

UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR - STRASBOURG I

Institut Gilbert Laustriat

UMR CNRS 7175 - LC1 - Faculté de Pharmacie

Thèse

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biophysique

Présentée par

Gora M'BAYE

« Sondes fluorescentes ratiométriques dérivées de la 3-Hydroxyflavone. Etude spectroscopique de nouveaux dérivés et applications en biophysique membranaire »

Soutenue le Vendredi 27 Avril 2007
devant la commission d'examen :

Professeur Panagiotis LIANOS ,	Patras (Grèce)	Rapporteur externe
Dr. André LOPEZ ,	Toulouse	Rapporteur externe
Dr. Raymond ZIESSEL ,	Strasbourg	Rapporteur interne
Professeur Claude HASSELMANN ,	Strasbourg	Examineur, Président de jury
Dr. Andrey S. KLYMCHENKO ,	Strasbourg	Examineur
Dr. Guy DUPORTAIL ,	Strasbourg	Directeur de thèse

Je dédie ce travail...

A ma FAMILLE

A mes amis

A « tous ceux qui paient de leurs douleurs et de leur sang leur attachement à la justice et à la vérité »

Remerciements

A l'Agence Universitaire de la Francophonie (**AU.F**) qui nous a accordé une bourse de recherche

Au Dr Guy DUPORTAIL qui n'a ménagé aucun effort pour la réussite de ce travail

Au Dr Andrey S KLYMCHENKO, pour sa contribution dans l'avancement de ce travail

Au personnel du laboratoire de photophysique des interactions biomoléculaires de la faculté de pharmacie de Strasbourg.

A toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réussite de ce travail.

A toutes les personnes qui m'ont témoigné leur amitié et leur assistance tout au long de cette période.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
ABREVIATIONS.....	5
INTRODUCTION GENERALE.....	7
PREMIERE PARTIE : GENERALITES.....	10
CHAPITRE 1	
SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE ET SONDES FLUORESCENTES	
MEMBRANAIRES.....	11
1. La spectroscopie de fluorescence.....	12
1.1. Diagramme d'énergie et spectre d'absorption.....	12
1.2. Etats excités et spectres d'absorption.....	13
1.3. Le spectre de fluorescence.....	16
1.4. Rendement quantique de fluorescence.....	17
1.5. Le temps de vie de fluorescence.....	18
1.6. Anisotropie de fluorescence.....	18
2. Les sondes fluorescentes membranaires.....	22
2.1. Les sondes de fluidité.....	22
2.1.1. Le DPH et ses dérivés.....	23
2.1.2. Les acides parinariques et leurs dérivés.....	26
2.2. Les sondes de polarité.....	27
2.2.1. Le Prodan et le Laurdan.....	28
2.2.2. Le rouge Nil (Nil Red).....	30
2.3. Les sondes de potentiels membranaires.....	31
2.3.1. Le potentiel de membrane.....	31
2.3.2. Les sondes styryles voltage dépendantes.....	32
CHAPITRE 2	
LES SONDES 3-HYDROXYFLAVONES : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	
1. Réaction intramoléculaire de transfert de proton (ESIPT).....	35
2. Mécanisme de l'ESIPT.....	36
3. Etudes de la fluorescence résolue en temps de l'ESIPT.....	36
4. Applications possibles de l'ESIPT.....	37
5. Evolution de la famille des 3-hydroxyflavones.....	38
6. Les 3-hydroxyflavones en solution.....	39
6.1. L'effet solvatochromique.....	39
6.2. L'effet de la liaison hydrogène.....	44
6.3. La forme anionique.....	46
6.4. La forme anionique.....	48
7. Applications des dérivés de la 3-HF à l'étude des propriétés physico-chimiques des	
bicouches lipidiques.....	49
7.1. Nouveaux dérivés de la 3-HF.....	49
7.2. Localisation des sondes dans la bicouche lipidique.....	52
7.3. Etude de la polarité et de l'hydratation des lipides.....	54
7.4. Etude du potentiel de surface de vésicules lipidiques.....	58
7.5. Etude du potentiel dipolaire dans les vésicules lipidiques.....	61
7.5.1. Le potentiel dipolaire dans une membrane modèle.....	61

7.5.2. L'effet Stark externe dans les vésicules lipidiques.....	63
7.5.3. Stratégie générale de synthèse des nouvelles sondes ratiométriques.....	65
7.6. Applications des sondes 3-HF en biophysique cellulaire.....	66
7.6.1. Mesure du potentiel dipolaire de la membrane plasmique cellulaire.....	66
7.6.2. Mesure du phénomène de l'apoptose.....	69
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....	73
CHAPITRE 3	
MATERELS ET METHODES.....	74
1. Produits chimiques.....	75
1.1. Sondes fluorescentes.....	75
1.2. Lipides.....	76
1.2.1. Phospholipides naturels.....	76
1.2.2. Phospholipides synthétiques.....	77
1.3. Autres composés.....	78
2. Préparation des vésicules lipidiques.....	79
3. Mesures spectroscopiques.....	80
3.1. Spectroscopie d'absorption.....	80
3.2. Spectroscopie de fluorescence.....	80
3.3. Détermination des rendements quantiques de fluorescence.....	80
3.4. Déconvolution des spectres d'émission.....	81
3.5. Détermination de l'hydratation et de la polarité d'une bicouche lipidique.....	85
3.6. Mesure de l'anisotropie de fluorescence.....	85
CHAPITRE 4	
ETUDE ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX DERIVES.....	87
Introduction (Publications 1 et 2).....	88
Publication 1.....	93
Conclusion (publication 1).....	94
Publication 2.....	97
Conclusion (publication 2).....	98
CHAPITRE 5	
APPLICATIONS BIOLOGIQUES.....	102
Introduction (Publication 3).....	103
Publication 3.....	108
Conclusion (publication 3).....	109
Degré d'hydratation des radeaux lipidiques	111
1. Introduction.....	112
2. Résultats	115
2.1. Spectres de fluorescence de F2N8 dans des LUV et préférence de la sonde pour les domaines « non-raft ».....	115
2.2. Formation de la phase Lo induite par le cholestérol.....	117
2.3. Les transitions de phases thermotropiques.....	121
3. Discussion.....	126
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	129

REFERENCES.....133

ABREVIATIONS

(hors sondes fluorescentes)

ATP	Adénosine triphosphate
3-HC	3-hydroxychromone
3-HF	3-hydroxyflavone
BBPS	Bovine Brain Phosphatidyl Serine (<i>Phosphatidylserine de cerveau de bœuf</i>)
Chol	Cholestérol
DMF	Dimethyl formamide
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMTAP	N-(1-(2,3-dimyristoyl)propyl)-N,N,N-trimethylammonium paratoluenesulfonate
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholine
DOPG	Dioleoylphosphatidylglycerol
DPPC	Dipalmitoyl-phosphatidylcholine
DTPC	1,2-di- <i>o</i> -tetradecyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
ESIPT	Excited State Intramolecular Proton Transfer <i>Transfert intramoléculaire de proton à l'état excité</i>
EYPC	Egg Yolk Phosphatidyl Choline (<i>Phosphatidylcholine de jaune d'œuf</i>)
EYPG	Egg Yolk Phosphatidyl Glycerol
EYPE	Egg Yolk Phosphatidyl Ethanolamine
FWHM	Full Width at Half Maximum (<i>Largeur à mi-hauteur</i>)
H-N*	Forme excitée avec liaison hydrogène
6-KC	6-Kétocholestanol
L _α	Phase cristal liquide fluide
L _β	Phase gel
L _d	Phase cristal liquide désordonnée
L _o	Phase cristal liquide ordonnée
LUV	Large Unilamellar Vesicles (<i>Vésicules unilamellaires de grande taille</i>)
MLV	Multilamellar Vesicles (<i>Vésicules multilamellaires</i>)
N*	Forme excitée normale
PBS	Phosphate Buffer saline (<i>Tampon phosphate salin</i>)
SM	Sphingomyéline
T*	Forme excitée tautomère

INTRODUCTION GENERALE

La fluorescence est l'une des méthodes spectroscopiques de détection et d'analyse les plus sensibles et les plus fiables, avec de nombreux domaines d'application, notamment en chimie analytique, en physicochimie, en photochimie, et dans la plupart des domaines de la biologie, de la biochimie à la physiologie en passant par la biologie cellulaire. Dans la mesure où il s'agit d'une technique physique, il est permis d'affirmer que cette spectroscopie de fluorescence constitue une part importante de la BIOPHYSIQUE. Au vu des développements techniques les plus récents, sa haute sensibilité permet actuellement d'aller jusqu'à la détection de molécules individuelles. La fluorescence peut être intrinsèque au système étudié, à savoir que ce système contiendra *sui generi* une molécule fluorescente (par exemple le tryptophane des protéines). Cependant, le plus souvent, la fluorescence est extrinsèque, c'est-à-dire que le système est rendu fluorescent par l'apport d'une molécule fluorescente "étrangère". On parlera alors de sondes fluorescentes

Le succès considérable de la fluorescence moléculaire comme outil d'étude de systèmes biologiques provient, outre sa haute sensibilité, du fait que les caractéristiques de la fluorescence dépendent, très souvent de manière spécifique, de toute modification de l'environnement immédiat de la molécule émissive, et rends ainsi possible l'obtention d'informations spatiales et temporelles sur les divers systèmes biologiques étudiés. Néanmoins, l'interprétation des expériences nécessite une analyse rigoureuse et approfondie afin d'éviter les écueils inhérents à la richesse de la technique. Ainsi, l'un des paramètres les plus communément étudiés n'est autre que l'intensité de fluorescence. Or, ce paramètre dépend aussi de la concentration de la sonde fluorescente dans le milieu étudié. Cette concentration est assez souvent localement mal maîtrisée, notamment en milieu cellulaire (au sein du cytoplasme, d'un organite intracellulaire, d'une biomembrane), ce qui peut conduire à des résultats artefactuels. Afin de circonvenir ce problème, des sondes dites ratiométriques ont été conçues, mesurant non pas une intensité, mais un rapport d'intensités indépendant de la concentration. De nombreuses sondes ratiométriques existent surtout pour des milieux aqueux tel le cytoplasme (ainsi des sondes à pH, ou des sondes permettant de déterminer les concentrations de toute une gamme d'anions ou de cations), mais très peu existent pour être utilisées en milieu membranaire. Cette lacune a conduit à la conception d'une nouvelle catégorie de sondes fluorescentes hydrophobes, basées sur le chromophore 3-hydroxyflavone, qui présentent l'avantage d'être ratiométriques avec deux bandes d'émission résultant d'une réaction de tautomérisation suite à un transfert intramoléculaire de proton à l'état excité. De telles sondes se sont révélées d'un grand apport dans l'étude des membranes biologiques qui constituent un des thèmes majeurs de recherche de

notre laboratoire, notamment en ce qui concerne certaines de leurs caractéristiques (hydratation, polarité, structure,...).

Ainsi notre travail de thèse s'insère dans la suite des travaux poursuivis depuis plusieurs années au laboratoire, consistant à l'aide de dérivés 3-hydroxyflavones et 3-hydroxychromones qui y sont synthétisés, à élucider certaines propriétés des biomembranes en vue d'une application en biophysique cellulaire.

Le présent mémoire comprendra une première partie consacrée d'une part à une revue générale sur la fluorescence et les sondes fluorescentes membranaires, d'autre part à une revue bibliographique relativement exhaustive portant sur la fluorescence des 3-hydroxyflavones, notamment sur les travaux précédemment réalisés au laboratoire. Après quoi nous traiterons de la deuxième partie qui sera consacrée à nos travaux expérimentaux, d'une part l'étude et la caractérisation de deux nouvelles sondes fluorescentes membranaires dérivées de la 3-hydroxyflavone, d'autre part à des applications biologiques de ces sondes en biophysique membranaire, notamment la mesure du potentiel dipolaire de membrane, et l'étude de certaines propriétés, notamment l'hydratation de la membrane, de ce qu'il est convenu d'appeler les radeaux lipidiques.

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

CHAPITRE 1
SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE ET SONDES
FLUORESCENTES MEMBRANAIRES

1. LA SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

La spectroscopie de fluorescence est l'une des méthodes de détection les plus sensibles, avec plusieurs domaines d'application, notamment en biologie. Elle permet d'obtenir une très haute sensibilité (pouvant aller jusqu'à la détection de molécules individuelles). Elle est basée sur la mesure de l'intensité de la lumière émise par fluorescence par une substance après excitation par des photons du domaine du visible ou du proche ultra violet [1].

L'utilisation de la spectroscopie de fluorescence dans l'étude des milieux biologiques résulte de la grande dépendance du spectre d'émission de la molécule fluorescente, vis-à-vis tant de sa propre conformation moléculaire que des caractéristiques de son environnement. Les paramètres les plus souvent utilisés sont : les spectres d'émission et d'excitation, le déplacement de Stokes, l'efficacité de fluorescence (ou rendement quantique), le temps de vie de fluorescence et l'anisotropie de fluorescence (ou polarisation). En outre, le spectre d'absorption de la molécule est d'une importance primordiale puisqu'il conditionne ses conditions d'excitation, notamment la longueur d'onde. Dans le présent chapitre, nous présenterons un bref descriptif de ces notions.

1.1. Diagramme d'énergie et spectre d'absorption

Les caractéristiques d'absorption et d'émission d'un fluorophore peuvent être décrites à partir du diagramme d'énergie, aussi qualifié de diagramme de Jablonski. Le diagramme présenté dans la Figure.1 donne une représentation schématique des différents niveaux d'énergie électronique du fluorophore (molécule fluorescente), et des différents niveaux d'énergie vibrationnelle propres à chaque niveau électronique. Il existe aussi des niveaux rotationnels pour chaque niveau vibrationnel, mais ils ne sont pas représentés sur la figure. Ce sont cependant ces derniers qui contribuent à donner à un spectre de fluorescence son aspect lissé.

Ces différents niveaux énergétiques sont de l'ordre de :

- 0,4 à 3 eV pour les niveaux électroniques ;
- 0,04 à 0,4 eV pour les niveaux vibrationnels ;
- 0,04 eV pour les niveaux rotationnels.

Les transitions quantiques intervenant dans l'absorption de la lumière visible ou ultraviolette par un chromophore interviennent entre les niveaux d'énergie des électrons périphériques des orbitales moléculaires. Il s'agit de transitions mettant en jeu des orbitales π et des électrons délocalisés. Plus la délocalisation est importante, plus la longueur d'onde du rayonnement électromagnétique est grande. Ainsi la molécule de benzène absorbe vers 220 nm dans l'UV lointain, alors que le diphénylhexatriène absorbe à 350 nm, dans l'UV proche.

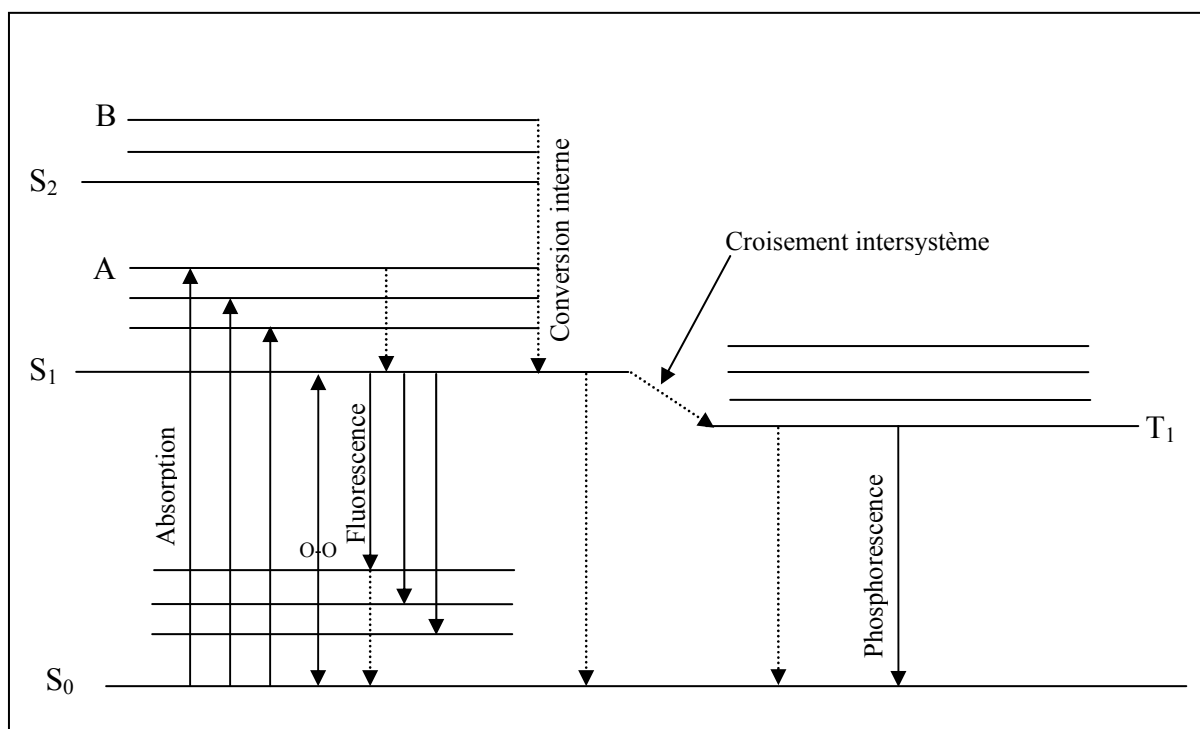


Figure 1. Niveau d'énergie d'un fluorophore. *Flèches pleines* : absorption ou émission de lumière, *flèches en pointillé* : processus non radiatifs. S_0 est l'état fondamental électronique singulet, S_1 et S_2 sont respectivement le premier et le second état électronique excité. T_1 est le premier état triplet.

Le phénomène d'absorption fait également intervenir le moment de transition d'absorption, qui est une quantité vectorielle dépendant de la répartition électronique au sein du chromophore considéré. Cette considération est surtout importante lorsque l'on utilise une lumière d'excitation polarisée. Nous y reviendrons pour l'anisotropie de fluorescence.

1.2. Etats excités et spectre d'absorption

Un état singulet (S_0, S_1, \dots) correspond à une configuration électronique de la molécule considérée pour laquelle les électrons sont appariés, avec un spin total égale à zéro. A l'opposé, un état triplet correspond à une configuration électronique pour laquelle les électrons sont non appariés, avec un spin total égal à 1.

A température ambiante, la presque totalité des molécules sont dans leur plus bas niveau d'énergie électronique, c'est-à-dire le niveau fondamental S_0 , et à l'intérieur de celui-ci, dans le sous-niveau vibrationnel le plus bas. En effet, la proportion de molécules présentes dans chacun des niveaux est proportionnelle à $e^{\frac{-E}{kT}}$, avec E égal à l'énergie du niveau considéré (mesurée à partir du niveau fondamental) et $kT = 0.026eV$ (à $25^\circ C$).

Comme l'énergie du premier niveau excité (vibrationnel ou électronique) est toujours supérieure à kT , cela explique que la presque totalité des molécules soient à l'état fondamental.

Lorsqu'une solution de molécules fluorescentes est illuminée par un faisceau de lumière de longueur d'onde λ , ces molécules peuvent absorber les photons correspondants si leur énergie $\left(h\nu = \frac{hc}{\lambda}\right)$ est égale exactement à la différence d'énergie entre le niveau fondamental et l'un des sous-niveaux d'énergie de l'un des états excités. En faisant varier la longueur d'onde du faisceau incident, on aura une absorption d'énergie chaque fois que l'énergie d'un photon sera égale à la différence entre deux niveaux d'énergie. En spectroscopie d'absorption, les plus importantes transitions concernent les excitations allant du niveau singulet S_0 (état fondamental) aux niveaux singulet excités S_1 ou S_2 (les transitions optiques entre l'état singulet S_0 et l'état triplet sont faibles et imperceptibles pour les spectrophotomètres ordinaires). Les spectres découlant de ces transitions sont appelés spectres d'absorption électroniques. Pour les molécules fluorescentes d'intérêt biologique, ces spectres se situent généralement dans les régions du visible et de l'ultraviolet du spectre électromagnétique (250-600 nm). A titre d'exemple, la Figure 2 montre le spectre d'absorption électronique de l'anthracène en solution dans le cyclohexane, dans la région spectrale allant de 290 à 380 nm. Les bandes étroites à l'intérieur même du spectre d'absorption découlent de la structure vibrationnelle de la molécule et correspondent aux transitions entre le niveau fondamental et les différents sous-niveaux vibrationnels du premier état excité électronique. La première bande vibrationnelle centrée à 378 nm, correspondant à la transition entre les niveaux vibrationnels zéro de l'état fondamental S_0 et de l'état électronique S_1 , est appelée la transition 0-0 (Fig.1). Des bandes d'absorption additionnelles (non montrées sur la figure 2) apparaissent en deçà de 290 nm, et correspondent aux transitions entre le niveau fondamental et les états électroniques plus élevés.

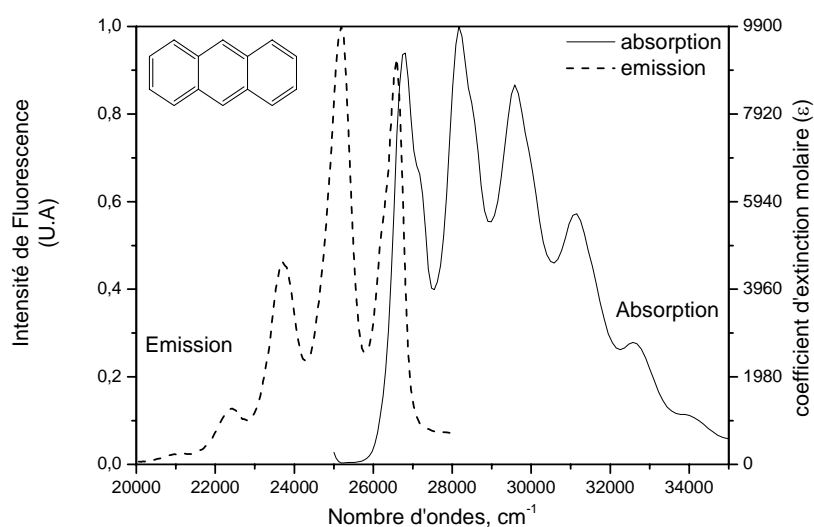


Figure 2. Spectres d'absorption et d'émission de l'anthracène dans le cyclohexane

Il convient de noter que beaucoup de fluorophores n'ont pas de structure vibrationnelle dans leurs spectres d'absorption (Fig.3), et dans certains cas le spectre d'un fluorophore diffère selon que le solvant soit polaire ou non polaire. Les spectres continus (spectres sans structure vibrationnelle résolue) résultent de sous-niveaux vibrationnels et rotationnels très proches mais aussi d'interactions soluté-solvant qui altèrent la séparation entre les niveaux d'énergie du diagramme d'énergie. En conséquence, les bandes vibrationnelles du spectre d'absorption s'élargissent jusqu'à se recouvrir totalement pour donner un spectre non résolu. Nous reviendrons sur les interactions soluté-solvant lorsque nous aborderons les sondes sensibles à la polarité.

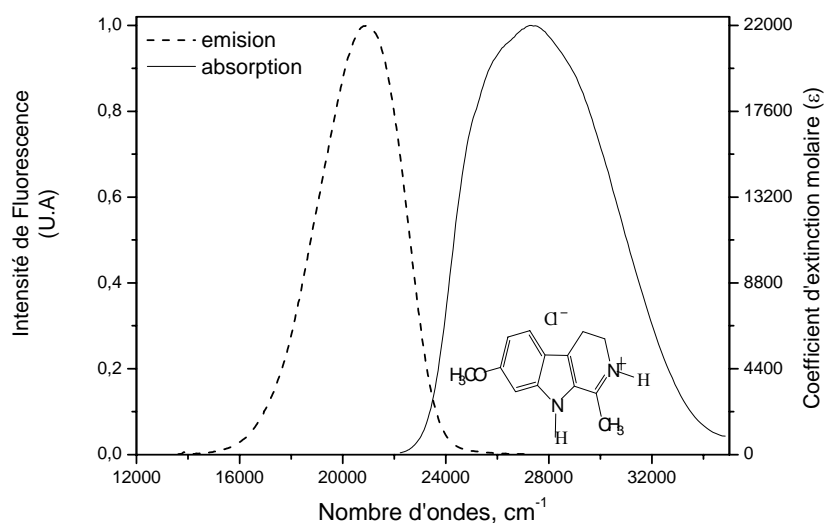


Figure 3. Spectres d'absorption et d'émission de l'harmaline dans de l'eau à pH 7.

1.3. le spectre de fluorescence

Lorsqu'une molécule est portée par excitation à un niveau d'énergie supérieur tel que S_1 ou S_2 (Fig.1), elle redescend rapidement (durée $< 10^{-10}$ s) au premier niveau vibrationnel du premier état excité S_1 , perdant le surplus d'énergie par chocs moléculaires avec le solvant sans émettre de lumière. Ce phénomène est donc non radiatif. Cependant une émission de lumière peut survenir à partir du niveau vibrationnel zéro de S_1 , la molécule considérée est alors fluorescente. Cette émission de lumière résulte de transitions radiatives entre le niveau vibrationnel zéro du premier état excité S_1 et les niveaux vibrationnels de l'état fondamental (Fig.1) et génèrent donc un spectre de fluorescence. Il est important de remarquer que le point de départ d'une transition électronique, à l'absorption comme à l'émission, est toujours le sous-niveau vibrationnel le plus bas de l'état électronique considéré, S_0 ou S_1 , respectivement.

Les spectres de fluorescence présentent certaines caractéristiques :

- Un fluorophore dans un solvant donné donne lieu à un spectre d'émission unique et bien caractérisé. Notamment, ce spectre est indépendant de la longueur d'onde de la lumière excitatrice. Ceci résulte directement du fait que le fluorophore émet à partir du seul niveau radiatif précisé ci-dessus ;

- le spectre de fluorescence correspond toujours à une gamme de longueurs d'onde plus élevée que celle du spectre d'absorption. Ceci s'explique aisément à partir du diagramme d'énergie, qui montre que les sauts d'énergie des transitions d'émission ont une énergie systématiquement moindre que pour les transitions d'absorption (énergie plus élevée, longueur d'onde plus petite), à la seule exception des transitions 0-0 qui ont toutes deux la même énergie. Ce décalage vers le rouge peut-être quantifié par l'écart entre la position de la première bande d'absorption et celle du maximum du spectre de fluorescence (exprimée en nombres d'onde), $\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$, appelé déplacement de Stokes. Sur le plan pratique, plus le déplacement de Stokes est important, plus il est facile d'isoler la lumière de fluorescence de la lumière d'excitation par des filtres adéquats [2]. Il en résulte que les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence peuvent donc présenter une zone de recouvrement. Ce recouvrement peut être altéré, voire supprimé par l'interaction soluté-solvant ;

- la forme et la position du spectre d'émission sont sensibles aux propriétés du milieu environnant. Ceci découle de la perturbation des niveaux d'énergie du fluorophore par les interactions dipolaires et électrostatiques (dans ce dernier cas pour les espèces chargées) existant entre les molécules de solvant et le fluorophore. En général, ces interactions augmentent avec la polarité du solvant, elles déplacent les spectres d'absorption et d'émission vers les grandes longueurs d'onde (bathochromisme) et élargissent les bandes vibrationnelles. Cependant, l'amplitude du déplacement n'est pas la même pour les spectres d'émission et d'absorption. Ceci est dû à la différence des interactions entre les molécules de solvant et celles du fluorophore, selon qu'il se trouve à l'état fondamental ou à l'état excité. Nous détaillerons ce point plus amplement dans un prochain chapitre.

1.4. Le rendement quantique de fluorescence

Du fait de la compétition entre les processus radiatifs et non radiatifs, toutes les molécules excitées n'émettent pas de photons de fluorescence. Pour un fluorophore donné, le rendement quantique de fluorescence est le rapport entre le nombre de photons émis et celui absorbé.

$$\phi_F = \frac{N_{ém}}{N_{abs}}$$

Le rendement quantique de fluorescence peut aussi être défini en termes de paramètres cinétiques. Le rendement quantique est essentiellement indépendant de la longueur d'onde d'excitation, et sa valeur dépend de la "balance" entre le processus de fluorescence proprement dit (émission d'un photon) et l'ensemble de processus non radiatifs (sans émission d'un photon) comme la conversion interne (retour non radiatif à l'état fondamental) la conversion vers l'état triplet, éventuellement la décomposition de la molécule à l'état excité. Selon les molécules considérées, il peut varier de 1 pour les molécules les plus fluorescentes à 0 pour les non fluorescentes. D'autres phénomènes peuvent contribuer à la diminution du rendement quantique :

- les collisions avec les molécules environnantes, en particulier avec les molécules de solvants, peuvent inhiber la fluorescence. On parle alors d'inhibition de fluorescence ("quenching") ;

- certains corps peu fluorescents en milieu polaire (dans l'eau), peuvent le devenir en milieu non polaire. Ce type de molécules trouve son utilité pour évaluer les variations de polarité de l'environnement ;

- des phénomènes de transfert d'énergie peuvent survenir entre les molécules voisines ; un chromophore absorbe un quantum de lumière puis le transfère (par un phénomène de résonance) à une molécule voisine qui va le réémettre. Le chromophore qui absorbe verra donc son rendement quantique de fluorescence diminuer. Ce processus de transfert dépendra de la distance entre les partenaires et de leur orientation réciproque. Il s'agit du transfert d'énergie de fluorescence.

1.5. Le temps de vie de fluorescence

Le temps de vie de fluorescence τ est défini par l'expression :

$$I(t) = I_0 e^{\frac{-t}{\tau}}$$

Il décrit la décroissance de l'intensité de fluorescence $I(t)$ consécutive à l'excitation d'une solution de fluorophore par une impulsion lumineuse de courte durée. Il est défini comme le temps nécessaire pour faire baisser l'intensité de fluorescence $I(t)$ d'un facteur $1/e$ à partir de sa valeur initiale I_0 . Le temps de vie de fluorescence est indépendant de la longueur d'onde d'excitation. Ceci découle du fait que les molécules excitées à un niveau d'énergie supérieur à S_1 , retombent au niveau d'émission S_1 extrêmement rapidement (10^{-12} à 10^{-11} s), les rendant ainsi indétectables par un dispositif dont la sensibilité est de l'ordre de la nanoseconde.

Outre sa définition expérimentale, le temps de vie de fluorescence peut être défini en termes cinétiques par la relation :

$$\frac{1}{\tau} = k_e + k_{nr},$$

k_e étant la constante d'émission radiative (émission provenant du niveau excité) radiatif et k_{nr} la constante d'émission non radiative relative à l'ensemble des processus non radiatifs du niveau d'émission.

Il existe une relation entre le rendement quantique ϕ_F et la durée de vie τ . En effet :

$$\phi_F = \frac{k_e}{(k_e + k_{nr})}$$

$$\phi_F = k_e \tau$$

1.6. L'anisotropie de fluorescence

Les concepts précédents ont été définis pour une excitation en lumière naturelle. La notion d'anisotropie de fluorescence se définit à partir d'une excitation en lumière polarisée. La probabilité d'absorption (P_A) d'une lumière linéairement polarisée par une molécule est proportionnelle à l'angle que fait le vecteur champ électrique \vec{E}_o du photon incident avec la direction du moment dipolaire de la transition d'absorption $\vec{\mu}_A$ porté par cette molécule. Plus précisément, on peut montrer que la probabilité d'absorption est proportionnelle à $\cos^2\theta$ si θ est l'angle entre $\vec{\mu}_A$ et \vec{E}_o .

Ainsi, lorsqu'on excite une population de molécules réparties de façon isotrope avec une radiation polarisée linéairement, la distribution des molécules passées à l'état excité n'est plus isotrope. Les molécules qui à un instant donné auront une direction de $\vec{\mu}_A$ parallèle à \vec{E}_o absorberont avec plus de probabilité : il y a photosélection (Fig. 4).

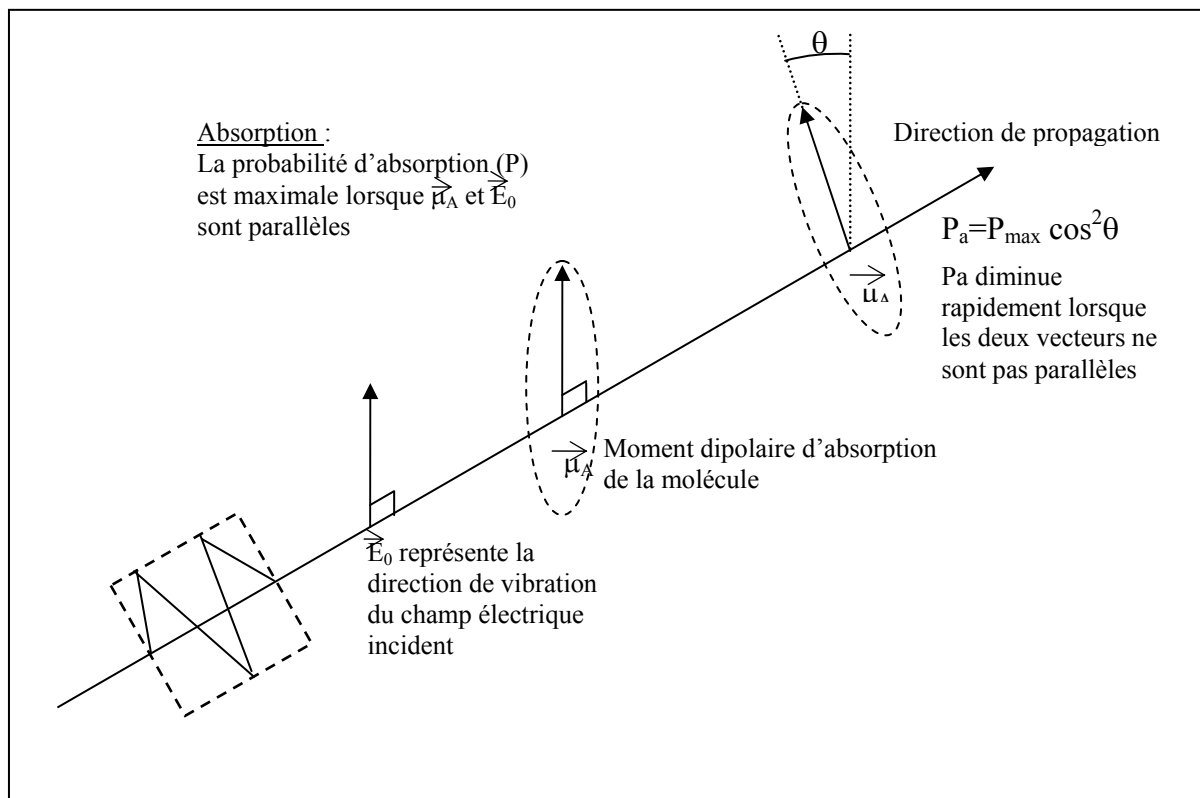


Figure 4. Principe de la photosélection à l'absorption d'une lumière verticalement polarisée [3].

Lors de l'émission, on aura une représentation analogue. Ainsi on définit un moment de transition d'émission $\vec{\mu}_E$ correspondant au retour à l'état S_0 par fluorescence. A ce moment de transition d'émission porté par la molécule correspond un dipôle oscillant qui émet un rayonnement polarisé. Si on convient d'observer la fluorescence émise par toutes les molécules (donc pour une orientation quelconque des $\vec{\mu}_E$) suivant une direction donnée, on caractérisera l'état de polarisation de cette lumière en définissant deux intensités $I_{//}$ et I_{\perp} : l'une correspondant à une émission polarisée parallèlement au champ \vec{E}_0 incident, l'autre à une émission polarisée perpendiculairement, non nulle du fait de la dépolarisation. On définit alors, à partir de $I_{//}$ et I_{\perp} , soit le taux de polarisation P , soit l'anisotropie de fluorescence r :

$$P = \frac{(I_{//} - I_{\perp})}{(I_{//} + I_{\perp})} \quad r = \frac{(I_{//} - I_{\perp})}{(I_{//} + 2I_{\perp})} \quad r = \frac{2P}{(3 - P)}$$

r , contrairement à P possède la propriété d'additivité dans le cas d'une émission composite :

$$r = \sum \alpha_i r_i \quad (\alpha_i = \text{la fraction de lumière d'anisotropie } r_i).$$

Si les molécules fluorescentes se trouvent immobilisées dans un milieu très visqueux ou solide, les dipôles d'émission $\vec{\mu}_E$ auront les mêmes directions, par rapport aux $\vec{\mu}_A$, pour toutes

les molécules, sans pour autant que $\vec{\mu}_A$ et $\vec{\mu}_E$ soient confondus (ce qui correspond à un cas particulier). Il n'y a pas de mouvement de rotation possible pour les molécules mais comme le milieu est isotrope, toutes les orientations des molécules sont possibles. Si α_0 désigne l'angle caractérisant intrinsèquement la direction de $\vec{\mu}_E$ par rapport à celle de $\vec{\mu}_A$ dans une molécule, l'anisotropie de fluorescence alors mesurée correspond à l'anisotropie fondamentale r_0 , caractéristique intrinsèque d'une assemblée de molécules immobiles :

$$r_0 = \frac{(3 \cos^2 \alpha_0 - 1)}{5}$$

Pendant le temps τ que dure l'état excité, la molécule est soumise au mouvement brownien de rotation dû à l'agitation thermique. Si ce mouvement est suffisamment rapide devant τ , la population de molécules excitées peut redevenir isotrope : la polarisation de la lumière émise est alors nulle. Mais, si ce mouvement est suffisamment lent, la population de molécules fluorescentes reste plus ou moins anisotrope et peut alors relier l'anisotropie de fluorescence à l'amplitude de rotation de la molécule durant le temps τ . Dans le cas de fluorophores mobiles, l'anisotropie de fluorescence dépend donc de l'amplitude du mouvement du chromophore entre le moment où il a été excité et le moment où le photon de fluorescence est émis. Si on appelle $\alpha(r)$ l'angle correspondant à cette rotation, il sera d'autant plus grand que la durée de vie τ sera longue. Ceci revient à introduire entre $\vec{\mu}_A$ et $\vec{\mu}_E$ non plus un angle constant α_0 mais une fonction aléatoire :

$\alpha = \alpha_0 + \alpha(\tau)$; le vecteur $\vec{\mu}_E$ lié à la molécule jouant le rôle d'indicateur de sa position angulaire (Fig.5).

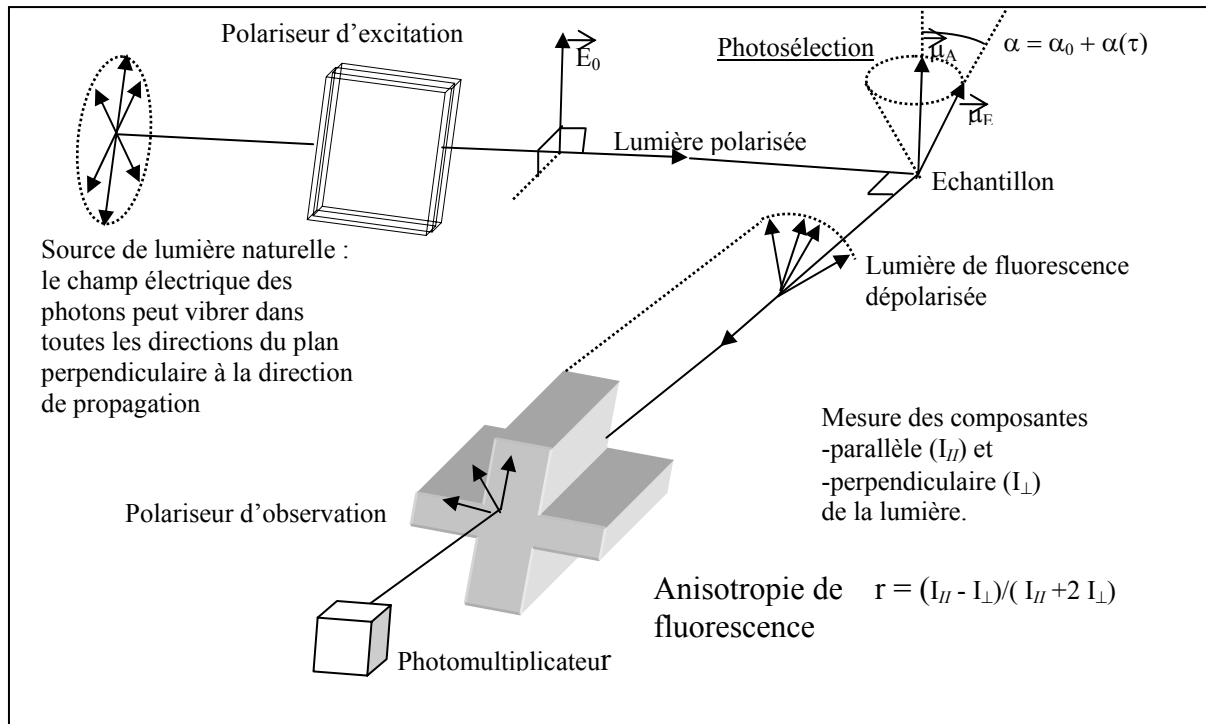


Figure 5. Principe de mesure de l'anisotropie de fluorescence [3].

On peut ainsi mesurer l'anisotropie en fonction du temps (déclin d'anisotropie) $r(t)$ qui dépend de la mobilité du chromophore et du temps t écoulé entre l'absorption et l'émission. Dans le cas de fluorophores en mouvement dans des solutions isotropes, on peut déduire de l'équation de Perrin l'expression qui permet de lier l'anisotropie aux paramètres impliqués dans la rotation de la molécule.

Ainsi : $r(t) = r_o e^{(-6D_r t)}$; où D_r est la constante de diffusion de rotation.

On fait plus communément des mesures statiques de r , en excitation continue (anisotropie de fluorescence à l'état stationnaire). En tenant compte de la double origine, intrinsèque et brownienne, de l'angle entre $\vec{\mu}_A$ et $\vec{\mu}_E$, et en moyennant sur toutes les molécules qui fluorescent dans la solution, on obtient la relation de Perrin :

$$\frac{r_o}{r} = 1 + D_r \tau$$

Pour une molécule sphérique de volume hydrodynamique V dans un milieu de viscosité η :

$$D_r = \frac{kT}{6\eta V} \quad (k = \text{constante de Boltzmann}) \quad \text{d'où} \quad \frac{r_o}{r} = 1 + \left(\frac{kT\tau}{\eta V} \right).$$

Donc, en principe, une mesure d'anisotropie de fluorescence à l'état stationnaire permet de mesurer la constante de diffusion brownienne de rotation de la molécule dans un milieu donné ou la viscosité de ce dernier.

