mole) et de CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol (1:1:1 mole) aux pH 5.2 et 7.4 sont présentées à la figure 33. La figure 33A montre que le  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  et le  $\bar{v}_s\text{CD}_2$  du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol aux pH 5.2 subissent une diminution progressive entre 20 et environ 40 °C, qui est suivie de deux transitions de phase à des T<sub>m</sub> de 44 et 63 °C ainsi que de 47 et 60 °C, respectivement (annexe I). De plus, le  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  et le  $\bar{v}_s\text{CD}_2$  obtenus pour ce mélange au bas de la chute à 37 °C étant voisins respectivement de ceux du céramide 3 et du PA-d<sub>31</sub> anhydres, il semble que le céramide 3 et le PA-d<sub>31</sub> soient dans une phase plus ordonnée que la phase gel en présence de cholestérol à pH 5.2. Les courbes de la figure 33C montrent qu'il se produit une diminution progressive du  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  et du  $\bar{v}_s\text{CD}_2$  du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 sur l'intervalle 20 à environ 40 °C, qui est suivie par une augmentation abrupte de ces  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  et  $\bar{v}_s\text{CD}_2$  se terminant à 60 °C et indiquant que le céramide 3 et le PA-d<sub>31</sub> subissent une transition de phase dont la T<sub>m</sub> est de 48 °C. Les valeurs de  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  et de  $\bar{v}_s\text{CD}_2$  mesurées à 37 °C pour ce mélange étant près de celles du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.4, ceci indique que le céramide 3 et le PA-d<sub>31</sub> sont également en phase plus ordonnée que la phase gel en présence de sulfate de cholestérol à pH 5.2. Par contre, la faible diminution des valeurs de  $\bar{v}_s\text{CH}_2$  observée entre 0 et environ 37 °C pour les mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 (figure 33A et C), suggère que le céramide 3 est dans une phase semblable à la phase gel à 37 °C qui est plus ordonnée qu'à 0 °C mais moins ordonnée que celle observée pour ces mêmes mélanges à pH 5.2 vers 37 °C. De plus, les valeurs de  $\bar{v}_s\text{CD}_2$  mesurées sur

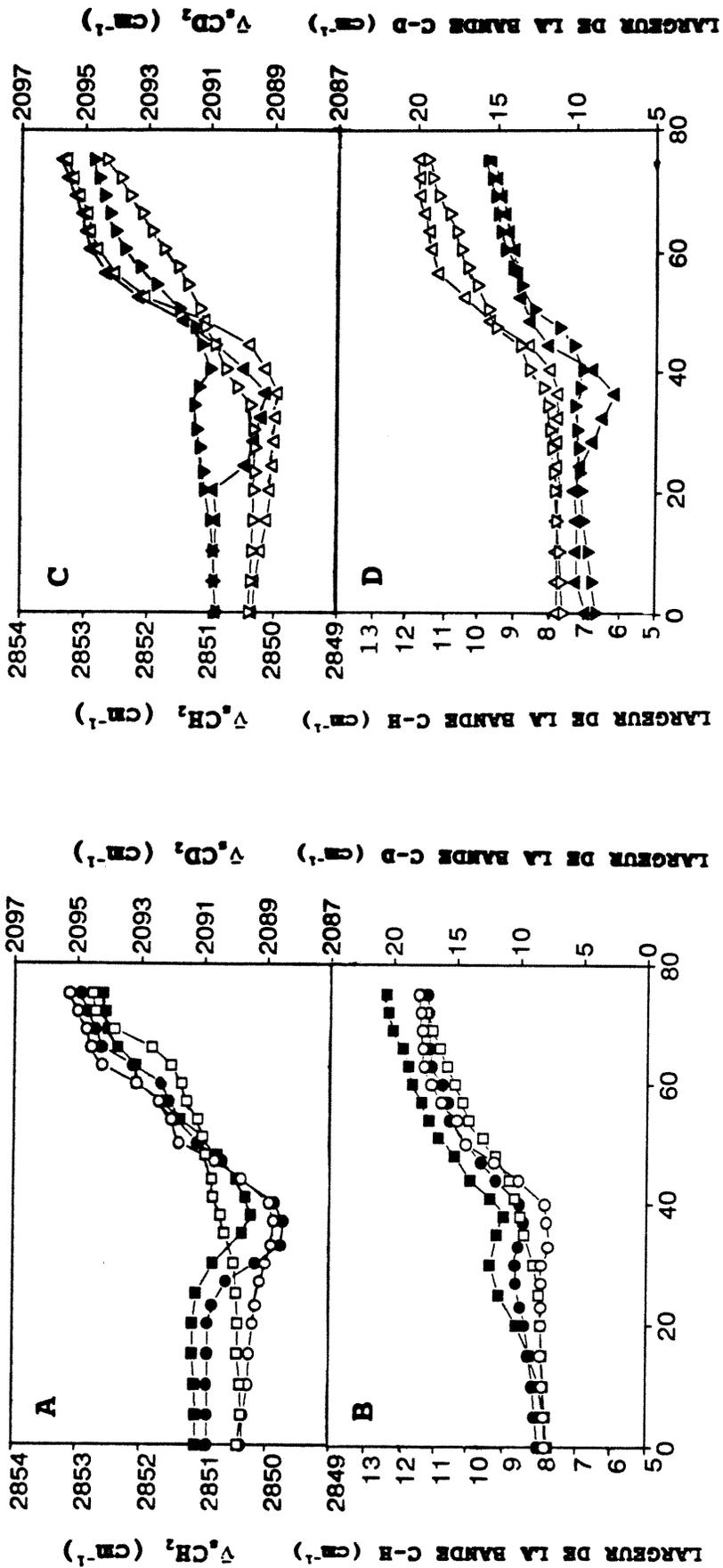


Figure 33: Effet de la température sur: A) la position et B) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■) et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□) du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol, et sur: C) la position et D) la largeur des bandes d'élongation symétrique C-H à pH 5.2 (▲) et pH 7.4 (▼) et d'élongation symétrique C-D à pH 5.2 (△) et pH 7.4 (▽) du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol.

l'intervalle 30-50 °C pour ces mélanges à pH 7.4 étant supérieures à celles du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> (figures 20C, 33A et C), ceci suggère que le PA-d<sub>31</sub> est dans une phase intermédiaire qui est moins ordonnée que la phase gel à ces températures. D'autre part, la courbe du  $\bar{\nu}_s\text{CH}_2$  du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 7.4 montre aussi deux transitions de phase ayant des T<sub>m</sub> de 51 et 65 °C, tandis que celle du  $\bar{\nu}_s\text{CD}_2$  de ce mélange montre une augmentation progressive sur l'intervalle variant de 30 à environ 50 °C et une transition de phase entre 50 et 75 °C dont la T<sub>m</sub> est de 63 °C. Pour sa part, la courbe des valeurs de  $\bar{\nu}_s\text{CH}_2$  du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 montre une transition de phase sur l'intervalle 40-65 °C dont la T<sub>m</sub> est de 54 °C, tandis que la courbe des valeurs de  $\bar{\nu}_s\text{CD}_2$  montre une augmentation progressive à partir d'environ 35 °C jusqu'à 75 °C (figure 33C). Enfin, la largeur des bandes des élongations symétriques C-H et C-D des mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 se comporte de manière comparable à celle de leur nombre d'onde (figure 33B et D).

#### 7.1.2 Région du mode de déformation des CH<sub>2</sub>

Les bandes de déformation des CH<sub>2</sub> des mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 sont constituées d'une seule composante qui est située à environ 1468 cm<sup>-1</sup> à toutes les températures (figure 34).

#### 7.1.3 Région des modes de vibration des groupements carboxyle et amide

La région associée à l'élongation des groupements carboxyles et aux vibrations amide I et amide II des spectres FTIR des mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 mesurés à 0 et 75 °C, est présentée à la figure 35. À pH 5.2, le spectre du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol comporte trois bandes d'absorption situées vers 1708, 1625 et 1553 cm<sup>-1</sup>, à 0 °C, qui sont attribuées au mode d'élongation carboxyle du PA-d<sub>31</sub> et aux modes de vibration amide I et amide II du céramide 3. À pH 7.4, le spectre du mélange ne montre que deux bandes d'absorption situées à environ 1630 et 1545 cm<sup>-1</sup> à 0 °C et assignées aux modes des vibrations amide I et amide II du céramide 3. Pour leur part, les spectres du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol comportent trois bandes d'absorption à 0 °C qui sont

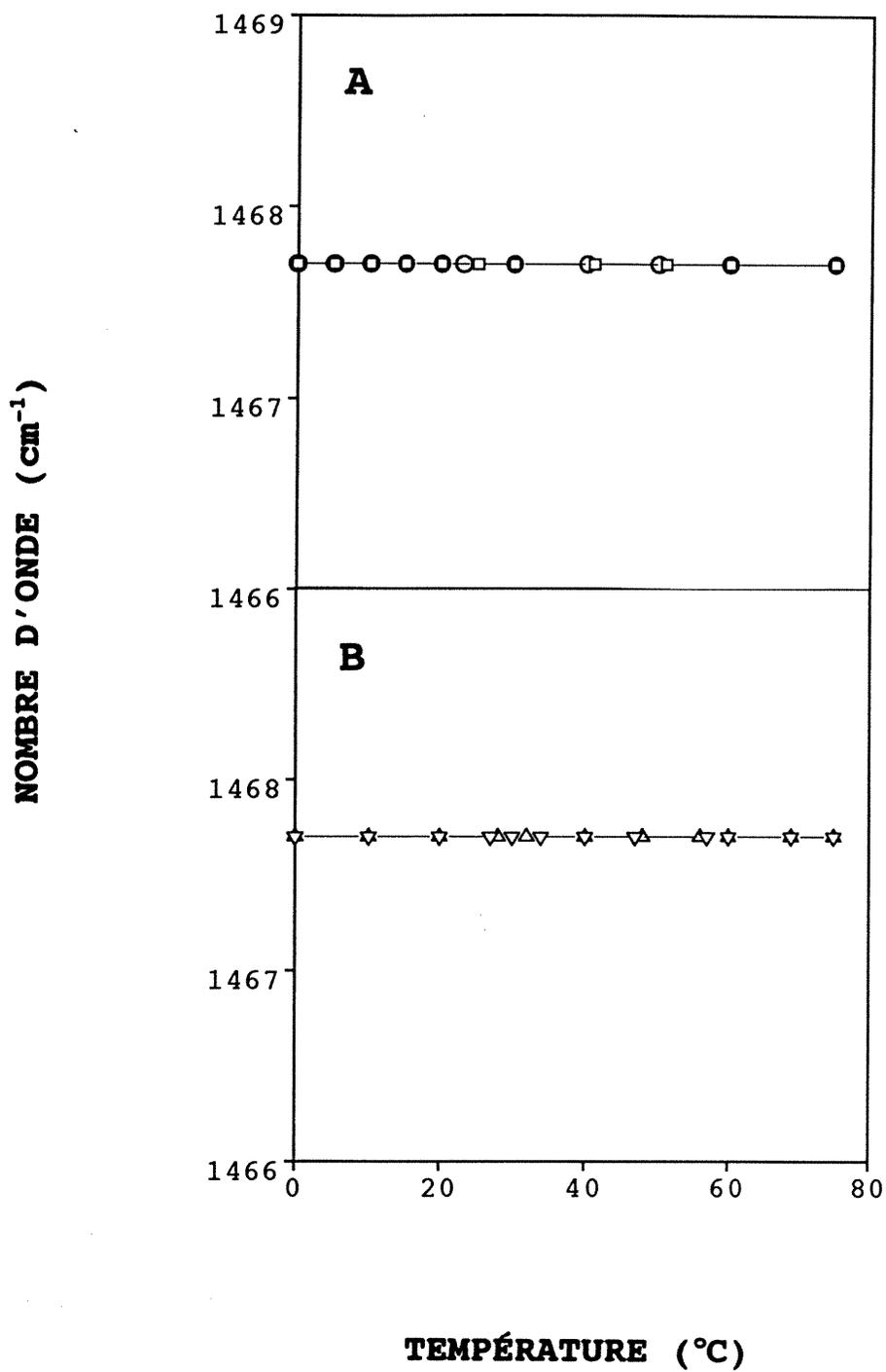


Figure 34: Effet de la température sur la position de la bande de déformation des CH<sub>2</sub> de la dispersion de: A) CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□); B) CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 (△) et pH 7.4 (▽).