2. LES SONDES FLUORESCENTES MEMBRANAIRES

Les membranes lipidiques constituent l'ossature des parois cellulaires et sont une structure d'accueil pour des protéines et des enzymes possédant un rôle essentiel dans le fonctionnement des processus cellulaires. Les propriétés physicochimiques de ces membranes interviennent directement dans l'expression des fonctions biochimiques de ces protéines. Notamment, les propriétés d'une membrane lipidique peuvent être affectées par de nombreux facteurs tels la température, la composition en lipides et en protéines ou l'incorporation dans la matrice lipidique d'autres molécules. Egalement, l'hétérogénéité des constituants d'une membrane naturelle peut conduire à des séparations en domaines de phases différentes. En conséquence, il existe un réel besoin de posséder des outils qui présentent une bonne sélectivité pour mesurer différents paramètres physicochimiques d'une membrane, parmi lesquels on peut citer la fluidité, la polarité, les potentiels électriques, ou le degré d'hydratation. Dans cette perspective, les sondes fluorescentes constituent de façon privilégiée, l'un de ces outils.

Présenter une revue des sondes fluorescentes, et plus particulièrement concernant notre propos, des sondes fluorescentes membranaires, est une tâche ardue tant le nombre de ces sondes va croissant, et une telle revue pourrait aisément "tourner" au catalogue. Nous faisons donc le choix de nous limiter, dans le présent rappel, à certaines catégories de sondes membranaires ayant démontré leur intérêt, et dont certaines propriétés ou utilisations peuvent être utilement comparées avec les sondes dérivées de la 3-hydroxyflavone au cœur de notre travail. L'un des critères les plus importants dans le choix d'une sonde fluorescente est sa sensibilité à une propriété particulière de son environnement. Dans ce chapitre, nous mettrons l'accent sur les sondes membranaires ayant fait leurs preuves dans la mesure de différents paramètres physiques d'une biomembrane, à savoir : les sondes de fluidité, les sondes de polarité et les sondes dites de potentiel.

2.1. les sondes de fluidité

De nombreuses molécules fluorescentes hydrophobes ont été utilisées, avec des fortunes diverses, comme sondes de "fluidité membranaire". En général, pour la plupart de ces sondes, l'approche consiste à mesurer l'amplitude du mouvement (le "wobbling") des chaînes d'acides

gras des phospholipides constitutifs de la bicouche lipidique, en considérant qu'une sonde fluorescente hydrophobe incorporée dans la bicouche est elle-même solidairement affectée d'un mouvement identique à celui des chaînes d'acides gras environnantes. En conséquence, les sondes les plus adaptées à cette mesure de fluidité membranaire sont des sondes linéaires dont la forme et la taille sont à peu près celles des chaînes grasses des phospholipides. Deux catégories de sondes répondent à ce critère : le diphénylhexatriène et ses dérivés, et les acides parinariques. Ces fluorophores ont des dipôles d'émission et d'excitation pratiquement colinéaires à leur grand axe moléculaire. Ainsi la rotation autour de ce grand axe moléculaire n'apporte aucune contribution à la dépolarisation de fluorescence, alors que les rotations autour des deux axes restant (orthogonaux entre eux et par rapport au grand axe) peuvent toutes deux être à l'origine d'une dépolarisation de fluorescence.

2.1.1. le Diphénylhexatriène et ses dérivés

La sonde fluorescente la plus utilisée en mesure de fluidité membranaire est sans conteste le diphénylhexatriène (DPH) [4]. Pour cette raison, ses caractéristiques spectroscopiques ont été largement étudiées. Son spectre d'absorption présente un déplacement bathochrome marqué avec la polarité du solvant. Cette propriété, ainsi que le fort coefficient d'extinction molaire du pic principal ($\epsilon_M \sim 80000$ à 360 nm), suggère un moment de transition élevé vers un état excité hautement polarisé résultant d'une transition $\pi \rightarrow \pi^*$, comme attendu pour un système polyénique [5]. A l'opposé, le spectre d'émission est peu sensible à la polarité du solvant et ne montre qu'un léger recouvrement avec le spectre d'absorption (Fig.6). Pratiquement insoluble dans l'eau, cette molécule présente en milieu hydrophobe des paramètres de fluorescence idéaux (rendement quantique élevé : $\Phi \geq 0.8$; temps de vie long : 8 à 10 ns, anisotropie fondamentale $r_0 = 0.362$). Sa longueur est d'environ 13 Å, ce qui correspond à la moitié de l'épaisseur d'un feuillet lipidique.

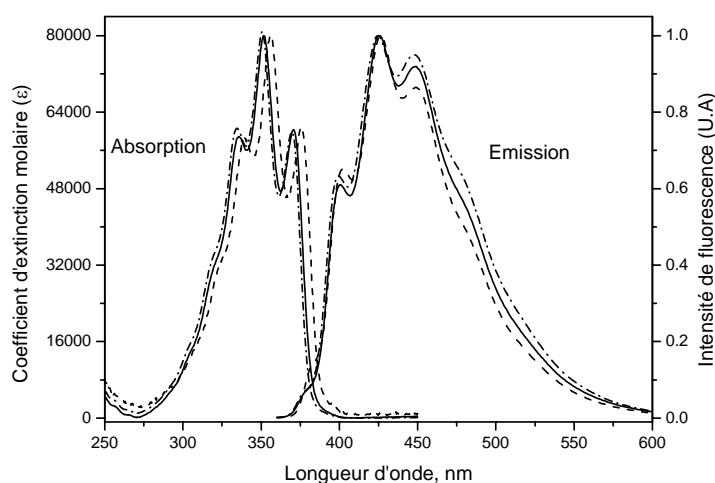


Figure 6. Spectres d'émission (à droite) et d'absorption (à gauche) du DPH dans l'éthanol (—),

le dioxane (---) et le N-hexane (·-·-·-·).

Un certain nombre de molécules dérivées contenant le noyau DPH dans leur structure ont également été utilisées comme sondes de fluidité. Les plus connues sont le 1-[4-triméthyl(amino)phényl]-6-phényl hexa-1,3,5-triène (TMADPH) [6], le (2-carboxyéthyl)-1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (CE-DPH) [7] et le dérivé phospholipidique 1-palmitoyl-2-[4-(6-phényl-trans-1,3,5-hexatriènyl)-phényl]éthyl]carbonyl]-3-sn-phosphatidylcholine(DPHpPC) [7,8] (Fig.7).

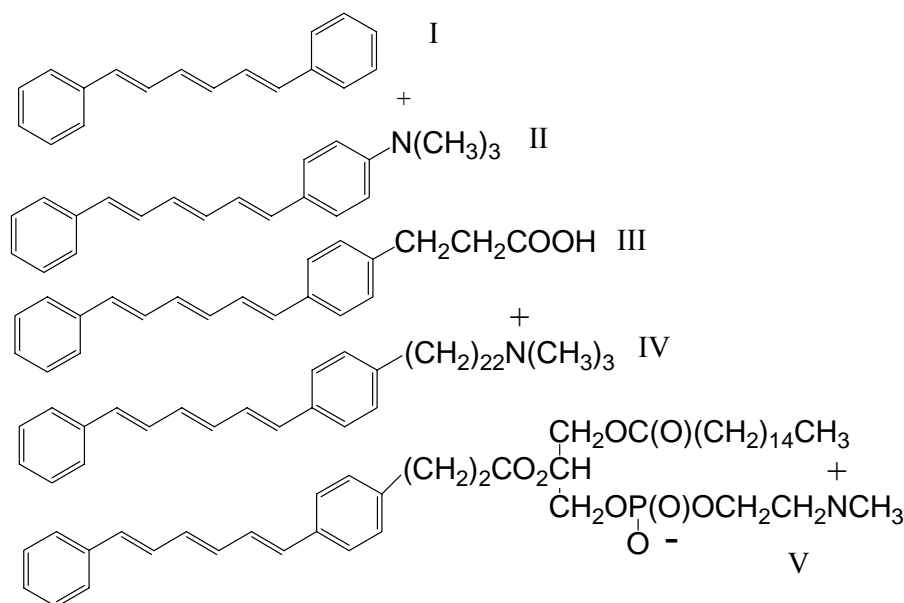


Figure 7. Structures chimiques du DPH et de ses dérivés. I: DPH; II: TMA-DPH; III: CE-DPH; IV: LcTMA-DPH; V:DPHpPC

Ces dérivés, dont les propriétés de fluorescence sont très voisines de celle de la molécule mère, permettent de lever l'ambiguïté concernant la localisation exacte du fluorophore DPH dans la bicouche lipidique. En effet, par l'intermédiaire de leur tête hydrophile, ces dérivés se fixent à l'interface de la bicouche assurant ainsi au noyau DPH un positionnement parfaitement défini en fonction de la structure de la molécule, tout en conservant son alignement avec les chaînes d'acides gras des phospholipides.

La plus ou moins grande facilité d'incorporation et de migration d'une sonde membranaire dans et hors d'une membrane est une caractéristique qui mérite attention. Ainsi, le DPH s'incorpore relativement lentement dans la membrane plasmique (~ 30 minutes) après injection dans la suspension aqueuse de cellules à partir d'une solution stock organique, mais migre simultanément, sans rétention au niveau de la membrane plasmique, vers les membranes intracellulaires.

Le DPH n'est donc pas utilisable en biologie cellulaire, car il ne donne pas d'information spécifique. Le TMA-DPH, au contraire s'incorpore très rapidement dans la membrane plasmique (~ 1 minute), mais y reste suffisamment longtemps (près de 30 minutes), vraisemblablement au niveau du feuillet externe, sans migrer à l'intérieur de la cellule [9,10]. Dû à sa tête polaire cationique, le mouvement de flip-flop entre les deux feuillets doit s'en trouver fortement ralenti. Cette propriété du TMA-DPH a été utilisée pour des mesures spécifiques de la membrane plasmique cellulaire, ainsi que pour la mesure des cinétiques d'endocytose [11].

Le DPH se partitionne de manière quasi identique dans les zones lipidiques en phase "cristal liquide" ou en phase "gel". Son coefficient de partition ($K_{f/s}$) est pratiquement égal à 1 [10]. Ainsi, dans un système membranaire hétérogène, le DPH se distribuera de façon aléatoire sur l'ensemble des domaines lipidiques et la fluidité mesurée sera une moyenne sur l'ensemble de la membrane. Les dérivés du DPH, par contre, ne partagent pas cette propriété d'équipartition. Ainsi, le TMA-DPH comme le DPHpPC se répartissent préférentiellement dans les domaines fluides d'une vésicule lipidique ou d'une biomembrane ($K_{f/s} = 3.2$) [8]. Au laboratoire a été conçu un dérivé à longue chaîne paraffinique, le 22-diphenylhexatriényldocosyl-triméthylammonium (LcTMADPH) qui présente un coefficient de partition inversé en faveur de la phase gel ($K_{f/s} = 0.22$) [12]. Après un "sommeil" de près de dix ans, cette sonde a trouvé toute son utilité dans le marquage des phases liquides ordonnées des zones "rafts" des membranes [13].

Du fait de la dissemblance de structures entre les phospholipides constitutifs de la membrane et le résidu DPH, qui ne correspond à aucun caractère biologique, il est légitime de se demander si un tel résidu peut perturber la structure d'une bicouche et donc fausser le résultat de la mesure (Notons que ce type de question peut se poser pour tout type de sonde extrinsèque). Par comparaison avec des mesures de calorimétrie, il a été montré que la présence de DPH ou de DPHpPC dans des vésicules de DPPC n'abaisse que très légèrement (0.5 °C) la température de transition de phase de ce lipide [8,14]. Ceci montre que de telles sondes ne perturbent pas de manière importante la structure de la membrane étant donné les faibles concentrations auxquelles elle sont utilisées (0.1-2 mol %). Un argument majeur sera apporté dans le même sens en considérant les résultats obtenus avec les acides parinariques.

2.1.2. les acides parinariques et leurs dérivés

Les acides parinariques, à savoir l'acide cis-parinarique (*acide-9,11,13,15-cis,trans,trans,cis octadécatétraénoïque*) et l'acide trans-parinarique (*acide-9,11,13,15-trans,trans,trans,trans octadécatétraénoïque*) (Fig.8) sont des acides gras naturels initialement

isolés de la graine d'une plante d'Océanie, *Parinari laurinum*. L'isomère cis présente une conformation spatiale identique aux chaînes d'acides gras insaturées, dont les phospholipides correspondants se trouvent à l'état cristal liquide fluide. Au contraire, la conformation entièrement trans et par conséquent sans aucun coude de l'isomère trans lui procure une forme toute en longueur qui le fait ressembler aux chaînes d'acides gras saturées donnant lieu à un état gel. Cette remarque permet de comprendre pourquoi les coefficients de partition entre zones fluides et zones gel d'une membrane, $K_{f/s}$, différent pour les deux isomères. En effet ce coefficient de partage est trouvé voisin de l'unité pour l'isomère cis (donc sans partition préférentielle) et égal à 0.33 pour l'isomère trans (donc nette partition préférentielle pour les phases gel) [15]. L'utilisation de ces deux isomères en tandem (comme d'ailleurs le couple TMA-DPH et LcTMADPH) permet d'étudier l'hétérogénéité latérale de distribution des lipides dans une membrane lipidique [16].

Il est à remarquer que le groupe carboxylique se prête facilement à une transformation chimique, ce qui a permis d'obtenir par exemple les dérivés methyl-esters ou les dérivés phospholipidiques, chacun de ces dérivés gardant les propriétés de partition de l'isomère original.

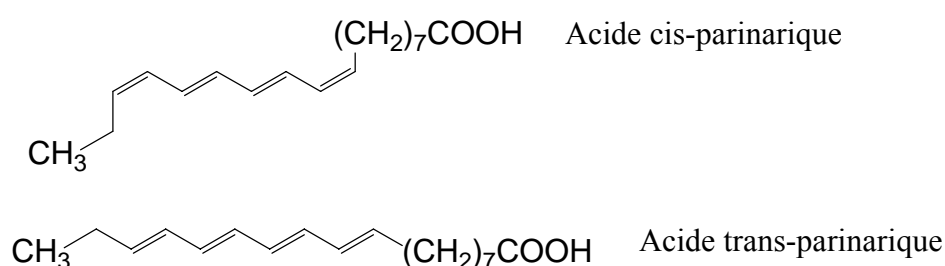


Figure 8. Structures chimiques des acides cis et trans parinariques

Les paramètres spectroscopiques des deux isomères, que ce soit en solvant organique ou dans un environnement lipidique, sont très voisins [16]. Leur spectre d'absorption est structuré avec quatre bandes dans le proche UV (270 à 330 nm) alors que le spectre d'émission ne l'est pas. Le déplacement de Stokes est important, puisque le maximum de fluorescence se situe vers 440 nm. En conséquence, ces sondes sont bien adaptées à des expériences de transfert d'énergie, étant d'excellents accepteurs pour le tryptophane des protéines, et des donneurs pour de nombreux autres fluorophores. Cependant, comme pour le DPH et ses dérivés, les acides parinariques ont été essentiellement utilisés pour des mesures de fluidité membranaire par anisotropie de fluorescence. Ces molécules étant fixées par leur tête polaire à l'interface membranaire, on se retrouve dans un cas de figure voisin de celui du TMA-DPH, avec une mesure de fluidité relativement localisée par rapport à l'épaisseur de la bicouche. Notons cependant que le fluorophore proprement dit, constitué des 4 doubles liaisons conjuguées, est

séparé de l'interface par une distance correspondant à sept carbones (surtout dans le cas du trans-parinarique, tout en longueur) et sondera donc une région de la membrane plus profonde que le TMA-DPH [17].

Les résultats obtenus sur des systèmes simples, comme des vésicules de composition connue, ont montré des résultats très voisins, sinon identiques, pour le DPH et l'acide cis-parinarique. En considérant ce dernier comme un acide gras naturel non-perturbant pour la membrane, ceci a permis de prouver *a contrario* que le DPH était lui-même non-perturbant.

Le moindre succès d'utilisation des acides parinariques et de leurs dérivés par rapport à ceux du DPH tient au fait que la suite des quatre doubles liaisons conjuguées est très facilement et rapidement oxydable, ce qui nécessite des conditions d'utilisation (travail sous atmosphère inerte) peu compatibles avec des mesures de routine.

2.2. les sondes de polarité

Le concept de polarité est très délicat, il recouvre tous les types d'interactions soluté-solvant (y compris la formation de liaisons hydrogène). La polarité de la bicouche a fait l'objet de nombreuses investigations y compris sur les modèles de membranes et des membranes naturelles [18].

Elle est fortement dépendante de la composition et de la dynamique des membranes [19]. La teneur en eau de la bicouche est profondément modifiée lors de la transition de phase des phospholipides (phase gel à la phase cristal liquide) [20]. Par ailleurs les processus d'oxydation des lipides entraînent la formation de résidus hydrophiles dans la bicouche, favorisant ainsi la pénétration d'eau [21].

2.2.1. le PRODAN et le LAURDAN

Le PRODAN (*6-propionyl-2-diméthylamino-naphtalène*) et son dérivé analogue le LAURDAN (Fig.9), porteur d'un acide gras (*6-dodecanoyl-2-diméthylaminonaphtalène*), sont deux sondes que l'on peut qualifier de "multi-émisives" et qui ont été conçues et synthétisées par G. Weber [22,23].

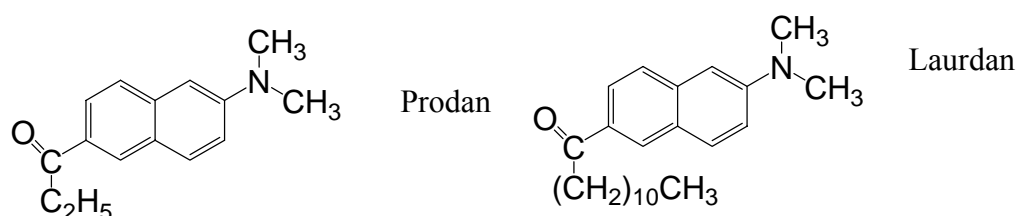


Figure 9. Structures du Prodan et du Laurdan

Leur but initial était d'étudier le phénomène de relaxation dipolaire. Le résidu naphthalène de ces sondes possède un moment dipolaire dû à une séparation partielle de charge entre les groupements 2-diméthylamino et 6-carbonyl. Lors de l'excitation, ce dipôle s'accroît et entraîne une réorientation des dipôles des molécules de solvant, ce qui se traduit par un déplacement bathochrome (red-shift) progressif dans le spectre d'émission de la sonde. Un schéma de ce processus de relaxation est donné dans la figure 10. Ce phénomène de relaxation dipolaire du solvant n'est bien sûr observé que dans les solvants polaires. Une émission vers le bleu est observée pour les solvants apolaires, le spectre se déplaçant de plus en plus vers le rouge lorsque la polarité du solvant augmente. Par exemple, le maximum d'émission du LAURDAN se situe à 380 nm pour le dodécane, 460 nm pour le DMSO et 490 nm pour le méthanol [24]. Cette sensibilité du LAURDAN à la polarité du solvant peut se représenter sous forme d'une corrélation linéaire (courbe de Lippert) [25].

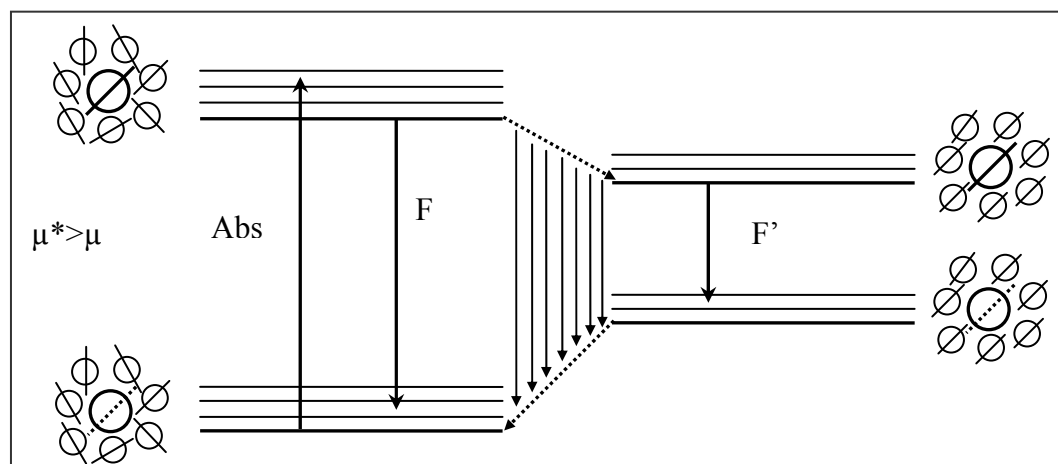


Figure 10. Schéma de la relaxation du solvant autour de la sonde avec un moment dipolaire plus élevé à l'état excité qu'à l'état fondamental. [26].

Cette propriété des deux sondes a été largement utilisée en biophysique membranaire. Ainsi, le maximum d'émission de ces sondes dans des bicouches phospholipidiques dépend de la polarité locale et la phase dans laquelle se trouve la membrane. Ainsi, les spectres d'émission du PRODAN et du LAURDAN montrent un important déplacement bathochrome lors de la transition de phase de l'état gel à l'état cristal liquide, et les deux bandes d'émission ainsi caractérisées, bleue (~ 435 nm) et rouge (~ 490 nm) sont attribuées respectivement à l'émission de ces sondes en phase gel et en phase cristal liquide. Si en phase gel, aucun déplacement du spectre n'est observé en fonction de la température, un déplacement continu vers le rouge est observé en phase cristal liquide avec l'augmentation de température. Le processus de relaxation dipolaire est donc possible lorsque la bicouche est fluide, mais non lorsqu'elle est en phase gel. Par contre, ce processus semble être indépendant de la nature des têtes polaires des

phospholipides [24]. En fait, l'origine de la relaxation dipolaire observée dans une bicouche phospholipidique a été attribuée aux quelques molécules d'eau présentes dans la bicouche au niveau du squelette glycérol, où résident les résidus fluorescents du LAURDAN et du PRODAN, la réorientation de l'eau le long du dipôle de la sonde à l'état excité ne pouvant survenir que dans la phase fluide.

Dans une bicouche phospholipidique, le LAURDAN est fortement ancré dans la partie hydrophobe par les interactions de Van der Waals existant entre sa chaîne d'acide laurique et les chaînes lipidiques, avec son noyau fluorescent localisé au niveau du squelette glycérol [27]. Le LAURDAN étant pratiquement insoluble dans l'eau, son émission est entièrement issue d'un environnement phospholipidique [28]. Le PRODAN, avec une chaîne propionyl plus courte, est plus faiblement ancré à la bicouche [21] et est donc partiellement hydrosoluble. Par rapport au LAURDAN, le PRODAN est localisé plus près de la surface de la bicouche dans un environnement plus polaire, ce qui lui permet de sonder les molécules d'eau libres pouvant s'aligner plus facilement. Ceci et son équilibre de partition avec la phase aqueuse lui donne quelques propriétés particulières par rapport au LAURDAN que nous ne développerons pas.

Les caractéristiques de ces sondes à l'émission se retrouvent également à l'excitation. Ainsi, en solvant polaire, les spectres d'excitation du LAURDAN et du PRODAN sont composés de deux bandes principales, centrées vers 350 et 390 nm. Il en est de même en milieu lipidique. Par rapport aux solvants polaires, la bande à 390 nm est particulièrement intense, surtout à l'état gel. Lorsque les deux phases coexistent, la fluorescence correspondant à cette bande provient essentiellement des sondes résidant dans des zones en phase gel [25].

Par analogie avec la polarisation de fluorescence, Parasassi et coll. ont développé ce qu'ils ont dénommé la "polarisation généralisée" (GP) [25] :

$$GP = \frac{(I_g - I_l)}{(I_g + I_l)}$$

I_g et I_l étant les intensités d'émission caractéristiques des phases gel et cristal liquide, respectivement à 440 et 490 nm. En utilisant différentes longueurs d'onde d'excitation, par exemple dans les bandes d'excitation bleue et rouge, la mesure de GP procure une détermination quantitative de la proportion de molécules de LAURDAN ou de PRODAN résidant dans chacune de ces phases. Ce paramètre a été utilisé entre autres pour quantifier le ratio de phases phospholipidiques coexistant [28] et, en couplant avec des mesures d'inhibition de fluorescence par l'oxygène, pour obtenir la vitesse de la relaxation dipolaire [29].

La sensibilité de ces sondes à la polarité locale et à la phase dans les membranes lipidiques a trouvé par ailleurs de nombreuses applications en biophysique membranaire :

propriétés interfaciales des éthers lipides [30], interaction d'alcools avec les biomembranes [31], influence du cholestérol [32], teneur en eau des micelles inverses [33], étude de l'interdigitation et des propriétés thermotropiques [34].

2.2.2. Le rouge Nile (Nil red)

Le Rouge Nil (*9-(diéthylamino)-5H-benzo[*a*]phenoxazin-5-one*) (Fig.11) est une sonde fluorescente hydrophobe qui est largement utilisée dans l'étude des biosystèmes tels que les membranes [35], les protéines [36,37] et les micelles [38,39]. Comme les deux sondes précédentes, le Rouge Nil présente une grande sensibilité à la polarité de l'environnement [40,41]. Son rendement quantique augmente lorsque la polarité diminue et le spectre d'émission est déplacé vers le bleu. De même, sa fluorescence résolue en temps est fortement solvant-dépendante. Outre le phénomène de relaxation dipolaire du solvant, un état de transfert de charge intramoléculaire "twisted" (TICT) a été proposé pour rendre compte des propriétés de cette sonde [42,43]. Cet état peut se concevoir étant donné la présence d'un groupe terminal diéthylamino attaché à la structure plane et rigide de la molécule, mais pouvant tourner autour de la liaison. Cependant, au contraire de la plupart des autres sondes présentant un tel état TICT, une fluorescence duale n'est pas toujours observée pour le Rouge Nil, ce qui semble indiquer que l'état "twisted" n'émet pas [42]. En fait, bien que non visible sur les spectres d'émission, cette fluorescence duale existe au moins en milieu relativement visqueux (comme par exemple une vésicule lipidique) puisque dans ce cas deux temps de vie de fluorescence sont observés, avec une amplitude négative pour le temps de vie correspondant à la partie rouge du spectre d'émission. Ce type de cinétique à l'état excité apparaît donc essentiellement viscosité-dépendante plutôt que polarité-dépendante, et a été parfaitement explicité par Krishna [44] en tenant compte du moment dipolaire très élevé du Rouge Nil (11.6 Debyes) qui entraîne une relaxation très rapide du solvant en milieu fluide, et ralentie en milieu visqueux. Dans une certaine mesure, ce comportement du Rouge Nil laisse entrevoir des possibilités d'utilisation complémentaires au PRODAN et au LAURDAN, notamment par l'étude de sa fluorescence résolue en temps. Ainsi, il a été confirmé par le Rouge Nil que l'addition de cholestérol diminuait l'hydratation d'une vésicule lipidique dans sa région hydrophobe [45].

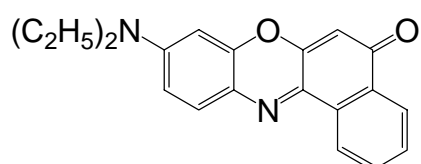


Figure 11. le Rouge Nil

2.3. les sondes de potentiels de membrane

2.3.1. Le potentiel de membrane

En introduction à ce paragraphe, il nous paraît nécessaire d'expliquer brièvement comment se décompose un potentiel électrique de membrane, et en quoi l'utilisation de sondes fluorescentes appropriées peut se révéler fort utile.

En considérant la structure d'une bicouche lipidique, il apparaît que les différents groupements chargés (comme les têtes polaires et groupements dipolaires des phospholipides et les molécules d'eau) ne sont pas distribués uniformément à travers la membrane. Ainsi, le potentiel électrique, ψ , n'évolue pas de manière linéaire sur toute la largeur de la membrane. En fait, ψ résulte de la contribution de trois potentiels membranaires différents définis comme la "trinité" des potentiels membranaires [46]: 1) $\Delta\psi$, le potentiel transmembranaire, qui dépend de la différence des concentrations ioniques dans les deux phases aqueuses de part et d'autre de la membrane ; 2) ψ_s , le potentiel de surface qui résulte des résidus chargés à l'interface membrane-eau ; 3) ψ_d , le potentiel dipolaire résultant de l'alignement des résidus dipolaires des lipides et des molécules d'eau associées à l'intérieur de la membrane. $\Delta\psi$ intervient dans la régulation fonctionnelle de certaines protéines membranaires, notamment l'ouverture des canaux à cations [47]. L'application d'un certain potentiel de part et d'autre de la membrane à l'aide d'électrodes, permet d'étudier en détail l'effet du $\Delta\psi$ dans les mécanismes d'ouverture et de fermeture de ces canaux. Cependant, $\Delta\psi$ n'opère pas au niveau des phases aqueuses, mais plutôt à l'intérieur de la membrane et à ses interfaces, où le champ électrique résultant non seulement de $\Delta\psi$, mais aussi de ψ_s et de ψ_d , peut influencer sur la conformation des protéines membranaires et la distribution de leurs substrats chargés. Le potentiel transmembranaire, $\Delta\psi$, peut être évalué de manière satisfaisante à l'aide d'électrodes, permettant ainsi de contrôler son influence sur les processus membranaires. L'effet du potentiel de surface, ψ_s , a aussi donné lieu à un certain nombre d'études, vu qu'il est relativement facile de déterminer le potentiel zêta de suspensions cellulaires ou membranaires par des méthodes électrophorétiques. Par contre, le contrôle et la mesure du potentiel dipolaire, ψ_d , s'avèrent plus difficiles. Les estimations en valeur absolue du ψ_d des bicouches de phosphatidylcholine varient de -280 mV à -500 mV, selon la méthode utilisée [48,49]. Des mesures directes de ce potentiel sont possibles uniquement sur des monocouches de phospholipides, mais qui donnent des valeurs différentes de celles obtenues avec les bicouches [50-53]. En conséquence, le potentiel dipolaire de membrane peut seulement se calculer par la

théorie ou déduit par des méthodes expérimentales indirectes. L'une de ces méthodes indirectes est l'utilisation de sondes fluorescentes voltage-dépendantes.

2.3.2. Les sondes "styryles" voltage-dépendantes

Ces dernières années, toute une série de sondes fluorescentes dérivées du styrylpyridinium se sont révélées être voltage-dépendantes et de ce fait être des outils de choix pour la mesure du potentiel dipolaire de membrane. Parmi d'autres sondes de structure chimique voisine, les plus utilisées sont sans conteste le RH 421 (*N*-(4-sulphobutyl)-4-(4-(*p*(dipentylamino)phényl)butadiényl)-pyridinium) et le di-8-ANEPPS (1-(3-sulfonatropyl)-4-[β[2-(*di-n*-octylamino)-6-naphtyl]pyridinium bêtaïne (Fig.12). Il est admis que ces types de sondes répondent aux modifications du potentiel dipolaire de membrane par un mécanisme d'électrochromisme [54]. La condition essentielle pour qu'un tel mécanisme puisse intervenir est que la sonde subisse un changement significatif dans sa distribution électronique lors de l'absorption d'un photon, de sorte que ses moments dipolaires soient significativement différents à l'état fondamental S_0 et à l'état excité S_1 . Si la sonde a une orientation bien déterminée à l'intérieur de la bicouche lipidique, un champ électrique membranaire pourra induire une stabilisation ou une déstabilisation de ces états électroniques, se traduisant par un déplacement du spectre d'absorption, et donc du spectre d'excitation [55]. Naturellement, pour une mesure du potentiel dipolaire de membrane, cela suppose que la sonde soit idéalement positionnée dans la bicouche, ce qui est le cas pour ces types de sondes, avec un chromophore situé juste en dessous des têtes polaires des phospholipides et orienté parallèlement aux chaînes d'acides gras, c'est-à-dire colinéaire au vecteur champ électrique.

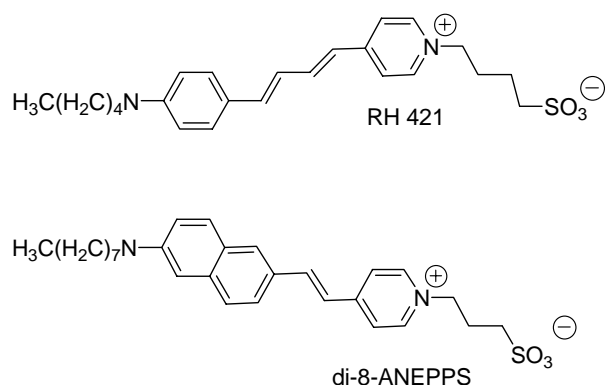


Figure 12. Sondes styryles voltage-dépendantes

Ces conditions sont presque idéalement satisfaites avec les sondes RH 421 et di-8-ANEPPS. En effet, les calculs d'orbitales moléculaires montrent que la charge positive est localisée sur l'azote du pyridinium à l'état fondamental, et sur l'azote opposé (triaryl-

ammonium) à l'état excité. Avec une tête polaire hydrophile (un sulfonate en l'occurrence) fixée à une extrémité de la molécule, et une paire de chaînes hydrocarbonées positionnée à l'autre extrémité, la sonde s'intercale facilement entre les chaînes d'acides gras de la membrane, avec le chromophore orienté perpendiculairement à la surface membranaire. L'excitation de la molécule induira donc une redistribution de charges qui surviendra parallèlement au champ électrique existant dans la membrane. Le déplacement du spectre d'excitation suite à une modification du voltage résulte d'une interaction directe entre ce champ électrique et les moments dipolaires de la sonde à l'état fondamental et à l'état excité. Les champs électriques dans une membrane peuvent atteindre jusqu'à 10^5 V/cm et la différence entre les deux moments dipolaires jusqu'à 15 Debye. Le déplacement de spectre qui en résulte peut atteindre la dizaine de nm, ce qui est suffisant pour pouvoir effectuer une mesure ratiométrique à deux longueurs d'onde aux bords bleu et rouge du spectre. Une telle approche a donné satisfaction dans beaucoup de cas d'études de systèmes biologiques.

Nous tenons à préciser que des analogues du di-8-ANEPPS sont actuellement développés avec succès comme sondes opérant en excitation biphotonique, notamment avec des applications sur des vésicules géantes.

CHAPITRE 2
LES SONDÉS 3-HYDROXYFLAVONES
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Réaction intramoléculaire de transfert de proton (ESIPT)

Les flavonols (3-hydroxyflavones) sont des composés naturels très répandus dans le monde végétal. Cette classe de composés chimiques attira l'attention des spectroscopistes suite à la découverte de leur fluorescence duale par Frolov et *coll.* [56], puis par Sengupta et Kasha [57]. Ces auteurs expliquèrent la fluorescence duale observée par une réaction de transfert intramoléculaire de proton à l'état excité (ESIPT, selon l'acronyme anglais), selon le schéma présenté sur la figure 13.

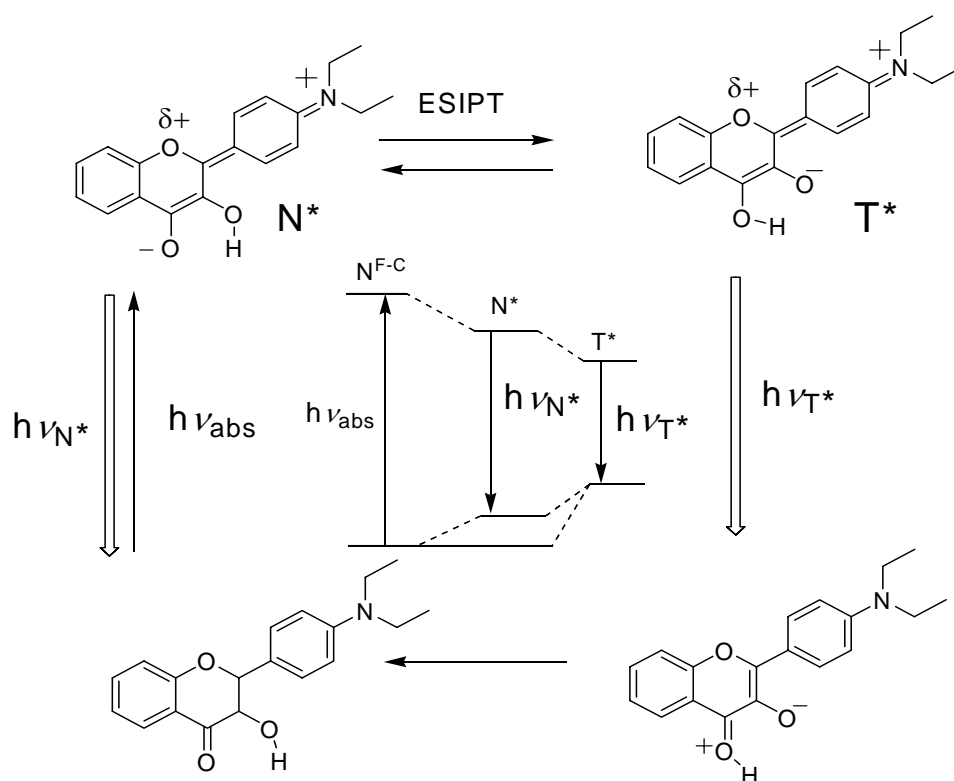


Figure 13. Schéma du transfert intramoléculaire de proton à l'état excité avec les flavones

Sur ce schéma sont représentés les états fondamental et excité de la forme normale des 3-hydroxyflavones (3-HF) ainsi que les états fondamental et excité de la forme tautomère résultant de la réaction intramoléculaire de transfert de proton. La forme normale excitée (N^*) est excitée directement à partir de l'état fondamental alors que la forme tautomère excitée (T^*) apparaît comme le résultat de la réaction de transfert de proton à l'état excité. Le spectre d'absorption des 3-hydroxyflavones va de 320 à 370 nm [58]. En émission sont observées habituellement deux bandes ; la première avec un maximum à 400 nm correspondant à la forme normale, N^* , et la seconde avec un maximum à 520 nm correspondant à la forme tautomère, (T^*). La présence de la forme tautomère à l'état fondamental n'a jamais été observée sur les spectres d'absorption.

En général, le transfert de proton se produit rapidement à l'état excité quand les groupements acides ou basiques de la même molécule deviennent des acides ou des bases forts à l'état excité. La grande majorité des réactions de ce type met en jeu le transfert d'un proton d'un oxygène donneur à un oxygène ou un azote accepteur, avec de rares cas où l'atome d'azote peut être donneur et l'atome de carbone accepteur [59]. Une liaison hydrogène intramoléculaire entre les deux groupements facilite le transfert de proton.

2. Mécanisme de l'ESIPT

Les premières études portant sur le mécanisme de la réaction ESIPT des 3-HF ont été faites à 77 °K avec des solvants organiques d'une extrême pureté. Dans ces conditions, la fluorescence verte (510-580 nm, $\lambda_{\max}=520$ nm) observée a été attribuée à la forme tautomère. Ce transfert intrinsèque de proton est très rapide et virtuellement indépendant de la viscosité [60,61] et de la température dans l'intervalle de 77 à 298 °K [58]. Dans ces conditions, aucune fluorescence violette (370-480 nm, $\lambda_{\max}=410$ nm) de la forme normale n'est observée [58]. Le déplacement de la bande tautomère par rapport à la bande d'absorption de la molécule est important, d'environ 8400 cm^{-1} .

Une complication de l'étude des 3-HF et des molécules similaires apparaît du fait de la multiplicité de formation de liaisons hydrogène existant en solution. Selon McMorro et Kasha [58,62], la présence de la forme N* sur les spectres d'émission des 3-HF en solution dans le méthanol s'explique par la formation de liaisons hydrogène avec le solvant. Ils interprètent leurs résultats comme résultant de complexes entre des molécules de 3-HF et le solvant, et par une compétition entre liaisons hydrogène inter et intramoléculaires.

3. Etudes de la fluorescence résolue en temps de l'ESIPT

Un grand nombre d'études cinétiques ont été décrites sur les réactions de transfert intramoléculaires de proton à l'état excité. Les premières études portant sur l'ESIPT de la 3-HF originelle ont abouti aux conclusions suivantes [6,56-58,63-65] :

- l'ESIPT est une réaction très rapide qui se produit le plus souvent en moins de 10 ps ;
- dans la plupart des cas, la réaction de transfert de proton n'a pas de barrière de potentiel, à 4 °K la réaction se produit en moins de 10 ps ;
- le processus de désactivation de la réaction de transfert de proton dépend de la température.

Le modèle cinétique à deux états basé sur des équations différentielles tenant compte des concentrations de la sonde dans ces deux états a été adopté pour la description des réactions à

l'état excité, en particulier pour le transfert intramoléculaire de proton. Les premiers travaux portant sur l'analyse des réactions à deux états excités sont les travaux de Birks [66] et Brand et *coll.* [67]. Ces derniers ont étudié la fluorescence résolue en temps de la réaction ESIPT du naphthol considéré comme système modèle. Son mécanisme réactionnel peut être modifié de manière réversible ou irréversible d'un état unique à deux états par simple modification du pH. D'autres paramètres expérimentaux, par exemple la composition du solvant, peuvent de la même manière servir à élucider le mécanisme de l'état excité de ce type de réactions. Ainsi, dans des travaux plus récents [68-70], un modèle à deux états excités a été utilisé pour décrire le transfert intramoléculaire de proton dans les 3-HF. Ceci est devenu possible grâce au développement de la fluorescence résolue en temps ultra rapide [71-74] qui a permis de mesurer les constantes de temps de l'ESIPT [75-81]. Brown et *coll.* [82] ont montré que l'ESIPT des 3-HF dans le méthylcyclohexane et l'acétonitrile était si rapide qu'on ne pouvait qu'estimer la constante de temps à environ 35 fs pour 60 fs dans l'éthanol [83]. L'ESIPT plus lente dans ce dernier solvant est attribué à la plus grande force des interactions solvant-soluté. Parallèlement, les temps de vie des formes N* et T* sont de l'ordre de la ps. C'est le cas par exemple pour les temps de vie de fluorescence de la forme T* dans le méthylcyclohexane [68]. Les valeurs de temps de vie mesurées pour la forme H-N* (*H-bonded form*) dans les alcools ont été trouvées du même ordre de grandeur que celles de la forme T* dans les alcanes, ce qui soulève une interrogation quant à la précision des mesures effectuées. En fait, la forme H-N* doit être plus stable que la forme N*, ce qui explique son temps de vie plus élevé.

4. Applications possibles de l'ESIPT

La réaction ESIPT confère aux 3-HF une propriété caractéristique, à savoir leur fluorescence duale. Le schéma à quatre niveaux d'énergie décrivant le processus de l'ESIPT peut conduire à un niveau métastable, avec une population pouvant s'inverser, ce qui constitue la condition essentielle pour générer une lumière cohérente. Les molécules de 3-HF peuvent donc constituer de bonnes sondes à lasers [84]. La seconde application importante des 3-HF est la détection par fluorescence de composés chimiques ou biochimiques. Si beaucoup d'efforts ont été consentis pour l'étude de la cinétique ultra-rapide du transfert de proton en vue de l'utilisation sur les lasers [85-87], ce n'est que depuis peu que les 3-HF ont été utilisées comme sondes fluorescentes proprement dites. Ainsi, les premiers travaux ont porté sur le marquage de sites de liaison de l'albumine [88], mettant à profit le transfert d'énergie du tryptophane vers les 3-HF et la formation de leur forme anionique durant la liaison. Les 3-HF ont également été utilisées comme sondes dans les micelles inverses [89] avec une modulation significative de la réaction

ESIPT en fonction de leur teneur en eau. En fait, les 3-HF ont pris leur essor comme sondes fluorescentes après que soient synthétisés les dérivés 4'-dialkylamino-3-hydroxyflavones. Il a été montré que ces dérivés pouvaient servir de sondes membranaires [90,91], pour la détection des ions [92,93], ainsi que pour la détection de traces de molécules d'eau dans les solvants organiques [94].

5. Evolution de la famille des 3-HF

La première utilisation des 4'-dialkylamino-3-hydroxyflavones résulte des travaux des groupes de Chou et Rettig [95,96]. Il a été montré que, pour ces dérivés, la forme N* peut être observée dans les solvants aprotiques polaires avec une augmentation relative de son intensité, corrélée avec l'augmentation de la polarité [70,88,96]. Ces observations ont permis de préciser pour la première fois le concept de sondes 3-HF à fluorescence duale et à réponse ratiométrique. Dans les solvants polaires, il est admis que la forme N* a un moment dipolaire plus élevé que celui de la forme T* et par conséquent la forme N* doit être plus stable. Dans ces conditions, la réaction ESIPT peut être endothermique [70]. Les intensités relatives des deux bandes sont alors contrôlées par les énergies relatives des états N* et T*. Ceci est en contradiction avec les résultats obtenus avec la 3-HF originelle [58]. La présence de petites quantités d'eau et d'alcools dans les solvants organiques induit une diminution, voire dans certaines conditions, une disparition de la forme tautomère de ces dérivés 3-HF [58,68]. Ce comportement doit être lié à la formation de complexes entre l'eau et ces dérivés 3-HF, pour lesquels le transfert intramoléculaire de proton est empêché. Parallèlement, il a aussi été admis que la forme N* apparaît comme le résultat d'une perturbation de la réaction de transfert intramoléculaire de proton par les protons du solvant [58]. Il en découle la coexistence de deux modèles incompatibles, ce qui n'apporte aucune réponse à la question primordiale concernant les applications des dérivés 3-HF : quelles peuvent être les raisons de leur fluorescence duale ? Répondre à cette question a nécessité d'étudier en détail les propriétés solvatochromiques, électrochromiques et d'hydratation de ces dérivés 3-HF dans différents solvants.

6. Les 3-hydroxyflavones en solution

Tous les solvants sont caractérisés par un certain nombre de paramètres tels que la polarité (ϵ), la polarisabilité électronique (n) et les capacités à donner ou à accepter une liaison hydrogène. Les molécules dissoutes dans les solvants sont soumises à l'influence de tous ces

facteurs. Notamment en ce qui concerne des fluorophores, les changements observés sur leurs spectres d'excitation et d'émission dépendent de la variation de ces paramètres. Ces changements correspondent aux phénomènes de solvatochromisme, de formation de liaisons hydrogène, d'électrochromisme et de formation d'ions, ce que nous allons détailler.

6.1. L'effet solvatochromique

La polarité du solvant et l'environnement local ont d'importants effets sur les spectres d'émission de fluorophores polaires. Ces effets sont à l'origine de la modulation du déplacement de Stokes, qui équivaut à la différence en longueur d'onde entre les maximums des spectres d'absorption et d'émission. Comme nous l'avons déjà indiqué, les fluorophores émettent à des longueurs d'onde supérieures à celles d'absorption. Cette perte d'énergie est due à plusieurs processus dynamiques survenant après excitation des molécules, par absorption de la lumière (Fig.14), dans le premier état singulet excité (S_1), plus précisément à un niveau vibrationnel excité à l'intérieur de S_1 . Cet excès d'énergie vibrationnelle est vite perdu par collision avec les molécules de solvant. Si le fluorophore est excité au second niveau singulet (S_2), elle revient rapidement au niveau S_1 en $\sim 10^{-12}$ s par conversion interne. Les effets de solvant déplacent l'émission vers les basses énergies permettant la stabilisation de l'état excité par les molécules polaires du solvant. Généralement, le moment dipolaire du fluorophore est plus élevé à l'état excité (μ_E) qu'à l'état fondamental (μ_G). Après excitation, les dipôles de solvant peuvent se réorienter ou se relaxer autour de μ_E , ce qui diminue l'énergie de l'état excité. Lorsque la polarité du solvant augmente, cet effet devient important, occasionnant une émission de plus faible énergie et donc à plus grandes longueurs d'ondes. Le plus souvent, l'équation de Lippert (ci-dessous) permet d'interpréter la dépendance du spectre d'émission en fonction du solvant. Elle décrit le déplacement de Stokes en fonction du changement de moment dipolaire au cours de l'excitation et de l'énergie des dipôles dans des solvants de constantes diélectriques (ϵ) et de polarisabilité électrique (n) variables [97,98].

$$\bar{\nu}_A - \bar{\nu}_F = \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_E - \mu_G)^2}{a^3} + \text{constante}$$

Dans cette équation, $\bar{\nu}_A$ et $\bar{\nu}_F$ sont respectivement les nombres d'onde au maxima d'absorption et d'émission ; h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière et a le rayon de la cavité dans laquelle se trouve le fluorophore. Le terme entre les grandes parenthèses est appelé la

polarisabilité d'orientation (Δf). Le terme $\frac{(\epsilon - 1)}{(2\epsilon + 1)}$ tient compte du déplacement spectral dû à la fois à l'orientation des dipôles de solvant et à la redistribution des électrons dans les molécules de solvant. Le terme $\frac{(n^2 - 1)}{(2n^2 + 1)}$ tient compte uniquement de la redistribution des électrons. La différence de ces deux termes renseigne sur le déplacement spectral dû à la réorientation des molécules de solvant, d'où le nom polarisabilité d'orientation. Selon cette théorie, seule la réorientation du solvant est censée induire un déplacement de Stokes important. La redistribution des électrons survient instantanément, et les états fondamentaux et excités sont approximativement stabilisés de manière identique par le processus. Il en résulte que la polarisabilité électronique n'a qu'un effet minime sur le déplacement de Stokes. Par conséquent, seuls les fluorophores eux-mêmes polaires seront fortement sensibles à la polarité du solvant. Les molécules non polaires, tels que les hydrocarbures aromatiques non substitués, le seront beaucoup moins.

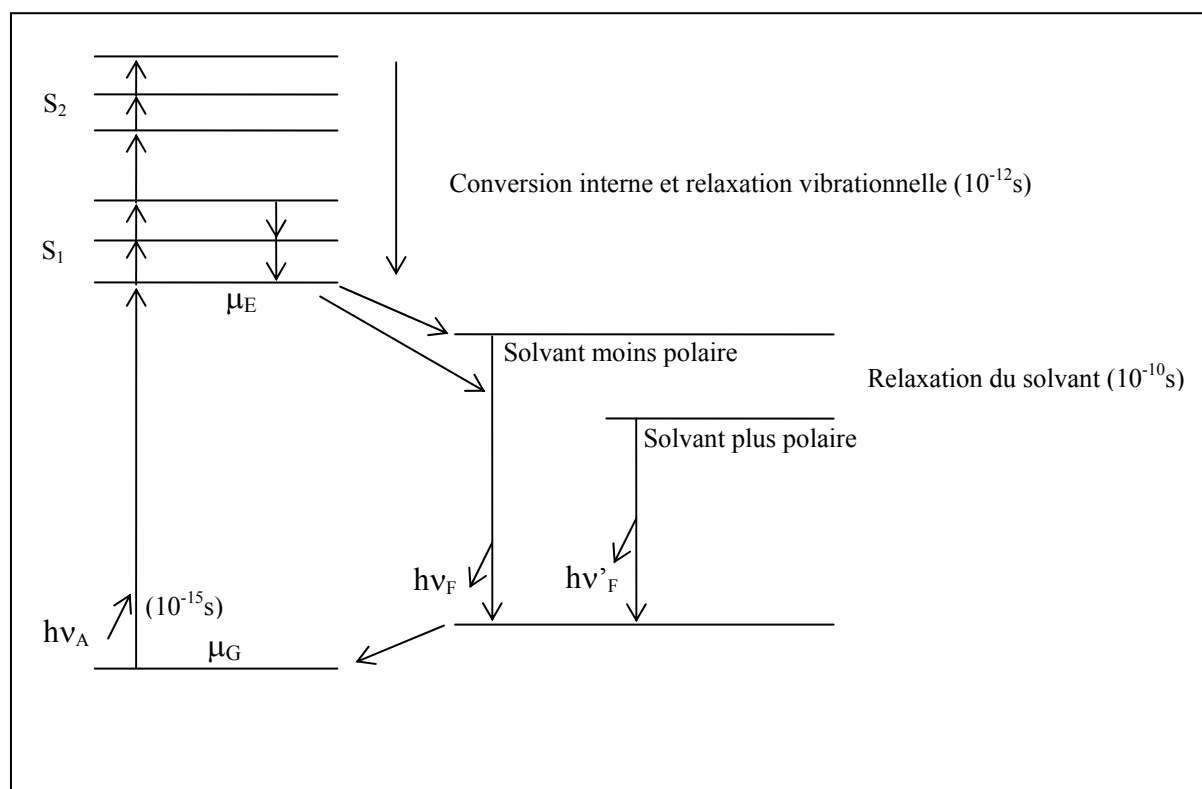


Figure 14. Diagramme de fluorescence de Jablonski tenant compte de la relaxation du solvant [99]

Dans le cas des molécules subissant un transfert de charge à l'état excité, il est observé une grande sensibilité à la polarité du solvant du fait d'une redistribution des charges au cours de la réaction. Le transfert de proton est un exemple type d'une telle réaction, d'une importance

certaine dans le domaine de la chimie. Le rôle de la dynamique du solvant dans ces réactions a fait l'objet de nombreuses études. Les systèmes moléculaires présentant une réaction intramoléculaire de transfert de proton (ESIPT) conviennent particulièrement à l'étude de la dynamique du transfert de proton via le solvant, étant donné leur "accessibilité" spectroscopique et leur géométrie bien définie. Le transfert intramoléculaire de proton modifie la distribution des charges des molécules et est donc couplé aux mouvements orientationnels des molécules du solvant polaire. Du fait de ce changement dans la distribution des charges sur le chromophore, la configuration du solvant peut être très différente avant et après l'ESIPT. Cette influence du solvant sur la réaction de transfert de proton à l'état excité a été décrite par Kelley et *coll.* [70,100]. L'idée principale réside dans la stabilisation, grâce au solvant, de la forme réactive de la molécule de telle sorte que le transfert de proton devienne énergétiquement favorable. Ces auteurs ont considéré la 3-HF et ses dérivés pour ces études de transfert de proton. Les dialkylamino-3-HF se sont révélées particulièrement intéressantes du fait des groupements amine et carboxyle qui sont respectivement fortement électron-donneur et électron-accepteur. A l'état excité, la densité électronique migre du groupement amine vers le carboxyle. Il en résulte un large moment dipolaire à l'état excité. Conformément à la théorie décrite ci-dessus, la réaction ESIPT diminue le moment dipolaire des molécules, celui de la forme T* devenant plus petit que celui de la forme N*. En accord avec l'équation de Lippert, le solvant stabilise fortement la forme N* des 3-HF, entraînant de ce fait un déplacement significatif de son émission vers le rouge. Cet effet a été observé par Kelley et *coll.* [70,100] ainsi que par Chou et *coll.* [95]. Le premier groupe a étudié les dérivés de l'amino-3-HF dans l'acétonitrile et le mélange acétonitrile/benzène. Ils ont montré une augmentation de l'intensité de la forme N* par rapport à celle de la forme T* et un déplacement vers le rouge des maxima d'émission des deux formes dans les mélanges acétonitrile/benzène, ceci proportionnellement à l'augmentation de la teneur en acétonitrile, qui est un solvant polaire comparé au benzène apolaire. Par des mesures de fluorescence résolue en temps, ils ont démontré la forte dépendance de l'ESIPT vis-à-vis de la composition du solvant. Le second groupe a observé un comportement similaire pour le 4'-diéthylamino-3-hydroxyflavone dans des solvants purs (du n-heptane au méthanol) de polarité différente, à savoir une augmentation d'intensité de la forme N* et un déplacement des bandes d'émission (N* et T*) vers les grandes longueur d'onde. Toutes ces observations d'effet solvatochromique sont en accord avec la description théorique proposée basée sur la fonction de Lippert [99].

Des travaux plus récents du groupe de Demchenko sont en accord avec les résultats précédents [101-105]. Ils ont synthétisé de nouveaux dérivés des 3-hydroxyflavones présentant

des propriétés spécifiques permettant leur usage comme outils d'étude du solvatochromisme [101]. Ainsi, outre le dérivé avec le groupement amine en position 4' (4'-N,N-diméthylamino-3-hydroxyflavone (F)), Demchenko et *coll.* [106] ont synthétisé un nouveau dérivé, la 3-hydroxychromone 2-(6-diéthylaminobenzo[b]furan-2-yl)-3-hydroxychromone (FA) (Fig.15).

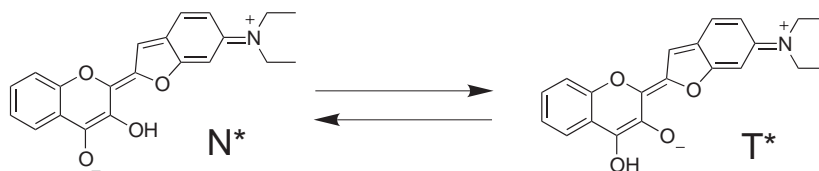


Figure 15. Séparation de charge de la molécule FA à l'état excité [106]

La sonde FA possède un noyau furanne supplémentaire qui accroît la séparation de charge. Comme conséquence de l'augmentation de la polarisabilité électronique et de la séparation de charge à l'état excité de FA, la présence de la forme N* a été observée pour la première fois avec des solvants apolaires. Le spectre d'émission de FA montre une dépendance très importante en fonction de la nature du solvant, y compris pour des solvants de faible polarité. Les deux bandes d'émission changent d'intensité à telle enseigne que la bande T*, de faible intensité dans l'hexane, devient plus importante que la bande N* dans des solvants plus polaires comme l'éthylacétate et le trichlorométhane. Ces propriétés inédites ont permis d'établir une nouvelle échelle de polarité basée sur les données spectroscopiques de cette sonde (à savoir la position des deux maxima et leur rapport d'intensité). L'échelle de polarité des solvants est très importante en chimie et en biologie. Elle est souvent utilisée pour analyser les mécanismes et pour prévoir les constantes des réactions chimiques, photochimiques [95,70,107,108] et biochimiques [109]. Elle est de plus en plus utilisée à l'échelle microscopique pour l'analyse des interactions aux interfaces liquide-liquide [110] et dans les systèmes hétérogènes comme les micelles [111], les micelles inverses, les films minces, les biomembranes et les vésicules lipidiques [21,112] ainsi que pour l'analyse des sites locaux des biomacromolécules telles que les protéines [113] ou les acides nucléiques [114].

Une avancée notoire dans l'application des dérivés des 3-HF à l'étude de la polarité des solvants résulte des travaux de Klymchenko et Demchenko [103]. Ces auteurs soulignent que la réponse de la plupart des sondes fluorescentes est souvent analysée à partir d'une échelle monoparamétrique réduite à une corrélation entre un paramètre spectroscopique unique (généralement le déplacement du spectre d'absorption et/ou d'émission) et une échelle empirique de solvants, comme par exemple l'échelle de polarité. Cependant, une telle méthode n'est pas adaptée, voire est souvent erronée, lorsque la réponse de la sonde concerne des systèmes complexes tels que des

mélanges de solvants, des micelles, des biomembranes, des protéines etc... pour lesquels d'autres paramètres de l'environnement tels que la capacité à former des liaisons hydrogène, sont impliqués. Une analyse multiparamétrique ne pouvait s'envisager du fait que ces sondes ne pouvaient répondre aux interactions avec le milieu environnant par des paramètres indépendants les uns des autres. Pour résoudre ce problème, ces auteurs suggèrent l'usage de la 4'-diéthylamino-3-hydroxyflavone (FE) comme sonde fluorescente multiparamétrique. En effet, la propriété essentielle de l'ESIPT demeure la fluorescence duale qui permet la détermination simultanée de quatre paramètres, ν_{abs} , ν_{N^*} , ν_{T^*} et $I_{\text{N}^*}/I_{\text{T}^*}$, qui peuvent caractériser indépendamment les propriétés du milieu grâce à la polarité $f(\epsilon)$, la polarisabilité $f(n)$ et la capacité à former des liaisons hydrogène.

Dans une étape ultérieure Shynkar et *coll.* [115] ont étendu cette étude à des mesures de fluorescence résolue en temps. Ainsi l'étude de la réaction de transfert intramoléculaire de proton pour la 4'-(Dialkylamino)-3-hydroxyflavone dans l'éthylacétate et le dichlorométhane a montré que les cinétiques de déclin de la fluorescence des formes N^* et T^* peuvent être caractérisées par les deux mêmes composantes de temps de vie. Ces deux composantes ont été trouvées constantes sur toute la gamme des longueurs d'onde d'émission. Cependant, le facteur pré-exponentiel du temps de vie court a été trouvé positif pour la forme N^* et négatif pour la forme T^* . De plus, les deux facteurs pré-exponentiels du déclin d'émission de T^* sont de même amplitude, mais de signes opposés. Ces résultats témoignent d'une réversibilité rapide des deux formes N^* et T^* de la réaction ESIPT. Dans une seconde étude, ces mêmes auteurs ont montré, dans des mélanges de solvants [116], que l'équilibre à l'état fondamental entre la forme normale et la forme H-N n'est pas significativement modifié si la sonde est excitée à l'état N^* . Ces différentes propriétés permettent d'utiliser la sonde pour non seulement calibrer les propriétés d'un solvant, mais aussi pour sonder les capacités d'un milieu donné à former des liaisons hydrogène.

Les effets de l'environnement du solvant sur les spectres de fluorescence sont complexes et aucune théorie unique n'est disponible pour rendre compte de tous ces effets. Les déplacements spectraux résultent de la polarité du solvant alors que l'énergie de l'état excité décroît avec l'augmentation de celle-ci. Cependant, des influences majeures sur les déplacements spectraux résultent également des effets spécifiques tels que la propension du solvant à former des liaisons hydrogène, les réactions acide-base, ou les interactions par transfert de charge. Les déplacements spectraux dus à de telles interactions peuvent être importants et même, s'ils sont méconnus, limiter l'interprétation des spectres de fluorescence. Il n'est pas facile d'estimer la contribution de ces effets spécifiques de solvant, en particulier la formation de liaisons hydrogène. Ce dernier effet est particulièrement important dans la formation de complexes

biomoléculaires tels que les protéines et les liposomes. C'est pourquoi nous insisterons sur ce point dans le paragraphe suivant.

6.2. L'effet de la liaison hydrogène

La liaison hydrogène consiste en une faible liaison électrostatique entre un atome électronégatif (par exemple : l'oxygène) et un atome d'hydrogène lié de manière covalente à un autre atome électronégatif. Cette liaison hydrogène peut être intra ou intermoléculaire. Une liaison hydrogène intramoléculaire est présente dans les dérivés des 3-HF. Comme il a été signalé précédemment, un transfert intramoléculaire de proton existe entre le groupement hydroxyle en position 3 et le groupement carbonyle en position 4. Dans ce cas de figure, il peut y avoir compétition entre liaison hydrogène et transfert de proton. Par conséquent, l'existence d'une liaison hydrogène intermoléculaire aux dépens du transfert intramoléculaire de proton peut être établie en comparant les spectres de fluorescence obtenus dans des solvants polaires et apolaires.

Sengupta et Kasha [57] sont les premiers à avoir correctement analysé la fluorescence duale des 3-HF dans les solvants alcooliques. Ils attribuèrent la fluorescence violette à la forme N^* , liée par liaison hydrogène externe avec les molécules de solvant, et la verte à la forme T^* résultant du transfert intramoléculaire du proton. Au contraire, dans des solvants organiques de type alcane extrêmement purs et dépourvus de traces d'eau, ils observèrent une seule fluorescence verte jaunâtre attribuée à la forme tautomère [58]. La fluorescence violette réapparaît en présence de traces d'eau dans ces solvants, attribuée alors à la forme "H-bonded" ($H-N^*$) (Fig.16).

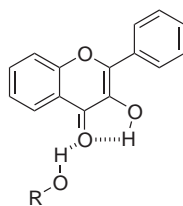


Figure 16. Forme à liaison de la 3-hydroxyflavone

Cette liaison hydrogène intermoléculaire empêche le transfert intramoléculaire de proton, influençant de ce fait la répartition de l'émission entre deux formes : $H-N^*$ et T^* . Le même mécanisme conduisant à une forme $H-N^*$ a été observé par Woolfe et Thistlethwaite [68], qui ont montré la rupture des faibles liaisons hydrogène intramoléculaires par la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires, en milieu alcoolique. Ultérieurement, la forme $H-N^*$ des dérivés 3-HF a donné lieu à plusieurs études visant à étudier les effets généraux des solvants [62,117,103]. La difficulté, pour les 3-HF comme pour d'autres chromophores, réside dans la formation à l'état

fondamental d'une liaison hydrogène due aux interactions soluté – solvant. Cet effet, non souhaité, empêche la réaction ESIPT, base de la conception de ces sondes. Une solution consiste à empêcher la formation de cette liaison hydrogène. Pour cela, Klymchenko et *coll.* [118] ont synthétisé un nouveau dérivé de la 3-HF, la 5.6-benzo-4'-diéthylamino-3-hydroxyflavone (BFE) (Fig.17), dans lequel un cycle benzénique additionnel protège le carbonyle en position 4 contre la liaison hydrogène avec les solvants polaires tout en permettant la liaison intramoléculaire avec le groupement hydroxyle en position 3, rendant ainsi possible la réaction ESIPT.

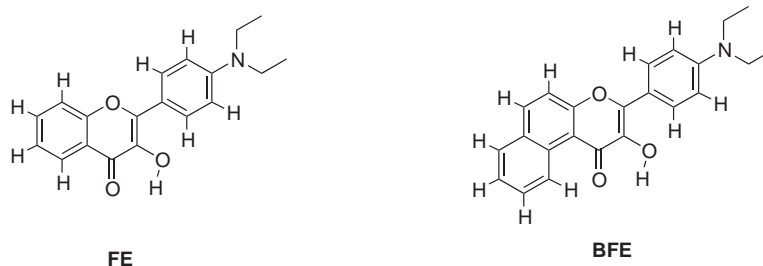


Figure 17. Protection du groupement carboxyle contre la liaison hydrogène intermoléculaire par addition d'un noyau benzène [118]

Des expériences réalisées sur une vingtaine de solvants ont confirmé la sensibilité de la BFE au solvatochromisme ainsi que son insensibilité à la formation de liaisons hydrogène avec le solvant, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans l'étude par fluorescence des propriétés du microenvironnement. En effet, la propension de celui-ci à former des liaisons hydrogène peut être soit renforcée, soit empêchée par une conception appropriée de la sonde fluorescente.

Si l'étude dynamique de l'ESIPT des 3-HF a fourni de nouveaux paramètres, elle a de plus permis d'expliquer correctement la répartition de l'intensité de fluorescence entre les deux bandes d'émission. En étudiant l'influence sur l'ESIPT de la liaison spécifique solvant-soluté, Strandjord et Barbara [119] ont été confrontés à quelques difficultés pour caractériser et comprendre les effets complexes de la liaison hydrogène sur ces molécules en présence de solvants tels les alcools. Ils attribuèrent le temps de vie long observé pour la forme N* à la forme H-N*. Ceci a été confirmé par Shynkar et *coll.* [116] lors de l'étude par fluorescence résolue en temps de la forme H-N* de la 4'-dialkylamino-3-hydroxyflavone pour laquelle ils montrèrent que la liaison hydrogène stabilise la forme N* et augmente le temps de vie de l'état excité de la molécule.

6.3. L'effet électrochromique

Les sondes dérivées de la 3-HF permettent aussi l'étude du champ électrique. La qualité la plus recherchée pour une sonde de fluorescence est sa capacité à répondre spécifiquement à toute perturbation du milieu par une modification notable de son spectre de fluorescence. Dans ce

domaine, la chimie organique a permis la synthèse de nombreuses sondes [120], mais seules celles présentant un transfert intramoléculaire de charge se sont révélées être d'une utilité pratique [26,121]. Les sondes de potentiel membranaire à réponse rapide en font partie. Leur réponse électrochromique est basée sur une interaction directe des dipôles (à l'état excité et à l'état fondamental) avec le champ électrique appliqué [122,123]. Malgré l'application réussie des sondes électrochromiques en recherche cellulaire [124,125], ces sondes sont limitées par leur sensibilité relativement faible. En réalité, les meilleures sondes électrochromiques de transfert de charge ont une réponse ratiométrique qui varie de 6-10% par 100 mV de potentiel électrique transmembranaire [122,123]. S'est donc posé la question de dépasser cette limite en couplant l'électrochromisme avec une réaction à l'état excité. Dans cette optique, la famille des 3-HF s'est avérée prometteuse du fait de la réaction ESIPT entre leurs formes N* et T*. L'étude de la sensibilité du transfert de proton des 3-HF a nécessité la synthèse de nouveaux dérivés de la 3-HF : 6-diéthylaminométhyl-4'-diéthylamino-3-hydroxyflavone (FN), [2-(4'-N,N-diéthylaminophényl)-3-hydroxy-6-chromonyl](N,N-diméthylloctyl) (F2), N-[(4'-diéthylamino)-3-hydroxy-6-flavonyl]methyl-N,N-diméthyl-octalammonium bromure (FN⁺Br⁻), 3-hydroxy-4'-[4-(pyridyl)pipérazino]flavone (NF) et 4-1-(3-sulfopropyl)pyridinium (S⁻N⁺F) (Fig.18).

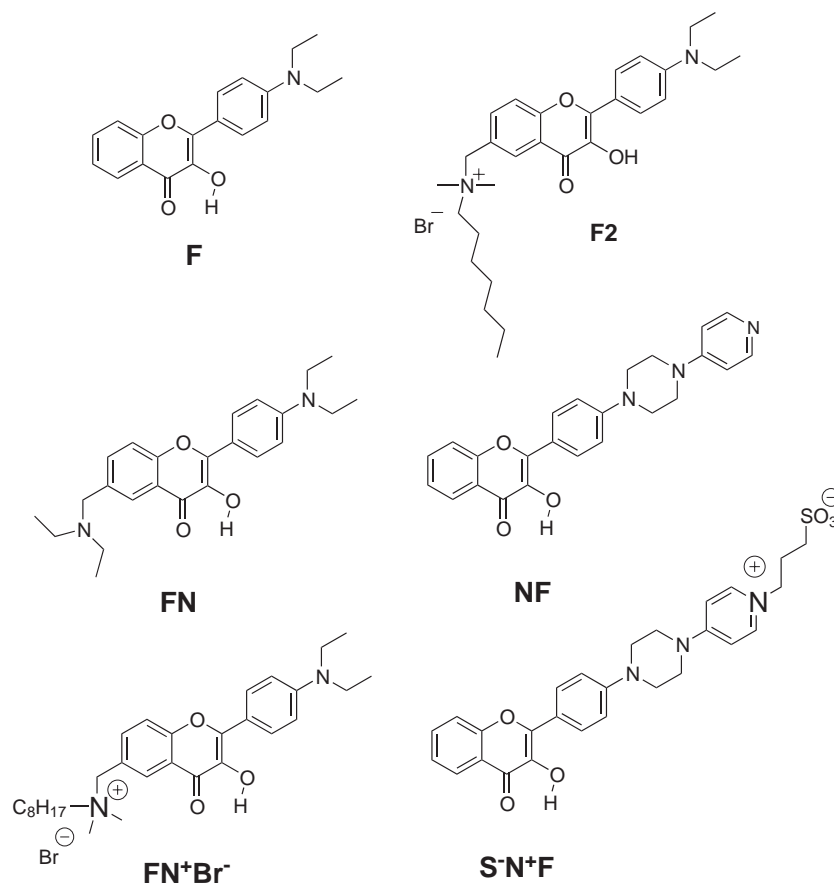


Figure 18. Sondes de la famille des 3-HF sensibles à l'effet électrochromique [126].

L'influence des groupements chargés positivement ne participant pas à la circulation des électrons π avec le chromophore de la flavone concorde bien avec la position des bandes d'absorption et d'émission [126]. L'explication la plus plausible de ces observations est basée sur l'effet Stark interne et résulte donc de l'interaction du moment dipolaire de l'état excité avec le champ électrique créé par la charge voisine. L'effet Stark est connu pour déplacer les spectres d'absorption et d'émission [127-135]. Dans l'approximation du dipôle, la direction et l'amplitude du déplacement $\Delta\nu_{obs}$ dépendent de la distance relative et de l'orientation entre le moment dipolaire de transition électronique $\Delta\mu$ et l'amplitude et la direction du vecteur champ électrique F :

$$h\Delta\nu_{obs} = -\left(\frac{1}{\varepsilon}\right)\left|\Delta\vec{\mu}\right|\left|\vec{F}\right|\cos\theta$$

où θ est l'angle formé entre les vecteurs $\Delta\vec{\mu}$ et \vec{F} , et ε la constante diélectrique. Dans le cas où la perturbation est le fait d'une charge ponctuelle à proximité, la direction du déplacement spectral dépend de l'orientation du champ électrique créé par cette charge par rapport au moment

dipolaire de transition électronique $\Delta\vec{\mu}$ et de sa valeur qui décroît avec la distance r à la puissance r^{-2} .

La technique développée à partir de l'effet Stark (spectroscopie à effet Stark) s'est révélée être un outil intéressant pour l'étude des structures électroniques de molécules organiques et en particulier des changements de polarisabilité électronique et de moments dipolaires au cours de l'excitation électronique [127-135]. A ce jour, l'effet Stark n'a cependant pas fait l'objet de beaucoup de travaux. Il a été utilisé pour évaluer le blindage du champ électrique par les conformations α -hélicoïdale des polypeptides, pour obtenir des informations sur l'environnement des caroténoïdes dans les membranes photosynthétiques, pour expliquer le déplacement du spectre de fluorescence du tryptophane selon sa position dans les protéines ainsi que la direction du transfert de proton dans les centres de réactions photosynthétiques.

A partir de ces exemples, il a été émis l'hypothèse que le champ électrique interne module de façon importante les probabilités et les constantes de réaction de l'état excité. Ceci a été démontré expérimentalement par la grande sensibilité du rapport (I_{N^*}/I_{T^*}) à la charge proximale des sondes FN^+Br^- et S^-N^+F dans les solvants organiques [126]. Ces observations suggèrent une grande sensibilité des paramètres de l'ESIPT aux modifications du champ électrique, conduisant à considérer les dérivés 3-HF pour la conception de sondes capables de détecter les variations du champ électrique. C'est ainsi qu'une utilisation pratique a été obtenue pour la mesure du potentiel dipolaire dans des vésicules lipidiques et des biomembranes.

6.4. La forme anionique

Comme toute molécule possédant un groupement phénolique, les 3-HF présentent, selon le pH du milieu, des formes dites anioniques. McMorro et Kasha [58] ont les premiers fait mention de l'existence de cette forme anionique. Ils ont étudié la 3-HF dans du méthylcyclohexane à une température allant de 298 à 77 °K en présence de traces d'eau. La forme anionique se manifeste par une fluorescence verte avec un maximum à 497 nm (Fig.19). Cette forme anionique a été attribuée à la présence de traces d'eau, d'où la conclusion selon laquelle en milieu aqueux, les 3-HF subissent une réaction de déprotonation à l'état excité [58]. La déprotonation de l'état excité est en contradiction avec les travaux de Wolfbeis et *coll.* [136], qui attribuent la bande d'émission à 512 nm dans l'eau à la forme tautomère. Des travaux plus récents de Klymchenko et Demchenko [137] ont démontré que les 7-acétamido-3-hydroxychromones nouvellement synthétisés subissent une réaction ESIPT dans les milieux polaires ainsi que dans l'eau avec deux bandes d'émission nettement séparées. Ces deux bandes proviennent du même état initial, sans aucune réaction intermoléculaire à l'état excité en milieu

aqueux neutre. En conséquence, pour ce type de dérivé, l'émission duale observée dans l'eau résulte de la réaction ESIPT et non de la formation d'une forme anionique à l'état excité.

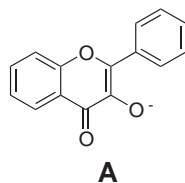


Figure 19.Forme anionique de la 3-hydroxyflavone

Mandal et *coll.* [138] ont également observé une forme anionique pour les 3-HF dans des solvants polaires. Ils ont ainsi observé une bande d'absorption aux alentours de 410 nm dans des solvants alcooliques et des mélanges acétonitrile-méthanol. Ils constatèrent qu'une excitation sélective de cette bande ne produit pas les bandes d'émission caractéristiques des formes normale et tautomère. Par contre, une nouvelle bande d'émission ($\lambda_{\text{max}} \approx 410$ nm) a été observée. Ces nouvelles bandes d'émission et d'absorption disparaissent complètement en présence d'eau, interdisant l'attribution de ces deux nouvelles bandes à la formation de liaisons hydrogène. En effet l'eau est plus à même de favoriser des liaisons hydrogène que les alcools. En conséquence la bande à 410 nm devrait également et a fortiori être observée dans l'eau. Ces auteurs ont effectivement montré que ces nouvelles bandes proviennent de la formation de la forme anionique à l'état fondamental suite à la déprotonation du groupement 3-hydroxyle par le solvant.

7. Applications des dérivés de la 3-HF à l'étude des propriétés physico-chimiques des bicouches lipidiques

7.1. Nouveaux dérivés de la 3-HF

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, avec la molécule 3-HF originelle, on n'observe souvent qu'une seule bande en émission [58], soit la bande T* dans les solvants apolaires, soit la bande N* avec les solvants polaires, ce qui ne permet pas de sonder convenablement le milieu par une mesure ratiométrique. Cette lacune a conduit à la synthèse de dérivés diméthylamino et diéthylamino de la 3-HF [95,96]. Comme le groupement ammonium agit comme donneur d'électrons vis-à-vis du groupement chromone, il augmente ainsi la polarisabilité de la molécule et le moment dipolaire de l'état excité, ce qui se traduit par l'obtention de deux bandes d'émission dans la plupart des solvants. Ces dérivés ont permis la mesure de la polarité de solvants [101,102,105,118,139]. Plus récemment, d'autres 3-HF chargées ont été synthétisées [126,140]. Ces nouvelles sondes, en plus de leur sensibilité à la

polarité, se sont avérées être sensibles au champ électrique [126,140] et sont donc à même de sonder simultanément différentes propriétés de leur environnement. Cette sensibilité est due au fait que les électrons π hétérocycliques montrent une augmentation de l'asymétrie de la distribution des charges à l'état excité, entraînant un déplacement des spectres de fluorescence identique à ceux observés avec les sondes dites solvatochromiques et électrochromiques. En outre, les deux bandes d'émission résultant des deux états excités, N^* et T^* , caractérisés par des moments dipolaires d'amplitude et d'orientation différentes [71,97], présentent également une haute sensibilité à toute modification de la polarité et/ou du champ électrique du microenvironnement.

En vue d'améliorer les propriétés spectroscopiques de la 3-HF originelle, des stratégies ont été élaborées afin d'obtenir [140,142] un déplacement des spectres d'absorption vers les grandes longueurs d'onde, une augmentation du rendement quantique ainsi qu'une meilleure modulation de la sensibilité des deux longueurs d'onde dans la gamme désirée. Le site de la réaction ESIPT est strictement localisé entre les groupes 3-hydroxyle et 4-carbonyle, qui forment la liaison hydrogène qui, en quelque sorte, ferme un cycle à 5 atomes de faible stabilité [57]. En conséquence, cette réaction se montre très sensible à toute perturbation de la liaison intermoléculaire [58] qui aurait lieu dans une direction privilégiée de l'espace. En outre, de par la nature asymétrique du chromophore et de l'unidirectionnalité de la réaction ESIPT, on s'attend à ce que les spectres de fluorescence soient sensibles aux propriétés d'anisotropie du milieu, en particulier les champs électriques, ce qui serait un précieux outil dans l'étude de systèmes anisotropiques tels que les micelles, les monocouches et les membranes biologiques. Il en est résulté l'utilisation de ces dérivés 3-HF dans l'étude des micelles inverses [89,142], des bicouches phospholipidiques [90,91,143] et des biomembranes [144].

L'utilisation pratique de ces propriétés suppose une parfaite connaissance de l'orientation et de la localisation de la sonde dans la membrane. Le meilleur moyen pour localiser avec précision une sonde dans une bicouche lipidique consiste à lui greffer une charge positive, de telle sorte qu'elle se localise à l'interface suite à l'interaction de cette charge avec la charge négative des groupements phosphates des phospholipides [112,145]. Une meilleure insertion et l'orientation de la sonde dans la bicouche peuvent être réalisées par l'adjonction de chaînes aliphatiques de longueur variable, d'où l'obtention de nouveaux dérivés (Fig.20) [146]. Ces modifications ont été effectuées en veillant constamment à ne pas modifier les propriétés fondamentales des 3-HF, notamment leur réaction ESIPT nécessaire à la réalisation de mesures ratiométriques.

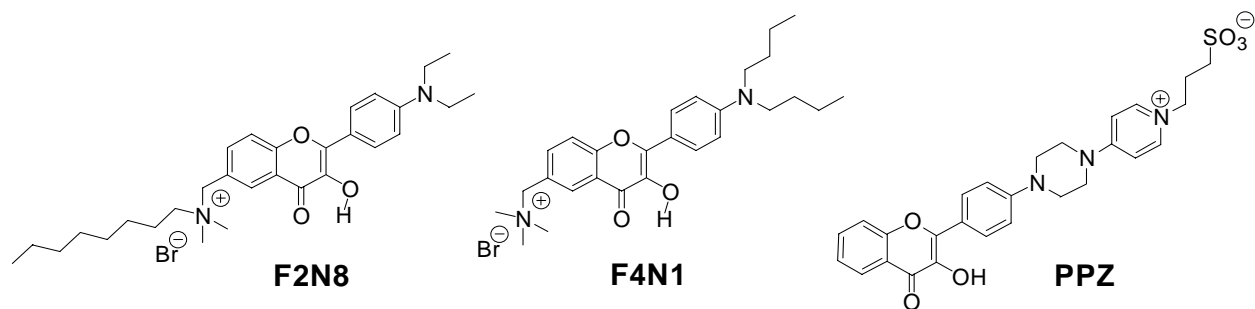


Figure 20. Structures chimiques des sondes F2N8, F4N1 et PPZ [146]

A l'image de la sonde originelle F, toutes ces nouvelles sondes possèdent deux bandes d'émission et une grande sensibilité à la polarité de leur environnement. En effet l'augmentation de polarité se traduit par un déplacement vers le rouge de la bande N^* et une augmentation du rapport d'intensité de la forme N^* sur celle de la forme T^* , (I_{N^*}/I_{T^*}). Ceci est caractéristique des dérivés 3-HF possédant un substituant 4'-dialkylamino sur le noyau phényle. La présence d'un tel groupement électro-donneur induit une augmentation du moment dipolaire de l'état excité N^* , exaltant ainsi la solvatochromicité de la sonde [56,95]. Par analogie avec la 4'-dialkylamino-3-hydroxyflavone, ces nouvelles molécules peuvent servir à sonder la polarité et l'hydratation des bicouches lipidiques. Les sondes possédant une charge positive sur leur noyau chromone (F2N8, F4N1) peuvent servir aussi à la mesure du champ électrique créé par les charges locales. Ces deux sondes présentent pratiquement les mêmes spectres d'absorption et d'émission dans une grande variété de solvants [146], avec le même déplacement bathochrome des spectres d'émission et d'absorption et une augmentation significative de l'intensité de la bande N^* . A l'opposé, avec le PPZ, on observe un déplacement hypsochrome avec une diminution de l'intensité de la forme N^* . Ces différences peuvent résulter de la proximité de la charge positive vis-à-vis du chromophore, ce qui permet de stabiliser (F2N8, F4N1) ou de déstabiliser (PPZ) l'état excité N^* . Ce phénomène a été largement étudié pour des 3-HF chargées ou non chargées avec des solvants de différentes propriétés diélectriques [140]. Il a été montré que le rapport d'intensité des bandes N^* et T^* subit une importante modulation électrochromique (effet Stark interne) et que le blindage diélectrique de la charge proximale par les molécules dipolaires ou les ions décroît cet effet. La grande sensibilité du rapport d'intensité (I_{N^*}/I_{T^*}) à l'effet Stark interne conduit à une nouvelle génération de sondes pour l'étude de l'effet Stark externe créée par le potentiel dipolaire régnant dans les vésicules phospholipidiques [147]. Dans ce but, une nouvelle sonde, la 3-(4-{4-[4'-(3-hydroxybenzo[f]flavonyl)piperazino]-1-pyridiniumyl})-1-propanesulfonate (BPPZ), a été synthétisée. Cependant, comme pour les sondes précédentes, son usage nécessite une connaissance précise de sa localisation dans la bicouche.

7.2. Localisation des sondes dans la bicouche lipidique

Afin de déterminer la localisation des sondes dans la bicouche, des expériences d'inhibition de fluorescence par la méthode de parallaxe ont été menées avec des lipides porteurs de groupements nitroxydes [148,149], à savoir la Tempo-phosphatidylcholine (TempoPC, inhibiteur de surface), le 5-SLPC (groupement nitroxyde inhibiteur localisé à une profondeur "moyenne", à savoir le 5^{ème} carbone d'une chaîne d'acide gras) et le 12-SLPC (inhibiteur localisé plus profondément, au 12^{ème} carbone). Ces phospholipides marqués ont été incorporés à 15% dans des vésicules de DOPC [146]. Les résultats montrent que les sondes F et F2N8 sont localisées respectivement à 16 ± 1 et 15 ± 1 Å du centre de la bicouche. Cette localisation se trouve au même niveau que les groupes esters et le résidu glycérol des phospholipides [150] et donc un peu plus profondément que pour la majorité des sondes à groupements chargés telles que la rhodamine B, la fluorescéine et l'ANS ($15,5$ - $18,5$ Å) [151]. Les chromophores de F4N1 et PPZ sont localisés plus en profondeur, au niveau des chaînes hydrocarbonées, respectivement à 10 ± 1 Å et $7 \pm 1,5$ Å du centre de la bicouche. Ces différences de localisation s'expliquent par leur différence de structure. La sonde F est dépourvue de charge et est relativement hydrophobe, ce qui lui autorise une localisation dans la partie la moins polaire de la membrane. Cependant la présence des deux groupes polaires, 3-hydroxyle et 4-carbonyle, pouvant former des liaisons hydrogène intermoléculaires avec l'eau et les groupements polaires lipidiques, suffit pour lui conférer une localisation proche de l'interface. Ceci a déjà été observé pour une molécule aromatique hydrophobe (le 9-méthylanthracène), localisée en profondeur dans la bicouche, à laquelle l'adjonction d'un groupement hydroxyle suffit pour lui conférer une localisation au niveau de l'interface [152]. F2N8 est une molécule chargée avec un groupement ammonium quaternaire lui servant de site d'ancrage à l'interface [153]. La présence d'une chaîne hydrophobe (8 carbones) fixée sur cet ammonium doit conférer à la sonde une orientation oblique exposant ainsi les groupes 3-hydroxyle et 4-carbonyle à l'interface membranaire. Il en résulte une apparente similitude quant à la localisation de F et F2N8 avec cependant une localisation plus précise pour F2N8 que pour F [146], cette dernière sonde pouvant osciller entre deux localisations (en profondeur et en surface). A l'opposé de F2N8, F4N1 contient un groupement polaire triméthylammonium de plus petite taille et un substituant hydrophobe 4'-dibutylamino sur le côté opposé du chromophore. Ceci lui confère une localisation plus en profondeur dans le coeur hydrophobe de la bicouche, ainsi qu'une orientation verticale vis-à-vis de la surface de la bicouche. Les groupes ammonium de F2N8 et F4N1 doivent se situer au même niveau, près des groupements phosphates des phospholipides membranaires. De ce fait, la plus grande profondeur (5 Å) du chromophore (à comparer à sa taille ≈ 10 Å) s'explique par la

quasi perpendicularité de l'orientation de la sonde par rapport à la bicouche lipidique. La longue chaîne hydrophobe séparant la tête polaire zwitterionique et le noyau flavone impose cette localisation profonde de PPZ. Cependant, cette orientation est peut être moins stricte car le noyau flavone de PPZ n'est pas aussi hydrophobe que celui de F4N1.