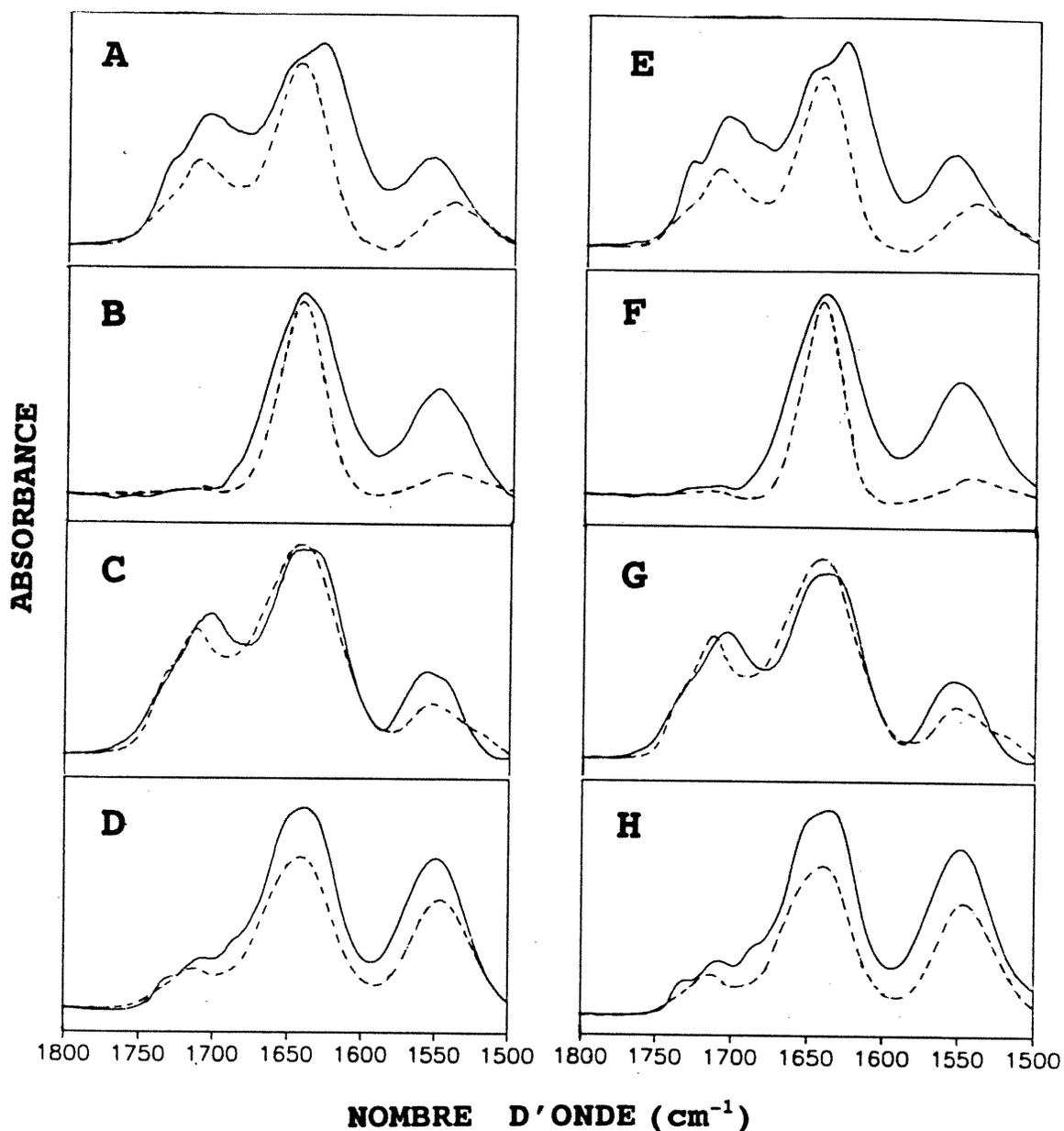


Figure 35: Spectres infrarouges des régions des modes de vibration du groupement carboxyle, amide I et amide II de la dispersion de: A) CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2; B) CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 7.4; C) CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2; D) CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4, mesurés à 0 °C (-) et 75 °C (--). Spectres infrarouges correspondants après déconvolution de Fourier de la dispersion de: E) CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2; F) CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 7.4; G) CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2; H) CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4.

situées vers 1703-1708, 1638 et 1549-1553  $\text{cm}^{-1}$  et qui sont attribuables au mode de l'élongation carboxyle et aux modes des vibrations amide I et amide II respectivement. De plus, on peut noter que la surface sous la bande d'élongation carboxyle du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol diminue lors du changement du pH 5.2 au pH 7.4 sans que cette bande d'élongation carboxyle ne disparaisse totalement à pH 7.4. Enfin, on note également que la bande amide I du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 semble comporter un épaulement vers 1640  $\text{cm}^{-1}$  pouvant correspondre à une deuxième composante moins importante que celle située vers 1625  $\text{cm}^{-1}$  à basse température.

La figure 36 illustre les variations de la position des bandes d'élongation carboxyle, amide I et amide II des mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4, en fonction de la température. De manière générale, ces variations sont pour la plupart relativement complexes. Le  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  des mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 diminue sur l'intervalle variant de 0 à environ 30 °C où sa valeur est voisine de celle du PA-d<sub>31</sub> anhydre puis augmente brusquement sur l'intervalle 44-50 °C pour le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et 40-48 °C pour le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol (figure 36A et D). Par contre, le  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 augmente entre 0 et environ 47 °C et les valeurs de  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  mesurées à 0 et 47 °C pour ce mélange sont voisines de celles qui ont été obtenues à 0 et 75 °C pour le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> (figures 23D et 36D). D'autre part, les  $\bar{\nu}_{\text{amide I}}$  et  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  des mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 et 7.4 et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 diminuent entre 0 et 20°C (figures 36B, C, E et F). Cette diminution est suivie d'une augmentation brusque du  $\bar{\nu}_{\text{amide I}}$  se terminant vers 35 °C ainsi que d'une légère diminution entre 55 et 75 °C, tandis que le  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  augmente entre 20 et environ 35 °C et diminue sur l'intervalle allant d'environ 45 à 75 °C. Dans le cas du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2, les  $\bar{\nu}_{\text{amide I}}$  et  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  augmentent sur l'intervalle allant de 0 à environ 20 °C, puis chute entre environ 55 et 75 °C. On peut aussi noter qu'à 0 °C les valeurs de  $\bar{\nu}_{\text{amide I}}$  de ces mélanges sont inférieures à celles des dispersions de céramide 3, de CER3/PA-d<sub>31</sub> et de CER3/Chol (figures 18, 23 et 26). De plus, les valeurs de  $\bar{\nu}_{\text{amide II}}$  des mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-

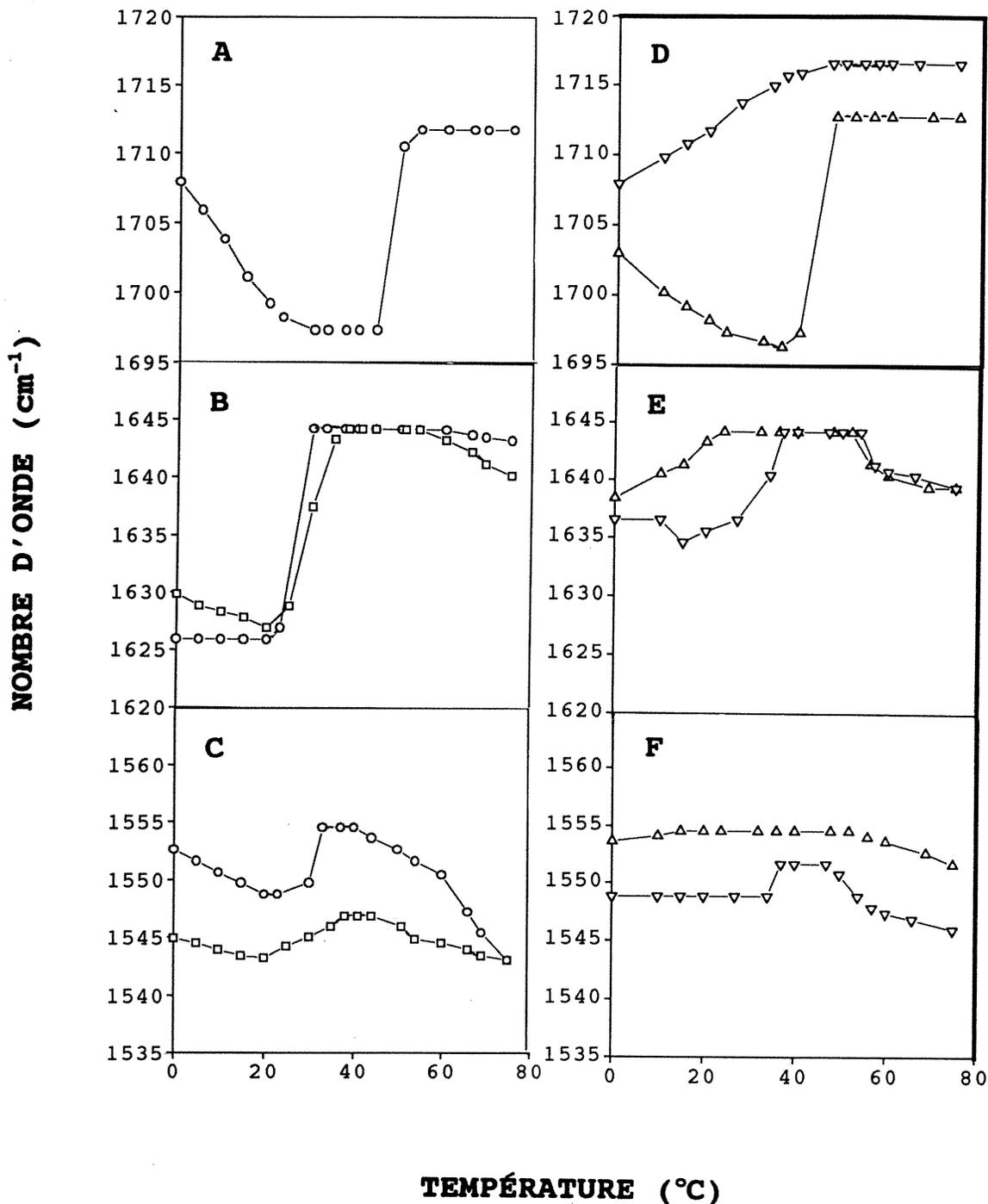


Figure 36: Effet de la température sur la position de la bande: A) de l'élongation du groupement carboxyle, B) amide I et C) amide II de la dispersion de CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 (o) et pH 7.4 (□); D) de l'élongation du groupement carboxyle, E) amide I et F) amide II de la dispersion de CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 (Δ) et pH 7.4 (▽).

$d_{31}$ /S.Chol à pH 7.4 sont inférieures à celles qui sont observées à pH 5.2.

## 7.2 Discussion

Les résultats obtenus dans les régions des modes des élongations C-H et C-D des mélanges CER3/PA- $d_{31}$ /Chol et CER3/PA- $d_{31}$ /S.Chol à pH 5.2, ont indiqué qu'il y a formation d'une phase plus ordonnée que la phase gel au sein du céramide 3 et du PA- $d_{31}$  en présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol vers 37 °C dans ces mélanges (figure 33). Ceci suggère que le cholestérol et le sulfate de cholestérol induisent une augmentation de l'ordre dans les chaînes acyles du céramide 3 et du PA- $d_{31}$  vers 37 °C au pH du stratum corneum (57,58,83). Or, puisque cette phase très ordonnée n'a pas été détectée pour le mélange CER3/PA- $d_{31}$  (figure 20), il semble que la présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol soit essentielle à la formation de cette nouvelle phase très ordonnée par le céramide 3 et le PA- $d_{31}$  aux environs de 37 °C au pH du stratum corneum. De plus, le thermotropisme du céramide 3 et du PA- $d_{31}$  de ces mêmes mélanges à pH 5.2 étant très semblable au-dessus de 37 °C mais différent de celui du mélange CER3/PA- $d_{31}$ , il appert que le cholestérol ou le sulfate de cholestérol serait incorporé dans la bicouche de céramide 3 et que l'incorporation de ces stérols rehausserait la miscibilité du céramide 3 et du PA- $d_{31}$  dans ces conditions expérimentales. Toutefois, puisque nous avons observé que le céramide 3 et le PA- $d_{31}$  subissent deux transitions dont l'une d'une phase ordonnée à une phase intermédiaire et une seconde d'une phase intermédiaire à une phase désordonnée à des  $T_m$  respectives d'environ 44-47 °C et 60-63 °C dans le mélange CER3/PA- $d_{31}$ /Chol à pH 5.2 tandis qu'ils subissent une seule transition d'une phase très ordonnée à une phase désordonnée à une  $T_m$  de 48 °C dans le mélange CER3/PA- $d_{31}$ /S.Chol à pH 5.2 (annexe I), ceci suggère que le céramide 3 et le PA- $d_{31}$  peuvent coexister dans une phase intermédiaire à la phase très ordonnée et désordonnée sur l'intervalle 50-60 °C uniquement en présence de cholestérol. Ces résultats semblent en accord avec ceux qui ont été obtenus lors d'études de  $^1\text{H}$ -RMN et de  $^2\text{H}$ -RMN réalisées par Thewalt et coll. (154) et Kitson et coll. (136) avec un mélange CER3/PA- $d_{31}$ /Chol (1:1:1 mole) aux pH 5.2 et 6.2, qui ont indiqué que le céramide 3 de

cerveau de bovin et le PA-d<sub>31</sub> subissent deux transitions de phase, dont une transition d'une phase solide à une phase lo survenant à environ 40 °C et se terminant vers 50 °C ainsi qu'une transition de la phase lo à une phase fluide sur l'intervalle 50-75 °C. Or, en considérant l'ensemble de ces résultats, il est donc possible que la phase intermédiaire que nous observons au sein de la dispersion de céramide 3 et du PA-d<sub>31</sub> en présence de cholestérol puisse correspondre à la phase lo et que celle-ci ne soit pas induite par le sulfate de cholestérol. Enfin, il est intéressant de noter que nos résultats présentent aussi une certaine similarité avec ceux qui ont été obtenus lors d'études du thermotropisme de préparations de stratum corneum humain et de rat malgré que la composition de ces préparations présente une plus grande complexité que celle de nos mélanges due à la présence de plusieurs types de céramides et d'acides gras ainsi que de plusieurs autres constituants telles que les protéines. Notamment, il a été déterminé par DSC et diffraction des rayons X que les lipides du stratum corneum humain et de rat subissent également deux transitions de phase soit vers 37-40 et 70 °C (17,156-158). De plus, il a été observé par spectroscopie IR que les lipides du stratum corneum humain subissent une transition d'une phase solide à une phase intermédiaire aux phases gel et liquide cristalline vers 35 °C (159).

Certaines particularités ont été aussi observées dans le thermotropisme des mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol observé à pH 7.4. Notamment, les résultats des régions associées aux elongations symétriques C-H et C-D du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 7.4, ont suggéré que le céramide 3 subit deux transitions de phase dont une première transition d'une phase semblable à la phase gel à une phase intermédiaire à une T<sub>m</sub> de 51 °C et une seconde d'une phase intermédiaire à une phase désordonnée à une T<sub>m</sub> de 65 °C, tandis que le PA-d<sub>31</sub> ne semble subir qu'une transition d'une phase intermédiaire à une phase désordonnée à une T<sub>m</sub> de 63 °C (figure 33, annexe I). Ceci semble indiquer que le céramide 3 et le PA-d<sub>31</sub> sont peu miscibles et qu'ils subissent une séparation de phase en présence du cholestérol à pH 7.4. Ces résultats semblent rejoindre ceux qui ont été obtenus lors d'une étude de <sup>2</sup>H-RMN

réalisée par Kitson et coll. (136) avec un mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol (1:1:1 mole) à pH 7.4, et qui ont indiqué que le PA-d<sub>31</sub> est dans une phase lo à 37, 50 et 60 °C et subit une transition à une phase désordonnée entre 60 et 75 °C au sein de ce mélange. De plus, puisque nous avons observé que le céramide 3 subit une seule transition d'une phase semblable à la phase gel à une phase désordonnée dans le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 tandis que le PA-d<sub>31</sub> subit une transition d'une phase intermédiaire à une phase désordonnée à une T<sub>m</sub> plus élevée que celle du céramide 3 (figure 33, annexe I), il semble que le céramide 3 et le PA-d<sub>31</sub> subissent également une séparation de phase en présence de sulfate de cholestérol à pH 7.4. Par contre, la phase intermédiaire du céramide 3 ne semblant pas être formée en présence du sulfate de cholestérol et du PA-d<sub>31</sub>, ceci suggère que le sulfate de cholestérol serait moins efficace que le cholestérol à induire la formation d'une phase intermédiaire pouvant correspondre à la phase lo au sein de la dispersion de céramide 3 de ce mélange autant à pH 7.4 qu'à pH 5.2. Or, puisque que l'ensemble de ces résultats suggère que le céramide 3 et le PA-d<sub>31</sub> subissent une séparation de phase en présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol à pH 7.4 et que leur thermotropisme diffère de celui du céramide 3 et du PA-d<sub>31</sub> du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>, il semble donc qu'une certaine proportion des molécules de cholestérol ou de sulfate de cholestérol puisse être incorporée au sein des domaines où sont regroupées les molécules de PA-d<sub>31</sub> ainsi que dans ceux contenant du céramide 3 au pH physiologique. Toutefois, les résultats de la région de la déformation des CH<sub>2</sub> qui ont été obtenus pour les mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol (figure 34) ayant indiqué que l'empilement des chaînes acyles du céramide 3 est hexagonal sur tout le domaine de température étudié autant à pH 7.4 qu'à pH 5.2 (58,100) et qu'il a été établi que l'empilement des chaînes est plus compact dans la structure orthorhombique que dans l'arrangement hexagonal (99), il semble que la présence simultanée du cholestérol ou du sulfate de cholestérol et du PA-d<sub>31</sub> puisse amener une plus grande diminution de la compacité de l'empilement des chaînes acyles du céramide 3 que celle exercée par leur présence individuelle autant au pH physiologique qu'à celui du stratum corneum.

Une autre observation intéressante est que les spectres du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol montrent qu'à pH 7.4 il y a disparition de la bande d'élongation carboxyle du PA-d<sub>31</sub> et augmentation de la surface sous la bande amide II du céramide 3 à 0 et 75 °C comparativement aux spectres de ce même mélange à pH 5.2 (figure 35), suggérant qu'il y a déprotonation complète des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans ce mélange à pH 7.4 (95,140). Ceci pourrait être dû à une incorporation du cholestérol au sein des domaines où sont regroupées les molécules de PA-d<sub>31</sub> dans ce mélange à pH 7.4 qui résulterait à un changement de la polarité autour des têtes polaires des molécules de PA-d<sub>31</sub> favorisant leur déprotonation, tel qu'il a été proposé pour d'autres lipides (43,140-144,147,149-151,160-162). Or, étant donné qu'il a été estimé que le pK<sub>a</sub> interfacial des molécules d'acide palmitique serait d'environ 7.7 dans des membranes en absence d'interactions électrostatiques (142,144) et que nous avons observé que la déprotonation des molécules de PA-d<sub>31</sub> semblerait être complète dans ce mélange, il appert que la présence des molécules de cholestérol à proximité du PA-d<sub>31</sub> pourrait entraîner un abaissement du pK apparent du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> qui serait beaucoup plus important que celui que nous avons noté pour les dispersions CER3/PA-d<sub>31</sub> et SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 7.4. Ceci pourrait être dû à une diminution de la densité de charge négative dans l'environnement des molécules de PA-d<sub>31</sub> résultant de la présence des molécules de cholestérol non chargées à leur proximité, tel qu'il a été suggéré pour d'autres mélanges de lipides (43,160-162). Toutefois, la déprotonation du PA-d<sub>31</sub> étant moins prononcée dans le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 que dans le mélange CER/PA-d<sub>31</sub>/Chol mais plus accentuée que dans le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub> (figures 22 et 35), il semble que la présence du sulfate de cholestérol puisse également favoriser la déprotonation du PA-d<sub>31</sub> mais moins que le cholestérol à ce pH. Ceci pourrait être dû à la présence d'une charge négative sur la tête polaire du sulfate de cholestérol ainsi qu'à la plus grande taille de son groupement SO<sub>4</sub><sup>-</sup> comparativement au groupement 3β-OH du cholestérol, qui pourraient créer un environnement autour des groupements carboxyles des molécules de PA-d<sub>31</sub> qui serait moins favorable à leur déprotonation. En particulier, la répulsion électrostatique entre la tête polaire

du PA-d<sub>31</sub> et celle du sulfate de cholestérol pourrait restreindre l'étendue de la déprotonation des molécules de PA-d<sub>31</sub> dans ce mélange à pH 7.4 comparativement à celui contenant du cholestérol. D'ailleurs, ceci semble rejoindre les résultats d'études de titration effectuées avec des lipides chargés et non chargés qui ont indiqué que la présence de lipides chargés négativement situés à proximité de la tête polaire des acides gras entraînerait une augmentation de la densité de charge négative dans l'environnement autour du groupement carboxyle des acides gras qui résulterait à une augmentation de leur pK apparent et nuirait à leur déprotonation dans la bicouche (43,140,143). Enfin, la plus faible déprotonation du PA-d<sub>31</sub> en présence de sulfate de cholestérol pourrait également être due à la formation de liaisons hydrogène entre la portion C=O de la tête polaire du PA-d<sub>31</sub> et le groupement 3β-OH du cholestérol qui ne pourrait avoir lieu avec la tête polaire du sulfate de cholestérol au pH physiologique tel que proposé dans le modèle de Rehfeld et coll. (78) et qui serait favorable à la déprotonation du PA-d<sub>31</sub> dans le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 7.4. En fait, ceci semble être en accord avec les résultats d'un ensemble d'études de spectroscopie, qui ont révélé que le degré de déprotonation des lipides dans les bicouches pourrait dépendre de la possibilité d'interaction via des liaisons hydrogène entre la forme déprotonée des lipides et des molécules agissant comme des donneurs de protons tel que le cholestérol et/ou d'interactions électrostatiques entre les lipides chargés négativement et certains cations divalents dont le Ca<sup>2+</sup> (143, 144,146,149,160-162).