Ces résultats permettent de schématiser la localisation des différentes sondes (Fig.21). D'importantes particularités sont à noter concernant la localisation du site de l'ESIPT (groupements 3-hydroxyle et 4-carbonyle). Alors que pour F et F2N8 la réaction a lieu à hauteur du carbonyle sn_2 , pour F4N1 et PPZ, celle ci a lieu plus en profondeur à hauteur du carbonyle sn_1 .

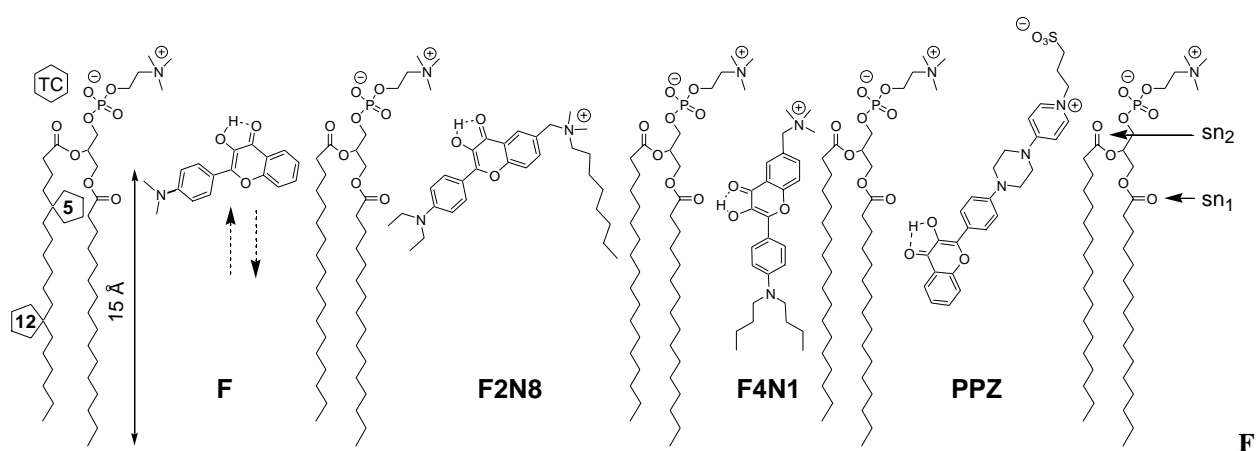


figure 21. Localisation des sondes F, F2N8, F4N1 et PPZ dans une membrane lipidique de DOPC [146].

La localisation d'une sonde dans la bicouche lipidique peut cependant se modifier en fonction de la nature des chaînes d'acides gras des lipides [146]. Avec la sonde neutre F, l'intensité de la bande N^* est plus faible dans des vésicules constituées de EYPC au lieu de DOPC, indiquant ainsi une plus faible polarité de l'environnement. Ceci peut s'expliquer par une redistribution de la sonde plus en profondeur dans la bicouche de EYPC qui est plus hétérogène du fait de sa grande variété en acides gras. Le même comportement a été constaté avec la sonde PPZ, qui possède une plus grande latitude de localisation du fait de la longue distance entre le chromophore et le groupe chargé, mais aussi de la faible hydrophobicité du noyau 3-HF. Par contre, cet effet n'est pas observé pour les sondes F2N8 et F4N1. Ceci s'explique par leur localisation plus précise (10-15 Å du centre de la bicouche), les rendant moins dépendantes de la structure de la chaîne lipidique. Ceci permet, en ce qui concerne ces sondes F2N8 et F4N1, de négliger les effets de la composition en acides gras pour s'intéresser en priorité aux effets de polarité, d'hydratation et de champs électriques.

7.3. Etude de la polarité et de l'hydratation des lipides

Nous présentons ici une analyse détaillée concernant l'impact de la localisation d'une sonde fluorescente, sur ses capacités à mesurer la polarité et l'hydratation de la membrane en portant une attention particulière aux applications possibles. Cette analyse a été faite avec des sondes dites sensibles à l'environnement, communément utilisées pour l'étude des membranes. De telles sondes répondent aux variations de leur environnement par un déplacement de leur spectre d'émission et/ou d'excitation [26,154,155]. Les plus connues dans cette catégorie de sondes membranaires sont : le 6-propionyl-2-diméthylaminonaphtalène (PRODAN) ; le 6-lauroyl-2-diméthylaminonaphtalène (LAURDAN) ; le Rouge Nil et les dérivés 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl (NBD-), anthroyl- et anthroyloxy-, qui sont toutes des sondes neutres hydrophobes présentant une forte affinité pour les bicouches lipidiques. L'exemple type est le PRODAN (Fig.9, page 16) [156], caractérisé par son solvatochromisme dû au transfert de charge de son état excité et aux interactions spécifiques qu'il peut avoir par liaison hydrogène [157,158]. Cette sonde est très sensible aux modifications de structure de la bicouche. Par exemple, la transition de la phase cristal liquide à la phase gel s'accompagne d'un déplacement bathochrome du spectre d'émission [159]. De même, l'addition de cholestérol influe sur l'aspect du spectre de fluorescence [160,161], ainsi que d'autres facteurs tels que une forte pression et l'addition d'anesthésiques locaux et d'alcools [161-163]. Une réponse similaire est obtenue avec le LAURDAN, son analogue plus hydrophobe [25,21], en ce qui concerne la transition de phase et l'addition de cholestérol. Cependant, l'hétérogénéité de la bicouche lipidique, résultant des gradients importants de polarité et d'hydratation, mais aussi de la localisation des groupements fonctionnels des phospholipides à des profondeurs différentes [164,165], ne permet pas à ces sondes neutres d'avoir une localisation et une orientation précises. Par ailleurs, la plupart de ces sondes contiennent des groupes (carbonyle, carboxyle, nitro) pouvant participer à des interactions spécifiques avec les molécules d'eau à différentes profondeurs dans la bicouche [150].

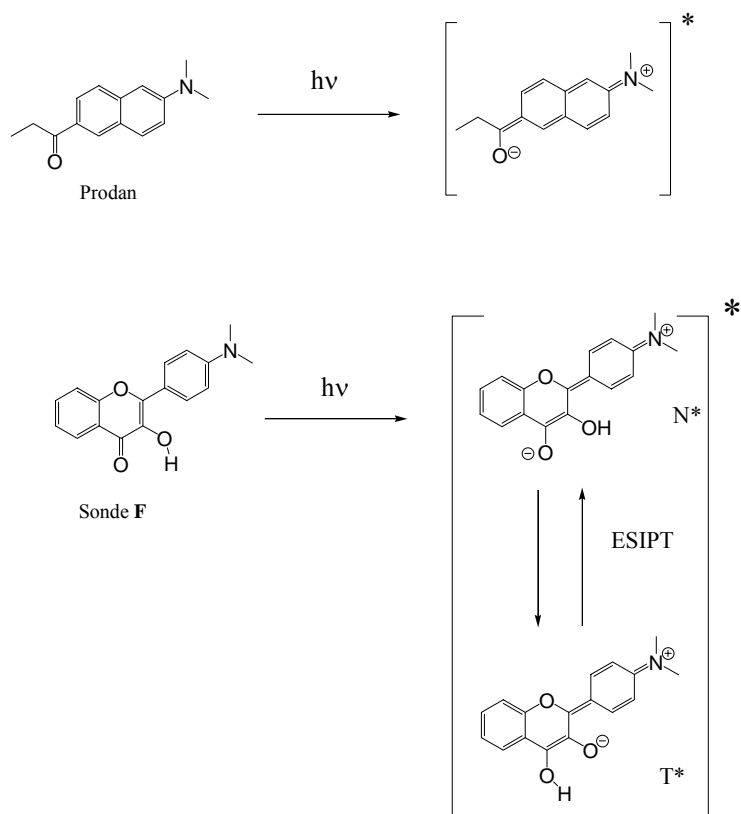


Figure 22. Structures chimiques des états fondamental et excité du Prodan et de la sonde F [166]

En conséquence, la présence sous deux formes de la sonde, soit la forme hydratée (ou plutôt la forme liée à l'eau par liaison hydrogène), soit la forme libre (non hydratée), est un facteur additionnel pouvant augmenter l'hétérogénéité de localisation de la sonde et donc rendre le profil de son spectre de fluorescence lui-même relativement hétérogène. Dans cet ordre d'idées, il a été montré que les sondes possédant des groupements polaires pouvaient avoir au moins deux localisations dans la bicouche [167,168]. De même, des résultats de fluorescence résolue en temps obtenus avec le Rouge Nil [44,169] et d'émission de fluorescence obtenus avec le PRODAN [162] et les kétocyanines [170] ont également montré que les sondes peuvent se localiser simultanément dans les régions polaires et apolaires de la membrane. Il en a résulté un certain nombre de questions : Quels sont les paramètres de la bicouche réellement mesurés par les sondes neutres et dans quelle mesure la diversité des localisations joue-t-elle un rôle? Dans le cas du PRODAN et du LAURDAN, un certain nombre de travaux [25,21,159] ont montré que lors de la transition de phase et de l'addition de cholestérol, les sondes mesurent en fait les modifications de la relaxation du solvant (l'eau en l'occurrence) dans la bicouche lipidique. Par ailleurs, Chong et coll. [162] ont montré que la redistribution du PRODAN entre les sites polaires et apolaires de la bicouche peut contribuer à sa réponse spectrale à certains facteurs modifiant les propriétés de la bicouche telles que la transition de phase, la pression hydrostatique

[171] et l'interdigitation de la bicouche [163]. De même, Bondar et Rowe [161] ont montré que l'addition du cholestérol entraîne une relocalisation du PRODAN dans un endroit plus polaire de la bicouche. D'une manière identique, la réponse à la transition de phase du NBD fixé à une chaîne lipidique est aussi attribuée à la redistribution du noyau fluorescent entre le cœur hydrophobe et l'interface de la membrane [172].

L'interprétation de la réponse de telles sondes est rendue difficile par le fait que même pour une localisation précise dans la bicouche, leur fluorescence est sensible à un certain nombre de paramètres tels que la polarité, l'hydratation, la viscosité,...[26]. Il est alors très difficile de distinguer tous ces facteurs en n'utilisant pour seule information que le déplacement spectral de la fluorescence. La distinction entre ces différents paramètres n'est possible que lorsque le nombre de paramètres spectroscopiques indépendants est suffisamment grand pour caractériser les différents types d'interactions intermoléculaires et en particulier de distinguer les effets dus à la polarité de ceux dus à l'hydratation.

Des travaux récents effectués au laboratoire ont montré qu'une analyse multiparamétrique est possible à l'aide d'un seul type de sonde, à savoir la 4'-diméthylamino-3-hydroxyflavone (F) (Fig.22) [103]. Cette molécule ressemble au PRODAN de par sa taille, sa polarité et la présence des groupements diméthylamino et carbonyle (puisque le groupement 3-hydroxyle est impliqué dans la liaison intramoléculaire avec le groupement 4-carbonyle, il ne peut pas contribuer de manière significative à la polarité de la molécule). La réponse de la sonde F aux modifications structurales de la bicouche a été étudiée [166]. Ce travail a montré qu'il y a essentiellement deux localisations énergétiquement favorables pour F dans la bicouche : une localisation profonde due aux interactions hydrophobes et une localisation en surface due à la formation de liaisons hydrogène. Par ailleurs, il a été montré que différents facteurs comme la phase, la température, la composition en lipides et le degré d'insaturation, la charge de surface, et la présence de cholestérol influencent de manière importante non seulement les propriétés des sites de liaison de la sonde mais aussi sa distribution entre ces différents sites. Les résultats obtenus avec la sonde F permettent de comprendre le comportement des petites molécules neutres de polarité voisine. C'est ainsi que les résultats obtenus ont été comparés avec ceux précédemment publiés et concernant le PRODAN et ses analogues.

L'étude des propriétés photophysiques du PRODAN [157,158,173] a montré qu'une part importante de son solvatochromisme positif découle de la liaison hydrogène spécifique contractée avec les solvants protiques. Selon cette étude, même avec les moins protiques de cette classe de solvants (cyclohexanol et 1-octanol), la bande d'émission maximale du PRODAN ne peut se situer à une longueur d'onde inférieure à 475 nm, alors que pour les plus polaires d'entre

eux (diméthylsulfoxyde, diméthylformamide) elle ne peut être supérieure à 465 nm. La comparaison entre ces données et celles obtenues avec les membranes suggère que le maximum observé à 435 nm correspond à la forme libre (de toute liaison hydrogène) alors que celui à 480 nm correspond à la forme hydratée (lié par liaison hydrogène). L'observation d'une émission duale du PRODAN avec des vésicules de DPPC en phase gel et de DLPC en phase cristal liquide [159] conforte l'idée d'une distribution bimodale de la sonde dans la bicouche.

L'analyse de la littérature sur le PRODAN et sa comparaison avec la sonde F, amènent donc à considérer une distribution bimodale de cette molécule (et de ses analogues) dans la bicouche reliée à la présence de deux formes (hydratée et non hydratée) de la sonde.

Il existe dans la littérature d'autres exemples de sondes solvatochromiques à groupements accepteurs de liaisons hydrogènes ayant une distribution bimodale dans les vésicules lipidiques. Par exemple, des expériences d'inhibition de fluorescence interprétées par la méthode du parallaxe ont permis de démontrer une distribution bimodale pour des dérivés du dansyl et du mansyl [167]. De même, une distribution bimodale a été démontrée en phase gel de vésicules de DPPC pour le NBD lié à une chaîne d'acide gras d'un phospholipide [172]. L'analyse des données de fluorescence résolue en temps lors de la relaxation du solvant du Rouge Nil dans des vésicules de EYPC a également montré la présence de deux populations émissives [44,169]. En outre, l'addition de cholestérol à ces vésicules se traduit par une augmentation significative de la forme émettant à la longueur d'onde courte [169], ce qui est en accord avec la redistribution de la sonde F, dans les mêmes conditions, dans la partie hydrophobe de la bicouche. L'observation d'une fluorescence duale attribuée à une distribution bimodale dans les bicouches lipidiques a été déjà notée avec d'autres sondes contenant, comme les 3-HF, un carbonyle accepteur de liaison hydrogène, telles que le 4-diméthylaminochalcone [174] et les kétocyanines [170]. En présence de cholestérol, ces sondes répondent exactement de la même manière que F. Il est donc permis d'affirmer que la distribution bimodale dans les vésicules lipidiques est une caractéristique générale pour les petits composés neutres contenant le groupe carbonyle ou d'autres groupes accepteurs de liaisons hydrogène (nitro, carboxyle, sulfonyle). Leur répartition entre les deux localisations est fortement dépendante de la température, de la phase de la membrane, de la présence de cholestérol, etc., ce qui se répercute forcément sur leur réponse en fluorescence. Ces molécules se partitionnent dans la bicouche selon les gradients de polarité et d'hydratation, ce qui peut conduire à des artefacts lors de l'estimation de la polarité du solvant. Pour conférer une localisation précise au fluorophore, la sonde doit être ancrée à l'interface membranaire au moyen d'un groupement chargé. Cette solution a été appliquée au dérivé du PRODAN, le PATMAN, avec l'introduction d'un groupement ammonium pouvant interagir avec les groupements

phosphate des lipides [175]. Les groupements chargés ont également été utilisés pour localiser le fluorophore anthroxyloxy à différentes profondeurs de la bicouche [149,176] et le fluorophore coumarine à une distance bien précise de l'interface [144], ainsi que pour assurer une orientation verticale des sondes styrylpyridinium [177]. Dans notre laboratoire, Klymchenko et *coll.* [146] ont démontré, pour les sondes F2N8 et F4N1, positivement chargées, une localisation et une orientation beaucoup plus précises dans la bicouche comparativement à la sonde F neutre. Ces sondes multiparamétriques permettent une évaluation simultanée de la polarité et de l'hydratation dans la bicouche via la formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire avec les molécules d'eau et les sites polaires des lipides [146,178]. La caractérisation de la réponse des sondes requiert de considérer deux paramètres: d'une part le rapport d'intensité (I_{N^*}/I_{T^*}) (qui est un indicateur du site de polarité de la forme non liée de la flavone), et d'autre part le rapport des intensités intégrales des formes liée et libre (s'entendant par rapport à la liaison hydrogène) de la sonde (F_B/F_F) qui correspond à l'hydratation [103,178]. Ces deux paramètres s'obtiennent après déconvolution du spectre de fluorescence en 3 bandes d'émission : N*, H-N* et T*. La présence des trois bandes se justifie par la dépendance des spectres d'émission et d'anisotropie de fluorescence vis-à-vis de la longueur d'onde d'excitation, mais aussi par les effets des inhibiteurs de fluorescence sélectifs selon leur profondeur dans la membrane.

Cette détermination simultanée de la polarité et de l'hydratation des membranes lipides est à l'origine de nouvelles avancées permettant une meilleure compréhension de la structure et des fonctions des bicouches lipidiques et des biomembranes.

7.4. Etude du potentiel de surface de vésicules lipidiques

L'hydratation des bicouches lipidiques joue un rôle important dans la modulation des potentiels de surface et dipolaire [166,178,179]. Les molécules d'eau pénètrent à l'intérieur de la bicouche, occasionnant une hydratation au niveau des groupements carbonyle et phosphate. La pénétration des molécules d'eau à l'intérieur de la bicouche est un phénomène bien connu qui a été prouvé par de nombreuses études [153,180] et confirmé par simulation en dynamique moléculaire [49,181]. Les expériences comme les simulations confirment que l'hydratation dépend à la fois du "packing" et de la dynamique des têtes polaires lipidiques. L'hydratation serait très élevée en l'absence d'équilibrage, par les charges positives des têtes polaires, des forces répulsives existant entre les charges négatives des groupements phosphate. Il apparaît de manière claire que le rôle de l'eau n'est pas seulement de donner une ossature à la bicouche, mais aussi de stabiliser "de manière diélectrique" les dipôles des têtes lipidiques modulant ainsi le potentiel à l'interface [177,182,183]. Cependant, le couplage entre l'hydratation des lipides et la

formation des potentiels de surface et dipolaire reste mal compris et suscite des débats récurrents souvent peu justifiés au vu du nombre limité d'évidences expérimentales [184,185].

Ces lacunes résultent en partie des limites des méthodes expérimentales basées sur la fluorescence et plus particulièrement des sondes utilisées à ce jour pour étudier les effets sur l'hydratation de la bicouche de la charge des lipides. Par exemple, des sondes chargées telles que l'ANS [151,186] ne peuvent pas pénétrer profondément dans la bicouche, alors que des sondes neutres telles que le LAURDAN ou le PRODAN [24,32,187] ne sont pas assez sensibles à la charge. La sonde neutre NBD, présentée comme sensible au potentiel électrostatique de la membrane, ne répond que par une variation de son intensité de fluorescence [172]. Le potentiel dipolaire peut être apprécié par les déplacements des spectres d'émission et d'excitation des sondes styryles électrochromiques, mais ces déplacements sont de faible amplitude et ne sont pas très sensibles à la composition en lipides [177,182,183]. Le déclin de fluorescence du DPH est sensible à l'hydratation de la bicouche [18], mais reste insensible aux effets de charge. Il y a donc eu nécessité de trouver de nouvelles approches et de nouvelles sondes pour satisfaire à ce besoin.

Dans cette optique, les dérivés des 3-HF se révèlent être des candidats prometteurs pour l'étude des potentiels des biomembranes et de leurs modèles [146,166,178]. Ils ont notamment été utilisés au laboratoire pour étudier la charge de surface [143,146,166,178,179], dont le couplage avec l'hydratation de la bicouche a été démontré [179]. Les molécules d'eau contribuent significativement à la création du potentiel interfacial. Leur caractère multiparamétrique [103] et leur grande sensibilité aux effets électrochromes prédestinent ces sondes à l'étude du potentiel de surface.

Les premières expériences sur le potentiel de surface [143] ont montré des variations importantes d'intensité de la sonde F dans les bicouches lipidiques. Ces résultats furent a priori surprenants au vu du caractère neutre de la sonde qui présageait de faibles interactions avec les charges des phospholipides. Qui plus est, du fait de sa faible polarité, la sonde F est plutôt localisée nettement en dessous de l'interface de la membrane et ne devrait donc pas avoir de préférence vis-à-vis des différentes têtes polaires lipidiques. Duportail et *coll.* ont proposé deux modèles pour expliquer ces résultats [143]. Dans un premier modèle, la réponse de F s'explique par sa relocalisation dans la bicouche. Cependant, les facteurs électrostatiques ne sont pas suffisants pour induire une relocalisation de la sonde. La modification d'orientation à l'état fondamental de la sonde est peu probable au vu de son faible moment dipolaire [144], de même la réorientation à l'état excité peut-être écartée du fait de l'observation d'un fort effet statique de bord rouge [91] démontrant l'absence d'une dynamique de relaxation dipolaire. Pour ces raisons un second modèle fût proposé qui explique l'augmentation de la bande N* par une plus grande

hydratation de la bicouche. Une vésicule composée de lipides chargés négativement est plus hydratée puisque les molécules d'eau pénètrent profondément dans la bicouche et hydratent les groupes phosphates et carbonyles [188,189]. Les études, par spectroscopies IR et Raman, des deux groupes carbonyle des phospholipides [153,172], montrent une plus grande hydratation pour les vésicules de PG que pour celles de PC. Ce modèle concorde avec les travaux de Duportail et *coll.* [179] sur le couplage entre l'hydratation des membranes et leur charge de surface. Outre la sonde F, ils ont également utilisé les sondes nouvellement synthétisées F2N8, F4N1 et PPZ chargées positivement, et donc présentant une localisation plus précise dans la membrane, pour l'étude du potentiel de surface des bicouches lipidiques [146]. Des études comparatives ont été faites sur des LUV composés de lipides anioniques DOPG et EYPG et de lipides neutres DOPC et EYPC. La réponse obtenue avec la sonde chargée F2N8 est similaire à celle de la sonde F, ceci en conformité avec leur localisation voisine dans la bicouche. La présence des charges négatives sur les têtes polaires du PG entraîne une augmentation du rapport I_{N^*}/I_{T^*} sans déplacement appréciable des bandes d'émission. Comme le même résultat a été obtenu avec la sonde F [143], dont la localisation est moins précise que celle de F2N8, ce résultat ne peut s'expliquer par une quelconque relocalisation de la sonde en réponse à une charge de surface différente. La sonde F4N1, avec une localisation plus profonde, présente le même comportement. Pour la sonde PPZ dont l'orientation du chromophore est inversé, l'effet est logiquement opposé : les charges négatives des têtes polaires de PG diminuent le ratio I_{N^*}/I_{T^*} . Tous ces résultats témoignent de la sensibilité des 3-HF aux changements du potentiel de surface, ce qui a été confirmé par des travaux plus récents [166,178].

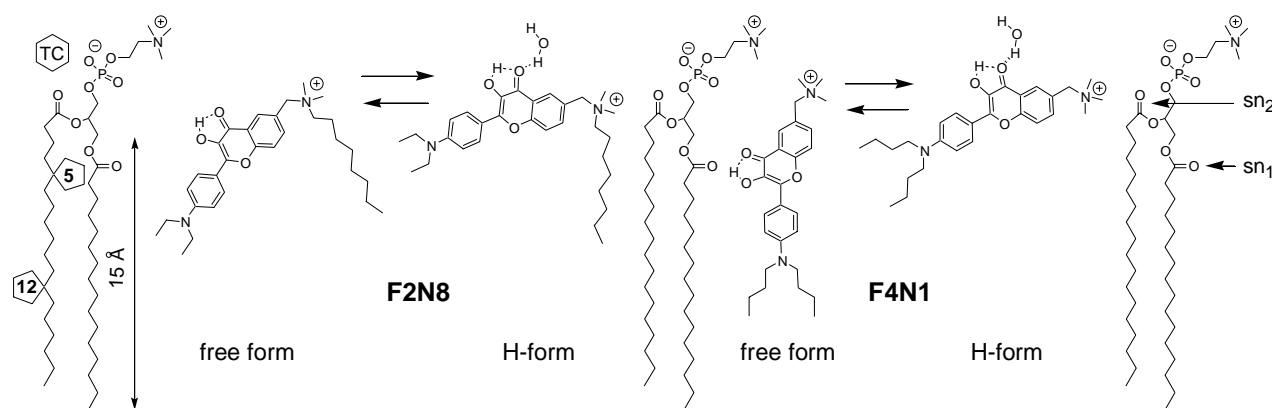


Figure 23. Localisation estimée des formes liées par liaison hydrogène et libre pour les sondes F2N8 et F4N1 dans une bicouche de phosphatidylcholine [178]

Une étape importante dans l'étude du couplage entre l'hydratation et la charge de surface est l'apport de la déconvolution des spectres de fluorescence permettant d'extraire du spectre de fluorescence chacun des spectres propre à la forme hydratée, et aux deux formes non hydratées normale (N^*) et tautomère (T^*) [166,178]. Cette méthode permet de distinguer les effets de

l'hydratation de ceux de la charge de surface. En conclusion, parmi les sondes 3-HF, F2N8 et F4N1, étant donné leur localisation précise dans la membrane (Fig.23), ont montré une grande sensibilité au potentiel de surface induit par les têtes polaires selon leur charge. Il est donc envisageable de synthétiser de nouvelles sondes 3-HF pour la mesure du potentiel de surface des biomembranes et des membranes cellulaires.

Reste maintenant à envisager la question du couplage entre l'hydratation et le potentiel dipolaire.

7.5. Etude du potentiel dipolaire dans les vésicules lipidiques.

7.5.1. Le potentiel dipolaire dans une membrane modèle.

Le potentiel dipolaire, ψ_d , est la différence de potentiel entre les têtes lipidiques fortement hydratées à la surface de la membrane et l'intérieur de la bicouche moins polaire [47,190]. Il provient de l'alignement des résidus polaires des phospholipides, avec la participation des molécules d'eau au niveau de leurs groupements carbonyle et phosphate. Le potentiel dipolaire crée une importante charge virtuelle positive au centre de la bicouche [48,191]. Pour des bicouches de phosphatidylcholine, le potentiel dipolaire varie entre -280 mV et -500 mV selon qu'il a été déterminé à partir de la vitesse de pénétration des ions hydrophobes [48] ou par simulation en dynamique moléculaire [49]. Cependant, les valeurs réelles de ψ_d , le rôle et la contribution quantitative de chaque constituant chimique ainsi que la distribution de ψ_d dans la bicouche, restent sujets à débat [50,51].

Il existe sans doute plusieurs sites de genèse du ψ_d . Du fait de leur orientation perpendiculaire au plan de la bicouche, les sn_2 -carbonyles joueraient un rôle majeur [47,48,185,190], alors que les sn_1 -carbonyles orientés parallèlement au plan de la bicouche n'auraient qu'une influence mineure. D'autres contributions au ψ_d proviennent du dipôle P^-N^+ [192] et des liaisons $P=O$ des groupes phosphate [193]. Il a aussi été suggéré que les molécules d'eau dans la bicouche sont dans un état polarisé avec une orientation perpendiculaire au plan de celle-ci [49], contribuant ainsi au ψ_d . De nombreux travaux [153,194] ont rapporté la présence de molécules d'eau soit hautement polarisées, soit formant des liaisons hydrogène, au niveau des groupements phosphates et esters, mais la corrélation entre le potentiel dipolaire et l'hydratation de la membrane reste à éclaircir. D'autres facteurs influençant le ψ_d ont été décrits (Fig.24). Ainsi l'addition de phlorétine, composé possédant un groupement carbonyle et quatre groupements hydroxyle, diminue considérablement le ψ_d [48,195-197], alors que l'addition de

stérols, dont le cholestérol, l'augmente. L'un des stérols ayant le plus d'effets sur le ψ_d est le 6-kétocholestanol (6-KC) [48,198]. Une autre manière de diminuer le ψ_d , consiste à éliminer les groupements *sn*-carbonyles, ce qui est réalisé avec les éthers lipides [184].

La difficulté de mesurer directement le ψ_d amène à utiliser des méthodes indirectes pour le faire. La méthode utilisant des sondes fluorescentes demeure à ce jour la plus connue, la plus sensible et la plus facile. Elle n'est pas destructive et permet de sonder les effets électrostatiques au niveau moléculaire. De plus, sa sensibilité permet l'usage de concentrations de 10^{-6} à 10^{-8} M avec un rapport sonde/lipides $\leq 1 : 100$. Ainsi, les sondes styryles, déjà utilisées comme sondes à réponse rapide pour la détermination du potentiel transmembranaire [177], ont été proposés comme sondes du ψ_d [54,182,182]. Leur réponse repose sur leur électrochromisme (effet Stark), donnant lieu au déplacement de leurs spectres d'absorption et d'émission sous l'influence d'un champ électrique [55]. Le mécanisme du transfert de charge électrochromique impose des limites à la réponse de ce type de sonde, qui ne peuvent être surpassées par une modification du fluorophore. La synthèse de nouvelles sondes réagissant par un mécanisme différent s'est donc avérée nécessaire.

Un de ces mécanismes est le processus de transfert de proton à l'état excité qui est très sensible à l'électrochromisme [126,140,179]. Récemment, Klymchenko et *coll.* [139] ont décrit la synthèse d'une nouvelle sonde basée sur les 3-HF. Comme détaillé précédemment, ces sondes possèdent un groupe chargé pour fixer le chromophore à la surface de la membrane et des substituants hydrophobes pour les orienter vers la partie la moins polaire de la bicouche, et ceci si possible parallèlement aux chaînes d'acides gras, condition nécessaire pour une mesure optimale du potentiel dipolaire. Deux représentants de cette famille, avec le noyau 3-HF orienté en sens opposé par rapport au plan de la bicouche, F4N1 et BPPZ (Fig.24) ont été introduits dans des vésicules phospholipidiques afin d'analyser la dépendance de leur fluorescence vis-à-vis du ψ_d [147]. Le potentiel dipolaire a été modifié soit par l'addition de phlorétine et de 6-KC, soit par substitution des phospholipides par les éthers correspondants (Fig.24).

La sonde électrochromique de type styryl, le di-8-ANEPPS [54], a été utilisée comme référence (Fig.24). Les résultats [147] ont montré que ces sondes 3-HF dotées de la réaction ESIPT s'appliquent parfaitement à la mesure du potentiel dipolaire dans les biomembranes, et s'avèrent donc prometteuses dans ce domaine.

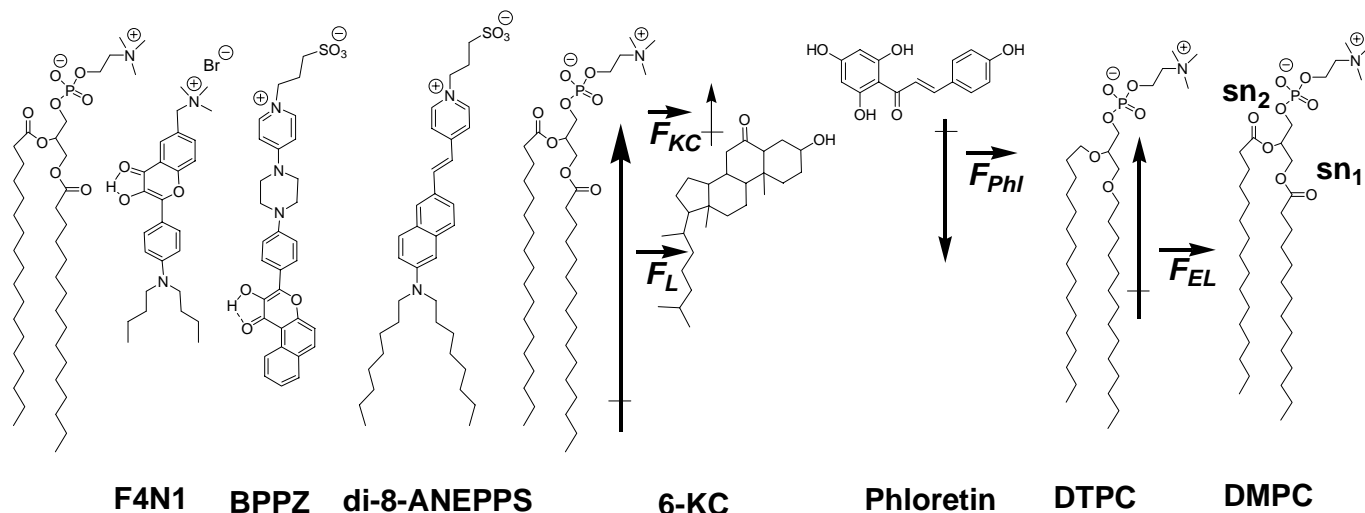


Figure 24. Localisation des sondes électrochromiques F4N1 et BPPZ, ainsi que de la sonde référence di-8-ANEPPS dans un feuillet de phosphatidylcholine. Sont également présentés les effecteurs du potentiel dipolaire 6-ketocholestanol et phlorétine [147]

7.5.2. L'effet Stark externe dans les vésicules lipidiques

Le fondement physique de la réponse des sondes 3-HF à un champ électrique externe est l'effet Stark [140]. Elle consiste dans les déplacements des bandes d'émission et d'absorption causés par l'interaction entre un champ électrique et les moments dipolaires des états fondamental et excité du chromophore [55]. Dans la plus simple approximation dipolaire qui néglige les effets de polarisation électronique, la direction et l'amplitude du déplacement, $\Delta\nu_{obs}$, est proportionnel au vecteur champ électrique F et à la variation du moment dipolaire $\Delta\vec{\mu}$ liée à la transition spectroscopique conformément à la formule ci-dessous :

$$h\Delta\nu_{obs} = -\left(\frac{1}{\varepsilon}\right) \|\Delta\vec{\mu}\| |\vec{F}| \cos\theta$$

Pour répondre avec une sensibilité maximale au potentiel électrostatique, la sonde doit avoir un moment dipolaire $\vec{\mu}$ très différent à l'état excité par rapport à l'état fondamental, ce qui implique une redistribution conséquente de la densité de charge électronique. En outre, la sonde doit être localisée dans un environnement de faible polarité (faible ε_{ef}) et orientée parallèlement ($\cos\theta = 1$) ou antiparallèlement ($\cos\theta = -1$) au champ électrique. Les sondes styryles ayant des substituants donneurs ou accepteurs d'électrons aux extrémités opposées du nuage électronique π en forme de bâtonnet de la molécule font partie des sondes électrochromiques les plus connues [54,177,182]. A l'état excité, elles présentent une redistribution importante de leur charge électronique pouvant être modulée par le champ électrique. Des représentants de cette classe de

composés sont les sondes 4-dialkylaminostyrylpyridinium qui subissent la réaction à l'état excité représenté dans la figure 25.

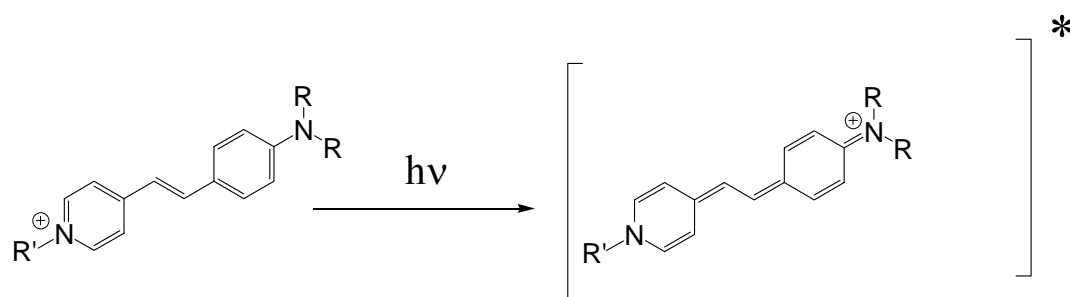


Figure 25. Transfert de charge à l'état excité pour les sondes styryles

Les dérivés de la dialkylamino-3-hydroxyflavone, présentant la réaction ESIPT (Fig. 26), sont également caractérisés par un important transfert de charge dans leur état excité N^* , survenant du groupement 4'-dialkylamino au groupe 4-carbonyl [96,97].

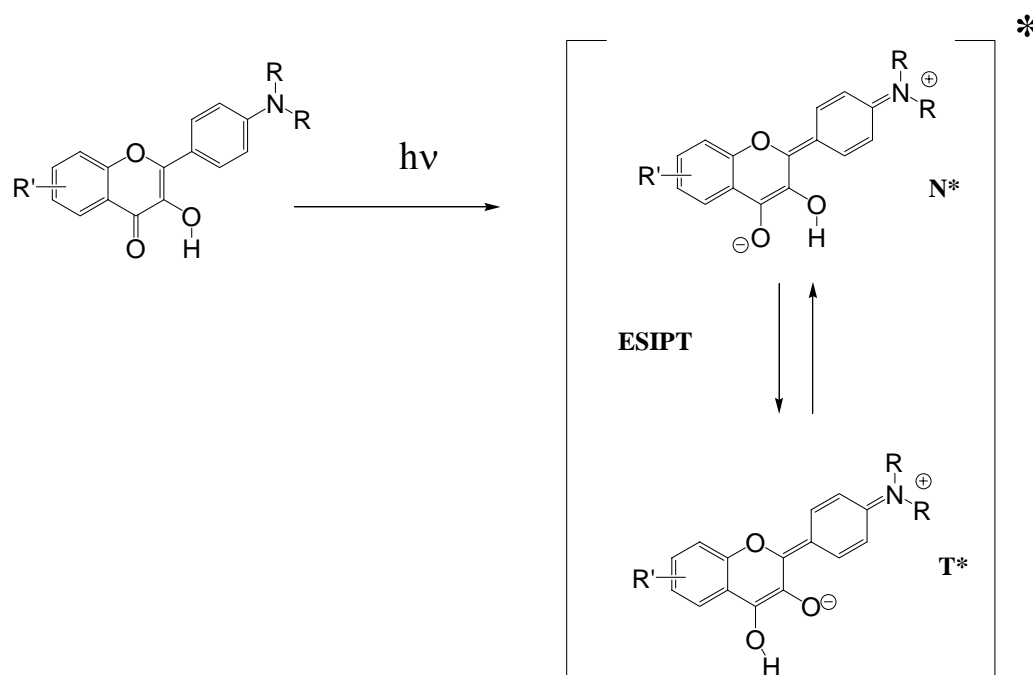


Figure 26. Réaction ESIPT dans les 3-hydroxyflavones [147]

La transition ESIPT de l'état normal N^* à l'état tautomère T^* réduit la séparation de charge électronique à l'état T^* , ce qui explique ses plus faibles solvatochromisme [103] et électrochromisme [128]. Puisque la réaction ESIPT pour ces molécules est rapide et réversible, le champ électrique influencera la distribution des espèces excitées entre les deux états N^* et T^* et donc les intensités d'émission des bandes correspondantes. Nous trouvons ici l'origine du fort couplage de l'électrochromisme et de l'ESIPT, pris en considération pour la synthèse des nouvelles sondes 3-HF destinées à la mesure du potentiel électrique dans les biomembranes.

7.5.3. Stratégie générale de synthèse de nouvelles sondes ratiométriques

Le développement de sondes fluorescentes sensibles aux potentiels électrostatiques de la membrane demeure un des thèmes majeurs de recherche du laboratoire. L'idée consiste à utiliser la sensibilité de la réaction ESIPT à l'électrochromisme [126]. La conception de sondes fluorescentes de la famille des 3-HF pour la mesure du potentiel dipolaire est soumise à plusieurs conditions [146,147].

La première concerne l'orientation verticale du chromophore par rapport au plan de la membrane, condition requise pour une orientation parallèle du moment dipolaire de la sonde $\Delta\vec{\mu}$ et du gradient de potentiel dipolaire ($\Delta\vec{F} = \nabla\Psi_d$) dans les membranes. La seconde condition est liée à la profondeur de localisation de la sonde dans la membrane. Pour une mesure optimale du Ψ_d , la sonde doit être localisée à hauteur du maximum du gradient de champ électrique, au même niveau que les groupements carbonyles. La profondeur de pénétration des sondes dans la bicouche peut être contrôlée au moyen de groupements chargés interagissant avec les têtes lipidiques. Cette idée a été déjà utilisée avec les sondes styryles, di-8-ANEPPS [54,177] et RH 421 [182,183]. Dans le cas qui nous intéresse, contrairement aux sondes styryles, le groupement positif d'ancrage ne fait pas partie du fluorophore ce qui permet d'avoir un espaceur de longueur variable. En plus, il est possible de concevoir des sondes 3-HF avec une orientation inversée du chromophore par rapport au plan de la membrane. Une étude comparative d'un tel couple permet d'éliminer des effets spectroscopiques dus à des facteurs indépendants de l'orientation des sondes par rapport au vecteur champ électrique, comme la polarité ou la viscosité.

Cette réaction ESIPT, hautement électrochromique, des dérivés 3-HF nouvellement synthétisés, a permis une réponse ratiométrique à l'émission aux variations de Ψ_d , ce qui n'était pas possible jusqu'alors avec les sondes qui répondaient par un mécanisme de déplacement de charge. En outre, ces sondes permettent d'enregistrer les changements d'intensité relative des deux bandes d'émission, ce qui est beaucoup plus commode et précis pour une détection en deux couleurs en spectroscopie et en microscopie que l'enregistrement d'effets ratiométriques mesurés dans d'étroites régions situées sur les bords des bandes d'excitation. Les sondes ci-dessus décrites ont servi de prototypes pour la mesure ratiométrique des champs électriques dans les membranes plasmiques cellulaires.

7.6. Applications des sondes 3-HF en biophysique cellulaire.

Les études précédentes, menées sur des vésicules phospholipidiques avec les sondes ratiométriques dérivées de la 3-hydroxyflavone, ne présentent de véritable intérêt que si elles

sont amenées à déboucher sur des travaux identiques s'appliquant aux membranes (notamment la membrane plasmique) de cellules vivantes. Notre laboratoire a abordé ce type d'applications dans deux directions, d'une part la mesure du potentiel dipolaire de la membrane plasmique cellulaire et d'autre part la détection du phénomène d'apoptose.