Par ailleurs, la présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol semble également influencer le réseau de liaisons hydrogène qui est formé aux interfaces et au niveau des têtes polaires du céramide 3 et du PA-d<sub>31</sub> aux pH 5.2 et 7.4. En effet, puisque nous avons observé une diminution importante du νamide I pour les mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 par rapport à ceux des mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>, CER3/Chol ou CER3/S.Chol à 0 °C, il semble donc que l'ajout simultané du PA-d<sub>31</sub> et du cholestérol ou du sulfate de cholestérol puisse renforcer les liaisons hydrogène intermoléculaires qui se manifestent au niveau de la portion

C=O du groupement amide du céramide 3 aux pH 5.2 et 7.4 (81,102,133-135). Ce renforcement pourrait être dû à une augmentation de l'hydratation du groupement amide du céramide 3 résultant de sa plus grande accessibilité à l'eau dans ces mélanges ainsi qu'à la formation de liaisons hydrogène entre le groupement amide du céramide 3 et la tête polaire du PA-d<sub>31</sub> (43,49,127). Toutefois, les résultats ayant indiqué qu'il y a un renforcement plus important des liaisons hydrogène impliquant la portion C=O du groupement amide du céramide 3 dans les mélanges contenant du cholestérol à 0 °C que dans ceux contenant du sulfate de cholestérol, il est possible que l'interaction du groupement 3β-OH du cholestérol avec la portion C=O du groupement amide du céramide 3 puisse contribuer à ce renforcement (44,77). De plus, la présence d'un épaulement situé vers 1640 cm<sup>-1</sup> sur le côté de la bande amide I du mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 et 0 °C suggère aussi qu'il pourrait exister une deuxième population de céramide 3 au sein de ce mélange dont la portion C=O du groupement amide serait liée moins fortement par des liaisons hydrogène que celle du céramide 3 appartenant à la population dont la composante est située vers 1625 cm<sup>-1</sup> à 0 °C (81,133-135). Enfin, l'affaiblissement des liaisons hydrogène au niveau de la portion N-H du groupement amide du céramide que nous avons observé pour les mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol lors du passage du pH 5.2 au pH 7.4 à 0 °C pourrait être dû à une diminution des interactions entre le groupement amide du céramide 3 et le groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> causé par la déprotonation du PA-d<sub>31</sub> (43,49,128). Toutefois, la variation du νamide II de ces mélanges qui se produit à 0 °C lors du passage du pH 5.2 au pH 7.4 pourrait être due également à la présence d'une bande d'élongation carboxylate à pH 7.4 qui contribuerait à déplacer la bande amide II (95,140).

Une réorganisation des liaisons hydrogène impliquant le groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> ainsi que le groupement amide du céramide 3 a été également observée pour les mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol aux pH 5.2 et 7.4 lors du chauffage. Notamment, puisque nous avons remarqué qu'il y a une augmentation des valeurs du νCOOH obtenues pour le mélange CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 7.4 de 0 à environ 47 °C, ceci suggère

qu'il se produit un affaiblissement des liaisons hydrogène au niveau du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> dans ce mélange lors du chauffage (70-73,100). Ceci pourrait résulter de la déshydratation du groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> et/ou d'une diminution des interactions intermoléculaires entre les têtes polaires des formes protonée et déprotonée des molécules de PA-d<sub>31</sub> (43,144,147) causées par l'agitation thermique. D'autre part, la diminution des valeurs du  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  que nous avons observée pour les mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 entre 0 et environ 35 °C suggère aussi qu'il y a un renforcement des liaisons hydrogène au niveau de la tête polaire du PA-d<sub>31</sub> dans ces mélanges à ces températures et pH (70-73,100). Ceci pourrait découler d'une augmentation de l'hydratation et/ou de la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires entre la tête polaire du PA-d<sub>31</sub> et le groupement amide ou le groupement hydroxyle du céramide 3 (43,49,62,127). Par contre, étant donné que nous avons observé une augmentation abrupte du  $\bar{\nu}_{\text{COOH}}$  pour les mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 entre environ 40 et 50 °C, il semble plutôt qu'il y a un affaiblissement des liaisons hydrogène intermoléculaires impliquant le groupement carboxyle du PA-d<sub>31</sub> durant sa transition de phase (70-73,100). Enfin, les variations du réseau de liaisons hydrogène formé au niveau des portions C=O et N-H du groupement amide du céramide 3 que nous avons remarquées pour les différents mélanges lors du chauffage, pourraient être dues à des changements dans l'hydratation ainsi que dans les interactions intermoléculaires impliquant le groupement amide du céramide 3 causés par l'agitation thermique. En particulier, les résultats semblent indiquer qu'il y a un affaiblissement des liaisons hydrogène au niveau de la portion C=O et un renforcement des interactions au niveau de la portion N-H du groupement amide du céramide 3 dans les mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol lors de la formation de la phase très ordonnée à pH 5.2 et de la phase semblable à la phase gel à pH 7.4.

Les résultats de ce chapitre ont indiqué que la miscibilité du céramide 3 et du PA-d<sub>31</sub> est rehaussée par la présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol dans les dispersions lipidiques à pH 5.2 et que le céramide 3 et le PA-

$d_{31}$  exhibent un thermotropisme très semblable en présence de ces stérols au pH du stratum corneum. De plus, l'incorporation du cholestérol ou du sulfate de cholestérol dans la dispersion contenant du céramide 3 et du PA- $d_{31}$  semble conduire à la formation d'une phase plus ordonnée que la phase gel au sein des constituants de la dispersion qui se manifeste seulement vers 37 °C au pH du stratum corneum. À l'opposé, le thermotropisme du céramide 3 est très différent de celui du PA- $d_{31}$  en présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol à pH 7.4, ce qui semble indiquer que le céramide 3 et le PA- $d_{31}$  subissent une séparation de phase en présence de ces stérols au pH physiologique. De plus, la présence du cholestérol au sein de la dispersion de céramide 3 et de PA- $d_{31}$  semble favoriser plus fortement la déprotonation du groupement carboxyle du PA- $d_{31}$  à pH 7.4, que ne le fait la présence du sulfate de cholestérol. Finalement, l'ajout simultané du cholestérol ou du sulfate de cholestérol et du PA- $d_{31}$  à la dispersion de céramide 3 semble mener à une diminution importante de la compacité d'empilement des chaînes acyles du céramide 3 qui pourrait découler d'une réorganisation des interactions intermoléculaires et/ou d'une augmentation de l'hydratation des groupements d'interface des molécules de céramide 3 se manifestant autant au pH physiologique qu'au pH du stratum corneum.

## CHAPITRE 8. CONCLUSION

L'ensemble des résultats de notre étude réalisée par spectroscopie infrarouge par transformée de Fourier à l'aide d'une variété de dispersions lipidiques, a permis de déterminer que certains traits structuraux des lipides retrouvés au niveau du stratum corneum pourraient jouer un rôle important dans leurs fonctions physiologiques.

Nos résultats ont indiqué que la petite tête polaire du céramide 3 permet un empilement plus serré de ses chaînes acyles par rapport à celui des chaînes acyles de la sphingomyéline. Ces différences structurales semblent influencer grandement les changements induits par le cholestérol et le sulfate de cholestérol sur le thermotropisme des bicouches de céramide 3 et de sphingomyéline en présence d'acide palmitique. Notamment, nous avons observé que le cholestérol abolit la transition de phase gel-liquide cristalline de la sphingomyéline et induit une phase liquide ordonnée de part et d'autre de sa température de transition, alors que le sulfate de cholestérol semble être moins efficace pour abolir la transition de phase de la sphingomyéline en présence du PA-d<sub>31</sub>. Ceci supporte les conclusions de plusieurs études qui ont indiqué que le cholestérol aurait généralement comme effet d'augmenter la perméabilité des bicouches de phospholipides en-dessous de leur température médiane de transition de phase, tandis que l'ajout de ce stérol dans des bicouches de phospholipides en phase liquide cristalline conduirait à une réduction de leur perméabilité (64,163-167). Par contre, nos résultats ont indiqué que des phénomènes thermodynamiques différents pourraient être observés avec le céramide 3. En effet, l'ajout de cholestérol ou de sulfate de cholestérol semble induire la formation d'une phase plus ordonnée que la phase gel dans la bicouche de céramide 3. Toutefois malgré que la présence de stérol soit suffisante pour induire la formation de cette phase très ordonnée dans les dispersions de céramide 3, il semblerait que le pH et la température exercent une grande influence sur l'organisation de la dispersion de céramide 3 lorsqu'il y a présence d'un acide gras tel que le PA-d<sub>31</sub> dans la dispersion. Nos résultats ont effectivement suggéré que les mélanges CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol et

CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol exhibent un thermotropisme complexe qui inclut la formation d'une phase plus ordonnée que la phase gel pour le céramide 3 et le PA-d<sub>31</sub>, telle que celle qui est observée dans le stratum corneum, seulement au pH du stratum corneum (pH 5.2) et aux environs de la température physiologique (37 °C).

Finalement, une dernière conclusion extraite de nos résultats qui s'est avérée intéressante est que la présence du cholestérol ou du sulfate de cholestérol semble augmenter la miscibilité du céramide 3 et du PA-d<sub>31</sub> au pH du stratum corneum, tandis qu'elle semble la diminuer et favoriser la déprotonation du PA-d<sub>31</sub> au pH physiologique.

Il ressort donc de toute cette étude que malgré que les propriétés de mélanges des lipides étudiés lors de nos travaux ne reflètent pas nécessairement celles associées aux lipides retrouvés dans les lamelles lipidiques du stratum corneum qui sont constituées d'un système lipidique beaucoup plus complexe que celui de nos membranes modèles, nos résultats semblent suggérer que les caractéristiques structurales du céramide 3 pourraient lui permettre d'adopter un empilement plus serré que celui de la sphingomyéline au niveau des lamelles lipidiques du stratum corneum. Cette particularité des céramides pourrait donc être importante pour le maintien de la fonction de barrière de perméabilité de la peau. De plus, la présence du cholestérol et du sulfate de cholestérol au niveau des lamelles lipidiques du stratum corneum pourrait aussi favoriser une organisation plus compacte des céramides lorsqu'ils sont en contact ou non avec des acide gras tel que l'acide palmitique. Toutefois, puisque la substitution du cholestérol par le sulfate de cholestérol enraie la formation de la phase liquide ordonnée du céramide 3 et du PA-d<sub>31</sub> au-dessus de 37 °C, il semblerait que la présence et la structure du cholestérol comptent parmi les éléments qui assurent le thermotropisme complexe du stratum corneum.

Nos travaux pourraient être poursuivis par l'étude des perturbations induites par une protéine présente dans le stratum corneum, la kératine, sur les lipides de nos membranes

modèles. Il serait également intéressant d'étudier le thermotropisme de mélanges plus complexes qui contiendraient du céramide 1 et de l'acide linoléique en plus des lipides de nos modèles. De telles études permettraient de déterminer les interactions qui se forment entre la kératine, le céramide I, l'acide linoléique et les lipides de nos membranes modèles, ainsi que de déterminer leurs implications dans les fonctions de barrière de perméabilité et de desquamation de la peau.