7.6.1. Mesure du potentiel dipolaire de la membrane plasmique cellulaire

Les sondes précédemment développées pour la mesure du potentiel dipolaire de vésicules lipidiques, à savoir les sondes F4N1 et BPPZ, n'ont pas donné satisfaction lors de leur application sur des cellules. En effet, des mesures effectuées en microscopie confocale par excitation laser ont montré d'une part que le rendement quantique du BPPZ était très faible en milieu cellulaire, d'autre part que F4N1 diffuse très rapidement dans l'ensemble de la cellule, ce qui ne permet plus d'obtenir une réponse relevant d'une localisation précise. Pour surmonter ces défauts, la stratégie de synthèse que nous avons évoqué précédemment a été mise en œuvre pour élaborer deux nouvelles sondes F8N1S, *3-[2-(4-(dioctylamino)-3-hydroxyflavonylmethyl)(dimethyl)ammonio]-1-propanesulfonate*, et PPZ8, *(3-(4-{4-[4'-(3-hydroxy-6-octyloxyflavonyl)phenyl] piperazino}-1-pyridiniumyl)-1-propanesulfonate*. Ces sondes, insérées dans un feuillet lipidique, sont représentées dans la figure 27.

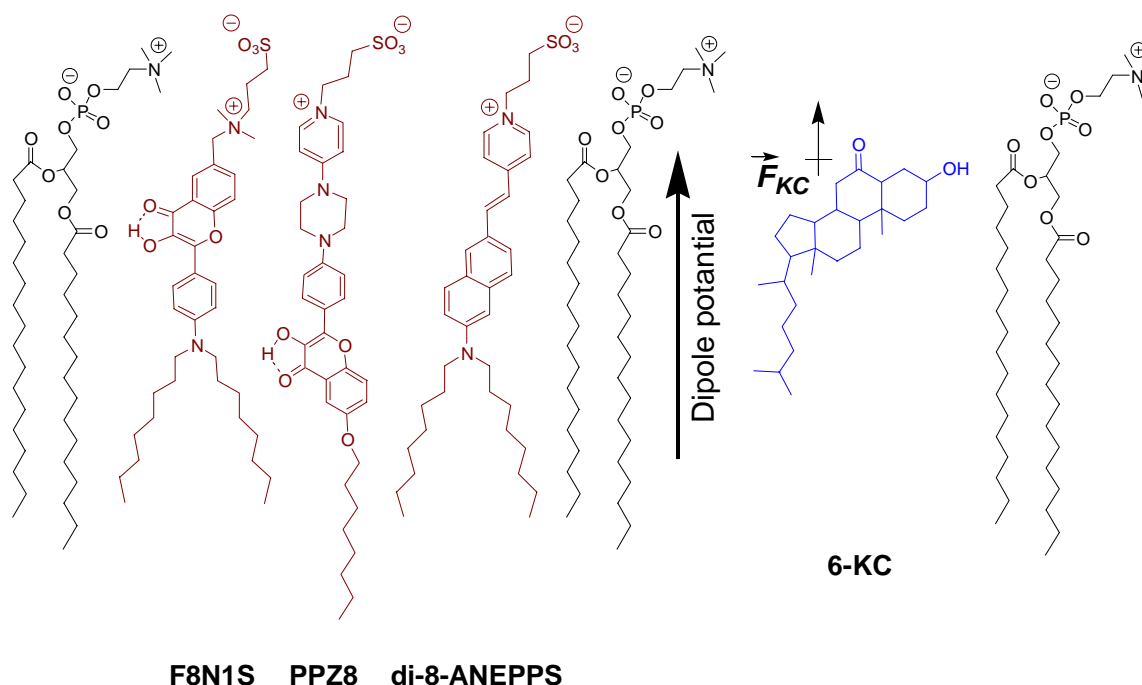


Figure 27. Sondes fluorescentes F8N1S, PPZ8 et di-8-ANEPPS ainsi que leur localisation dans la bicouche. La grande flèche indique la direction du potentiel dipolaire et la petite flèche indique la contribution du 6-KC [199].

La sonde F8N1S, comparée à son analogue F4N1, possède un groupe zwitterionique et deux chaînes octyles devant diminuer de manière significative sa vitesse de pénétration au travers d'une membrane. Pour la sonde PPZ8, le noyau benzène de l'analogue BPPZ a été remplacé par un groupement 6-octyloxy plus compatible avec les composants d'une membrane. Le résultat obtenu quant à l'incorporation de ces sondes dans des cellules comme le démontrent les images obtenues avec des cellules adhérentes L929 (Fig.28)

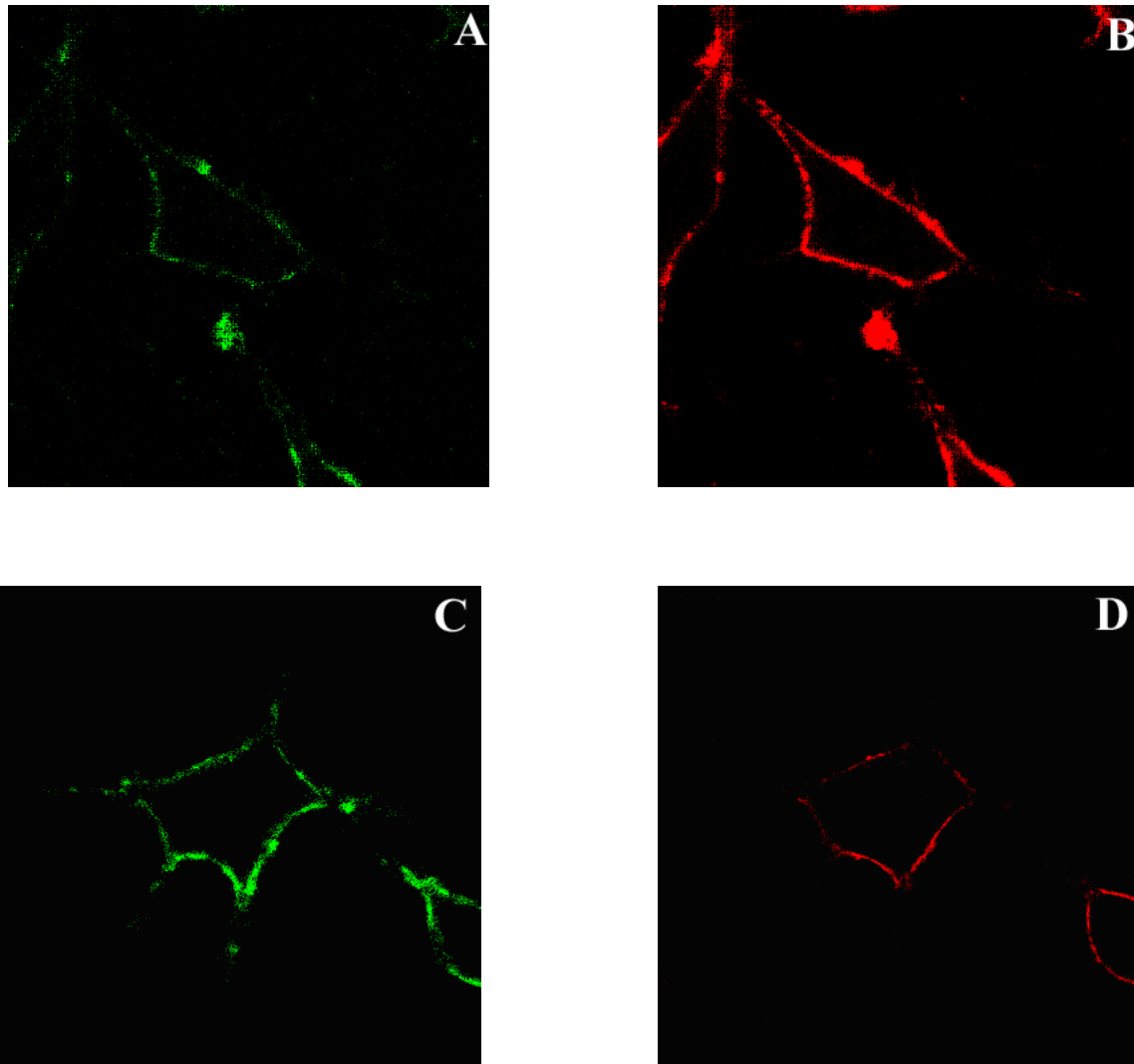


Figure 28. Localisation des sondes PPZ8 (A,B) et F8N1S (C,D) dans la membrane plasmique de cellules L929. Les images A et C ont été obtenues dans la bande spectrale 470-500 nm correspondant à l'émission de la forme N*, les images B et D dans la zone spectrale 585-700 nm correspondant à la forme T* [199]

Ces images montrent une localisation des deux sondes uniquement dans la membrane plasmique. Cette même sélectivité a été observée pour d'autres lignées cellulaires comme les monocytes THP-1. En outre, ceci est très important, ces sondes restent dans la membrane durant toute la période d'observation sous le microscope, temps qui n'est limité que par la durée de viabilité des cellules dans leur milieu de suspension (~1 heure).

Dans une étude menée sur des cellules humaines de lignée monocyttaire THP-1., Shynkar et coll. [199] ont étudié, selon un protocole identique à l'étude faite sur les liposomes, la variation du potentiel dipolaire de la membrane plasmique induit par l'ajout de 6-kétocholestanol. Ces sondes ont montré une excellente réponse à l'augmentation du potentiel dipolaire de la membrane plasmique révélé par une modification du rapport des intensités I_{N^*}/I_{T^*} en accord avec l'orientation respective des deux sondes dans la membrane. Ces deux intensités I_{N^*} et I_{T^*} ont été mesurées simultanément sur deux voies séparées équipées des filtres adéquats pour sélectionner chacune des deux bandes spectrales. La sensibilité de ces nouvelles sondes a permis de révéler une certaine hétérogénéité de distribution du potentiel dipolaire de la membrane plasmique, de toute évidence liée à son hétérogénéité de composition.

7.6.2. Mesure du phénomène de l'apoptose

L'apoptose est le processus qui conduit à la mort naturelle des cellules. Elle est caractérisée par la perte de l'asymétrie de distribution des phospholipides entre les feuillet externe et interne de la membrane plasmique, effective dès les premières étapes du processus [200,201]. Le phénomène le plus caractéristique dans cette perte d'asymétrie est la translocation de la phosphatidylsérine membranaire du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Cette translocation est mise à profit dans la méthode classique de détection de l'apoptose. Cette méthode consiste à utiliser l'Annexine V marquée à la fluorescéine qui interagit avec la phosphatidylsérine à la surface des cellules. Cependant cette méthode est parfois source d'erreur du fait de la présence de produits, eux-mêmes négativement chargés, de peroxydation des lipides [202,203]. En outre, la méthode nécessite la présence de concentrations élevées en Ca^{2+} . Pour palier à ces défauts, il a été envisagé une sonde fluorescente de type 4'-(dialkylamino)-3-hydroxyflavone sensible à cette variation d'asymétrie de la membrane, en mettant à profit la sensibilité au potentiel de surface, qui est modifié du fait de l'augmentation de concentration surfacique de phosphatidylsérine négativement chargée. Un bon candidat aurait pu être la sonde F2N8, sensible au potentiel de surface, comme précédemment mentionné [178]. Cependant, cette sonde, comme les sondes F4N1 et BPPZ [147], s'internalise très rapidement dans la cellule. Il a donc fallu élaborer une stratégie de synthèse identique à celle mise en œuvre pour les sondes PPZ8 et F8N1S, dont il est résulté la sonde F2N12S, (*1-dodécaminium, N-[2-[4-diéthylaminophényl]-3-hydroxychromone-6-yl]-méthyl]-N-Nméthyl-N-(3-sulfopropyle)*), un analogue de F2N8 (Fig.29).

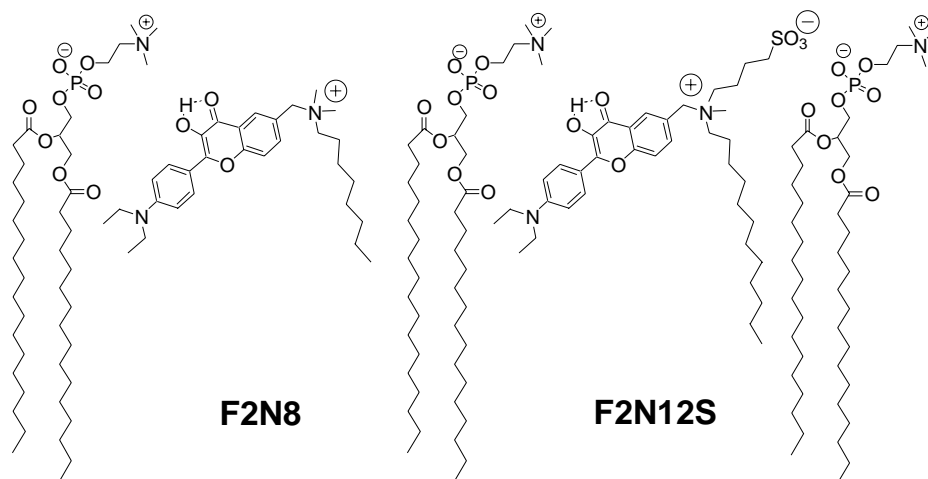


Figure 29. Structures et localisations des sondes F2N8 et F2N12 dans la bicouche phospholipidique et les membranes cellulaires [204].

Comme F8N1S, cette sonde possède un groupe zwitterionique, qui assure une interaction forte avec les têtes polaires des lipides, et une longue chaîne dodecanoyle qui augmente l'interaction hydrophobe avec les chaînes d'acides gras. Comme pour les sondes PPZ8 et F8N1S, les images de microscopie confocale démontrent la rétention de cette sonde au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique.

Les études menées au laboratoire sur cette sonde [204] ont démontré qu'elle pouvait remplacer très avantageusement l'Annexine V-fluorescéine en permettant de distinguer les cellules apoptotiques des cellules saines par une mesure ratiométrique, pour laquelle l'intensité I_{N^*} s'accroît par rapport à I_{T^*} , ce qui correspond effectivement au fait que la membrane s'enrichit en lipides de type anionique, notamment en phosphatidylsérine. Ceci est clairement démontré sur la Figure 30 où sont comparés des résultats obtenus sur des vésicules et sur des cellules.

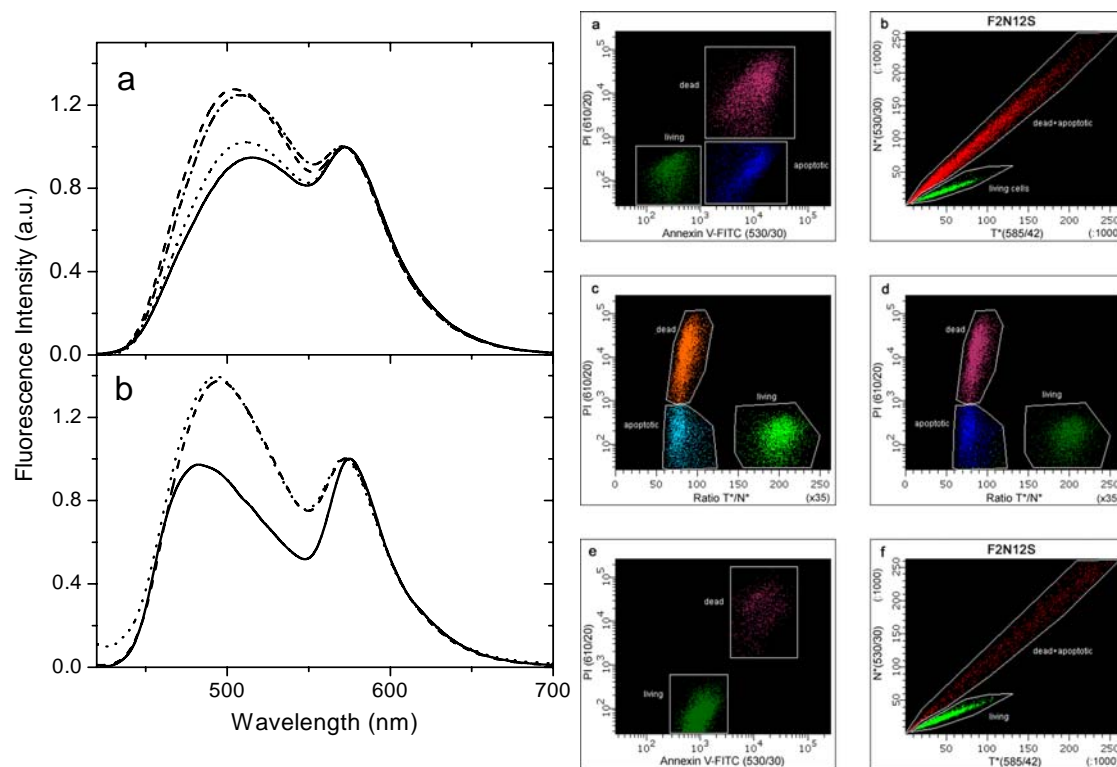


Figure 30. A gauche: Spectres de fluorescence de **F2N12S** dans les vésicules (a) et les cellules (b). En (a), les vésicules de lipides composés de EYPC (—), EYPE (····), EYPG (— · — ·) et PS (— — —). En (b) les spectres du **F2N12S** sont recueillis avec des cellules normales (—) et des cellules CEM apoptotiques en l'absence (— — —) et en présence de Ca^{2+} à 2mM (····). La longueur d'onde d'excitation est 400nm. La concentration finale en sonde est de 0.1 μ M.

A droite : Cytométrie en flux des cellules lymphoblastiques T traitées avec l'actinomycine D. Les cellules sont imprégnées d'annexine V-FITC de PI et de **F2N12S**. En (a), l'annexine V-FITC et le PI sont sélectivement excités à 488 nm et les intensités de fluorescence à 530 et 610 nm sont simultanément collectées. Les cellules vivantes apparaissent en vert foncé, celles mortes en pourpre et celles apoptotiques en bleu en fonction des intensités absolues des deux sondes. En (b), **F2N12S** est sélectivement excité à 407 nm, son intensité de fluorescence est collectée à 530 et 585 nm. Les cellules vivantes (en vert) se distinguent des cellules mortes (rouge) par les intensités relatives des deux bandes d'émission. En (c), les intensités de fluorescence de PI sont tracées en fonction du ratio des deux bandes (T^*/N^* , 585/530) de **F2N12S**. Les cellules vivantes apparaissent en vert, celles apoptotiques en bleu et celles mortes en orange. En (d), les populations marquées avec le couple **F2N12S**/PI sont colorées selon leur réponse avec le couple annexine V-FITC/PI. La comparaison avec (c) montre que les populations marquées avec les deux couples de sondes s'équivalent. En (e) et (f) la comparaison des réponses de l'annexine V-FITC et de **F2N12S** sur des cellules T lymphoblastiques non traitées. Les cellules vivantes apparaissent vertes et celles mortes rouges [204].

La détection de l'apoptose à l'aide de F2N12S peut se faire en microscopie confocale selon la même approche expérimentale que pour la mesure du potentiel dipolaire de la membrane plasmique, en effectuant le ratio de la lumière émise dans deux régions spectrales correspondant respectivement à l'émission de la forme N^* et à celle de la forme T^* . Un exemple de ce type de mesure est donné dans la figure 31.

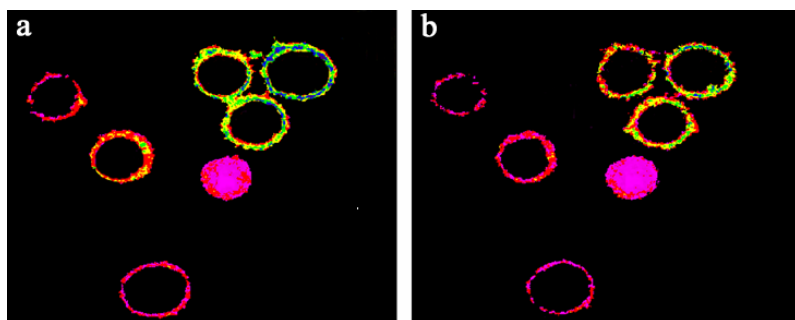


Figure 31. La série de temps des images de fluorescence confocale ratiométriques des lymphocytes T imprégnés de F2N12S et traités à l'actinomycine D. Les cellules sont traitées à l'actinomycine D pendant 18 heures, puis sont incubées avec la sonde ($0,2 \mu\text{M}$) pendant 2 min. les images sont recueillies après 1 min (a) et 10 min (b) d'incubation. La taille des images est $60 \times 73,1 \mu\text{m}$ [204].

DEUXIEME PARTIE :
TRAVAUX EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 3 :
MATERIEL ET METHODES

1. Produits chimiques

1.1. Sondes fluorescentes

A l'exception des sondes originales étudiées dans ce travail (cf. articles 1 et 2), tous les dérivés 3-hydroxyflavone que nous avons utilisés ont été synthétisés par le Dr. Andrey Klymchenko d'abord dans le laboratoire du Professeur Demchenko (Research Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Gebze-Kocaeli, Turquie) puis dans notre laboratoire à Illkirch. Pour les études en solvants organiques, l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation a été systématiquement ajustée à ~ 0.1 . Pour les études avec des vésicules lipidiques, la concentration finale a généralement été ajustée à $2 \mu\text{M}$, à partir de solutions stocks millimolaires dans le DMSO, pour une concentration en phospholipides de $200 \mu\text{M}$, soit un rapport lipides/sonde de 100. Les sondes 3-HF que nous avons utilisées sont les suivantes :

- la *4'-diethylamino-3-hydroxyflavone* (FE) a été utilisée comme référence pour les mesures de rendement quantique, en adoptant la valeur donnée par Ormson et coll. : $\Phi_R = 0.52$ [96].
- la *[2-(4'-N,N-diéthylaminophényl)-3-hydroxy-6-chromonyl](N,N-diméthylloctyl) ammonium bromide* (F2N8), qui est particulièrement sensible à l'hydratation des vésicules, a été utilisée dans l'étude de l'hydratation des vésicules modélisant les radeaux lipidiques.
- les *N-[4'-N,N-Dibutylamino)-3-Hydroxy-6-Flavonyl]Methyl-N,N,N-Trimethyl Ammonium Bromide* (F4N1) et *3-[2-(4-(dioctylamino)-3-hydroxyflavonylmethyl)(dimethyl)ammonio]-1-propanesulfonate* (F8N1S), qui toutes deux, étant donné leurs structures, s'orientent parallèlement aux chaînes d'acides gras, ont été utilisées pour les mesures de potentiel dipolaire de membranes.

La sonde originale *2-[4-di(2-hydroxyethyl)aminophenyl]-3-hydroxy-4H- 'chromenone* (FHE) a été synthétisée par O.V. Martyloga, doctorant du Département de Chimie à l'Université Nationale Taras Shevchenko de Kiev (Ukraine), sous la direction du Professeur V.G. Pivovarenko, dans le cadre d'une collaboration entre les deux laboratoires. Les deux sondes originales dérivées de la 2-(2-thienyl)-3-hydroxychromone ont été synthétisées au laboratoire par notre collègue doctorant Dmytro Yushchenko. La synthèse de ces sondes a été explicitée dans les articles correspondants.

Par ailleurs, pour des mesures de fluidité membranaire par anisotropie de fluorescence, nous avons utilisé selon les cas soit le 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH, de Koch-Light Laboratories) ou son dérivé triméthyl-ammonium (TMA-DPH, de Molecular Probes). Ces deux sondes ont été utilisées à partir de solutions stock millimolaires dans le chloroforme pour le DPH et la diméthyl-formamide pour le TMA-DPH. Le di-8-ANEPPS (Molecular Probes) a été utilisé

comme sonde de référence pour les mesures de potentiel dipolaire de membrane à partir d'une solution stock millimolaire dans le méthanol.

1.2. Lipides

1.2.1. Phospholipides naturels

La L- α -phosphatidylcholine et le L- α -phosphatidylglycérol de jaune d'œuf (Sigma-Aldrich) sont deux phospholipides qui correspondent au mélange naturel d'espèces "phosphatidylcholine" ou "phosphatidylglycérol" existant dans le jaune d'œuf. Ce ne sont donc pas des espèces chimiques bien définies. Le premier est un phospholipide zwitterionique et donc neutre dont le groupement choline positif est compensé par la charge négative du groupement phosphate, le second un phospholipide anionique, dit acide dont le groupement glycérol neutre ne compense pas le groupement phosphate.

La sphingomyéline, ou ceramide 1-phosphocholine est constituée d'un groupement ceramide auquel est greffé, en position 1, un groupement phosphorylcholine. C'est donc l'analogue, en tant que sphingolipide, d'une phosphatidylcholine. Ce lipide est un composant ubiquitaire des membranes animales, ou dans certains cas, il peut atteindre une teneur de 50% en lipides totaux. Il est reconnu comme étant le constituant majeur des radeaux lipidiques (rafts). L'espèce moléculaire d18 :1/16 :0 est donnée en exemple ci-dessous. Le taux d'insaturation des sphingolipides est particulièrement bas comparé aux glycérophospholipides. Nous avons utilisé la sphingomyéline issu du cerveau de bœuf (Avanti Lipids).

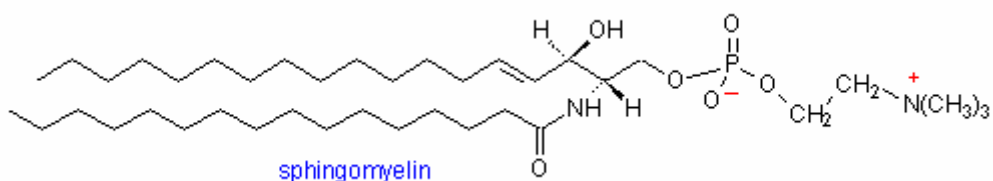


Figure 32. Structure de la sphingomyéline.

Le cholestérol est l'un des constituants les plus importants de la membrane plasmique des cellules animales. En association avec la sphingomyéline et d'autres phospholipides saturés, il participe à la constitution des radeaux lipidiques.

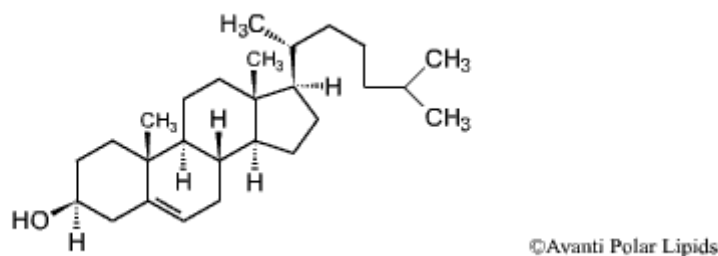


Figure 33. Structure du cholestérol.

1.2.2. Phospholipides synthétiques

Il s'agit en premier lieu de glycérophospholipides (en l'occurrence dans notre cas, de phosphatidylcholines, d'origine Sigma-Aldrich) correspondant à des espèces moléculaires bien définies. Ont été utilisées soit la dioleoyl-phosphatidylcholine (DOPC) donnant des vésicules lipidiques à l'état cristal liquide, soit la dimyristoyl- et la dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DMPC et DPPC), donnant des vésicules lipidiques présentant des transitions de phase gel ↔ cristal liquide à 23 °C et 41 °C, respectivement.

Nous avons également utilisé un éther-phospholipide, la 1,2-di-*o*-tetradecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DTPC, Avanti Lipids), qui est un analogue du DMPC pour lequel les chaînes d'acides gras sont liées au noyau glycérol non par des liaisons esters, mais par des liaisons éthers. Ce phospholipide permet de s'affranchir de la présence des groupes carbonyle *sn1* et *sn2* qui contribuent au potentiel dipolaire de la membrane.

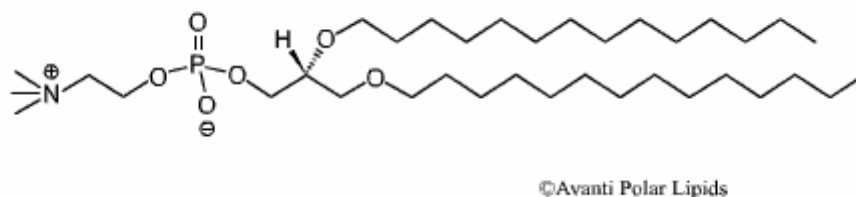


Figure 34. Structure de la DTPC (1,2-di-*o*-tetradecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine).

Enfin nous avons utilisé un lipide cationique, le *N*-(1-(2,3-dimyristoyl)propyl)-*N,N,N*-triméthylammonium paratoluenesulfonate (DMTAP), don gracieux du Dr. Heissler (Institut de Chimie, Strasbourg). Ce lipide nous a permis de moduler la charge de surface des vésicules.

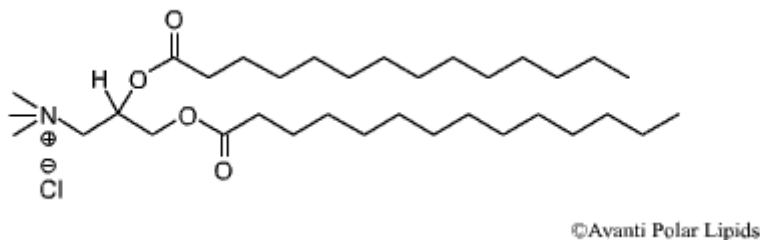


Figure 35. Structure du DMTAP (N-(1-(2,3-dimyristoyl)propyl)-N,N,N-triméthylammonium paratoluenesulfonate)

1.3. Autres composés

Le 6-ketocholestanol (6-KC, Sigma-Aldrich) est aussi un stérol naturel, mais contrairement au cholestérol, n'est pas présent en grande quantité dans les membranes naturelles. Son addition à une bicouche lipidique augmente de manière importante son potentiel dipolaire

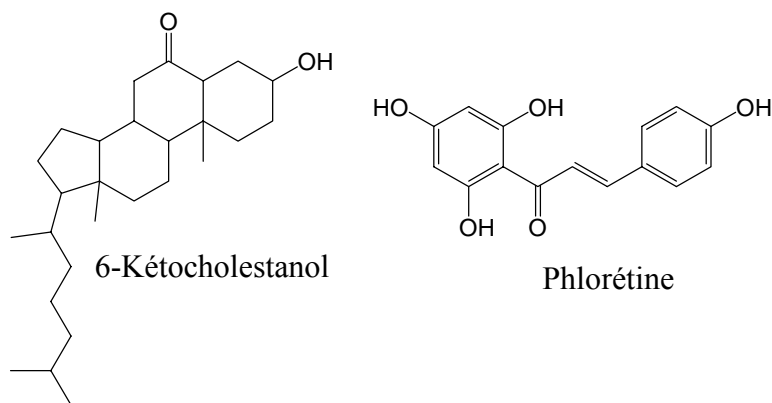


Figure 36. Structures du 6- Kétocholestanol et de la phlorétine.

La phlorétine (*[3-(4hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)1-propanone]*) est une molécule présentant un moment dipolaire élevé (5.6 Debye) dont l'orientation dans une bicouche lipidique induit, contrairement au 6-KC, une baisse du potentiel dipolaire de membrane .

Le détergent non ionique Pluronic F-127 (Sigma-Aldrich) est utilisé communément pour faciliter l'incorporation dans des cellules ou des liposomes de molécules hydrophobes, voire de sondes fluorescentes [54]. Nous l'avons utilisé pour incorporer de manière progressive 6-KC et phlorétine dans les vésicules lipidiques. Pour ce faire, ces deux molécules ont été dissoutes dans une solution de DMSO à 2.5% de Pluronic F-127 afin d'obtenir des solutions stock à 25 mM. Des aliquotes de ces solutions stock ont été successivement ajoutées à une suspension de vésicules, sous agitation. L'incorporation est effective après 3 min d'incubation.

Les solvants organiques que nous avons utilisés sont tous de qualité spectroscopique. Dans certains cas (solvants polaires comme l'éthanol), nous avons pris soin d'utiliser des préparations fraîchement distillées pour éviter la présence de traces d'eau.

2. Préparation des vésicules lipidiques

Nous avons préparé dans le présent travail des liposomes ou vésicules lipidiques de composition variable en fonction du problème abordé. Cependant, sauf en de rares cas où l'utilisation de vésicules multilamellaires pouvait suffire, nous avons systématiquement utilisé des vésicules unilamellaires calibrées en taille, qualifiées de *Large Unilamellar Vesicles* (LUV).

L'obtention de LUV nécessite préalablement l'obtention d'une suspension de vésicules multilamellaires (MLV). Des aliquotes de solutions stock de lipides de concentration connues (quelques mM) dans des mélanges chloroforme/méthanol sont mélangées de façon à obtenir le mélange de lipides correspondant à la composition souhaitée dans la vésicule. Après évaporation totale, à l'aide d'un évaporateur rotatif, du solvant chloroforme/méthanol (vide maintenu 30 minutes pour assurer une disparition totale du solvant), un film lipidique est obtenu sur les parois d'un ballon de 10 à 25 ml de volume. Ce film est hydraté pendant une demi-heure par le tampon phosphate (20mM) citrate (10mM) à pH 7, puis la solution est vortexée vigoureusement pendant 2 minutes, ce qui permet d'obtenir directement une suspension de MLV. Cette solution nécessite un repos de 30 minutes avant toute utilisation ultérieure. Dans certains cas, il peut être recommandé de rendre cette solution moins hétérogène par une succession de trempes dans l'azote liquide et l'eau à 80 °C.

Les LUV sont ensuite obtenus par extrusion de la suspension de MLV. L'extrusion consiste à forcer le passage, sous haute pression d'azote, des MLV sur des filtres de polycarbonate ayant des pores de diamètre bien défini. Nous avons utilisé un extrudeur Lipex Biomembranes et des filtres Nuclepore. Une série de passages (7 X) sur des pores de 0.2 µm permet un premier "dégrossissage" des MLV, puis une seconde série de passages (10 X) sur des pores de 0.1 µm permet d'obtenir *in fine* une suspension de vésicules parfaitement calibrées, de diamètre ~ 0.11-0.12 µm, comme nous l'avons vérifié par mesure de diffusion de la lumière. Cette petite différence entre la taille ainsi obtenue et le diamètre des pores est due à l'élasticité naturelle des vésicules. Si des lipides saturés (DMPC, DPPC, Sphingomyéline) entrent dans la composition des vésicules désirées, les étapes d'hydratation et d'extrusion doivent être effectuées ~ 10 °C au dessus de leur température de transition.

3. Mesures spectroscopiques

3.1. Spectroscopie d'absorption

Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur des spectrophotomètres Cary 400 ou Cary 4000. Dans certains cas (par exemple pour des solutions de vésicules), l'absorbance a dû être corrigée d'une composante de lumière diffusée, OD_{sc} , qui dépend de la longueur d'onde λ selon la formule [205] :

$$\log(OD_{sc}(\lambda)) = A \log(\lambda) + B$$

A et B étant les paramètres déterminés dans le domaine de longueur d'onde où apparaît uniquement la composante de lumière diffusée (aucune absorption due à l'échantillon).

L'absorbance vraie corrigée est alors :

$$OD_{corr}(\lambda) = OD_{mes} - OD_{sc}(\lambda)$$

3.2. Spectroscopie de fluorescence

Les spectres de fluorescence, d'excitation ou d'émission, ont été enregistrés sur des spectrofluorimètres Jobin-Yvon Horiba Fluoromax-3 ou Fluorolog, équipés d'un porte-échantillon thermostaté. Ces fluorimètres sont des instruments à comptage de photons présentant une réponse linéaire pour des intensités inférieures à 3 Mcps. La source lumineuse est une lampe à xénon 450-W. La correction du faisceau d'excitation est effectuée à l'aide d'une photodiode calibrée. Les fonctions de correction, à l'excitation comme à l'émission, et notamment la courbe de réponse du photomultiplicateur, sont définies par le constructeur et incorporées dans le logiciel des appareils. Les spectres de fluorescence sont donc automatiquement corrigés.

3.3. Détermination des rendements quantiques de fluorescence

Une détermination de rendement quantique nécessite des mesures d'absorbance et de spectres d'émission. Il est nécessaire de disposer d'un composé fluorescent de référence (r) dont le rendement quantique est connu, et dont les spectres d'absorption et d'émission recouvrent du mieux possible ceux du composé dont on cherche à déterminer le rendement quantique. La formule suivante s'applique :

$$\frac{\Phi_x}{\Phi_r} = \frac{\left[I_x \left(1 - 10^{-OD_r} \right) n_x^2 \right]}{\left[I_r \left(1 - 10^{-OD_x} \right) n_r^2 \right]}$$

où Φ_x est le rendement quantique à déterminer, Φ_r est le rendement quantique connu de la référence, OD_x et OD_r sont leurs absorbances respectives à une longueur d'onde commune (dans

la pratique, il est conseillé que ces absorbances soient, sinon égales, aussi proches que possible), I_x et I_r leurs intensités de fluorescence respectives mesurées par intégration des spectres d'émission corrigés correspondants, n_x et n_r les indices de réfraction des solvants respectifs.

3.4. Déconvolution des spectres d'émission

La déconvolution consiste en la décomposition d'un spectre de fluorescence composite en ses différentes bandes constitutives. Elle permet ainsi de mesurer la contribution de chaque bande au spectre de fluorescence. Dans le cas qui nous intéresse, il s'agit de déconvoluer le spectre de fluorescence d'une 3-HF en ses trois composantes, N* (forme normale), H-N* (forme normale « H-bonded ») et T* (forme tautomère), en utilisant le logiciel (SIANO) gracieusement mis à notre disposition par son auteur (Dr A. O. Doroshenko, Université de Kharkov) [170]. Ce logiciel est basé sur une méthode itérative non linéaire des moindres carrés, reposant sur les algorithmes de Fletcher-Powell. Les bandes d'émission des trois formes (N*, H-N* et T*) sont approchées à l'aide d'une fonction log-normal [206]. La fonction log-normal nécessite quatre paramètres pour chaque bande considérée: I_{\max} , l'amplitude maximale, ν_{\max} , la position du maximum de la bande, et ν_1 et ν_2 , les positions à mi-hauteur sur les bords bleu et rouge de la bande. Le programme SIANO fonctionne avec des paramètres de forme de la fonction log-normal directement liés à ceux cités ci-dessus à savoir la largeur à mi hauteur (FWHM) $FWHM = \nu_1 - \nu_2$ et l'asymétrie de

la bande $P = \frac{(\nu_1 - \nu_{\max})}{(\nu_{\max} - \nu_2)}$. Ce programme autorise la fixation d'un ou de plusieurs paramètres,

dans la mesure ou leurs valeurs ainsi fixées sont justifiées par une analyse comparative sur des systèmes modèles.

(Fig.37).

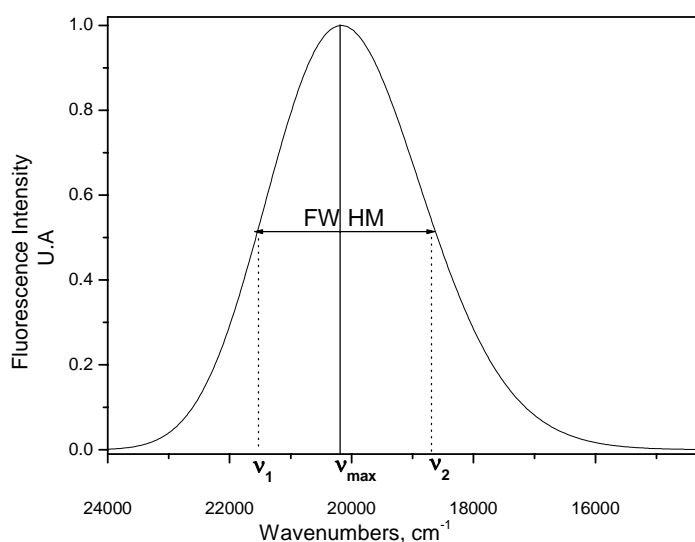


Figure 37. Exemple type de bande montrant les différents paramètres.