## BIBLIOGRAPHIE

1. François, C., *Traité de biochimie*, Université de Boeck, Éditions du renouveau pédagogique, Montréal, 1990.
2. Dixon, B., *Le corps humain*, France loisir, Paris, 1986.
3. Williams, M.L., *Pediatr. Dermatol.* **1**, 1-24, 1983.
4. Elias, P.M. et Menon, G.K., *Adv. Lipid Res.* **24**, 1-26, 1991.
5. Gurr, M.I. et James, A.T., *Lipid Biochemistry : an introduction 2<sup>rd</sup> ed.*, Chapman and Hall Ltd, London, 1975.
6. Roullet, A., *Biochimie des lipides : métabolisme-techniques d'exploration*, Lyon, 1966.
7. Wertz, P.W., Swartzendruber, D.C., Abraham, W., Madison, K.C. et Downing, D.T., *Arch. Dermatol.* **123**, 1381-1384, 1987.
8. Merrill, A.H. et Stevens, V.L., *Biochim. Biophys. Acta* **1010**, 131-139, 1989.
9. Lampe, M.A., Williams, M.L. et Elias, P.M., *J. Lipid Res.* **24**, 131-140, 1983.
10. Bouwstra, J.A., de Vries, M.A., Gooris, G.S., Bras, W., Brusee, J. et Ponec, M., *J. Controlled Release* **15**, 209-220, 1991.
11. Potts, R.O. et Francoeur, M.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3871-3873, 1990.
12. Cevc, G. et Blume, G., *Biochim. Biophys. Acta* **1104**, 226-232, 1992.
13. Abraham, W. et Downing, D.T., *Biochim. Biophys. Acta* **1068**, 189-194, 1991.
14. Blank, I.H., *J. Invest. Dermatol.* **45**, 249-256, 1965.
15. Sweeney, T.M. et Downing, D.T., *J. Invest. Dermatol.* **55**, 135-140, 1970.
16. Hould, R., *Histologie descriptive*. Décarie éditeur, 1983.
17. Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., van der Spek, J.A. et Bras, W., *J. Invest. Dermatol.* **97**, 1005-1012, 1991.
18. Matoltsy, A.G., *J. Invest. Dermatol.* **67**, 20-25, 1976.
19. Elias, P.M., *J. Invest. Dermatol.* **80**, 44s-49s, 1983.
20. Madison, K.C., Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W. et Downing, D.T., *J. Invest. Dermatol.* **88**, 714-718, 1987.
21. Bowser, P.A. et White, R.J., *Br. J. Dermatol.* **112**, 1-14, 1985.
22. Elias, P.M., Goerke, J. et Friend, D.S., *J. Invest. Dermatol.* **69**, 535-546, 1977.
23. Wertz, P.W., Kremer, M. et Squier, C.A., *J. Invest. Dermatol.* **98**, 375-378, 1992.
24. Guy, R.H., *Transdermal Drug delivery: developmental issues and research initiatives v. 35*, J. Hadgraft editor, New York, 1989.
25. Schurer, N.Y. et Elias, P.M., *Adv. Lipid Res.* **24**, 27-56, 1991.
26. Yoshikawa, N., Imokawa, G., Akimoto, K., Jin, K., Higaki, Y. et Kawashima, M., *Dermatology* **188**, 207-214, 1994.
27. Imokawa, G., Kuno, H. et Kawai, M., *J. Invest. Dermatol.* **96**, 845-851, 1991.
28. Melton, J.L., Wertz, P.W., Swartzendruber, D.C. Downing, D.T., *Biochim. Biophys. Acta* **921**, 191-197, 1987.

29. Hansen, H.S. et Jensen, B., *Biochim. Biophys. Acta* **834**, 357-363, 1985.
30. Ponec, M., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mommaas, A.M. et Nugteren, D.H., *J. Lipid Res.* **29**, 949-961, 1988.
31. Swartzendruber, D.C., Wertz, P.W., Kitko, D.C., Madison, K.C. et Downing, D.T., *J. Invest. Dermatol.* **92**, 251-257, 1989.
32. Lampe, M.A., Burlingame, A.L., Whitney, J., Williams, M.L., Brown, B.E., Roitman, E. et Elais, P.M., *J. Lipid Res.* **24**, 120-130, 1983.
33. Epstein, Jr E.H., Williams, M.L. et Elias, P.M., *Arch. Dermatol.* **117**, 761-763, 1981.
34. Williams, M.L., *Adv. Lipid Res.* **24**, 211-262, 1991.
35. Elias, P.M., Williams, M.L., Maloney, M.E., Bonifas, J.A., Brown, B.E., Grayson, S. et Epstein, Jr E.H., *J. Clin. Invest.* **74**, 1414-1421, 1984.
36. Wertz, P.W., Swartzendruber, D.C., Madison, K.C. et Downing, D.T., *J. Invest. Dermatol.* **89**, 419-425, 1987.
37. Ranasinghe, A.W., Wertz, P.W. et Downing, D.T., MacKenzie, I.C., *J. Invest. Dermatol.* **86**, 187-190, 1986.
38. Long, S.A., Wertz, P.W., Strauss, J.S. et Downing, D.T., *Arch. Dermatol. Res.* **277**, 284-287, 1985.
39. Gennis, R.B., *Biomembranes, Molecular Structure & Fonctions*, Springer-Verlag, New York, 1989.
40. *Catalogue Chemicals and Biochemicals for Lipid Research 1986-1987*, Serdary Research Laboratories Inc., Ontario.
41. Watson, J.D., Hopkins, N.H., Roberts, J.W., Steitz, J.A. et Weiner, A.M., *Molecular Biology of the Gene*, 4<sup>rd</sup> ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company, Californie, 1987.
42. Huang, C.-H., *Lipids* **12**, 348-356, 1976.
43. Boggs, J.M., *Biochim. Biophys. Acta* **906**, 353-404, 1987.
44. Brockerhoff, H., *Lipids* **9**, 645-650, 1974.
45. Kan, C.-C., Ruan, Z.-S. et Bittman, R., *Biochemistry* **30**, 7759-7766, 1991.
46. Kan, C.-C., Bittman, R. et Hajdu, J., *Biochim. Biophys. Acta* **1066**, 95-101, 1991.
47. Pascher, I., *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 433-451, 1976.
48. Löfgren, H. et Pascher, I., *Chem. Phys. Lipids* **20**, 273-284, 1977.
49. Pascher, I. et Sundell, S., *Chem. Phys. Lipids* **20**, 175-191, 1977.
50. Stewart, R.J. et Boggs, J.M., *Biochemistry* **29**, 3644-3653, 1990.
51. Pfannemuller, B. et Welte, W., *Chem. Phys. Lipids* **37**, 227-240, 1985.
52. Schmidt, C.F., Barenholz, Y. et Thompson, T.E., *Biochemistry* **16**, 2649-2656, 1977.
53. Sundaralingam, M., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **195**, 324-355, 1972.
54. Shinitzky, M. et Barenholz, Y., *J. Biol. Chem.* **249**, 2652-2657, 1974.
55. Linseisen, F.M., Thewalt, J.L., Bloom, M., et Bayerl, T.M., *Chem. Phys. Lipids* **65**, 141-149, 1993.
56. Finean, J.B., *Chem. Phys. Lipids* **54**, 147-156, 1990.

57. Casal, H.L. et Mantsch, H.H., *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 381-401, 1984.
58. Umemura, J., Cameron, D.G. et Mantsch, H.H., *Biochim. Biophys. Acta* **602**, 32-44, 1980.
59. Robinson, A.J., Richards, W.G., Thomas, P.J. et Hann, M.M., *Biophys. J.* **68**, 164-170, 1995.
60. Thewalt, J.L. et Bloom, M., *Biophys. J.* **63**, 1176-1181, 1992.
61. Mouritsen, O.G., *Chem. Phys. Lipids* **57**, 179-194, 1991.
62. Abraham, W. et Downing, D.T., *Pharm. Res.* **9**, 1415-1421, 1992.
63. Kitson, N., Monck, M., Wong, K., Thewalt, J. et Cullis, P., *Biochim. Biophys. Acta* **1111**, 127-133, 1992.
64. Blok, M.C., van Deenen, L.L.M. et de Gier, J., *Biochim. Biophys. Acta* **464**, 509-518, 1977.
65. de Kruyff, B., *Lipids*, v.1, Paoletti, R., Porcellati, G. et Jacini editors, G., Raven Press, New York, 1976.
66. Reinl, H., Brumm, T. et Bayerl, T.M., *Biophys. J.* **61**, 1025-1035, 1992.
67. Bloom, M., *Physics in Canada*, **48**, 7-16, 1992.
68. Hyslop, P.A., Morel, B. et Sauerheber, R.D., *Biochemistry* **29**, 1025-1038, 1990.
69. Vist, M.R. et Davis, J.H., *Biochemistry* **29**, 451-464, 1990.
70. Scott, H.L. et Kalaskar, S., *Biochemistry* **28**, 3687-3691, 1989.
71. Dufourc, E.J., Parish, E.J., Chitrakorn, S. et Smith, I.C.P., *Biochemistry* **23**, 6062-6071, 1984.
72. Needham, D. et Nunn, R.S., *Biophys. J.* **58**, 997-1009, 1990.
73. Flanagan, M.T. et Hesketh, T.R., *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 535-545, 1973.
74. Oldfield, E. et Chapman, D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 610-616, 1971.
75. Cullis, P.R. et Hope, M.J. *Biochim. Biophys. Acta* **597**, 533-542, 1980.
76. Davis, P.J. et Keough, R.M.W., *Biochemistry* **22**, 6334-6340, 1983.
77. Sankaram, M. et Thompson, T.E., *Biochemistry* **29**, 10670-10675, 1990.
78. Rehfeld, S.J., Plachy, W.Z., Williams, M.L. et Elias, P.M., *J. Invest. Dermatol.* **91**, 499-505, 1988.
79. Van Scott, E.J. et Yu, R.J., *Arch. Dermatol.* **118**, 860-861, 1982.
80. Maréchal, Y., *La Recherche* **20**, 480-489, 1989.
81. Wong, P.T.T. et Mantsch, H.H., *Chem. Phys. Lipids* **46**, 213-224, 1988.
82. Marsh, D., *Chem. Phys. Lipids* **57**, 109-120, 1991.
83. Mantsch, H.H. et McElhaney, R.N., *Chem. Phys. Lipids* **57**, 213-226, 1991.
84. Israelachvili, J., *Intermolecular & Surface Forces*, Academic Press, London, 1992.
85. Barenholz, Y. et Thompson, T.E., *Biochim. Biophys. Acta* **604**, 129-158, 1980.
86. Lee, D.C., Durrani, A.A. et Chapman, D., *Biochim. Biophys. Acta* **769**, 49-56, 1984.

87. Bloom, M., Evans, E. et Mouritsen, O.G., *Q. Rev. Biophys.* **24**, 293-397, 1991.
88. Ipsen, J.H., Karlström, G., Mouritsen, O.G., Wennerström, H. et Zuckermann, M.J., *Biochim. Biophys. Acta* **905**, 162-172, 1987.
89. Ipsen, J.H., Mouritsen, O.G. et Bloom, M., *Biophys. J.* **57**, 405-412, 1990.
90. Streitwieser, A. et Heathcok, C.H., *Introduction to Organic Chemistry*. 3<sup>rd</sup> ed., Macmillan Publishing Company, New York, 1985.
91. Willard, H.H., Meritt, L.L., Dean, J.A. et Settle, F.A., *Instrumental methods of analysis*, Wadsworth Publishing Company, California, 1988.
92. Castellan, G.W., *Physical Chemistry*, 3<sup>rd</sup> ed., The Benjamin, Cummings Publishing Company Inc, California, 1983.
93. Allinger, N.L., Cava, M.P., De Jnghe, D.C., Johnson, C.R., Lebel, N.A. et Stevens, C.L., *Chimie Organique (volume 1)*, McGraw Hill, Paris, 1976.
94. Chavanne, M., Jullien, A., Beaudoin, G.J. et Flamand, E., *Chimie organique expérimentale*, Modulo, Québec, 1986.
95. Bellamy, L.J., *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1958.
96. Hsiao, C.Y.Y., Ottaway, C.A. et Horn, R.G., *Lipids* **9**, 913-915, 1974.
97. Lamba, O.P., Lal, S., Yappert, M.C., Lou, M.F. et Borchman, D., *Biochim. Biophys. Acta* **1081**, 181-187, 1991.
98. Cameron, D.G., Casal, H.L., Gudgin, E.F. et Mantsch, H.H., *Biochim. Biophys. Acta* **596**, 463-467, 1980.
99. Cameron, D.G., Casal, H.L. et Mantsch, H.H., *Biochemistry* **19**, 3665-3672, 1980.
100. Hübner, W., Mantsch, H.H. et Kates, M., *Biochim. Biophys. Acta* **1066**, 166-174, 1991.
101. Cameron, D.G., Gudgin, E.F. et Mantsch, H.H., *Biochemistry* **20**, 4496-4500, 1981.
102. Bellamy, L.J., *The infra-red Spectra of Complex Molecules*, Chapman and Hall, London, 1975.
103. Villalain, J., Ortiz, A. et Gómez-Fernández, J.C., *Biochim. Biophys. Acta* **941**, 55-62, 1988.
104. Parker, F.S., *Applications of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine*, Plenum Press, New York, 1971.
105. Samson, I. *Mémoire de maîtrise, Université Laval*, 1990.
106. Cameron, D.G. et Dluhy, R.A., *Spectroscopy in the Biomedical Sciences*, R. Michael Gendreau editor. CRC Press, Florida, 1986.
107. Cameron, D.G., Casal, H.L. et Mantsch, H.H., *J. Biochem. Biophys. Methods*. **1**, 21-36, 1979.
108. Kodati, V.R. et Lafleur, M., *Biophys. J.* **64**, 163-170, 1993.
109. Cameron, D.G., Kauppinen, J.K., Moffatt, D.J. et Mantsch, H.H., *Appl. Spectrosc.* **36**, 245-250, 1988.
110. Griffiths, P.R. et Pariente, G.L., *Trends in Analytical Chemistry* **8**, 209-215
111. Benga, G. et Holmes, R.P., *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **43**, 195-257, 1984.

112. Shipley, G.G., Avecilla, L.S. et Small, D.M., *J. Lipid Res.* **15**, 124-131, 1974.
113. Barenholz, Y., Suurkuusk, J., Mountcastle, D., Thompson, T.E., et Biltonen, R.L., *Biochemistry* **15**, 2441-2447, 1976.
114. Neuringer, L.J., Sears, B., Jungalwala, F.B. et Shriver, E.K., *FEBS Lett.* **104**, 173-175, 1979.
115. Mendelsohn, R. et Bernstein, H.J., *Biochim. Biohys. Acta* **413**, 329-340, 1975.
116. Faiman, R., *Chem. Phys. Lipids* **23**, 77-84, 1979.
117. Keough, K.M., Oldfield, E., Chapman, D., et Beynon, P., *Chem. Phys. Lipids* **10**, 37-50, 1973.
118. Untracht, S.H., et Shipley, G.G., *J. Biol. Chem.* **252**, 4449-4457, 1977.
119. Bunow, M.R., *Biochim. Biohys. Acta* **574**, 542-546, 1979.
120. Cohen, R., Barenholz, Y., Gatt, S., et Dagan, A., *Chem. Phys. Lipids* **35**, 371-384, 1984.
121. Oldfield, E. et Chapman, D., *FEBS Lett.* **21**, 303-306, 1972.
122. Estep, T.N., Calhoun, W.I., Barenholz, Y., Biltonen, R.L., Shipley, G.G. et Thompson, T.E., *Biochemistry* **19**, 20-24, 1980.
123. Siminovitch, D.J. et Jeffrey, K.R., *Biochim. Biohys. Acta* **645**, 270-277, 1981.
124. Reiss-Husson, F., *J. Mol. Biol.* **25**, 363-382, 1967.
125. Calhoun, W.I. et Shipley, G.G., *Biochemistry* **18**, 1717-1722, 1979.
126. Kodati, V.R., El-Jastimi, R. et Lafleur, M., *J. Phys. Chem.* **98**, 12191-12197, 1994.
127. Wiedmann, T.S. et Salmon, A., *Lipids* **26**, 364-368, 1991.
128. McIntosh, T.J., *Biophys. J.* **29**, 237-246, 1980.
129. Lafleur, M., Bloom, M. et Cullis, P.R., *Biochem. Cell. Biol.* **68**, 1-8, 1990.
130. Lafleur, M., Cullis, P.R. et Bloom, M., *Eur. Biophys. J.* **19**, 55-62, 1990
131. Thompson, T.E. et Tillack, T.W., *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **14**, 361-386, 1985.
132. Lafleur, M., Samson, I. et Pézolet, M., *Chem. Phys. Lipids* **59**, 233-244, 1991.
133. Mushayakarara, E.C., Wong, P.T.T. et Mantsch, H.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**, 140-145, 1986.
134. Mushayakarara, E.C., Wong, P.T.T. et Mantsch, H.H., *Biochim. Biophys. Acta* **857**, 259-264, 1986.
135. Mushayakarara, E.C. et Levin, I.W., *J. Phys. Chem.* **86**, 2324-2327, 1982.
136. Kitson, N., Thewalt, J., Lafleur, M. et Bloom, M., *Biochemistry* **33**, 6707-6715, 1994.
137. Mushayakarara, E.C., Albon, N. et Levin, I.W., *Biochim. Biophys. Acta* **686**, 153-159, 1982.
138. Pauls, K.P., MacKay, A.L. et Bloom, M., *Biochemistry* **22**, 6101-6109, 1983.
139. Mabrey, S. et Sturtevant, J.M., *Biochim. Biophys. Acta* **486**, 444-450, 1977.
140. Villalain, J. et Gómez-Fernández, J.C., *Chem. Phys. Lipids* **62**, 19-29, 1992.

141. Schullery, S.E., Seder, T.A., Weinstein, D.A. et Bryant, D.A., *Biochemistry* **20**, 6818-6823, 1981.
142. Fernández, M.S., González-Martinez, M.T. et Calderon, E., *Biochim. Biophys. Acta* **863**, 156-164, 1986.
143. Ptak, M., Egret-Charlier, M., Sanson, A. et Bouloussa, O., *Biochim. Biophys. Acta* **600**, 387-397, 1980.
144. Cistola, D.P., Hamilton, J.A., Jackson, D. et Small, D.M., *Biochemistry* **27**, 1881-1888, 1988.
145. Harned, H.S. et Owen, B., *The Physical Chemistry of Electrolytic Solution*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1958.
146. Spector, A.A., *J. Lipid Res.* **16**, 165-179, 1975.
147. Boggs, J.M., Rangaraj, G., et Koshy, K.M. *Chem. Phys. Lipids* **40**, 23-34, 1986.
148. Kouaouci, R., Silvius, J.R., Graham. I. et Pézolet, M., *Biochemistry* **24**, 7132-7140, 1985.
149. Boggs, J.M., *Can. J. Biochem.* **58**, 755-770, 1980.
150. Miyazaki, J., Hideg, K. et Marsh, D., *Biochim. Biophys. Acta* **1103**, 62-68, 1992.
151. Rooney, E.K., East, J.M., McWhirter, J., Simmonds, A.C. et Lee, A.G., *Biochim. Biophys. Acta* **728**, 159-170, 1983.
152. Lund-Katz, S., Laboda, H.M., McLean, L.R. et Phillips, M.C., *Biochemistry* **27**, 3416-3423, 1988.
153. Parrott, D.T. et Turner, J.E., *Biochim. Biophys. Acta* **1147**, 273-276, 1993.
154. Thewalt, J., Kitson, N., Araujo, C., Mackay, A. et Bloom, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 1247-1252, 1992.
155. Downing, D.T., Dose, R.W. et Abraham, W., *J. Lipid Res.* **34**, 563-569, 1993.
156. Van Duzee, B.F., *J. Invest. Dermatol.* **65**, 404-408, 1975.
157. Rehfeld, S.J. et Elias, P.M., *J. Invest. Dermatol.* **79**, 1-3, 1983.
158. Wilkes, G.L., Nguyen, A.-N. et Wildnauer, R., *Biochim. Biophys. Acta* **304**, 267-275, 1973.
159. Gay, C.L., Guy, R.H., Golden, G.M., Mak, V.H.W. et Francoeur, M.L., *J. Invest. Dermatol.* **103**, 233-239, 1994.
160. Tokutomi, S., Ohki, K. et Ohnishi, S.-I., *Biochim. Biophys. Acta* **596**, 192-200, 1980.
161. MacDonald, R.C., Simon, S.A. et Baer, E., *Biochemistry* **15**, 885-891, 1976.
162. Haines, T.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 160-164, 1983.
163. McElhaney, R.N., de Gier, J. et van Deenen, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta* **219**, 245-247, 1970.
164. de Kruff, B., de Greef, W.J., van Eijk, R.V.W., Demel, R.A. et van Deenen, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 479-499, 1973.
165. McElhaney, R.N., de Gier, J. et van der Neut-Kok, E.C.M., *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 500-512, 1973.
166. de Gier, J., Mandersloot, J.G. et van Deenen, L.L.M., *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 143-145, 1969.

**ANNEXE I**

**Températures médianes des transitions de phase des dispersions de sphingomyéline, SPM/PA-d<sub>31</sub>, SPM/Chol, SPM/S.Chol, SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol, SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol, céramide 3, CER3/PA-d<sub>31</sub>, CER3/Chol, CER3/S.Chol, CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol, et de CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol évaluées à l'aide des bandes d'élongation symétriques C-H et C-D**

Dispersion lipidique	pH	T <sub>m</sub> (°C)	
		mode C-H	mode C-D
SPM	5.2	33	--
	7.4	31	--
SPM/PA-d <sub>31</sub> (2:1 mole)	5.2	48	51
	7.4	45	46
SPM/Chol (2:1 mole)	5.2	--	--
	7.4	--	--
SPM/S.Chol (2:1 mole)	5.2	--	--
	7.4	--	--
SPM/PA-d <sub>31</sub> /Chol (1:1:1 mole)	5.2	--	--
	7.4	--	--
SPM/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol (1:1:1 mole)	5.2	52	52
	7.4	--	44
Céramide 3	5.2	>72	--
	7.4	>72	--
CER3/PA-d <sub>31</sub> (2:1 mole)	5.2	>60	50
	7.4	>60	60
CER3/Chol (2:1 mole)	5.2	>60	--
	7.4	>60	--
CER3/S.Chol (2:1 mole)	5.2	>60	--
	7.4	>60	--
CER3/PA-d <sub>31</sub> /Chol (1:1:1 mole)	5.2	44 ; 63	47 ; 60
	7.4	51 ; 65	63
CER3/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol (1:1:1 mole)	5.2	48	48
	7.4	54	>34

## ANNEXE II

**Position des bandes d'élongation C-H, C-D, carboxyle, phosphate et des vibrations amide I et amide II des sphingomyéline, céramide 3 et acide palmitique perdeutééré mesurée dans le KBr**