Ainsi, dans notre cas, les valeurs de certains de ces paramètres peuvent être approchées, voire fixées à partir d'études faites avec des solvants organiques [146,147]. Par exemple dans le cas des 3-HF, pour la bande normale N*, la forme de celle-ci n'est guère différente pour les différents solvants aprotiques. Son asymétrie a pu être fixée à ~ 0.9 et sa largeur à mi-hauteur (FWHM) approchée dans l'intervalle $2500-3000\text{ cm}^{-1}$. Dans les mêmes solvants aprotiques, la bande T* montre une asymétrie plus prononcée à ~ 0.75 et une FWHM presque deux fois inférieure, $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$. En solvant protique, tel que le méthanol ou l'éthanol, la bande H-N* est principalement observée, ce qui permet de lui attribuer une asymétrie de 0.9 et une FWHM de 3000 cm^{-1} , valeurs voisines de celles trouvées pour la bande N* [166]. La position de la bande H-N* a fait l'objet d'une mesure particulière dans des LUV, en inhibant de manière différentielle la fluorescence des bandes N* et T* d'une part, de la bande H-N* d'autre part, à l'aide d'inhibiteurs de fluorescence adéquats (phospholipides nitroxylés), ce qui permet de lui attribuer une valeur à 18400 cm^{-1} [178]. Selon les cas, il nous est donc possible d'utiliser tout ou partie des valeurs ainsi déterminées pour fixer certains paramètres. Les autres paramètres, à savoir les intensités relatives de fluorescence des trois bandes et les positions des bandes N* et T*, mais aussi l'asymétrie et la FWHM de la bande T* sont laissés variables et s'ajustent lors du processus d'itération. Dans la pratique la déconvolution ne se fait pas directement sur les spectres de fluorescence exprimés en longueur d'onde. En fait, les longueurs d'onde sont converties en nombres d'ondes ν (cm^{-1}), ensuite le fichier ainsi obtenu est converti en un fichier compatible pour être utilisé pour la déconvolution dont nous présentons ci-dessous trois approches successives d'affinement dans le processus d'itération. La Figure 40 donne l'exemple (spectre obtenu avec des LUV de EYPC marqués par la F2N8) d'une première déconvolution effectuée de manière approximative, c'est à dire sans fixer de paramètres, pour laquelle est obtenu un facteur de corrélation $R= 0.9984$. Ce même spectre fait ensuite l'objet d'une déconvolution plus précise en fixant les asymétries des bandes N* et H-N* ainsi que le FWHM et la position de la bande H-N*. Une première itération (Fig. 41) donne un facteur de corrélation de 0.99973, une itération supplémentaire (Fig. 42) démontrant une excellente convergence avec un facteur de 0.99974

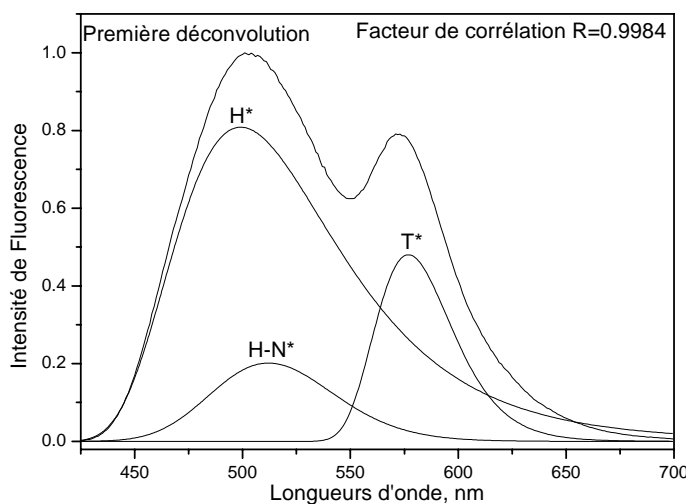


Figure 38. Première déconvolution faite sans paramètres fixes

Tableau 1. Paramètres de forme découlant de la première déconvolution

1 ^{ère} déconvolution	ν (cm ⁻¹)	Intensité	FWHM	Asymétrie (P)
N*	20035	0.8084	3580	0.756
H-N*	19531	0.2014	549	0.991
T*	17334	0.4802	1258	0.798

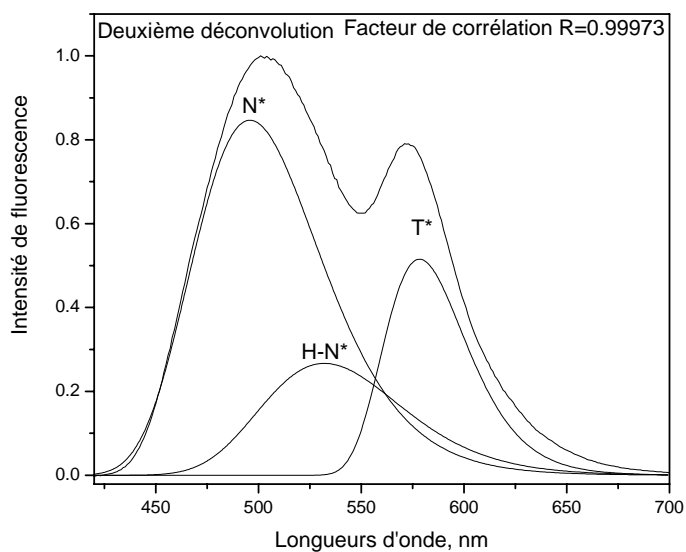


Figure 39. Seconde déconvolution (avec paramètres fixes)

Tableau 2. Paramètres de forme découlant de la deuxième déconvolution

1 ^{ère} déconvolution	ν (cm ⁻¹)	Intensité	FWHM	Asymétrie (P)
N*	20104	0.900	3000	0.951
H-N*	18400	0.2321	3000	0.9
T*	17331	0.4766	1302	0.717

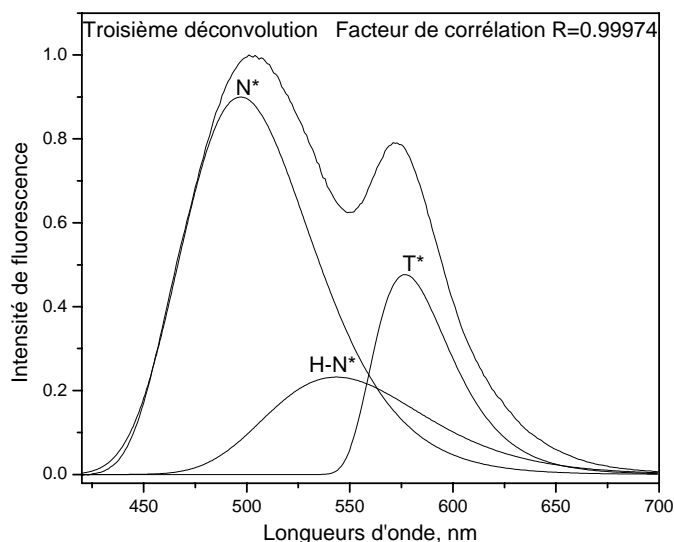


Figure 40. Troisième déconvolution (avec paramètres fixes)

Tableau 3. Paramètres de forme découlant de la troisième déconvolution

1 ^{ère} déconvolution	ν (cm ⁻¹)	Intensité	FWHM	Asymétrie (P)
N*	20119	08949	3000	0.945
H-N*	18400	0.2401	3000	0.9
T*	17337	0.4702	1320	0.710

3.5. Détermination de l'hydratation et de la polarité d'une bicouche lipidique

La contribution relative des formes hydratées et non hydratées d'une sonde 3-HF au niveau de la bicouche peut être évaluée en calculant les intégrales des intensités relatives des bandes H-N*, N* et T* obtenues après déconvolution des spectres expérimentaux. En tenant compte du fait que, pour la plupart des sondes étudiées dans le présent travail, les largeurs à mi-hauteur (FWHM) des bandes N* et H-N* sont sensiblement égales entre elles et égales à 2.5 fois celle de la bande T*, il est possible d'approcher le rapport forme hydratée sur forme non hydratée par l'équation [178]:

$$\frac{[B]}{[F]} = C \frac{Q(F)}{Q(B)} \frac{\int I_{HN^*} d\lambda}{\int I_{N^*} d\lambda + \int I_{T^*} d\lambda} \cong C \frac{Q(F)}{Q(B)} \frac{I_{HN^*}}{I_{N^*} + 0.4I_{T^*}},$$

où [B] et [F] représentent respectivement les concentrations en forme hydratée et forme non hydratée de la sonde, C une constante correspondant au rapport des absorbances molaires de ces deux formes à la longueur d'onde d'excitation, et Q(F) et Q(B) leurs rendements quantiques respectifs. Cependant la valeur absolue du rapport [B]/[F] ne peut être facilement calculée, car le

rapport des rendements quantiques, $Q(F)/Q(B)$, n'est pas connu et ne peut être facilement déterminé. Cependant, si l'on admet que ce rapport de rendements quantiques est relativement voisin pour les différents types de vésicules lipidiques, le rapport des intensités $F_B/F_F = I_{H-N^*}/(I_{N^*} + 0.4I_{T^*})$ peut servir de paramètre relatif pour évaluer l'hydratation de la sonde et par conséquent celle de la bicouche [178].

L'autre paramètre spectroscopique important que l'on peut obtenir après déconvolution des spectres d'émission est le rapport d'intensité des formes N^* et T^* , I_{N^*}/I_{T^*} . Selon les études antérieures menées au laboratoire, ce paramètre est un indicateur sensible de la polarité de l'environnement. Les deux rapports I_{N^*}/I_{T^*} et F_B/F_F peuvent être obtenus directement à partir de la déconvolution des spectres de fluorescence. Une telle démarche nous permet donc d'étudier simultanément, en une seule étape, la polarité et l'hydratation de la bicouche lipidique au niveau de localisation de la sonde [178].

3.6. Mesure de l'anisotropie de fluorescence

Les anisotropies de fluorescence ont été mesurées à l'aide d'un spectrofluoropolarimètre SLM 8000 ultérieurement informatisé par la Société Biologic Science Instruments de Grenoble. La longueur d'onde d'excitation est obtenue à l'aide d'un monochromateur à deux réseaux. La lumière d'excitation est polarisée linéairement (verticalement ou horizontalement) à l'aide d'un prisme de Glan dont la rotation (manuelle ou automatique) est assurée par un moteur piloté par l'informatique. Les composantes de l'émission $I_{//}$ ou I_{\perp} , par rapport à une lumière d'excitation verticalement polarisée, sont également obtenues à l'aide de prismes de Glan positionnés sur le trajet de la lumière de fluorescence.

Deux dispositifs expérimentaux ont été utilisés : le cas le plus simple consiste à mesurer une anisotropie de fluorescence à longueur d'onde d'émission fixe (mesure de fluidité membranaire à l'aide du DPH par exemple). On utilise alors le fluorimètre dans sa conformation dite en T, et on sélectionne tout ou partie du spectre de fluorescence sur les deux voies d'émission ($//$ et \perp) à l'aide soit de filtres interférentiels (Schott), soit de filtres passe-haut (Kodak Wratten). Le facteur de correction du montage est déterminé par une mesure préalable en lumière d'excitation horizontalement polarisée. Par contre, la mesure d'un spectre d'anisotropie de fluorescence $r(\lambda)$ nécessite de balayer la longueur d'onde d'émission, donc de maintenir le monochromateur d'émission en place. Ceci suppose d'utiliser une seule voie d'émission, donc la conformation de l'appareil dite en L. Sont successivement enregistrés la paire de spectre $I_{HV}(\lambda)$ et

$I_{HH}(\lambda)$ en excitation horizontale permettant de déterminer le facteur de correction

$G(\lambda) = \frac{I_{HV}(\lambda)}{I_{HH}(\lambda)}$, puis la paire $I_{VV}(\lambda)$ et $I_{VH}(\lambda)$ permettant d'obtenir $r(\lambda)$ selon la formule :

$$r(\lambda) = \frac{[I_{VV}(\lambda) - G(\lambda)I_{VH}(\lambda)]}{[I_{VV}(\lambda) + 2G(\lambda)I_{VH}(\lambda)]}$$

CHAPITRE 4:
ETUDE ET CARACTERISATION DE NOUVEAUX
DERIVES

Introduction (Publications 1 et 2)

Les nombreux travaux publiés ces dernières années, notamment au sein du laboratoire, ont confirmé le grand intérêt que présentent les 3-Hydroxyflavones dans la conception de sondes fluorescentes non seulement pour l'étude des processus physico-chimiques en solution mais aussi pour l'étude des systèmes biologiques, notamment les systèmes membranaires. Cet intérêt des 3-HF procède de leur réaction de transfert intramoléculaire de proton à l'état excité (ESIPT) donnant naissance à deux formes à l'état excité : une forme normale (N^*) et une forme tautomère (résultant de la réaction ESIPT, T^*), toutes deux émissives avec deux bandes d'émission nettement séparées [57]. Les intensités relatives ainsi que les positions de ces deux bandes d'émissions renseignent sur les propriétés physico-chimiques du microenvironnement. De plus, l'addition d'un groupement électro-donneur de type dialkylamino en position 4' du noyau 3-HF rend de telles molécules beaucoup plus solvatochromiques [70,95,207], de telle sorte que les interactions avec l'environnement induisent une plus grande perturbation non seulement de l'équilibre entre les deux formes à l'état excité, mais aussi dans la position des bandes d'émission.

La grande sensibilité des 3-HF vis-à-vis de la polarité des solvants et leur capacité à former des liaisons hydrogène avec les solvants protiques [101,103,105,118,139,141,199], ont fait de ces molécules des sondes de choix pour la recherche d'impuretés protiques dans des solvants apolaires [94,208], la détection de molécules d'eau dans des micelles inverses [209], et l'étude des propriétés biophysiques des liposomes et des biomembranes [90,143,146,147,166,178,179,210]. Notamment, dans cette dernière application, l'usage des dérivés 4'-(dialkylamino) est apparu particulièrement intéressant, car l'échelle de polarité détectée par leur émission duale correspond bien à celle qui existe dans les membranes lipidiques.

L'utilisation de dérivés 3-HF dotés dans leur structure de groupements chargés permet leur ancrage à l'interface de la membrane. De plus, leur orientation vers l'intérieur de la bicouche peut être assuré par l'adjonction de substituants hydrophobes à l'autre extrémité de la molécule. Leur ancrage à la surface comme leur orientation dans la bicouche permettent la détermination de potentiels membranaires tels le potentiel de surface [143,179], ou le potentiel dipolaire [147,199]. En outre, l'existence de la forme « H-bonded » ($H-N^*$) rend possible la détermination simultanée de la polarité et de l'hydratation de la bicouche phospholipidique [166,178]. Cependant, il n'est pas exclu que l'ancrage à l'interface membranaire via une interaction électrostatique puisse modifier le champ électrique local induit par les groupements phosphates des phospholipides, et par conséquent également la distribution des champs électriques existant dans la bicouche lipidique elle-même [211]. Une contribution à résoudre ce problème peut être

apportée par une sonde qui serait dépourvue de groupements chargés, mais qui garderait la faculté de s'orienter dans la bicouche lipidique. C'est ce que nous avons tenté de faire avec la sonde 3-hydroxy-4'-[di-(2-hydroxyéthyl)amino]flavone (FHE) lors d'une collaboration avec le laboratoire du Professeur Vasyl Pivovarenko (Laboratoire de Chimie Organique de l'Université Taras Shevchenko de Kiev) qui nous a synthétisé cette sonde.

Cette sonde FHE, qui est dépourvue de groupements chargés, possède au niveau de l'amine deux groupements hydroxyéthyle capables de former des liaisons hydrogène avec les atomes d'oxygène des groupements carbonyle des phospholipidiques situés à l'interface de la membrane. Un troisième groupement hydroxyle se trouve en position 3 de l'anneau chromone, mais est moins apte à former une liaison hydrogène intermoléculaire suite à la proximité du carbonyle en position 4. Ainsi, la sonde FHE doit s'incorporer dans la bicouche lipidique en gardant une orientation parallèle aux chaînes d'acides gras, avec son cycle chromone orienté vers le centre de la bicouche, en position inverse par rapport aux 3-HF habituellement utilisés. **[Article 1].**

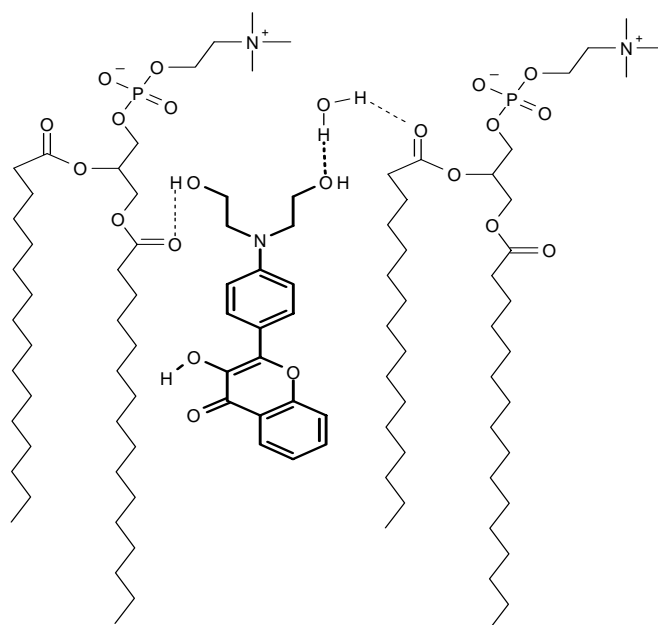


Figure 41. Localisation et orientation de la sonde FHE dans la membrane lipidique.

D'autres problèmes se posent concernant l'utilisation de ces sondes dans des systèmes biologiques. En premier lieu, les dérivés 3-HFs utilisés jusqu'à présent ont comme principal inconvénient leur longueur d'onde d'absorption proche de 400 nm. Lors d'études sur des cellules, cette longueur d'onde peut induire une autofluorescence non négligeable susceptible d'interférer avec le signal de la sonde. D'autre part, s'il existe bien des diodes laser émettant à 405 nm, une telle excitation peut se révéler phototoxique pour les cellules. Afin d'améliorer ces conditions d'excitation (mais aussi d'émission), plusieurs modifications du fluorophore originel

ont été envisagées. Par exemple, une augmentation du pouvoir électro-donneur de certains substituants en position 2 de même que l'élongation du fluorophore déplace les spectres d'absorption et d'émission vers le rouge et augmente le rendement quantique de fluorescence [105]. Un déplacement bathochrome plus marqué peut être obtenu par l'introduction de substituants électro-accepteurs sur le coté opposé du fluorophore [212]. Cependant, dans tous les cas, ce déplacement bathochrome est obtenu de concert avec des variations importantes, et non désirées, du rapport d'intensité des deux bandes d'émission, avec comme conséquence un déplacement de l'échelle de polarité vers des polarités inférieures. Par exemple, des 3-hydroxychromones récemment synthétisées, absorbant vers 440-450 nm, montre une émission duale seulement en milieu hautement apolaire (constante diélectrique ϵ entre 2 et 6) peu fréquent dans des systèmes biologiques [105]. En effet, les sites les plus apolaires en milieu cellulaire sont les biomembranes, dans lesquelles les sondes peuvent être exposées à un environnement correspondant à $\epsilon \sim 3-20$. L'idéal est donc de disposer d'une sonde présentant une émission duale dans cette large gamme de polarité tout en étant excitable vers 450 nm. L'autre problème relatif à l'utilisation des 3-HFs sur des systèmes biologiques résulte de leur sensibilité à certaines interactions spécifiques, notamment leur propension à former des liaisons hydrogène avec l'eau ou les alcools pouvant, comme nous l'avons vu, influencer voire inhiber la réaction ES IPT et favoriser l'émission d'une forme H-N* [58]. Par ailleurs, les sondes 3-HFs ne sont pas sensibles à la basicité d'un solvant (autrement dit sa capacité à être un accepteur de liaison hydrogène), probablement parce que le complexe correspondant n'est pas fluorescent [104]. Dans ce contexte, de nouvelles sondes ont été conçues dans lesquelles le cycle phényle a été remplacé par un cycle thiophène, pour obtenir des (3-hydroxy-2-(5-(1-dialkylamino)-2-thienyl)chromones (composés **2** et **3**).

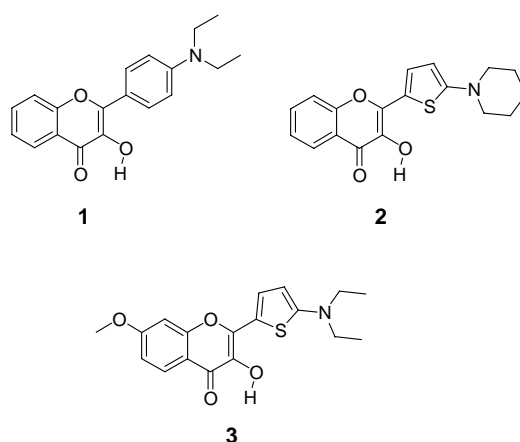


Figure 42. Structures chimiques de la sonde 4'-(dialkylamino)-3-hydroxyflavone de référence (**1**) et des nouvelles sondes 2-(2-thiényle)-3-hydroxychromone (**2**) et (**3**).

Nous avons étudié ces deux nouveaux dérivés qui présentent, comme nous allons le voir [Article 2], des spectres d'absorption et d'émission décalés vers le rouge, une émission duale dans une gamme plus grande de polarité et une meilleure sensibilité à la basicité du solvant, par comparaison avec la sonde 3-HF de référence.

Avec quelques variantes en fonction de l'intérêt propre à chaque type de sondes étudiés, soit la FHE, soit les dérivés thiényl-chromone, le plan général des articles suivra le même canevas, à savoir d'abord une étude de leur solvatochromicité en utilisant essentiellement l'échelle de polarité de Reichardt [155], puis une étude de leurs propriétés spectroscopiques après incorporation dans des vésicules lipidiques de composition variable.

Publication 1

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SICD – Service des thèses électroniques]

3-Hydroxy-4'-[di-(2-hydroxyethyl)amino]flavone as a new step in search of an ideal membrane ratiometric fluorescent probe

Gora M'Baye, Oleksandr V. Martyloga, Guy Duportail et Vasyl G. Pivovarenko

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2006, Vol. 184, Pages 113-124

Pages 113 à 124:

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.03.037>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Conclusion (publication 1)

L'étude de la sonde FHE en solvant organique a montré qu'à l'image des autres sondes 3-HF, à l'exception des solvants les plus protiques comme le méthanol, celle-ci possède les deux bandes d'émission nettement différenciées caractéristiques des formes normale (N*) et tautomère (T*). De plus la sonde FHE présente une grande sensibilité à la polarité des solvants. En effet, une augmentation de la polarité entraîne un déplacement de la bande N* vers le rouge avec une augmentation du rapport I_{N^*}/I_{T^*} . On note une bonne linéarité entre la position des bandes et la polarité des solvants confirmant la solvatochromicité de la sonde conséquence de la différence de moment dipolaire à l'état excité entre les formes normale N* et tautomère. Par ailleurs, on note une assez bonne corrélation entre le logarithme du rapport d'intensité (I_{N^*}/I_{T^*}) et l'échelle de polarité de Reichardt [155].

Dans les liposomes, on note une bonne incorporation de FHE aussi bien dans les LUV neutres (EYPC) que ceux chargés positivement (EYPC/DMTAP 1:1 ; charge +0,5) ou négativement (EYPG ; charge -1). Les deux bandes N* et T* sont très rapprochées, ce qui suggère l'absence d'une forme hydratée H-N*. Cette absence de la forme hydratée a été confirmée par la faible variation de l'anisotropie de fluorescence sur la gamme des longueurs d'onde du spectre d'émission. Cette absence de la forme hydratée ainsi que la faible sensibilité de la sonde au potentiel de surface (eu égard à la faible différence constatées entre les deux spectres mesurés pour les vésicules lipidiques possédant des charges opposées) suggère une localisation en profondeur de la sonde dans la zone hydrophobe de la bicouche, en l'occurrence nettement en dessous des groupements esters des phospholipides. Une telle localisation pouvant la prédisposer à une détermination du potentiel dipolaire. Nous avons vérifié, dans des LUV de EYPC, que FHE est sensible au potentiel dipolaire de membrane, notamment les modifications de potentiel dipolaire induites par le 6-Ketocholestanol, y compris et surtout sa forme tautomère T*. La sonde FHE est également sensible aux modification de fluidité membranaire induites par des variations soit du ratio de cholestérol, soit de la température, ainsi qu'à la présence de poly-anions tels que l'ATP, ce qui se traduit par une augmentation de l'intensité relative de la forme N*.

Cependant, l'intérêt principal de cette sonde réside dans la présence des deux groupements hydroxyéthyle qui, grâce aux liaisons hydrogène avec les groupements ester des phospholipides, lui confèrent une localisation et une orientation précises dans la bicouche, en évitant toute interaction électrostatique. Une telle localisation peut permettre l'utilisation de cette sonde pour la mesure du potentiel dipolaire de membrane, avec l'avantage supplémentaire de ne pas nécessiter une déconvolution en trois bandes pour s'affranchir de l'influence de la forme hydratée H-N*, puisque celle-ci est absente (cf. Article 3). L'ensemble de ces caractéristiques

rend la sonde FHE intéressante, en tant que prototype, pour la conception de nouveaux dérivés originaux de la 3-HF dans l'étude des biomembranes.

Publication 2

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SICD – Service des thèses électroniques]

Fluorescent dyes undergoing intramolecular proton transfer with improved sensitivity to surface charge in lipid bilayers

Gora M'Baye, Andrey S. Klymchenko, Dmytro A. Yushchenko, Volodymyr V. Shvadchak, Turan Ozturk, Yves Mély *et* Guy Duportail

Photochemical & Photobiological Sciences, 2007, Vol.6, Pages 71–76

Pages 71 à 76 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://www.rsc.org/Publishing/Journals/PP/article.asp?doi=b611699j>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Conclusions (publication 2)

La présente étude a eu pour but de caractériser des sondes présentant des propriétés spectroscopiques plus favorables que les sondes 3-hydroxyflavones, en vue de leur utilisation en biologie cellulaire. Que ce soit en solution organique ou incorporés dans des vésicules lipidiques, les dérivés 2-(2-thienyl)-3-hydroxychromone (notés **2** et **3**) présentement étudiés montrent une fluorescence duale avec un déplacement des spectres d'absorption et d'émission vers le rouge, déplacement de l'ordre de 40 à 50 nm comparé à la sonde 3-HF de référence (notée **1**).

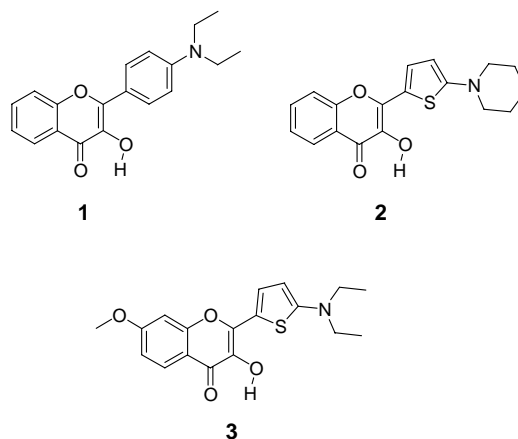


Figure 42 Bis. Structures chimiques de la sonde 4'-(dialkylamino)-3-hydroxyflavone de référence (**1**) et des nouvelles sondes 2-(2-thiényl)-3-hydroxychromone (**2**) et (**3**).

Ce déplacement vers le rouge s'explique par le remplacement du groupement phényle par le groupement thiophène plus facilement polarisable et plus électro-donneur, ce qui augmente le transfert de charge à l'état excité. En confirmation de ce dernier point, l'augmentation du rapport d'intensité (I_{N^*}/I_{T^*}) va de pair avec le déplacement vers le rouge de l'ensemble du spectre de fluorescence. Le maximum d'absorption des sondes **2** et **3**, se situant vers 440 nm, les rend plus aptes à des applications biologiques, puisque cette longueur d'onde d'excitation est compatible avec les lasers du type He-Cd qui émettent à 442 nm. Une autre propriété importante des dérivés **2** et **3** comparativement à la sonde 3-HF de référence est leur rendement quantique de fluorescence plus élevé, avec comme exception notable un rendement quantique plus faible dans les solvants polaires protiques, probablement dû à des effets d'inhibition de ces solvants.

Comme pour la sonde de référence **1**, la sensibilité aux propriétés du solvant des sondes **2** et **3** reste très importante. Notamment, dans des solvants neutres, l'augmentation de la polarité du solvant entraîne un déplacement de la bande N^* vers le rouge et une augmentation linéaire de $\log(I_{N^*}/I_{T^*})$. Cependant, la pente de cette relation linéaire s'avère plus faible que la pente correspondante de la sonde 3-HF de référence **1**, avec comme conséquence favorable le fait que l'émission duale polarité-dépendante de ces nouvelles sondes peut être observée sur une échelle de polarité plus large. Ces sondes sont également sensibles à l'acidité du solvant (capacité à céder un proton) comme à sa basicité (capacité à accepter un proton). Dans les deux cas, le \log

(I_{N^*}/I_{T^*}) se situe au dessus de la courbe linéaire obtenue en solvants neutres. En ce qui concerne l'acidité du solvant, un tel effet a précédemment été observé de façon plus marquée avec les 3-HFs. Il apparaît donc que l'émission duale est moins sensible à l'acidité du solvant dans le cas des sondes **2** et **3**. A contrario, la grande sensibilité des sondes **2** et **3** à la basicité du solvant est inexistante pour les 3HFs. Cette sensibilité a été démontrée notamment en considérant les spectres de fluorescence obtenus dans une paire de solvants de polarité voisine, mais de basicité différente, comme l'acétonitrile et le diméthylformamide (DMF). Alors que le rapport d'intensité est identique pour la sonde 3-HF de référence, une forte augmentation du rapport I_{N^*}/I_{T^*} est présentement observée pour **2** et **3** avec le DMF, qui est le solvant le plus basique. Les solvants basiques inhibent probablement la réaction ESIPT, ce qui diminue donc la contribution de la bande T^* . Cette inhibition de la réaction ESIPT par les solvants basiques peut s'expliquer par la formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire entre la sonde et une molécule de solvant, empêchant de ce fait la formation de la liaison hydrogène intramoléculaire.

En résumé, les sondes **2** et **3** apparaissent moins sensibles à la polarité et à l'acidité du solvant que la sonde **1**, mais montrent une forte sensibilité à la basicité, ce dernier point pouvant constituer un avantage quant à l'utilisation de ces sondes.

Dès lors que les propriétés spectroscopiques des sondes **2** et **3**, et notamment leurs différentes sensibilités aux caractéristiques de l'environnement, ont été déterminées, nous avons cherché à les utiliser comme sondes membranaires. L'étude dans des LUV de composition différente a montré une bonne incorporation des sondes dans la bicouche lipidique, et un excellent rendement quantique de fluorescence, le plus souvent compris entre 0.35 et 0.45 (alors qu'il est très faible en solution aqueuse, ~ 0.008). La résolution entre les bandes N^* et T^* pour la sonde **2** et encore plus pour la sonde **3** est nettement meilleure (+ 25 nm) que pour la sonde **1** de référence, ce qui ne peut être que favorable pour une utilisation comme sonde ratiométrique. Cependant, le résultat le plus intéressant de notre étude réside dans l'influence de la charge de surface de la vésicule sur le rapport d'intensité I_{N^*}/I_{T^*} . Nous avons modulé cette charge de surface via la composition de la vésicule : -1 pour des vésicules composées de phospholipides anioniques (EYPG ou BBPS), 0 pour des phospholipides neutres (EYPC), -0.5 pour des mélanges équimoléculaires de EYPG et EYPC, voire positive si on introduit des lipides cationiques dans la vésicule. On constate qu'une décroissance de la charge de surface s'accompagne d'une décroissance de l'intensité de la forme T^* . Une charge de surface d'autant plus négative se traduit donc par une augmentation importante du rapport I_{N^*}/I_{T^*} . Ainsi par exemple, pour le dérivé **2**, ce rapport diminue d'un facteur 2,4 fois en passant de vésicules d'EYPC à des vésicules de BBPS, comparé à un facteur de seulement 1,35 pour la sonde de

référence 1. Cette plus grande sensibilité à la charge de surface peut s'expliquer par les différences de basicité entre les bicouches de charge négative (forte basicité) et les bicouches de charge positive (faible basicité).

Ces propriétés font de ces molécules des sondes potentielles très intéressantes pour l'étude des biomembranes. Comme pour les 3HFs, mais avec une résolution meilleure, ces sondes présentent une fluorescence duale due à la réaction ESIPT, ce qui constitue une amélioration conséquente par rapport aux sondes communément utilisées comme le Prodan, le Laurdan ou le Rouge Nil. En leur greffant des groupements amphiphiles comme ce fût le cas avec les dérivés 3HFs précédemment étudiés au laboratoire, le développement d'une nouvelle génération de sondes fluorescentes membranaires utilisables en biophysique cellulaire est envisageable, notamment pour la mesure du potentiel de surface, et par conséquent pour la mesure de l'apoptose cellulaire. Des résultats récents obtenus au laboratoire sur ce type de dérivés en témoignent.

CHAPITRE 5:
APPLICATIONS BIOLOGIQUES

Introduction (publication 3)

Certains des paramètres physiques de la membrane biologique ne sont pas faciles à mesurer. C'est le cas notamment du potentiel dipolaire de membrane (ψ_d). Ainsi que nous l'avons rappelé dans la première partie de cette thèse, ψ_d est le potentiel formé entre les têtes polaires fortement hydratées des phospholipides à la surface de la membrane et l'intérieur hydrophobe de cette membrane qui en est la partie la moins polaire [47,190]. Il résulte de l'alignement des résidus dipolaires de molécules de phospholipides, avec la participation de l'eau d'hydratation, à hauteur de leurs groupements phosphate et carbonyle. Ce potentiel ψ_d entraîne une importante charge virtuelle positive au centre de la bicouche et conditionne un certain nombre de propriétés de la membrane [48,191]. Suite à leur orientation perpendiculaire au plan de la bicouche, les groupements carbonyles sn_2 sont considérés comme ayant un rôle déterminant [47,48,184,190], alors que les groupements carbonyles sn_1 orientés parallèlement au plan de la bicouche auront une faible influence. Comme nous l'avons également souligné dans la première partie, la mesure directe du ψ_d n'étant pas possible, des méthodes expérimentales indirectes ont été proposées. L'une de ces méthodes, sans doute la plus simple et la plus sensible, est basée sur l'usage de sondes fluorescentes. Une telle approche n'est pas destructive et permet de détecter des effets électrostatiques à l'échelle moléculaire avec des concentrations de sondes correspondant à un rapport sonde/lipides $\leq 1 : 100$. Ainsi, des sondes styryls à réponse rapide initialement conçues pour la mesure du potentiel transmembranaire ont été proposées pour la mesure du ψ_d [54,177,182,183]. Leur réponse repose sur le phénomène d'électrochromisme (effet Stark), résultant de l'influence du champ électrique [55] et induisant un déplacement des bandes d'émission et d'absorption de la sonde. C'est le cas du di-8-ANEPPS, proposé par Gross et *coll.* [54] qui permet une mesure ratiométrique dans la mesure où l'échantillon peut être excité à deux longueurs d'onde (généralement sur les bords du spectre d'excitation). Nous avons utilisé cette sonde, bien reconnue par la communauté scientifique, comme sonde de référence dans le présent travail. Cependant, une telle sonde, nécessitant la mesure d'un ratio sur le spectre d'excitation, est difficilement utilisable pour des mesures de microscopie de fluorescence sur des cellules. En l'occurrence, des sondes ratiométriques à l'émission sont beaucoup mieux adaptées à ce type d'études. Dans ce contexte, le laboratoire a développé des sondes fluorescentes sensibles aux variations de ψ_d dérivées de la 3-hydroxyflavone émettant une fluorescence duale résultant de leur réaction ESIPT. En effet, dans un certain nombre de systèmes, il a été montré que le déplacement électrochromique de ces deux bandes se traduit par une importante modification de leur rapport d'intensité I_{N^*}/I_{T^*} . On parle alors de modulation électrochromique de la réaction ESIPT. Deux dérivés ont été synthétisés dans ce but, à savoir les sondes F4N1 et BPPZ, dont les structures et les localisations dans une bicouche lipidique sont montrées dans la figure 25 (cf.

Chapitre Etude du potentiel dipolaire dans les vésicules lipidiques). Ces sondes ont été synthétisées de manière à ce que leur groupement chargé se fixe à l'interface membranaire au niveau des têtes phospholipidiques et que leur fluorophore soit orienté vers l'intérieur de la bicouche via une greffe de chaînes hydrocarbonées à l'extrémité opposée de la molécule. On remarquera que le moment dipolaire du fluorophore 3-HF dans BPPZ est orienté vers le centre de la bicouche alors que dans F4N1 il est orienté de manière opposée, ce qui a permis aux auteurs de confirmer que ces sondes répondaient bien de manière vectorielle au potentiel dipolaire de membrane ψ_d , lui-même vectoriel.

Il est possible de modifier ψ_d de différentes manières. Ainsi la phlorétine (un composé avec un groupement carbonyle et quatre groupements hydroxyles), de même que l'absence des groupements carbonyles dans les phospholipides (en considérant des éther-lipides au lieu d'ester-lipides), réduisent ψ_d de manière importante [48,184,195-197]. Au contraire les stérols, et plus particulièrement le 6-Kétocholestanol, l'augmentent [48,198]. Ces modifications ont permis, dans un travail que l'on peut qualifier de pionnier [147], de montrer l'adaptabilité des dérivés des 3-HF pour la mesure du ψ_d . Ainsi, la corrélation entre les réponses des sondes F4N1 et BPPZ et celle de la di-8-ANEPPS admise comme référence a été trouvée suffisamment bonne pour certifier leur usage pour la détermination du ψ_d . Cependant, il nous est apparu que cette étude, pour satisfaisante qu'elle ait été, nécessitait une confirmation. En effet, il a été montré récemment que les spectres de fluorescence des sondes 3-HF dans les vésicules phospholipidiques ne pouvaient pas s'expliquer en tenant compte uniquement des bandes d'émission correspondant aux formes N* et T* résultant de la réaction ESIPT. En effet ces deux formes N* et T* sont toutes deux des formes non hydratées avec basculement intramoléculaire du proton alternativement sur les oxygènes en position 3 et 4. Or, deux travaux du laboratoire [166,178], ultérieurs au travail portant sur la détermination du ψ_d , ont montré que dans des vésicules phospholipidiques s'ajoutait à ces deux formes N* et T* une forme qualifiée d'hydratée, notée H-N*, résultant de la formation d'une liaison hydrogène intermoléculaire entre le fluorophore 3-HF et les molécules d'eau de l'environnement, notamment celles situées à l'interface membranaire. Cette forme H-N*, tout en inhibant la réaction ESIPT, a sa propre bande d'émission, dont la longueur d'onde maximum est intermédiaire à celles des émissions des formes N* et T*. A première vue, l'émission de la forme H-N* peut se confondre avec l'émission de la forme N* (et initialement d'ailleurs n'en a pas été distinguée), mais en fait interfère aussi avec l'émission de la forme T*. Les bandes individuelles des différentes formes sont obtenues séparément par déconvolution de l'ensemble du spectre d'émission, déconvolution dont la procédure a été explicitée dans le paragraphe correspondant de Matériels et Méthodes. Un

vrai rapport I_{N^*}/I_{T^*} , au lieu du rapport “apparent” utilisé dans l’étude précédente, peut donc être obtenu après cette déconvolution. Cette émission additionnelle de la forme H-N*, n’ayant pas été considérée lors de l’étude précédente, il nous est apparu nécessaire de réévaluer la validité de la méthode. De plus, il n’est pas exclu que la phlorétine et le 6-kétocholestanol utilisés pour moduler ψ_d puissent localement influencer l’hydratation de la bicouche [195,178], ce qui constitue un argument supplémentaire pour une telle réévaluation.

Notre travail a donc consisté à revalider la méthode préalablement établie en confirmant la corrélation entre la réponse ratiométrique en excitation du di-8-ANEPPS et le rapport I_{N^*}/I_{T^*} “vrai” obtenu après soustraction de la forme hydratée N-H*. Dans cette étude nous n’avons pas jugé utile de reprendre le BPPZ, étant donné que l’effet électrochromique inversé a bien été établi, et que les relativement faibles amplitudes de l’émission des formes N* et N-H*, peuvent conduire à des erreurs lors de la déconvolution. Nous avons choisi d’étudier d’une part le dérivé F4N1 utilisé précédemment, et qui a donc permis d’effectuer la comparaison avec cette précédente étude, d’autre part le nouveau dérivé F8N1S. Le choix d’étudier ce nouveau dérivé découle de son affinité et de sa sélectivité importante vis-à-vis de la membrane plasmique des cellules, ce qui en fait une sonde particulièrement adaptée pour des études de microscopie cellulaire [199]. Comparée à la sonde F4N1, cette sonde possède un groupement zwitterionique et de plus longues chaînes hydrocarbonées qui doivent, tout en maintenant la position verticale, logiquement diminuer la vitesse de pénétration de la sonde dans la bicouche lipidique, expliquant ainsi sa rétention dans la membrane plasmique.

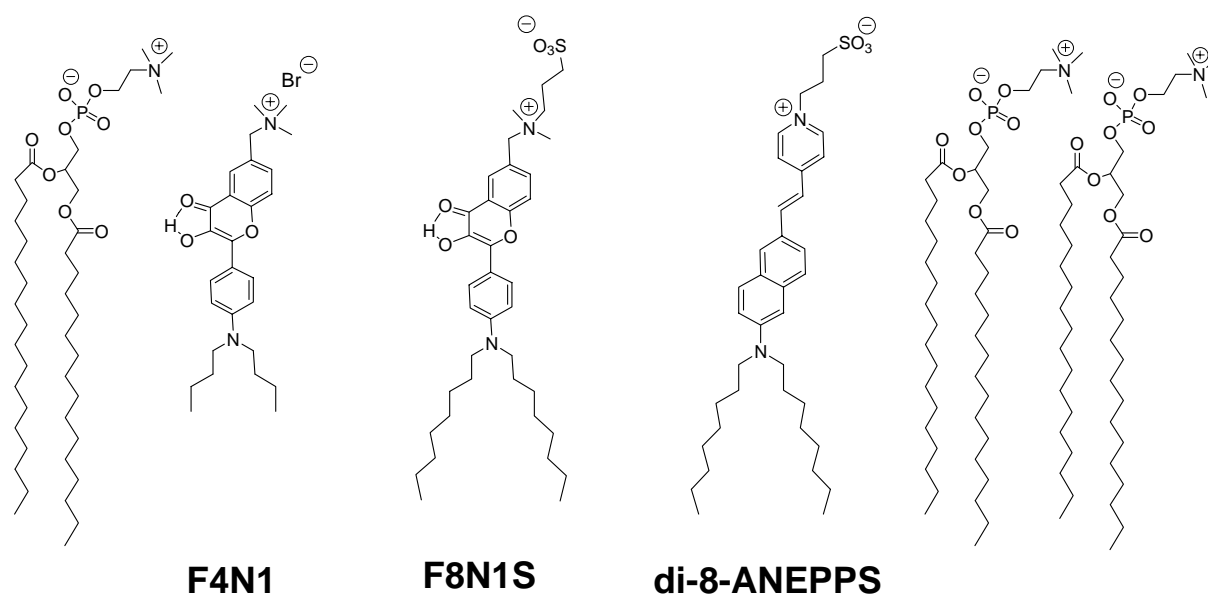


Figure 43. Structure et localisations estimées des sondes F4N1, F8N1S et di-8-ANEPPS dans le feuillet de phosphatidylcholine

Comme dans l'article de référence, nous avons modulé le potentiel dipolaire de membrane ψ_d par des ajouts de phlorétine (5, 10 et 20%) et de 6-Kétocholestanol (5, 10, 20, 30, et 40%) à des vésicules de EYPC. Pour chaque quantité ajoutée, les spectres d'excitation du di-8-ANEPPS et ceux d'excitation et d'émission pour F4N1 et F8N1S ont été enregistrés, afin d'établir les corrélations recherchées (I_{440}/I_{530} mesuré sur le spectre d'excitation du di-8-ANEPPS par rapport à I_{390}/I_{445} mesuré sur le spectre d'excitation ou I_{N^*}/I_{T^*} après déconvolution mesuré sur le spectre d'émission des flavones). Ces mesures ont également été effectuées sur des vésicules de DMPC et son analogue éther-lipide DTPC.

Publication 3

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SICD – Service des thèses électroniques]

**Membrane Dipole Potential as Measured by Ratiometric 3-Hydroxyflavone
Fluorescence Probes: Accounting for Hydration Effects**

Gora M`Baye, Vasyl V. Shynkar, Andrey S. Klymchenko, Yves Mély et Guy Duportail

Journal of Fluorescence, 2006, Vol. 16, Pages 35-42

Pages 35 à 42 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://springerlink.metapress.com/content/p6781537140u743q/fulltext.html>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Conclusion (publication 3)

Le déplacement des spectres d'excitation des sondes F4N1 et F8N1S observé suite à l'addition de phlorétine ou de 6-Kétocholestanol évalué par le rapport des intensités I_{390}/I_{445} , a donné une excellente corrélation avec le déplacement correspondant des spectres d'excitation du di-8-ANEPPS évalué par le rapport I_{440}/I_{530} . Seuls les points relatifs à la plus forte concentration de phlorétine (20%) font exception, ce qui peut être lié à un effet collatéral de la phlorétine. En effet, la réponse de la phlorétine n'est pas uniquement due à son action sur le potentiel dipolaire, mais aussi à son interaction directe avec les flavones incorporées dans les vésicules comme le prouve leur inhibition de fluorescence en présence de phlorétine.