Bande d'absorption infrarouge	Position (cm <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>		
	Sphingomyéline	Céramide 3	PA-d <sub>31</sub>
$\bar{\nu}_s\text{CH}_2$	2850.9	2850.0	--
$\bar{\nu}_s\text{CD}_2$	--	--	2089.3
$\bar{\nu}\text{COOH}$	--	--	1698.5
$\bar{\nu}\text{amide I}$	1658.0	1646.1	--
$\bar{\nu}\text{amide II}$	1548.1	1550.7	--
$\bar{\nu}_{\text{as}}\text{PO}_2^-$	1234.4	--	--
$\bar{\nu}_s\text{PO}_2^-$	1091.6	--	--

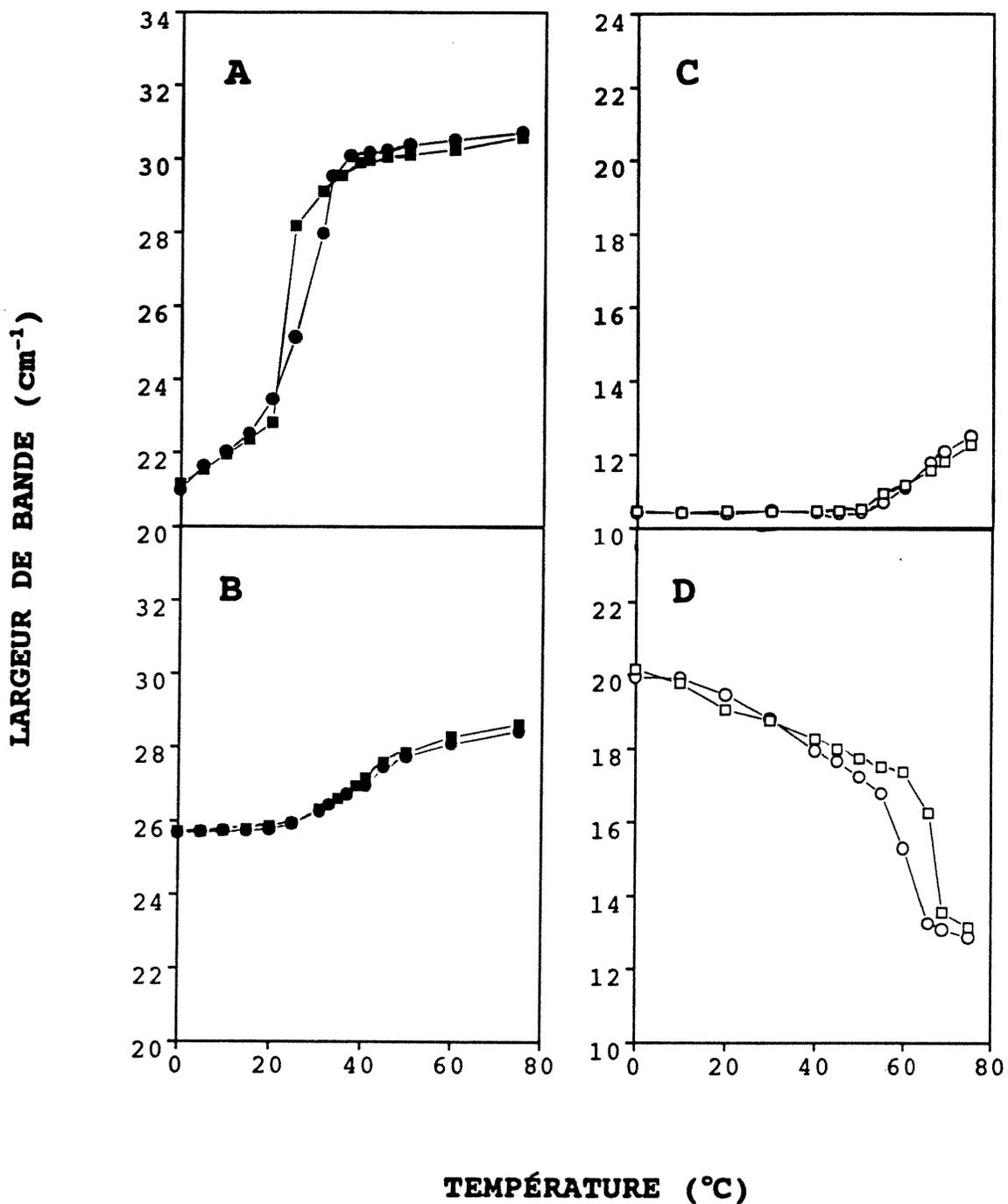
<sup>a</sup> Ces résultats ont été mesurés à 20°C.

ANNEXE III

Positions des bandes des élongations antisymétrique et symétrique des groupements phosphates des dispersions de sphingomyéline, SPM/PA-d<sub>31</sub>, SPM/Chol, SPM/S.Chol, SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol et de SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol

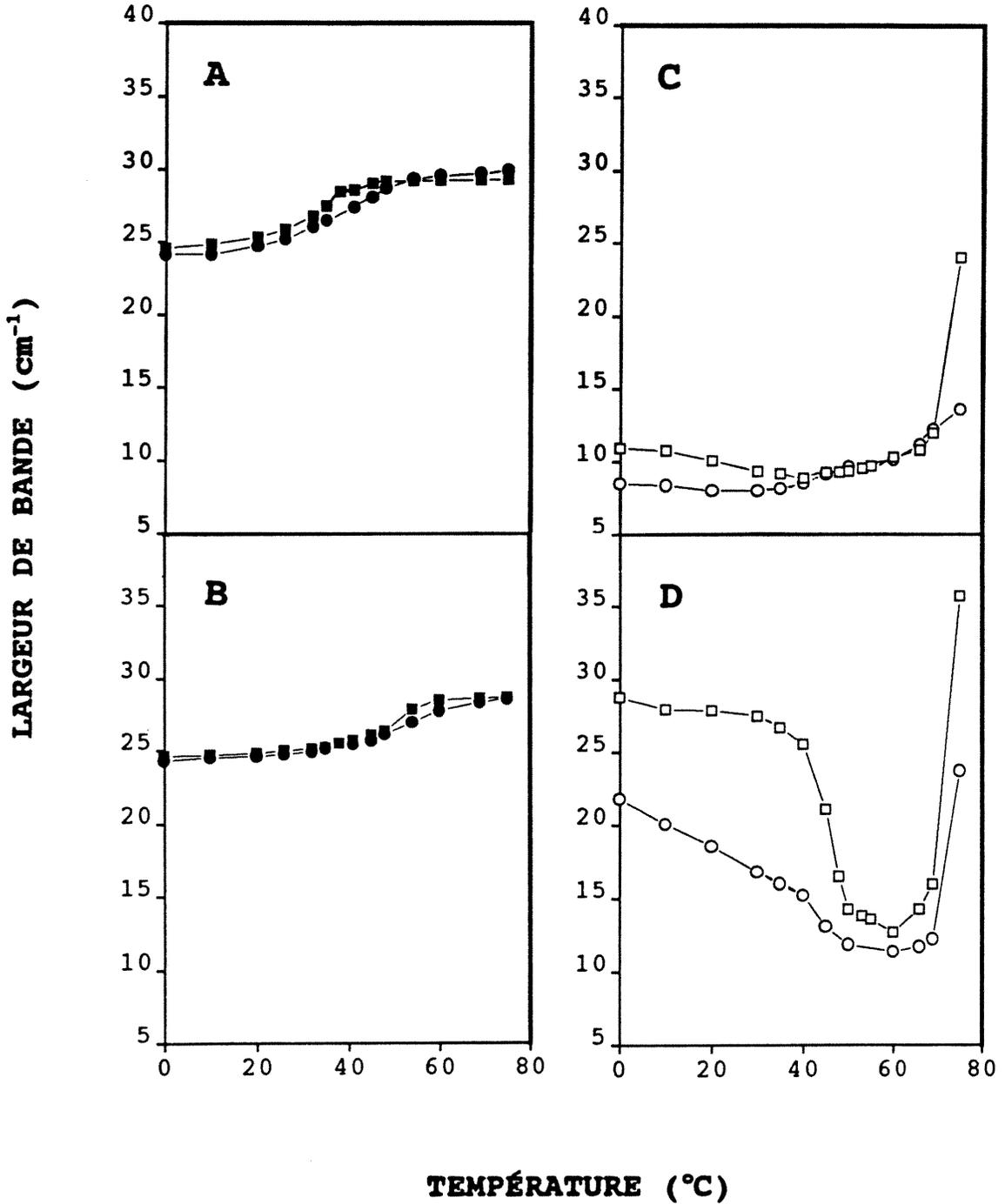
Dispersion lipidique	pH	Température (°C)	$\bar{\nu}_{as}PO_2^-$ (cm <sup>-1</sup> )	$\bar{\nu}_sPO_2^-$ (cm <sup>-1</sup> )
SPM	5.2	0	1224.9	1085.0
		75	1222.0	1085.0
	7.4	0	1223.9	1086.0
		75	1221.0	1086.0
SPM/PA-d <sub>31</sub> (2:1 mole)	5.2	0	1221.0	1087.9
		75	1221.0	1087.0
	7.4	0	1220.1	1087.9
		75	1219.1	1086.0
SPM/Chol (2:1 mole)	5.2	0	1218.9	1084.9
		75	1221.8	1084.9
	7.4	0	1217.0	1084.9
		75	1219.9	1084.9
SPM/S.Chol (2:1 mole)	5.2	0	1219.9	1086.5
		75	1218.4	1088.8
	7.4	0	1219.9	1086.8
		75	1218.9	1088.8
SPM/PA-d <sub>31</sub> /Chol (1:1:1 mole)	5.2	0	1215.1	1086.8
		75	1220.9	1086.9
	7.4	0	1215.6	1087.9
		75	1220.1	1087.0
SPM/PA-d <sub>31</sub> /S.Chol (1:1:1 mole)	5.2	0	1219.9	1088.8
		75	1221.8	1086.8
	7.4	0	1218.0	1088.8
		75	1219.9	1086.8