Il n'empêche que cette bonne corrélation entre les rapports d'intensité mesurés sur les spectres d'excitation confirme l'identité du mécanisme de réponse entre les sondes F4N1 et F8N1S d'une part, et le di-8-ANEPPS d'autre part, à savoir la réponse électrochromique, et prouvent donc que ces deux dérivés 3-HF peuvent valablement se substituer au di-8-ANEPPS pour la mesure du potentiel dipolaire membranaire. La corrélation existant entre la réponse en excitation du di-8-ANEPPS et les réponses en émission de F4N1 et F8N1S mesurées par le ratio I_{N^*}/I_{T^*} après déconvolution et soustraction de la forme N-H* est toute aussi excellente et confirme donc celle obtenue avec les spectres bruts avant déconvolution, faisant ainsi des dérivés 3-HF les sondes les mieux adaptées pour l'évaluation des potentiels électriques à l'intérieur des membranes lipidiques, en lieu et place des sondes nécessitant une mesure ratiométrique aux extrémités de leur spectre d'excitation.

Le présent travail a donc permis de valider, sans qu'il subsiste de contestation, l'usage des dérivés 3-HF pour la mesure du potentiel dipolaire, usage qui découle de la forte électrochromicité de leur réaction ESIPT.

Degré d'hydratation des radeaux lipidiques

(Ce présent chapitre fait l'objet d'un manuscrit qui sera soumis en première intention à Biophysical Journal et en deuxième intention à Chemistry and Physics of Lipids)

1. Introduction

Le cholestérol est un constituant majeur des membranes plasmiques des cellules de mammifères. Entre autres propriétés, il a la capacité d'induire la formation de domaines dans des membranes lipidiques en formant des associations spécifiques avec certains types de phospholipides [213]. Notamment, les domaines riches en cholestérol et sphingomyéline ont suscité une attention particulière du fait qu'ils sont liés aux microdomaines existant dans la membrane plasmique des cellules animales, connus sous le nom de radeaux lipidiques (*rafts* en anglais). L'existence des radeaux lipidiques a été démontrée par leur insolubilité dans certains détergents non ioniques à 4°C, donnant lieu à des fractions membranaires résistantes au détergent, riches en cholestérol et en sphingolipides, ainsi qu'en différents types de protéines membranaires. Ces radeaux semblent impliqués dans certaines fonctions de régulation cellulaires telles que la transduction du signal, le trafic lipidique et les fonctions des protéines [214-216].

De tels domaines lipidiques peuvent être obtenus dans des vésicules phospholipidiques ou des bicouches sur support solide contenant des glycérophospholipides saturés et/ou des sphingolipides et du cholestérol [217-219]. Il est maintenant clairement admis que l'important « *packing* » des chaînes acyles saturées est une propriété essentielle dans l'organisation de ces radeaux lipidiques [220,221]. Dans les biomembranes, les "rafts" sont présumés exister dans une phase qualifiée de liquide ordonnée (L_o), sous la forme d'îlots flottant sur une mer composée de domaines labiles constitués de glycérophospholipides insaturés, dans une phase cristal liquide qualifiée de phase liquide désordonnée (L_d). Une séparation de phase entre des lipides présentant différents états physiques ne se limite pas au seul problème de la formation de radeaux lipidiques, la séparation de phase ayant été depuis longtemps parfaitement bien caractérisée dans des membranes modèles, le plus souvent entre une phase cristal liquide (L_α) et une phase à l'état gel (L_β). Si d'une certaine manière, la phase L_d peut être considérée comme une phase fluide L_α , la nature réelle de la phase L_o est moins évidente. En effet, la phase à l'état gel L_β est l'état le plus commun pour lequel les chaînes acyles sont fortement ordonnées [222]. Cependant, malgré le fait que dans la phase L_o les chaînes acyles sont en extension et étroitement ordonnées, cet état ne peut être considéré comme identique à une phase L_β du fait qu'elle présente un degré plus élevé de mobilité latérale des lipides, probablement dû à la présence d'une forte concentration de cholestérol [223]. La comparaison du comportement de mélanges avec et sans cholestérol montre que le cholestérol peut induire la séparation de phase, [224,225] en raison de ses interactions stériques favorables avec les phospholipides saturés. Cet effet du cholestérol explique

probablement pourquoi les radeaux peuvent se former dans des membranes cellulaires à faible teneur en sphingolipides et pourquoi la déplétion en cholestérol peut détruire ces radeaux et ainsi affecter leur fonction.

Une meilleure compréhension des mécanismes de formation des domaines induits par la présence du cholestérol requiert de plus amples informations concernant les interactions moléculaires entre le cholestérol et la sphingomyéline (SM) ou d'autres phospholipides saturés. Il est pratiquement admis que, alors que les effets hydrophobes conduisent à la formation de la bicouche lipidique, les forces attractives de Van der Waals constituent l'interaction principale entre les chaînes acyles des phospholipides et le cholestérol [213]. En outre, les interactions entre le cholestérol et les phospholipides peuvent impliquer des liaisons hydrogène entre le groupement hydroxyle du cholestérol et les groupements interfaciaux des phospholipides. Comme il a été précédemment montré, le groupe 3-OH du cholestérol forme, dans les bicouches de DPPC, des liaisons hydrogène avec les groupes carbonyle sn_2 des lipides [226,227]. Cependant, des études postérieures ont montré que ce type de liaisons ne jouait pas un rôle clé dans les interactions lipides-cholestérol, que ce soit pour le DPPC ou la sphingomyéline [228,229]. Récemment, il a été suggéré que dans des bicouches de sphingomyéline le groupement hydroxyle du cholestérol forme principalement des liaisons hydrogène intramoléculaires avec l'oxygène de la fonction ester des phosphates, alors que le groupement NH pourrait également agir en tant que donneur d'hydrogène dans la liaison hydrogène intermoléculaire entre les molécules de sphingomyéline [230-233]. S'il est avéré que l'importance des liaisons hydrogène dans la région interfaciale des bicouches de sphingomyéline et de DPPC est importante, leur implication dans la formation de la phase L_o doit être confirmée.

A cet égard, l'hydratation de l'interface membranaire est un paramètre important à suivre étant donné que la formation ou la destruction des liaisons hydrogène à l'interface de la bicouche doit contrôler la présence et l'ordonnement des molécules d'eau. Les molécules d'eau s'associent aux têtes polaires des phospholipides par l'intermédiaire de liaisons hydrogène pour former la couche dite d'hydratation [234]. En plus de cette couche d'hydratation, il demeure évident que l'eau pénètre dans la bicouche lipidique au moins jusqu'au niveau du groupement glycérol mais aussi plus profondément dans la bicouche, jusqu'à s'insérer dans les espaces situés entre les chaînes d'acides gras (ce que l'on peut considérer comme des défauts de structure [235]), constituant ainsi une hydratation interne. Ainsi, les groupements carbonyles sn_1 - et particulièrement sn_2 - sont bien hydratés. Précédemment, il a été rapporté, à l'aide du LAURDAN, que l'addition de cholestérol à des bicouches en phase gel L_β diminue leur hydratation [236]. En tenant compte que l'addition de cholestérol à de telles bicouches doit

induire une phase L_o , cette diminution d'hydratation apparaît intéressante. Cependant, comme la localisation du LAURDAN n'est pas connue avec précision [178] du fait de l'absence de tout groupement d'ancrage, il est difficile d'assigner cette diminution de l'hydratation à une région particulière à l'interface de la bicouche.

Pour localiser l'hydratation de la membrane avec plus de précision, nous avons utilisés certaines de nos sondes 3-hydroxyflavone (3HF) fluorescentes ancrées dans la bicouche lipidique via leurs groupements ammonium, et dont le fluorophore est positionné à une profondeur relativement précise. Ainsi que nous l'avons précédemment montré au chapitre 2 il a été démontré que, ces sondes sont présentes dans la bicouche de lipides sous deux formes : soit sous leur forme libre (sans liaison hydrogène) montrant une fluorescence duale résultant de la réaction intramoléculaire de transfert de proton à l'état excité (ESIPT), soit sous leur forme liée avec des molécules d'eau présentes dans l'environnement, montrant une seule bande d'émission, sans participation à l'ESIPT. L'hydratation locale peut donc être estimée à partir de la contribution relative de ces deux formes, dont les différents profils d'émission sont obtenus par déconvolution des spectres de fluorescence [166,178]. Dans cette catégorie de sondes, la sonde F2N8 apparaît la plus appropriée pour une telle étude. L'inhibition de fluorescence par la méthode du parallaxe (Fig. 44) [146] a prouvé que le fluorophore est localisé à hauteur du groupement glycérol de la bicouche lipidique. Dans le présent travail, nous avons donc utilisé cette sonde pour étudier l'influence de l'augmentation du cholestérol sur l'hydratation des bicouches de SM et de DPPC, qui sont connus pour former, en présence du cholestérol, des radeaux lipidiques. En l'absence de phospholipides insaturés, nous sommes donc en présence d'une phase "raft" (L_o) pure. Parallèlement à ces mesures d'hydratation, nous avons évalué la fluidité membranaire des mêmes systèmes par anisotropie de fluorescence, ceci afin de vérifier si les variations d'hydratation constatées sont corrélées avec les variations de l'ordre lipidique au même niveau dans la bicouche. Pour ce faire, nous avons utilisé le TMA-DPH qui, étant donné son groupement triméthylammonium, est ancré à l'interface de la bicouche de la même manière que la sonde F2N8 et sonde donc la même région. Contre toute attente, la comparaison entre la phase gel L_β et la phase liquide ordonnée L_o ne conduit à aucune corrélation entre ces deux paramètres : hydratation et fluidité. En effet, alors que l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH ne montre presque aucune différence de fluidité entre ces deux phases, les spectres d'émission de F2N8 montrent une diminution dramatique de l'hydratation de la phase liquide ordonnée par rapport à la phase gel. Ces résultats constituent une des premières démonstrations d'une différence claire

entre ces deux phases et autorisent de nouvelles perspectives pour une meilleure compréhension du rôle et de la fonction des phases liquides ordonnées des membranes biologiques.

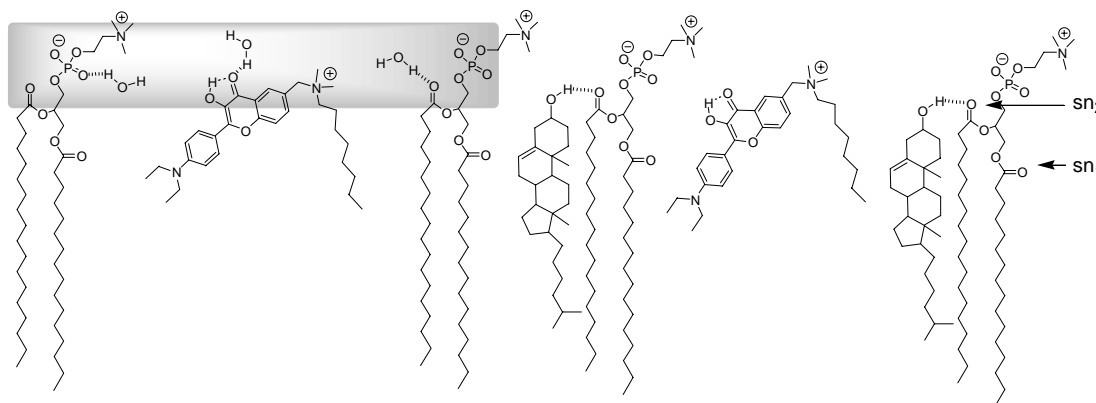


Figure 44. Représentation schématique d'un feuillet lipidique montrant les localisations de l'eau, du cholestérol et des différentes formes (libre et liée) de la sonde F2N8.

2. Résultats

2.1. Spectres de fluorescence de F2N8 dans des LUV et préférence de la sonde pour les domaines « non raft »

Les spectres de fluorescence de F2N8 incorporée dans des LUV ont été enregistrés à 20°C pour trois types de vésicules de composition différente (Fig.45). Un premier type de LUV sont ceux obtenus à partir d'un seul phospholipide, DOPC ou sphingomyéline. Pour un second type, 35% de cholestérol ont été ajoutés à ces phospholipides pour obtenir soit des vésicules uniquement en phase L_d , sans radeaux (DOPC + Chol), soit des vésicules en phase L_o , uniquement constitués de radeaux (SM + Chol). En dernier lieu, des LUV ont été obtenus à partir d'un mélange ternaire (DOPC + SM + Chol) dans le rapport molaire 1 :1 :0,7. Ces dernières vésicules doivent présenter à la fois des domaines en phase L_o ou en phase L_d . Dans tous les cas, la sonde F2N8 montre son émission duale caractéristique. Ainsi que nous l'avons précédemment démontrés (cf. chapitre 2), ces deux bandes apparentes résultent non seulement des formes N^* et T^* résultant de la réaction ESIPT, mais aussi de la forme hydratée ($H-N^*$) qui ne participe pas à l'ESIPT [166,178]. La bande d'émission résultant de la forme $H-N^*$, dont le maximum d'émission (~ 550 nm) est localisée entre les bandes d'émission des formes N^* et T^* , ne peut être déduite directement de ces spectres mais nécessite pour cela la déconvolution en trois bandes du spectre d'émission. C'est essentiellement la contribution relative de la forme hydratée (masquée dans le spectre) qui est responsable des différences survenant entre les spectres de la figure 45.

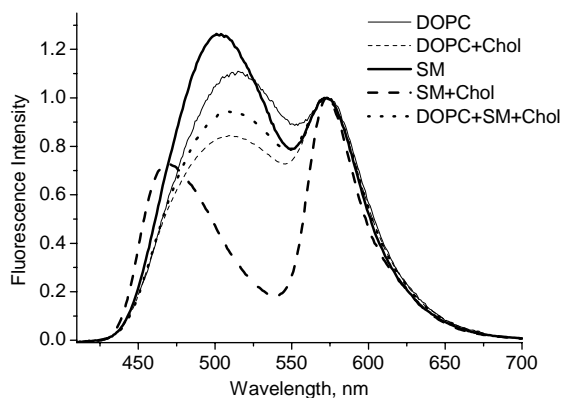


Figure 45. Spectres d'émission de F2N8 dans des LUV de différentes compositions. Certaines vésicules contiennent 35% de cholestérol (Chol). Dans le mélange ternaire, les concentrations molaires des lipides sont de DOPC/SM/Chol=1/1/0.7. Les spectres sont normés au maximum de la bande T*. La longueur d'onde d'excitation est 400 nm

Dans les deux lots de vésicules obtenues à partir d'un composant unique (DOPC ou SM), l'intensité de fluorescence de la première bande est relativement importante. L'ajout de cholestérol à hauteur de 35% diminue l'intensité de la première bande à la fois pour les vésicules de sphingomyéline et de DOPC, avec cependant un effet considérablement plus marqué avec la sphingomyéline comme le montre l'importante dépression de l'intensité observée au milieu du spectre. De plus, dans le cas de la sphingomyéline, la première bande montre un fort effet hypsochrome. Comme nous l'avons précédemment montré, de tels effets, s'ils peuvent être liés en partie à la diminution de la polarité, sont principalement dus à la diminution de l'hydratation dans l'environnement immédiat de la sonde. Les différences significatives dans l'évolution des spectres d'émission induits par l'addition de cholestérol peuvent être expliquées par des changements de phase différents, en présence de cholestérol, selon que les vésicules sont constituées de DOPC ou de sphingomyéline. Ainsi, avec l'addition de cholestérol, les vésicules de DOPC restent en phase cristal liquide (d'abord L_{α} puis L_o) malgré une diminution de la fluidité membranaire, alors que les vésicules de sphingomyéline passent d'une phase gel (L_{β}) à une phase "raft" L_o . Le mélange ternaire DOPC/ sphingomyéline/cholestérol, dans lequel peuvent coexister à la fois les zones "rafts" et celles "non-rafts" [217-219], nous a permis d'évaluer la partition préférentielle de la sonde F2N8 pour l'une ou l'autre de ces deux phases. Malgré une légère différence, le spectre de fluorescence dans le mélange ternaire (Fig.45) ressemble au spectre obtenu avec les vésicules de DOPC/cholestérol ne contenant que des zones "non-rafts". Même si ce résultat brut ne permet pas de calculer le coefficient de partition, on peut aisément conclure que F2N8 se partitionne préférentiellement dans les zones "non-rafts" (L_d) en

évitant de s'incorporer dans la phase L_o correspondant aux zones « rafts », en tout cas lorsqu'un tel choix existe.

2.2. Formation de la phase L_o induite par le cholestérol

Etant donné que la sonde F2N8 ne montre aucune affinité préférentielle pour la phase L_o , nous avons été amené à utiliser des systèmes modèles ne pouvant contenir que des radeaux, à savoir des vésicules constituées de mélanges de sphingomyéline ou de DPPC avec le cholestérol, en l'absence de DOPC. Nous avons préparé des lots de vésicules de sphingomyéline et de DPPC en faisant varier le taux de cholestérol de 0 à 35%, vésicules que nous avons ensuite marquées avec la sonde F2N8. Comme le montre la Figure 46.A, l'addition de cholestérol à la sphingomyéline modifie graduellement et fortement les spectres de fluorescence obtenus en phase gel (20°C). L'augmentation du cholestérol entraîne un effet hypsochrome et une diminution d'intensité de la première bande, effets particulièrement marqués pour les fortes concentrations de cholestérol. Le plus remarquable consiste en la nette séparation des deux bandes d'émission concomitante de la dépression apparaissant entre les deux bandes d'émission, vers 525 nm. A 60°C, ces effets du cholestérol sur les mêmes vésicules apparaissent plus faibles (Fig.46B). La diminution d'intensité ainsi que l'hypsochromicité de la première bande sont moins accentuées qu'à 20°C, avec comme conséquence une différenciation moins nette des deux bandes. L'hydratation des vésicules peut être déduite de ces spectres après déconvolution du spectre de fluorescence en trois bandes [166,178]. Cette analyse montre que le cholestérol diminue fortement l'hydratation des bicouches de sphingomyéline à 20°C (Fig.47A). Par contre, à 60°C, cette déshydratation est plus faible. Cette dernière observation corrobore ce qui avait été précédemment observé lors de l'addition de cholestérol à des vésicules en phase cristal liquide L_α de EYPC [178] et de DOPC (Fig. 44) marqués par F2N8, à savoir de faibles modifications spectrales ainsi qu'un faible effet déshydratant. Ceci signifie donc qu'une forte déshydratation n'est observée que lors de l'addition de cholestérol à des vésicules de sphingomyéline initialement en phase gel L_β . Cette observation est importante car à 20°C, de fortes concentrations de cholestérol dans de telles vésicules de sphingomyéline entraînent la formation de radeaux, alors que à 60°C dans ces mêmes vésicules ainsi que dans celles de EYPC et DOPC à 20 °C, la présence de radeaux n'est pas attendue. Ainsi, on peut en déduire que le processus spécifique de formation de ces radeaux a pour conséquence une forte déshydratation de la membrane, tout au moins au niveau de localisation de la sonde.

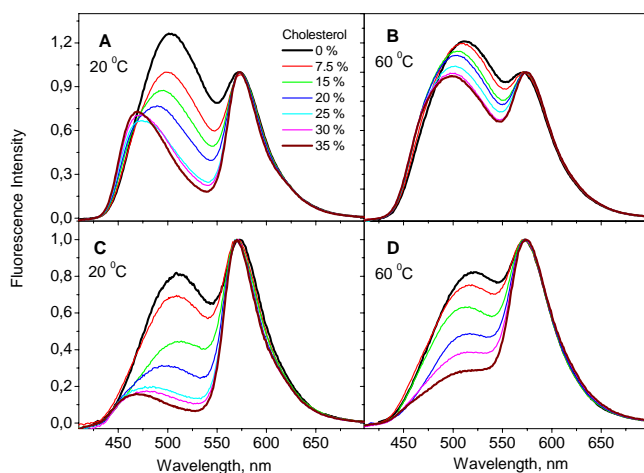


Figure 46. Spectres d'émission de F2N8 dans des vésicules de sphingomyéline (A et B) et le DPPC (C et D) avec des concentrations différentes de cholestérol à 20°C (A et C) et 60°C (B et D). Ces spectres sont normés au maximum de la bande T*

Le mélange cholestérol/DPPC (un phospholipide saturé) est une autre composition connue pour entraîner la formation de radeaux dans des systèmes modèles. Nous avons donc réalisé avec des vésicules de DPPC les mêmes expériences qu'avec les vésicules de sphingomyéline. Une évolution similaire des spectres d'émission de F2N8 est observée, avec une diminution progressive de l'intensité relative de la première bande en même temps qu'un léger effet hypsochrome lors de l'augmentation de la quantité de cholestérol (Fig.46C). De plus à 60°C, on observe des effets significativement plus faibles, avec pratiquement aucun effet hypsochrome pour la première bande (Fig.46D). Dans le cas présent également, l'analyse des trois bandes constitutives des spectres d'émission montre une diminution de l'hydratation des bicouches de DPPC à 20°C avec l'augmentation de la concentration de cholestérol (Fig.47B). Ici encore, la diminution est plus importante que celle observée à 60°C. Ainsi, pour des vésicules de DPPC comme pour des vésicules de sphingomyéline, le même phénomène de déshydratation est observé, résultant de l'augmentation de la teneur en cholestérol. Ce phénomène apparaît donc être lié à la formation des radeaux lipidiques dans la membrane. Par ailleurs, on note que la diminution de l'hydratation de la bicouche devient plus importante au-delà d'un seuil de 15-20% de cholestérol, tant pour le DPPC que pour la sphingomyéline. Ceci indique probablement qu'au dessus de ce seuil de concentration en cholestérol, un vaste domaine constitué uniquement de radeaux se forme, empêchant ainsi la sonde de choisir entre un domaine en phase gel L_{β} , n'existant plus, et un domaine en phase liquide ordonnée L_o , le seul possible. On peut donc conclure qu'un tel seuil de 15-20% de cholestérol correspond à une concentration critique pour

laquelle on observe, pour le DPPC comme pour la sphingomyéline, ce que nous qualifions de transition de la bicouche lipidique d'une phase gel L_{β} en une phase liquide ordonnée L_{α} .

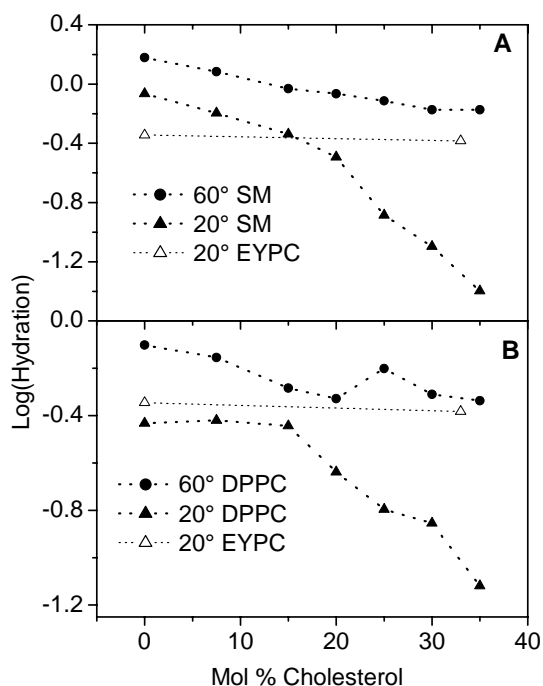


Figure 47. Hydratation des vésicules de sphingomyéline (A) et de DPPC (B) en fonction de la teneur en cholestérol. Les valeurs d'hydratation sont obtenues après analyse des spectres d'émission de F2N8, déconvolués selon la procédure indiquée dans Matériels et Méthodes, en fixant les valeurs des paramètres suivants : FWHM des bandes N^* et $H-N^*$: 3000 cm^{-1} ; asymétrie et position de la bande $H-N^*$: 0.9 et 18400 cm^{-1} , respectivement ; à l'exception des vésicules contenant sphingomyéline et cholestérol pour lesquelles FWHM de la bande N^* est fixée à 2600 cm^{-1} , son asymétrie à 0.7 et la position de la bande $H-N^*$ à 19200 cm^{-1} . Ces valeurs d'hydratation sont reprises dans le tableau 4 ci-dessous

Tableau 4. Hydratation des LUV de sphingomyéline et de DPPC à 20°C et 60°C avec des proportions de cholestérol allant de 0 à 35%.

% chol	Hydratation			
	DPPC 20°C	DPPC 60°C	SM 20°C	SM 60°C
0	0.369	0.790	0.860	1.042
7,5	0.379	0.700	0.637	1.210
15	0.359	0.519	0.460	0.929
20	0.230	0.470	0.322	0.860
25	0.160	0.629	0.129	0.769
30	0.140	0.490	0.080	0.669
35	0.075	0.460	0.04	0.669

Afin d'obtenir de plus amples informations sur l'influence de l'addition de cholestérol à des vésicules de sphingomyéline et de DPPC, nous avons réalisé des expériences d'anisotropie de fluorescence sur les mêmes systèmes en les marquant avec le TMA-DPH, ceci afin de mesurer leur fluidité. Le TMA-DPH présente deux propriétés similaires à celles de F2N8 : d'une part il est préférentiellement localisé dans la phase fluide (L_{α} ou L_d) comparativement à une phase gel

(L_{β}) [6], d'autre part il est ancré à l'interface de la bicouche grâce à son groupement triméthylammonium, sondant ainsi la partie supérieure de la bicouche, comme F2N8. Il est donc possible de comparer les informations fournies par ces deux sondes (hydratation et fluidité). Ainsi que le montre la Figure 48, l'addition de cholestérol ne modifie pas considérablement l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH dans des vésicules de sphingomyéline et DPPC à 20°C. Au contraire, nous avons observé à 60°C une augmentation relativement importante de l'anisotropie de fluorescence lorsque la concentration en cholestérol augmente, en l'absence de formation de radeaux. En réalité, ces deux informations ne sont pas réellement nouvelles. Il est bien connu qu'en phase cristal liquide (à 60°C dans le cas présent), l'addition de cholestérol diminue la fluidité membranaire, ce qui se traduit par une augmentation de l'anisotropie de fluorescence de la sonde. Au contraire, dans la phase gel, l'addition de cholestérol ne perturbe que légèrement la fluidité, d'où la faible influence sur l'anisotropie de fluorescence [237,238]. Ce résultat signifie que la fluidité des vésicules de sphingomyéline et de DPPC en phase gel L_{β} est proche de celle en phase liquide ordonnée L_o , avec une composition correspondant à celle d'une zone "raft". On aboutit donc à un constat important lors de la comparaison entre ces deux phases L_{β} et L_o : Elles présentent une grande différence d'hydratation alors que leur différence de viscosité est faible.

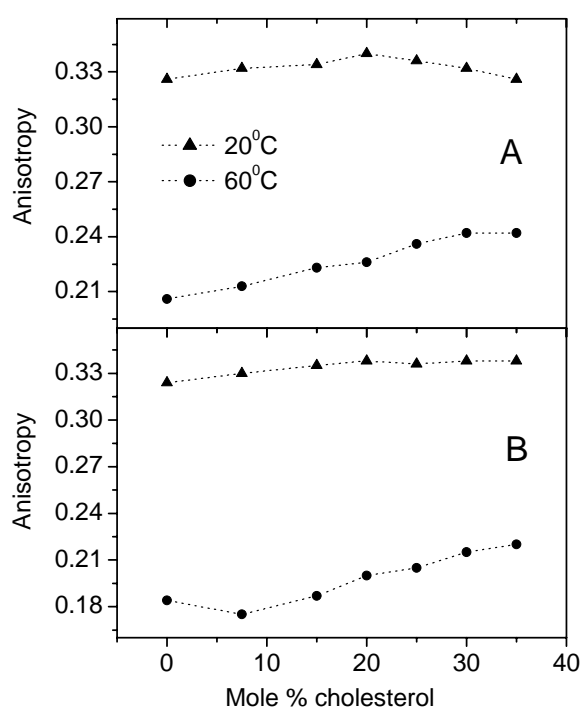


Figure 48. Anisotropie de fluorescence du TMA-DPH en fonction de la teneur en cholestérol pour des vésicules de sphingomyéline (A) et de DPPC (B).

2.3. Les transitions de phase thermotropiques

Selon les résultats précédents, un faible degré d'hydratation apparaît comme une caractéristique importante des radeaux lipidiques. Pour cette raison, nous avons comparé la transition de phase induite par la température de vésicules constituées uniquement de rafts (c'est-à-dire en quelque sorte la transition $L_o \rightarrow L_d$) avec la transition plus classique entre une phase gel et une phase cristal liquide ($L_\beta \rightarrow L_\alpha$) caractéristique de vésicules composées uniquement de sphingomyéline et de DPPC.

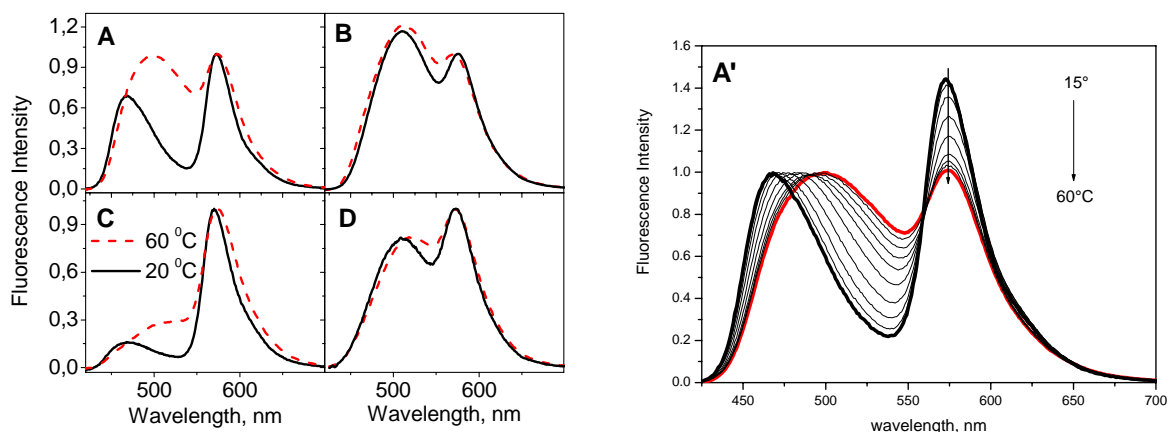


Figure 49. Effets de la température (15° et 60°C) sur les spectres d'émission de F2N8 incorporée dans des LUVs de SM/ 35% cholestérol (A), SM (B), DPPC/ 35% cholestérol (C) et DPPC (D). Les spectres sont normés au maximum de la bande T*. (A') reprends les spectres de (A) obtenus avec les vésicules de SM/ 35% cholestérol en y incluant les températures intermédiaires, à intervalle de 5°C. Ces spectres sont normés au maximum de la bande N*.

Dans un premier temps, nous avons considéré l'évolution des spectres d'émission des différents systèmes marqués avec le F2N8, soit en phase L_{β} (sphingomyéline ou DPPC) ou en phase L_{α} pure (sphingomyéline ou DPPC avec 35% de cholestérol), à partir desquels nous avons déterminé l'évolution de l'hydratation pour les différents types de vésicules (Fig. 49A, C). L'augmentation de la température de 15°C à 60°C se traduit par une augmentation de l'hydratation des vésicules (Fig.50). Une hausse particulièrement prononcée de l'hydratation est observée pour des températures entre 15 et 45°C, pour lesquelles les radeaux existent. Au dessus de 45°C, les radeaux sont détruits, ce qui correspond à la transition vers la phase liquide désordonnée (L_d) [239]. L'on n'observe plus alors d'augmentation notable de l'hydratation. De façon surprenante, les vésicules composées uniquement de sphingomyéline et de DPPC pour lesquelles l'augmentation de température entraîne une transition de la phase gel L_{β} à la phase cristal liquide L_{α} ne montrent aucun changement notable dans leur spectres d'émission (Fig.49B,D) et par conséquent dans leur hydratation (Fig.50). De plus, il est remarquable qu'au-delà de 45°C, la dépendance de l'hydratation vis-à-vis de la température est presque identique pour les deux types de vésicules, qu'elles soient en phase cristal liquide L_{α} (sans cholestérol) et en phase L_d (avec cholestérol).

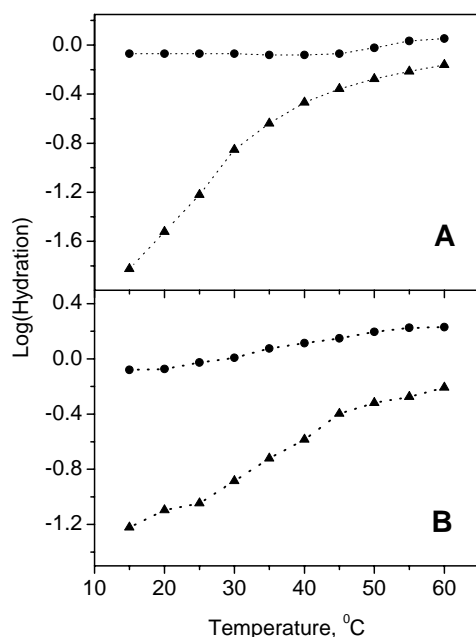


Figure 50. Courbes d'hydratation en fonction de la température de F2N8 incorporée dans des vésicules de SM (A) et DPPC (B) sans cholestérol (.) et avec 35% de cholestérol (▲). Cf. légende de la Fig. 47 pour les détails de l'analyse. Les valeurs de l'hydratation sont reprises dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5. Hydratation des LUV de sphingomyéline et DPPC seules et additionnées de 35% chol en fonction de la température.

Temp °C	Hydratation			
	DPPC	DPPC + 35% chol	SM	SM + 35% chol
15	0.833	0.059	0.850	0.149
20	0.843	0.080	0.850	0.029
25	0.940	0.089	0.850	0.059
30	1.019	0.129	0.850	0.140
35	1.190	0.189	0.830	0.230
40	1.299	0.259	0.830	0.340
45	1.410	0.400	0.850	0.439
50	1.570	0.479	0.949	0.530
55	1.680	0.530	1.080	0.610
60	1.700	0.619	1.130	0.690

Comme la sonde n'est pas fluorescente dans l'eau [146], sa fluorescence devrait caractériser l'accessibilité de la sonde dans ses sites à l'intérieur de la bicouche. Comme le montre la Fig.51, dans les vésicules de sphingomyéline et de DPPC, l'augmentation de température entraîne, pour les températures situées en dessous de la température de transition, une augmentation de l'intensité de fluorescence, alors qu'au-dessus de cette température l'intensité de fluorescence décroît lentement. Ce résultat paraît logique puisque la transition d'une phase L_{β} hautement ordonnée à une phase L_{α} doit rendre plus facile l'incorporation de petites molécules dans la bicouche avec comme conséquences un marquage plus efficace. Au dessus de la température de transition, les effets d'inhibition par la température prévalent, contribuant ainsi à la diminution de

fluorescence observée. Pour les vésicules contenant 35% de cholestérol, une plus forte augmentation d'intensité de fluorescence est observée, particulièrement pour les températures juste inférieures à la température de transition. Dans une certaine mesure, la destruction des radeaux par la température augmente le nombre de sites de liaison de la sonde. Cette augmentation de l'intensité de fluorescence avec la température est en quelque sorte corrélée avec l'augmentation de l'hydratation, ce qui n'est pas surprenant puisque l'intérieur de la bicouche doit alors être plus accessible non seulement pour les molécules de solutés mais aussi pour les molécules d'eau.

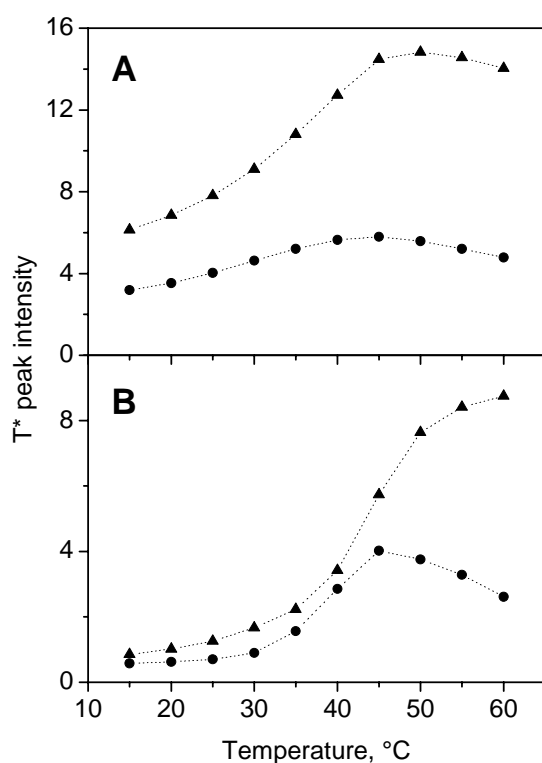


Figure 51. Intensité de fluorescence de F2N8 mesurée à la longueur d'onde du maximum de la bande T* en fonction de la température, sur des vésicules de SM (A) et DPPC (B) sans (●) et avec 35% de cholestérol (▲).

Nous avons aussi caractérisé ces transitions thermotropiques en enregistrant la courbe d'anisotropie de fluorescence pour chaque type de vésicules marquées au TMA-DPH (Fig.52). Dans les vésicules de sphingomyéline ou de DPPC, l'on observe la transition classique de la phase gel vers la phase cristal liquide ($L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$) caractérisée par une décroissance rapide de l'anisotropie avec un point d'inflexion correspondant à la température dite de transition. A l'opposé, pour les vésicules contenant 35% de cholestérol, la différence d'anisotropie entre les deux phases limites (L_o et L_d) est moins importante et la transition de phase plus douce. Ces

résultats sont parfaitement en accord avec les données de la littérature [237,238]. Ainsi, ces résultats d'anisotropie de fluorescence, qui correspondent à une mesure de fluidité membranaire, n'apparaissent pas corrélées avec les résultats d'hydratation. En fait, avec les vésicules à composant unique, une transition franche est observée pour la courbe d'anisotropie de fluorescence en fonction de la température, alors que la courbe d'hydratation correspondante ne montre pas de changement notable. Ces deux paramètres évoluent différemment en présence de vésicules contenant du cholestérol : la dépendance de l'anisotropie est moins importante que précédemment alors que la dépendance de l'hydratation est plus importante, particulièrement aux basses températures correspondant aux zones "rafts" intactes. Il est donc permis de conclure que la transition $L_o \rightarrow L_d$ modifie la microviscosité de la bicouche de façon moindre que la transition $L_\beta \rightarrow L_\alpha$ alors que l'effet opposé est observé en ce qui concerne l'hydratation de la bicouche, du fait que celle-ci augmente fortement lors de la transition $L_o \rightarrow L_d$ sans pratiquement être affectée lors de la transition $L_\beta \rightarrow L_\alpha$.

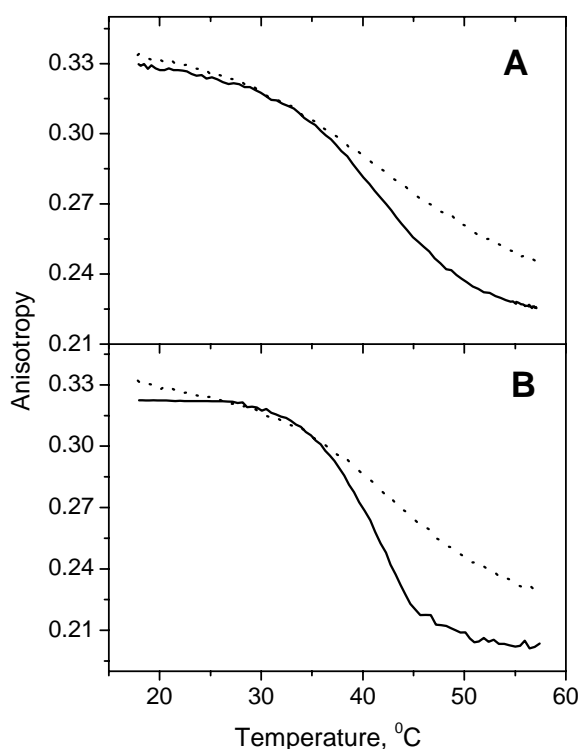


Figure 52. Variations thermotropiques de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH pour des LUV composés de SM (A) et DPPC (B) sans (trait plein) et avec 35% cholestérol (pointillés).

3. Discussion

Dans ce travail, les vésicules phospholipiques, considérées comme modèles de biomembranes, sont décrites principalement en termes d'hydratation et de fluidité, ces deux paramètres étant suivis indépendamment à l'aide de deux sondes fluorescentes différentes, et avec les deux techniques de fluorescence qui leur sont propres. La fluidité de la membrane est directement décrite à partir de l'anisotropie de fluorescence du TMA-DPH, alors que l'hydratation est estimée par la contribution relative de la forme hydratée de F2N8. Du fait de la localisation similaire des deux sondes à l'interface de la bicouche lipidique, la fluidité et l'hydratation sont chacune déterminées à hauteur du groupement glycérol (ou du groupement "équivalent" dans le cas de la sphingomyéline) à l'interface de la membrane. Nos mesures de fluidité par anisotropie de fluorescence sont en accord avec les travaux précédemment publiés utilisant le DPH et/ou ses dérivés. En effet, nous avons observé que l'addition de cholestérol à des vésicules à composant unique entraîne une diminution de la fluidité de la bicouche lipidique en phase cristal liquide L_{α} alors qu'aucune modification significative ne survient lorsque le cholestérol est ajouté à une phase gel L_{β} pour en faire une phase "raft" L_0 . Des résultats tout aussi attendus sont obtenus en faisant varier la température pour induire une transition de phase. En effet, la transition de phase $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$ est nettement plus marquée que la transition de phase a priori similaire $L_0 \rightarrow L_d$. Il s'agit en l'occurrence de l'effet bien connu du cholestérol lissant la transition de phase des bicouches phospholipidiques saturées. Ainsi, alors que la différence de fluidité entre les phases L_{β} et L_{α} est très importante, elle est pratiquement nulle entre les phases L_0 ("rafts") et L_{β} (Fig.53).

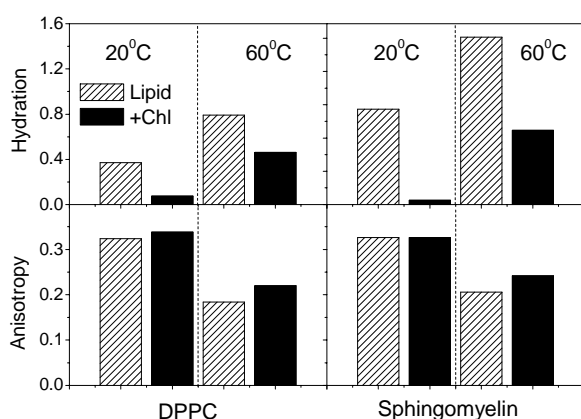


Figure 53. Comparaison de l'hydratation et de l'anisotropie de fluorescence mesurée pour des LUV composés de phospholipides formant des rafts. La phase L_{β} correspondant à des vésicules sans cholestérol, les phases L_0 et L_d à des vésicules contenant 35% de cholestérol.