## ANNEXE IV



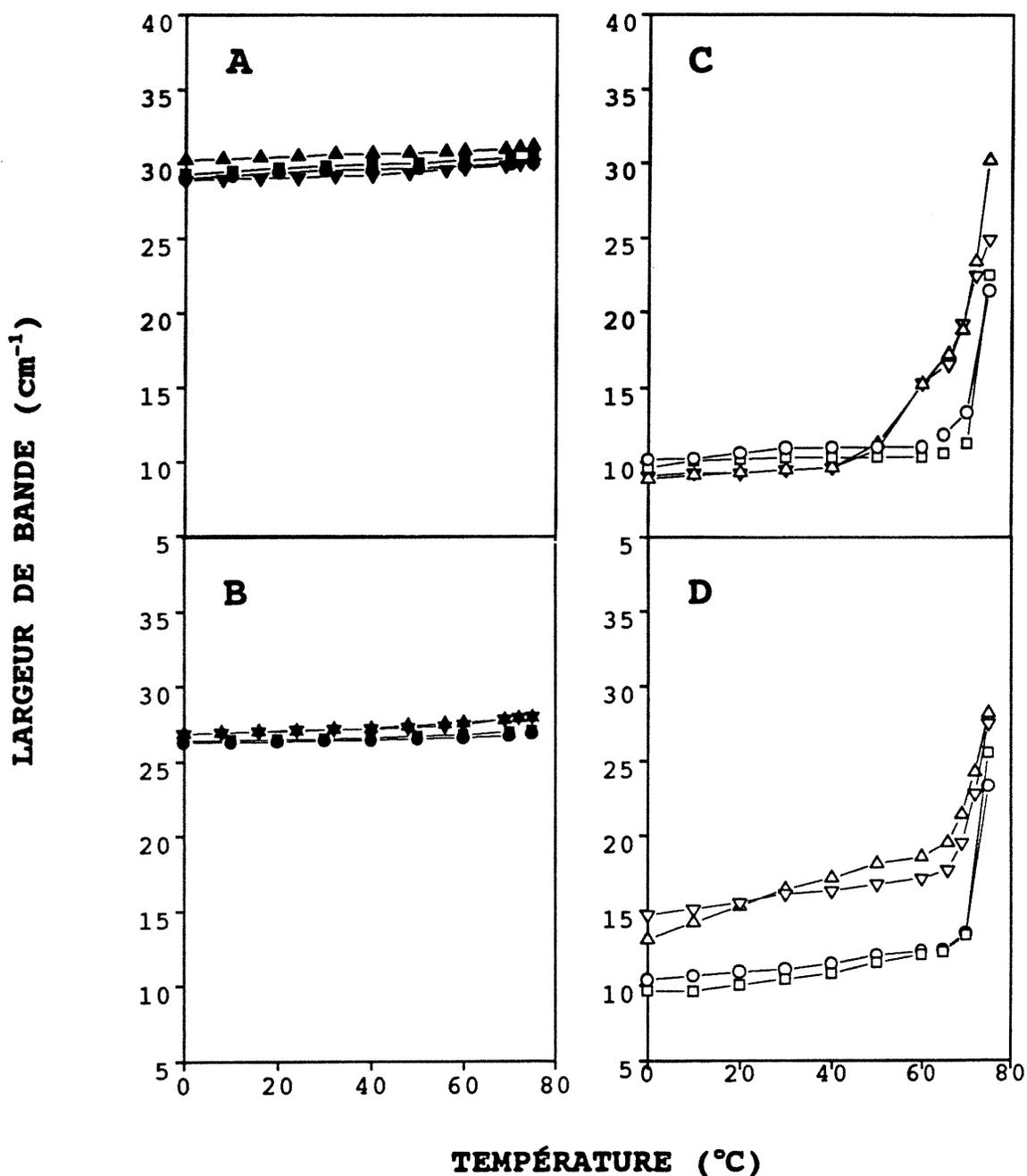
Effet de la température sur la largeur de: A) la bande amide I et B) la bande amide II de la dispersion de sphingomyéline à pH 5.2 et pH 7.4; C) la bande amide I et D) la bande amide II de la dispersion de céramide 3 à pH 5.2 et pH 7.4.

ANNEXE V



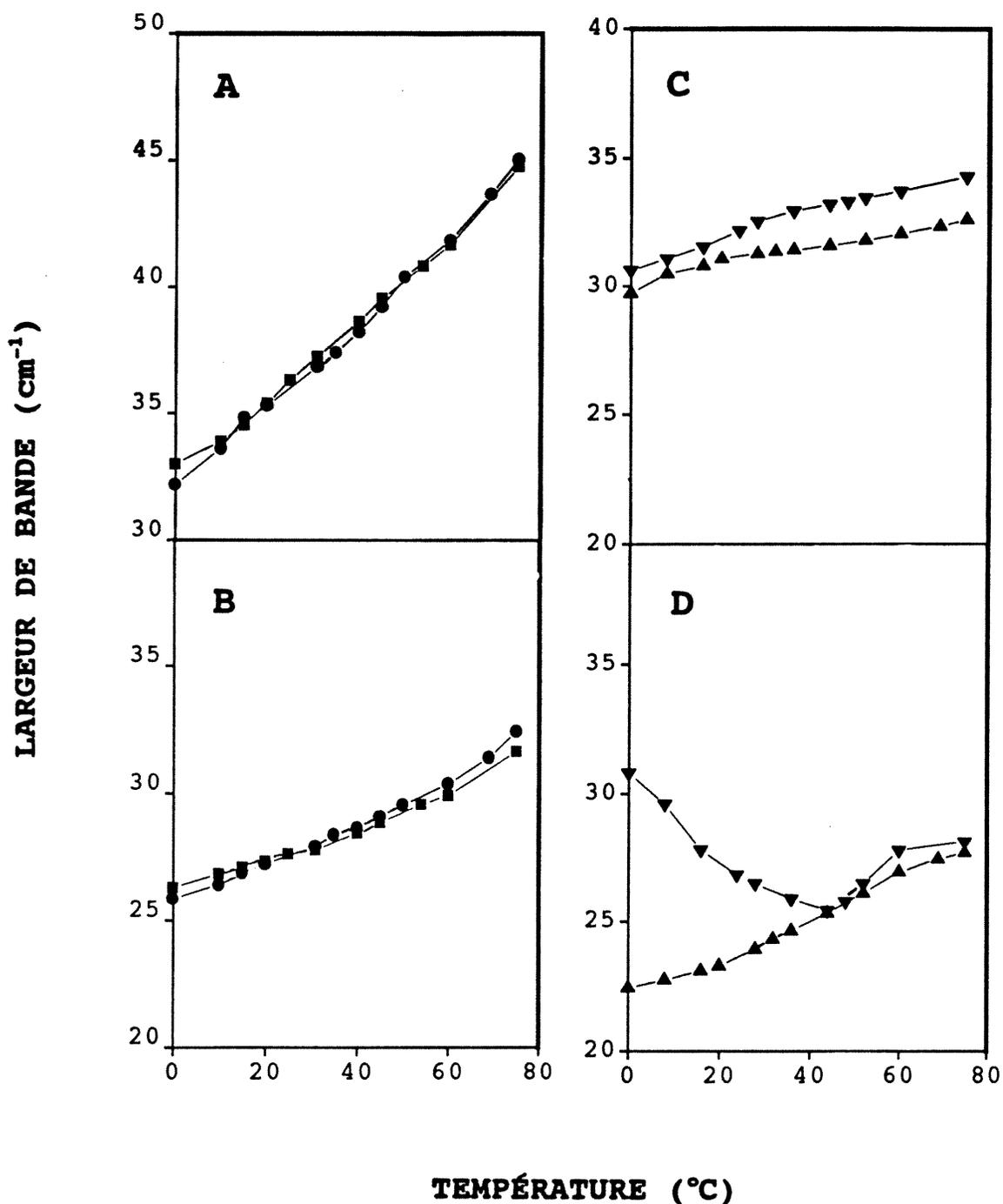
Effet de la température sur la largeur de la bande: A) amide I et B) amide II de la dispersion de SPM/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■); C) amide I et D) amide II de la dispersion de CER3/PA-d<sub>31</sub> à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□).

ANNEXE VI



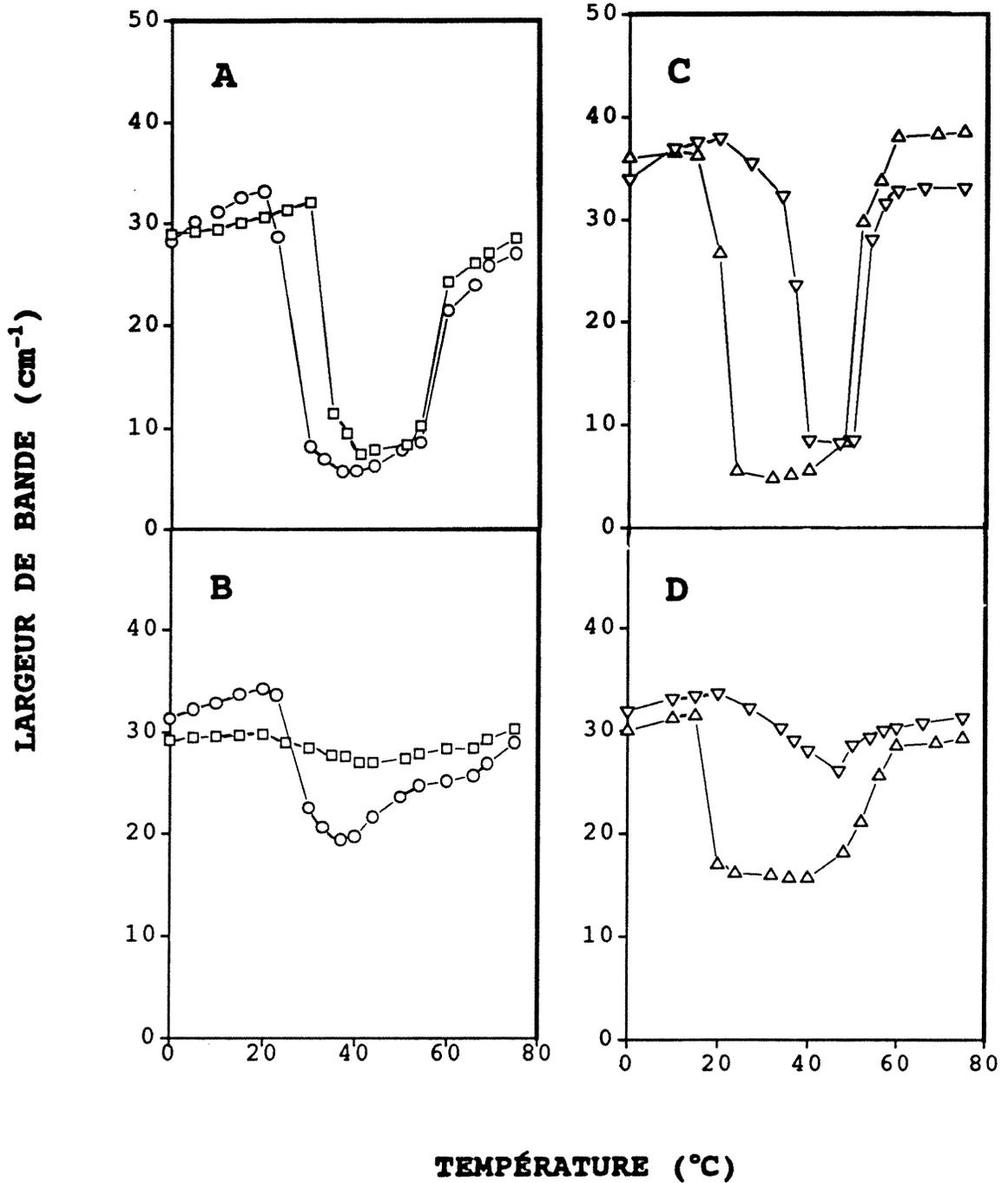
Effet de la température sur la largeur de: A) la bande amide I et B) la bande amide II des dispersions de SPM/Chol à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■) et de SPM/S.Chol à pH 5.2 (▲) et pH 7.4 (▼); C) la bande amide I et D) la bande amide II des dispersions de CER3/Chol à pH 5.2 (○) et pH 7.4 (□) et de CER3/S.Chol à pH 5.2 (△) et pH 7.4 (▽).

ANNEXE VII



Effet de la température sur la largeur de: A) la bande amide I et B) la bande amide II de la dispersion de SPM/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 (●) et pH 7.4 (■); C) amide I et D) amide II de la dispersion de SPM/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 (▲) et pH 7.4 (▼).

ANNEXE VIII



Effet de la température sur la largeur de: A) la bande amide I et B) la bande amide II de la dispersion de CER3/PA-d<sub>31</sub>/Chol à pH 5.2 (o) et pH 7.4 (□); C) la bande amide I et D) la bande amide II de la dispersion de CER3/PA-d<sub>31</sub>/S.Chol à pH 5.2 (Δ) et pH 7.4 (▽).