A l'opposé, l'hydratation de la bicouche montre un comportement différent vis-à-vis de la température. On observe, aussi bien pour des vésicules de sphingomyéline que de DPPC, que

l'hydratation de la membrane est relativement élevée, pour la phase gel L_β à 20°C comme pour la phase cristal liquide L_α à 60°C, alors que pour les vésicules contenant 35% de cholestérol, la phase L_o à 20°C est caractérisée par une très faible hydratation comparée à la phase L_d à 60°C. En réalité, à 20°C, l'augmentation de la teneur en cholestérol entraîne une déshydratation très élevée surtout au dessus de 15-20% de cholestérol. Ceci pourrait indiquer que l'on a formé à cette concentration critique de cholestérol, peut être sur l'ensemble de la vésicule, de grandes zones "raft" caractérisées par une faible hydratation. De plus, ces mesures en température montrent que l'hydratation ne varie pas beaucoup lors de la transition $L_\beta \rightarrow L_\alpha$, alors qu'en présence de cholestérol, les effets de la température sur l'hydratation sont importants surtout à des températures en dessous de 45°C. Au dessus de 45°, les radeaux lipidiques sont probablement détruits ; on se trouve alors en phase L_d ce qui rend la dépendance de l'hydratation vis-à-vis de la température identique à celle observée avec les vésicules en phase cristal liquide L_α . En résumé, l'important est de souligner que l'hydratation apparaît relativement similaire pour les phases gel et cristal liquide alors qu'elle est très basse dans les radeaux lipidiques en phase L_o (Fig.53). Il est donc évident que, dans la comparaison entre les phases gel L_β et liquide ordonnée L_o , la fluidité et l'hydratation ne sont pas corrélées : leur fluidité apparaît très voisine alors que leur hydratation est très différente (Fig.53). Au contraire, dans une phase cristal liquide (L_α ou L_d), la fluidité se corrèle bien avec l'hydratation. Ceci n'est pas surprenant puisque l'augmentation de la dynamique des lipides résultant d'une augmentation de température ou d'une diminution de la teneur en cholestérol se traduit par une meilleure accessibilité de la membrane aux molécules d'eau du fait de l'existence temporaire de failles ou de défauts dans la bicouche lipidique.

Se pose alors la question du comment peut-on expliquer que l'addition de cholestérol à une bicouche en phase gel, en vue d'induire la formation de radeaux lipidiques, fasse décroître l'hydratation sans changer la fluidité de la bicouche ? Nous pensons que ce phénomène est basé principalement sur les interactions spécifiques du cholestérol avec les lipides capables de former ces radeaux, à savoir la sphingomyéline ou les glycérophospholipides saturés. Il est désormais bien établi que le cholestérol forme des liaisons hydrogène avec les lipides grâce à ses groupements 3-OH. En outre, il a été montré que cette liaison hydrogène dans les bicouches de DPPC se forme avec le groupement carbonyle- sn_2 (dans le cas du DPPC) [226,227] et/ou avec les oxygènes des phosphates des têtes polaires (dans le cas de SM et DPPC) [230-233]. La formation de liaisons hydrogène avec le cholestérol pourrait se substituer aux liaisons hydrogène formées avec les molécules d'eau, avec comme conséquence l'expulsion des molécules d'eau

hors de la bicouche. Ceci est en accord avec les travaux rapportés par Parassasi et *coll* [236]. En utilisant le LAURDAN, ces auteurs ont montré que l'addition de cholestérol à des vésicules de DMPC en phase gel entraînait leur déshydratation. Cependant, l'usage du LAURDAN ne permet pas la localisation précise du phénomène dans la bicouche. Au contraire, la sonde F2N8 est plus précisément localisée à proximité des groupements carbonyle- sn_2 et des groupements phosphates de la bicouche (Fig.44) et peut donc sélectivement localiser cette déshydratation spécifique observée lors de la formation des radeaux, notamment au seuil de 15-20% de cholestérol.

Cette déshydratation est probablement une importante caractéristique de ces radeaux lipidiques, qui se trouve probablement être une (la ?) différence fondamentale entre la phase liquide ordonnée qui les caractérise et une phase gel plus classique. Ce travail démontre qu'il est possible de différencier deux phases lipidiques présentant une fluidité voisine, par leur hydratation à hauteur des groupements carbonyle- sn_2 et phosphates de la bicouche. Ce haut degré de déshydratation constaté lors de la formation des complexes spécifiques entre les phospholipides à même de former des radeaux et le cholestérol, a probablement une implication biologique importante, dont les tenants et les aboutissants restent cependant à élucider.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Les sondes fluorescentes ratiométriques offrent un avantage évident par rapport aux sondes purement “intensiométriques” étant donné qu’elles permettent de s’affranchir de la connaissance de leur concentration. Un tel avantage s’avère particulièrement intéressant lors d’études sur des milieux cellulaires pour lesquels la détermination de la concentration locale d’une sonde est souvent difficile, voire impossible. S’il existe de nombreuses sondes ratiométriques hydrophiles utilisables par exemple au niveau du cytoplasme cellulaire, la communauté scientifique ne disposait que de très peu de sondes ratiométriques membranaires jusqu’à peu de temps.

Dans ce contexte, l’intérêt du laboratoire s’est porté depuis quelques années sur les 3-hydroxyflavones (3-HFs) du fait de leur fluorescence duale. En effet, deux bandes sont communément observées dans leur spectre d’émission, avec une séparation spectrale significative entre elles (~ 60-80 nm). Cette fluorescence duale résulte d’une réaction de transfert de proton à l’état excité (ESIPT) provoquant une isomérisation partielle de la forme excitée normale du flavonol (N*) vers une forme tautomère excitée (T*), le proton du groupement 3-hydroxyl basculant vers le groupement 6-carboxyl. Chacun des deux isomères retourne à son état fondamental par émission d’une bande de fluorescence hypsochrome pour la forme N*, bathochrome pour la forme T*. Parmi ces molécules, les dérivés de la 4’-dialkylamino-3-HF sont apparus plus particulièrement intéressants, car ils présentent une très grande sensibilité au milieu. Aussi bien la position des maxima de fluorescence que le rapport des intensités des formes N* et T* varient notamment en fonction de la polarité et des champs électriques de leur environnement. En outre, leur propension à former des liaisons hydrogène se traduit par l’apparition d’une forme “*H-bonded*” (H-N*) qui se manifeste par une bande d’émission additionnelle ne participant pas à la réaction ESIPT, et qui permet notamment de suivre l’hydratation de l’environnement.

Nos travaux se sont donc insérés dans cette thématique du laboratoire de deux manières : d’une part nous avons étudié de nouvelles sondes dérivées de la 3-hydroxyflavone en les caractérisant en milieu organique et incorporées dans des vésicules lipidiques ; d’autre part en abordant, à l’aide de telles sondes, deux problèmes de biophysique membranaire.

En ce qui concerne les nouvelles sondes étudiées, la première d’entre elles a été la 2-[4-di(2-hydroxyéthyl)aminophényl]-3-hydroxy-4*H*-4-chromenone (FHE), qui présente l’originalité de posséder deux groupements hydroxyéthyl pouvant permettre son ancrage au niveau de la membrane sans qu’une interaction électrostatique via une charge positive soit nécessaire. Cette sonde FHE a d’abord été étudiée dans toute une série de solvants et a démontré une bonne réponse à la polarité du milieu selon l’échelle développée par Lippert. Incorporée dans des vésicules lipidiques, FHE présente la singularité de ne pas donner de forme “*H-bonded*” (H-N*),

ce qui semble indiquer une insertion en profondeur du fluorophore dans la bicouche lipidique. Par ailleurs, FHE démontre une bonne sensibilité au potentiel dipolaire et à la fluidité de la membrane et, de façon plus surprenante, à la présence de polyanions amphiphiles tels l'ATP, qui induirait une relocation de la sonde plus proche de l'interface (**Publication 1**).

Nous avons ensuite étudié deux dérivés pour lesquels le noyau phényle de la 3-HF a été remplacé par un noyau thiophène. Cette substitution augmente le rendement quantique et déplace notablement les spectres d'absorption et d'émission vers le rouge, ce qui permet l'utilisation de sources laser conventionnelles à l'excitation. En comparaison avec les analogues 3-HF, l'émission duale de ces sondes est très sensible à la basicité du solvant, alors que leur sensibilité à la polarité et leur propension à être donneurs de liaisons hydrogènes sont moindres. L'intérêt majeur de ces sondes est leur réponse très marquée à la charge de surface des vésicules lipidiques, probablement due à des différences de basicité de l'interface membranaire. Cette propriété fait de ces sondes des candidats prometteurs pour la conception d'une nouvelle génération de sondes capables de mesurer le potentiel de surface des membranes cellulaires (**Publication 2**).

La seconde partie de notre travail a porté sur l'application des sondes 3-HF en biophysique membranaire. Dans cette optique, nous avons d'abord confirmé l'applicabilité des 3-HF à la mesure ratiométrique du potentiel dipolaire membranaire (ψ_D) en tenant compte des effets d'hydratation. Une précédente étude du laboratoire (*PNAS 2003, 100, 11219*) avait en effet démontré que ce potentiel ψ_D pouvait se mesurer à l'aide du rapport de la fluorescence duale I_{N^*}/I_{T^*} . Ce travail n'avait cependant pas tenu compte de l'existence de la forme *H-bonded* (H-N*) de la sonde qui correspond à sa forme hydratée et qui introduit une troisième bande d'émission à une longueur d'onde intermédiaire par rapport aux longueurs d'onde caractéristiques des formes N* et T*. En effet, l'existence de cette forme hydratée n'a été découverte que postérieurement au travail de 2003. Il a donc été nécessaire de reprendre l'ensemble des expériences, et notamment de déconvoluer les spectres de fluorescence afin d'obtenir séparément les trois bandes d'émission N*, T* et H-N*. Cette déconvolution permet d'obtenir le rapport I_{N^*}/I_{T^*} vrai et non plus le rapport apparent utilisé avant déconvolution. Ce travail nous a permis de confirmer définitivement l'utilité de telles sondes pour la mesure du potentiel dipolaire de membrane. (**Publication 3**).

Enfin, nous avons utilisé la sonde fluorescente F2N8 pour la mesure de l'hydratation dans des mélanges lipidiques riches en sphingomyéline et cholestérol, donnant lieu à la formation de radeaux lipidiques (*rafts*). Nous avons pu mettre en évidence, au niveau de l'interface membranaire, une hydratation nettement moindre pour des vésicules en phase liquide ordonnée

correspondant aux radeaux lipidiques (sphingomyéline + cholestérol) que pour celles en phase classique gel (sphingomyéline seule), ceci en dépit d'une fluidité membranaire similaire pour ces deux phases. Il apparaît que cette très faible hydratation des phases liquide-ordonnées constitue une caractéristique originale des radeaux lipidiques, caractéristique dont l'intérêt biologique, s'il est probable, reste à démontrer.

REFERENCES

- [1]. Demchenko, A. P. (2006) Visualisation and sensing of intermolecular interactions with two-color fluorescent probes, *FEBS Letters*. **580**: 2951-2957
- [2]. Valeur, B. (2004) Invitation à la fluorescence moléculaire, De Boeck.
- [3]. Houbre, D. (1990) Interactions protéines biomembranes étude par fluorescence sur des systèmes modèles, thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur Strasbourg I, mention sciences, option Biophysique.
- [4]. Van Ginkel, G. (1989) Diphenylhexatrienes as fluorescent membrane probes. *Applied fluorescence technology*. **I**: 1-9.
- [5]. Lentz, B. R. (1989) Membrane "fluidity" as detected by diphenylhexatriene probes. *Chemistry and Physics of Lipids*. **50**: 171-190.
- [6]. Prendergast, F. G., Haugland, R. P. and Callahan, P. J. (1981) 1-[4-(Trimethylamino)phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene: synthesis, fluorescence properties and use as a fluorescence probe of lipid bilayers. *Biochemistry*. **20**: 7333-7338.
- [7]. Morgan, C. G., Thomas, E. W., Moras, T. S. and Yianni, Y. P. (1982) The use of a phospholipid analogue of diphenyl-1,3,5-hexatriene to study melittin-induced fusion of small unilamellar phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*. **692**: 196-201.
- [8]. Parente, R. A. and Lentz, B. R. (1985) Advantages and limitations of 1-palmitoyl-2-[[2-[4-(6-phenyl-trans-1,3,5-hexatrienyl)phenyl]ethyl]carbonyl]-3-sn-phosphatidylcholine as a fluorescent membrane probe. *Biochemistry*. **24**: 6178-6185.
- [9]. Lentz, B.R., Barenholz, Y. and Thompson, T. E. (1976), Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 1. Single component phosphatidylcholine liposomes 4521-4528; Fluorescence depolarization studies of phase transitions and fluidity in phospholipid bilayers. 2. Two-component phosphatidylcholine liposomes. *Biochemistry*. **15**: 4529-4537.
- [10]. Lentz, B. R., Moore, B. M. and Barrow, D. A. (1979) Light-scattering effects in the measurement of membrane microviscosity with diphenylhexatriene. *Biophys. J.* **25**: 489-494.
- [11]. Illinger, D., Duportail, G., Mely, Y., Poirel-Morales, N., Gerard, D. and Kuhry, J. G. (1995) A comparison of the fluorescence properties of TMA-DPH as a probe for plasma membrane and for endocytic membrane. *Biochim. Biophys. Acta*. **1239**: 58-66.
- [12]. Beck, A., Heissler, D. and Duportail, G. (1993) Influence of the length of the spacer on the partitioning properties of amphiphilic fluorescent membrane probes. *Chemistry and Physics of Lipids*. **66**: 135-142.
- [13]. Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. and London, E. (2001) Effect of the Structure of Natural Sterols and Sphingolipids on the Formation of Ordered Sphingolipid/Sterol Domains (Rafts). *J. Biol. Chem.* **276**: 33540-33546.
- [14]. Lentz, B.R., Freire, E. and Biltonen, R. L. (1978) Fluorescence and calorimetric studies of phase transitions in phosphatidylcholine multilayers: kinetics of the pretransition. *Biochemistry*. **17**: 4475-4480.
- [15]. Sklar, L. A., Hudson, B. S. and Simoni, R. D. (1977). Conjugated polyène fatty acids as fluorescent probes: synthetic phospholipid membrane studies. *Biochemistry*. **16**: 819-829.

- [16]. Sklar, L. A. (1980) The partition of cis-parinaric acid and trans-parinaric acid among aqueous, fluid lipid, and solid lipid phases. *Molecular and Cellular Biochemistry* **32**: 169-177.
- [17]. Castanho, M., Prieto, M. and Acuña, A. U. (1996) The transverse location of the fluorescent probe trans-parinaric acid in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1279**: 164-168.
- [18]. Stubbs, C. D., Ho, C. and Slater, S. J. (1995) Fluorescence Techniques for Probing Water Penetration into lipid Bilayers. *J Fluorescence.* **5**: 19-28.
- [19]. Damodaran, K. V. and Kenneth Jr, M. M. (1994) A comparison of DMPC- and DMPE-based lipid bilayers. *Biophys. J.* **66**: 1076-1087.
- [20]. Parasassi, T., Gratton, E., Yu, W. M., Wilson, P. and Levi, M. (1997) Two-photon fluorescence microscopy of Laurdan GP domains in model and natural membranes. *Biophys. J.* **72**: 2413-2429.
- [21]. Parasassi, T., Giusti, A. M., Gratton, E., Monaco, E., Raimondi, M., Ravagnan, G. and Saporita, O. (1994) Evidence for an increase in water concentration in bilayers after oxidative damage of phospholipids induced by ionizing radiation. *Int.J. Radiat. Biol.* **65**: 329-334.
- [22]. Weber, G. and Farris, F. J. (1979) Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry.* **18**: 3075-3078.
- [23]. MacGregor, R. B. and Weber, G. (1981) Fluorophores in polar media: spectral effects of the laurdan distribution of electrostatic interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **366**: 140-154.
- [24]. Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M. and Gratton, E. (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **60** : 179-189.
- [25]. Parasassi, T., De Stasio, G., d'Ubaldo, A. and Gratton, E. (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **57**: 1179-1186.
- [26]. Valeur, B. (2002). *Molecular Fluorescence.* New-York, Wiley-VCH.
- [27]. Chong, P. L.-G. and Wong, P. T. T. (1993) Interactions of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study. *Biochim. Biophys. Acta.* **1149**: 260-266.
- [28]. Parasassi, T., Loiero, M., Raimondi, M., Ravagnan, G. and Gratton, E. (1993) Absence of lipid gel-phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types. *Biochim. Biophys. Acta.* **1153**: 143-154.
- [29]. Parasassi, T., Ravagnan, G., Rusch, R. M. and Gratton, E. (1993) Modulation and dynamics of phase properties in phospholipid mixtures detected by Laurdan fluorescence. *Photochem. Photobiol.* **57**: 403-410.
- [30]. Sommer, A., Paltauf, F. and Hermetter, A. (1990) Dipolar solvent relaxation on a nanosecond time scale in ether phospholipid membranes as determined by multifrequency phase and modulation fluorometry. *Biochemistry.* **29**: 11134-11140.
- [31]. Rottenberg, H. (1992) Probing the interactions of alcohols with biological membranes with the fluorescent probe Prodan. *Biochemistry.* **31**: 9473-9481.
- [32]. Krasnowska, E. K., Bagatolli, L. A., Gratton, E., and Parasassi, T. (2001) Surface properties of cholesterol-containing membranes detected by Prodan fluorescence. *Biochim Biophys Acta.* **1511**: 330-340.

- [33]. Sengupta, B., Guharay, J. and Sengupta, P. K. (2000) Characterization of the fluorescence emission properties of prodan in different reverse micellar environments. *Spectrochimica. Acta A*. **56**: 1433-1441.
- [34]. Hutterer, R. and Hof, M. (2001) Dynamic in diether lipid bilayers and interdigitated bilayer structures studied by time-resolved emission spectra, decay time and anisotropy profiles. *J. Fluorescence*. **11**: 227-236.
- [35]. Greenspan, P. and Fowler, S. D.(1985) Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile Red. *J.Lipid Res*. **26**: 781-789.
- [36]. Mazumdar, M., Parrack, P. K. and Bhattacharyya, K. (1992) Interaction of Prodan with tubulin. A fluorescence spectroscopic study. *Eur. J. Biochem*. **204**: 127-132.
- [37]. Sackett, D. L. and Wolff, J. (1987) Nile Red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. *Anal. Biochem*. **167**: 228-234.
- [38]. Maiti, N. C., Krishna, M. M G., Britto, P. J. and Periasamy, N. (1997) Fluorescence dynamics of dye probes in micelles. *J.Phys. Chem. B* .**101**: 11051-11060.
- [39]. Datta, A., Mandal, D., Pal, S. K. and Bhattacharyya, K. (1997) Intramolecular charge transfer processes in confined systems. Nile Red in reverse micelles. *J. Phys. Chem. B*. **101**: 10221-10225.
- [40]. (a) Dutt, G. B., Doriswamy, S. and Periasamy, N. (1991) [Molecular reorientation dynamics of polar dye probes in tertiary-butyl alcohol–water mixtures](#). *J. Chem. Phys.* **94**: 5360-5368. (b) Dutt, G. B. and Doriswamy, S. (1992) [Picosecond reorientational dynamics of polar dye probes in binary aqueous mixtures](#). *J.Chem. Phys.* **96**: 2475-2491.
- [41]. Deye, J. F., Berger, T. A. and Anderson, A. G. (1990) Nile Red as a solvatochromic dye for measuring solvent strength in normal liquids and mixtures of normal liquids with supercritical and near critical fluids. *Anal. Chem*. **62**: 615-622.
- [42]. Sarkar, N., Das, K., Nath, D. N. and Bhattacharya, K. (1994) Twisted charge transfer processes of Nile Red in homogeneous solutions and in faujasite zeolite. *Langmuir*. **10**: 326-329.
- [43]. Dutta, A. K., Kamada, K. and Ohta, K. (1996) Spectroscopic studies of Nile Red in organic solvents and polymers. *J.Photochem.Photobiol. A*. **93**: 57-64.
- [44]. Krishna, M. M. G. (1999) Excited-state kinetics of the hydrophobic probe Nile Red in membranes and micelles. *J Phys Chem A*. **103**: 3589-3595.
- [45]. Ira, and Krishnamoorthy, G. (2001). Probing the link between proton transport and water content in lipid membranes. *J. Phys. Chem B*. **105**: 1484-1488.
- [46]. O' Shea, P.(2003). Intermolecular interactions with/within cell membranes and the trinity of membrane potentials: Kinetics and imaging. *Biochem. Soc. Transactions*. **31**: 990-996.
- [47]. Clarke, R. J (2001). The dipole potential of phospholipids membranes and methods of its detection. *Adv. Colloid Interface Sci*. **89-90**: 263-281.
- [48]. Franklin, J. C. and Cafiso. D. S (1993). Internal electrostatic potentials in bilayers measuring and controlling dipole potential in lipid vesicles. *Biophys. J*. **65**: 289-299

- [49]. Mashl, R. J., Scott, H. L., Subramaniam, S. and Jakobsson, E. (2001). Molecular simulation of dioleoylphosphatidylcholine lipid bilayers at different level of hydration. *Biophys. J.* **81**: 3005-3015.
- [50]. Moncelli, M. R, Becucci, L., Buoninsegni, F. T. and Guidelli, R. (1998). Surface dipole potential at the surface between water and self-assembled monolayers of phosphatidylserine and phosphatidic acid. *Biophys. J.* **74**: 2388-2397
- [51]. Becucci, L., Moncelli, M. R., Herrero, R. and Guidelli, R. (2000). Dipole potentials of monolayers of phosphatidylcholine, phosphatidylserine and phosphatidic acid on mercury. *Langmuir.* **16**: 7694-7700.
- [52]. Herrero, R., Moncelli, R., Guidelli, R., Carlà, M., Arcangeli, A. and Olivotto, M. (2000). Hybrid polar compounds produce a positive shift in the surface dipole potential of self-assembled phospholipids monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1466**: 278-288.
- [53]. Peterson, U., Mannock, D. A., Lewis, R. N. A. H., Pohl, P., McElhaney, R. N., and Pohl, E. P. (2002). Origin of the membrane dipole potential. Contribution of the phospholipids fatty acid chains. *Chem. Phys. Lipids.* **117**: 19-27.
- [54]. Gross, E., Bedlack, R. S., Jr, and Loew, L. M. (1994) Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. *Biophys. J.* **67**: 208-216.
- [55]. Bublitz, G. U. and Boxer, S. G. (1997) Stark spectroscopy: applications in chemistry, biology, and materials science. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**: 213-242.
- [56]. Frolov, Y. L., Sapozhnikov, Y. M., Barev, S. S., Pogodaeva, N. N. and Tyuhakina, N. A. (1974) *Izv. Akad. Navk SSSR.* **10**: 2364-2367.
- [57]. Sengupta, P. K. and Kasha, M. (1979) Excited state proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxyflavone and quercetin. *Chem. Phys. Lett.* **68**: 382-385.
- [58]. McMorrow, D. and Kasha, M. (1984) Intramolecular excited-state proton transfer in 3-hydroxyflavone. Hydrogen-bonding solvent perturbations. *J. Phys. Chem.* **88**: 2235-2243.
- [59]. Formosimo, S. J. and Arnaut, L. G. (1993) Excited-state proton transfer reactions. II Intramolecular reactions. *J Photochem Photobiol A: Chem.* **75**: 21-48.
- [60]. Salman, O. A. and Drickamer, H. G. (1981) The luminescence characteristics of 3-hydroxyflavone as a function of pressure and viscosity. *J Chem Phys.* **75**: 572-576.
- [61]. Salman, O. A. and Drickamer, H. G. (1982) The effect of pressure and freezing on luminescence. I. 3-hydroxyflavone and indole. *J Chem Phys.* **77**: 3329-3336.
- [62]. McMorrow, D. and Kasha, M. (1983) Proton-transfer spectroscopy of 3-hydroxychromones. Extreme sensitivity to hydrogen-bonding perturbations. *J Am Chem Soc.* **105**: 5133-5134.
- [63]. Itoh, M., Tanimoto, Y. and Tokumura, K. (1983) Transient absorption study of the intramolecular excited-state and ground-state proton transfer in 3-hydroxyflavone and 3-hydroxychromone. *J Am Chem Soc.* **105**: 3339-3340.
- [64]. Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* **260**: 3440-3450.

- [65]. Plasek, J. and Sigler, K. (1996) Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. *J Photochem Photobiol B*. **33**: 101-124.
- [66]. Birks, J. B. (1970) Photophysics of aromatic molecules. Londres, Wiley Interscience.
- [67]. Laws, W. R. and Brand, L. (1979) Analysis of two-state excited-state reactions. The fluorescence decay of 2-naphthol. *J Phys Chem*. **83**: 795-802.
- [68]. Woolfe, G. J. and Thistlethwaite, P. J. (1981) Direct observation of excited state intramolecular proton transfer kinetics in 3-hydroxyflavone. *J Am Chem Soc*. **103**: 6916-6923.
- [69]. Itoh, M., Tokumura, K., Tanimoto, Y., Okada, Y., Takeuchi, H., Obi, K. and Tanaka, I. (1982) Time-resolved and steady-state fluorescence studies of the excited-state proton transfer in 3-hydroxyflavone and 3-hydroxychromone. *J Am Chem Soc*. **104**: 4146-4150.
- [70]. Swinney, T. C. and Kelley, D. F. (1993) Proton transfer dynamics in substituted 3-hydroxyflavones: solvent polarization effects. *J. Phys. Chem*. **99**: 211-221.
- [71]. Ofran, M. and Feitelson, J. (1973) Time dependence of dissociation in the excited state of -naphthol. *Chem Phys Lett*. **19**: 427-431.
- [72]. El Bayoumi, M. A.; Avouris, P. and Ware, W. R. (1975) Dynamics of double proton transfer in the excited state of 7-azaindole hydrogen bonded dimer. A time-resolved fluorescence study. *J Chem Phys*. **62**: 2499-2500.
- [73]. Campillo, A. J., Clark, J. H., Shapiro, S. L., Winn, K. R. and Woodbridge, P. K. (1979) Excited-state protonation kinetics of coumarin 102. *Chem Phys Lett*. **67**: 218-222.
- [73]. Thistlethwaite, P. J. and Woolfe, G. J. (1979) Kinetic evidence for excited state proton transfer in salicylamide. *Chem Phys Lett*. **63**: 401-405.
- [75]. Larmer, F., Elsaesser, T. and Kaiser, W (1988) Femtosecond spectroscopy of excited-state proton transfer in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzothiazole. *Chem Phys Lett*. **148**: 119-124
- [76]. Wiechmann, M., Port, H., Frey, W., Larmer, F. and Elsaesser, T. (1990) Excited-state proton transfer in a benzotriazole photostabilizer investigated by femtosecond spectroscopy. *Chem Phys Lett*. **165**: 28-34
- [77]. Chudoba, C., Riedle, E., Pfeiffer, M. and Elsaesser, T. (1996) Vibrational coherence in ultrafast excited state proton transfer. *Chem Phys Lett*. **263**: 622-628.
- [78]. Zhang, H., Van der Meulen, P. and Glasbeek, M. (1996) Ultrafast single and double proton transfer in photo-excited [2,2'-bipyridyl]-3,3'-diol. *Chem Phys Lett*. **253**: 97-102.
- [79]. Marks, D., Zhang, H., Glasbeek, M., Borowicz, P. and Grabowska, A. (1997) Solvent dependence of (sub)picosecond proton transfer in photo-excited [2,2'-bipyridyl]-3,3'-diol. *Chem Phys Lett*. **275**: 370-376.
- [80]. Sekikawa, T., Kobayashi, T. and Inabe, T. (1997) Femtosecond Fluorescence Study of the Substitution Effect on the Proton Transfer in Thermochromic Salicylideneaniline Crystals. *J Phys Chem A*. **101**: 644-649.
- [81]. Neuwahl, F. V. R., Foggi, P. and Brown, R. G. (2000) Sub-picosecond and picosecond dynamics in the S1 state of [2,2'-bipyridyl]-3,3'-diol investigated by UV-visible transient absorption spectroscopy. *Chem. Phys Lett*. **319**: 157-163.

- [82]. Brown, R. G., Entwistle, N., Hepworth, J. D., Hodgson, K. W. and May, B. (1982) Photophysics of three pyridylbenzimidazoles in solution. *J. Phys. Chem.* **86**: 2418-2420.
- [83]. Ameer-Beg, S., Ormson, S. M., Brown, R. M., Matousek, P., Towrie, M., Nibbering, E. T., Foggi, P. and Neuhwal, F. V. R. (2001) Ultrafast measurements of excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) in room temperature solutions of 3-hydroxyflavone and derivatives. *J. Phys. Chem. A.* **105**: 3709-3718.
- [84]. Khan, A. U. and Kasha, M. (1983) Mechanism of four-level laser action in solution excimer and excited-state proton-transfer cases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **80**: 1767-1770.
- [85]. Chou, P., McMorrow, D., Aartsma, T. J. and Kasha, M. (1984) The proton-transfer laser. Gain spectrum and amplification of spontaneous emission of 3-hydroxyflavone. *J. Phys Chem.* **88**: 4596-4599.
- [86]. Chou, P. and Aartsma, T. J. (1986) The proton-transfer laser. Dual wavelength lasing action in binary dye mixtures involving 3-hydroxyflavone. *J. Phys. Chem.* **90**: 721-723.
- [87]. Macinnis, J. M. and Kasha, M. (1988) The role of the anionic potential in excited-state proton transfer in lumichrome picosecond spectroscopy. *Chem Phys Lett.* **151**: 375-378.
- [88]. Sytnik, A. I. and Litvinyuk, I. (1996) Energy transfer to a proton-transfer fluorescence probe: tryptophan to a flavonol in human serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 12959-12963.
- [89]. Sarkar, M., Ray, J. G. and Sengupta, P. K. (1996) Effect of reverse micelles on the intramolecular excited-state proton-transfer (ESIPT) and dual luminescence behavior of 3-hydroxyflavone. *Spectrochim. Acta.* **52**: 275-278.
- [90]. Bondar, O. P., Pivovarenko, V. G. and Rowe, E. S. (1998). Flavonols--new fluorescent membrane probes for studying the interdigitation of lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* **1369**: 119-130.
- [91]. Dennison, S. M., Guharay, J. and Sengupta, P. K. (1999) Excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) and charge transfer (CT) fluorescence probe for model membranes. *Spectrochim. Acta A.* **55**: 1127-1132.
- [92]. Roshal, A. D., Grigorovich, A. V., Doroshenko, A. O., Pivovarenko, V. G. and Demchenko, A. P. (1998) Flavonols and crown-flavonols as metal cation chelators. The different nature of Ba²⁺ and Mg²⁺ complexes. *J. Phys. Chem. A.* **102**: 5907-5914.
- [93]. Roshal, A. D., Grigorovich, A. V., Doroshenko, A. O., Pivovarenko, V. G. and Demchenko, A. P. (1999) Flavonols as metal-ion chelators: complex formation with Mg²⁺ and Ba²⁺ cations in the excited state. *J Photochem Photobiol A: Chem.* **127**: 89-100.
- [94]. Liu, W., Wang, Y., Jin, W., Shen, G. and Yu, R. (1999) Solvatochromogenic flavone dyes for the detection of water in acetone. *Anal Chim Acta.* **383**: 299-307.
- [95]. Chou, P. T., Martinez, M. L. and Clements, J. H. (1993) Reversal of excitation behavior of proton-transfer vs. charge-transfer by dielectric perturbation of electronic manifolds. *J. Phys. Chem.* **97**: 2618-2622.
- [96]. Ormson, M. S., Brown, R. G., Vollmer, F. and Rettig, W. (1994) Switching between charge- and proton-transfer emission in the excited state of a substituted 3-hydroxyflavone. *J Photochem Photobiol A: Chem.* **81**: 65-72.

- [97]. Mataga, N., Kaifu, Y. and Koizumi, M. (1956) Solvent effects upon fluorescence spectra and the dipole moments of excited molecules. *Bull Chem Soc Jpn.* **29**: 465-470.
- [98]. Von Lippert, E. (1957) Spektroskopische bestimmung des dipolmomentes aromatischer verbindungen im ersten angeregten singulettzustand. *Z. Electrochem.* **61**: 962-975.
- [99]. Lakowicz, J. R. (1999). *Excited-State Reactions in Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- [100]. Brucker, G. A., Swinney, T. C. and Kelley, D. F. (1991) Proton-transfer and solvent polarization dynamics in 3-hydroxyflavone. *J Phys Chem.* **95**: 3190-3195.
- [101]. Ercelen, S., Klymchenko, A. S. and Demchenko, A. P. (2002) An ultrasensitive fluorescent probe for hydrophobic range of solvent polarities. *Analytica Chimica Acta.* **464**: 273-287.
- [102]. Demchenko, A. P., Ercelen, S., Roshal, A. D. and Klymchenko, A. S. (2002) Excited-state proton transfer reaction in a new benzofuryl 3-hydroxychromone derivative: the influence of low-polar solvents. *Polish J Chem.* **76**: 1287-1299.
- [103]. Klymchenko, A. S. and Demchenko, A. P. (2003) Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5**: 461-468.
- [104]. Klymchenko, A. S., Pivovarenko, V. G. and Demchenko, A. P. (2003) Perturbation of planarity as the possible mechanism of solvent-dependent variations of fluorescence quantum yield in 2-aryl-3-hydroxychromones. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **59**: 787-792.
- [105]. Klymchenko, A. S., Pivovarenko, V. G., Ozturk, T. and Demchenko, A. P. (2003) Modulation of the solvent-dependent dual emission in 3-hydroxychromones by substituents. *New J Chem.* **9**: 1336-1343.
- [106]. Ercelen, S., Klymchenko, A. S. and Demchenko, A. P. (2003) Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin. *FEBS Letters.* **538** : 25-28.
- [107]. Reynolds, L., Gardecki, J. A., Frankland, S. J. V., Horng, M. L. and Maroncelli, M. (1996) Dipole solvation in nondipolar solvents: experimental studies of reorganization energies and solvation dynamics. *J. Phys. Chem.* **100**: 10337-10354.
- [108]. Dey, J. and Warner, I. M. (1997) Dual fluorescence of 9-(N,N-dimethylamino)anthracene: Effect of solvent polarity and viscosity. *J. Phys. Chem A.* **101**: 4872-4878.
- [109]. Demchenko, A. P., Rusyn, O. I., Egorov, A. M. and Tishkov, V. I. (1990) The solvent effects on the kinetics of bacterial formate dehydrogenase reaction. *Biochim Biophys Acta.* **1039**: 290-296.
- [110]. Michael, D. and Benjamin, I. (1997) Electronic spectra of dipolar solutes at liquid/liquid interfaces: effect of interface structure and polarities. *J. Chem. Phys.* **107**: 5684-5693.
- [111]. Vitha, M. F. and Carr, P. W. (1998) Study of the polarity and hydrogen-bond ability of dodecyltrimethylammonium bromide micelles by the Kamlet-Taft solvatochromic comparison method. *J. Phys. Chem B.* **102**: 1888-1895.
- [112]. Epand, R. M. and Kraayenhof, R. (1999) Fluorescent probes used to monitor membrane interfacial polarity. *Chem. Phys. Lipids.* **101**: 57-64.

- [113]. Cupane, A., Leone, M., Militello, V., Friedman, F., Koley, A. P., Vasquez, G. B., Brinigar, W. S., Karavitis, M. and Fronticellis, C. (1997) Modification of alpha-chain or beta-chain heme pocket polarity by Val(E11) --> thr substitution has different effects on the steric, dynamic, and functional properties of human recombinant hemoglobin. deoxy derivatives. *J Biol Chem.* **272**: 26271-26278.
- [114]. Rachofsky, E. L., Osman, R. and Ross, J. B. A. (2001) Probing structure and dynamics of DNA with 2-aminopurine: effects of local environment on fluorescence. *Biochemistry.* **40**: 946-956.
- [115]. Shynkar, V. V., Mely, Y., Duportail, G., Piémont, E., Klymchenko, A. S. and Demchenko, A. P. (2003) Picosecond Time-Resolved Fluorescence Studies Are Consistent with Reversible Excited-State Intramolecular Proton Transfer in 4'-(Dialkylamino)-3-hydroxyflavones *J. Phys. Chem. A.* **107**: 9522-9529.
- [116]. Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Piémont, E., Demchenko, A. P. and Mely, Y. (2004) Dynamics of Intermolecular Hydrogen Bonds in the Excited States of 4'-(Dialkylamino)-3-hydroxyflavones. On the Pathway to an Ideal Fluorescent Hydrogen Bonding Sensor. *J. Phys. Chem. A.* **108**: 8151-8159.
- [117]. Sytnik, A., Gormin, D. and Kasha, M. (1994) Interplay between excited-state intramolecular proton transfer and charge transfer in flavonols and their use as protein-binding-site fluorescence probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**: 11968-11972.
- [118]. Klymchenko, A. S., Pivovarenko, V. G. and Demchenko, A. P. (2003) Elimination of the hydrogen bonding effect on the solvatochromism of 3-hydroxyflavones. *J Phys Chem A.* **107**: 4211-4216.
- [119]. Strandjord, A. J. G. and Barbara, P. F. (1985) Proton-transfer kinetics of 3-hydroxyflavone: solvent effects. *J Phys Chem.* **89**: 2355-2361.
- [120]. de Silva, A. P., Gunaratne, H. Q. N., Gunnalugsson, T., Huxley, A. J. M., McCoy, C. P., Rademacher, J. T. and Rice, T. E. (1997) Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches. *Chem Rev.* **97**: 1515-1566.
- [121]. Valeur, B. (1993). Molecular Luminescence Spectroscopy. Methods and Applications. New York, Wiley-Interscience.
- [122]. Gross, D. and L. M. Loew (1989) Fluorescent indicators of membrane potential: microspectrofluorometry and imaging. *Methods Cell Biol.* **30**: 193-218.
- [123]. Loew, L. M. (1993) Confocal microscopy of potentiometric fluorescent dyes. *Methods Cell Biol.* **38**: 195-209.
- [124]. Loew, L. M., Scully, S., Simpson, L. and Waggoner, A. S. (1979) Evidence for a charge-shift electrochromic mechanism in a probe of membrane potential. *Nature.* **281**: 497-499.
- [125]. Montana, V., Farkas, D. L. and Loew, L. M. (1989) Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. *Biochemistry.* **28**: 4536-4539.
- [126]. Klymchenko, A. S. and Demchenko, A. P. (2002) Electrochromic modulation of excited-state intramolecular proton transfer: the new principle in design of fluorescence sensors. *J Am Chem Soc.* **124**: 12372-12379.

- [127]. Karki, L., Vance, F. W., Hupp, J. T., LeCours, S. M. and Therien, M. J. (1998) Electronic Stark-effect studies of a porphyrin-based push-pull chromophore displaying a large first hyperpolarizability: state-specific contribution to beta. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 2606-2611.
- [128]. Murga, L. F. and Ondrechen, M. J. (1998) Theory of the Stark effect in protein systems containing an electron donor-acceptor couple. *J Inorganic Biochem.* **70**: 245-255.
- [129]. Rohlfsing, F. and Bradley, D. D. C. (1998) Non-linear Stark effect in polyazomethine and poly(p-phenylene-vinylene): the interconnection of chemical and electronic structure. *Chem Phys.* **227**: 133-138.
- [130]. Franzen, S., Moore, L. J., Woodruff, W. H. and Boxer, S. G. (1999) Stark-effect spectroscopy of the Heme charge-transfer bands of deoxymyoglobin. *J Phys Chem B.* **103**: 3070-3072.
- [131]. Premvardham, L. L. and Peteanu, L. A. (1999) Dipolar properties of and temperature effects on the electronic states of 3-hydroxyflavone (3HF) determined using Stark-effect spectroscopy and compared to electronic structure calculations. *J Phys Chem A.* **103**: 7506-7514.
- [132]. Stanley, R. J. and Jang, H. (1999) Electronic structure measurements of oxidized flavins and flavin complexes using Stark-effect spectroscopy. *J Phys Chem A.* **103**: 8976-8984.
- [133]. Bordat, P., Orrit, M., Brown, R. and Würger, A. (2000) The anomalous Stark effect of single perylene molecules in p-terphenyl crystals. *Chem Phys.* **258**: 63-72.
- [134]. Emilsson, E. and Gutowsky, H. S. (2000) Rotational patches: Stark effect, dipole moment, and dynamics of water loosely bound to benzene. *Chem Phys.* **112**: 1287-1293.
- [135]. Krawczyk, S. X. and Olszowka, D. (2001) Spectral broadening and its effect in Stark spectra of carotenoids. *Chem Phys.* **265**: 335-347.
- [136]. Wolfbeis, O. S., Knierzinger, A. J. and Schipfer, R. (1981) pH-dependent fluorescence spectroscopy. XVII. First excited singlet state dissociation constants, phototautomerism and dual fluorescence of flavonol. *J. Photochem.* **21**: 67-79.
- [137]. Klymchenko, A. S. and Demchenko, A. P. (2004) 3-Hydroxychromone dyes exhibiting excited-state intramolecular proton transfer in water with efficient two-band fluorescence. *New J Chem.* **28**: 687-692.
- [138]. Mandal, P. K. and Samanta, A. (2003) Evidence of ground-state proton-transfer of 3-hydroxyflavone in neutral alcoholic solvents. *J Phys Chem A.* **107**: 6334-6339.
- [139]. Klymchenko, A. S., Ozturk, T. and Demchenko, A. P. (2002) Synthesis of furanochromones: a new step in improvement of fluorescence properties. *Tetrahedron Lett.* **43**: 7079-7082.
- [140]. Klymchenko, A. S. and Demchenko, A. P. (2002) Internal Stark effect mediates intramolecular excited-state proton transfer in 3-hydroxyflavone derivatives. *SPIE Proceedings.* **4938**: 323-330.
- [141]. Klymchenko, A. S., T. Ozturk, Pivovarenko, V. G., and Demchenko, A. P. (2001) 3-hydroxychromone with dramatically improved fluorescence properties. *Tetrahedron Lett.* **42**: 7967-7970.
- [142]. Klymchenko, A. S. and Demchenko, A. P. (2002) Probing the aqueous and nonaqueous reverse micelles by 3-hydroxyflavone derivatives with two-color ratiometric response. *Langmuir.* **18**: 5637-5639.

- [143]. Duportail, G., Klymchenko, A. S., Mely, Y. and Demchenko, A. P. (2001) Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes. *FEBS Lett.* **508**: 196-200.
- [144]. Nemkovich, N. A., Kruchenok, J. V., Rubinov, A. N. and Baumann, W. (2001) Site-selectivity in excited-state intramolecular proton transfer in flavonols. *J Photochem Photobiol A: Chem.* **139**: 53-62.
- [145]. Kraayenhof, R., Sterk, G. J. and Wong Fong Sang, H. W. (1993) Probing biomembrane interfacial potential and pH profiles with a new type of float-like fluorophores positioned at varying distance from the membrane surface. *Biochemistry.* **32**: 10057-10066.
- [146]. Klymchenko, A. S., Duportail, G., Ozturk, T., Pivovarenko, V. G., Mely, Y. and Demchenko, A. P. (2002) Novel two-band ratiometric fluorescence probes with different location and orientation in phospholipid membranes. *Chem Biol.* **9**: 1199-1208.
- [147]. Klymchenko, A. S., Duportail, G., Mely, Y. and Demchenko, A. P. (2003) Ultrasensitive two-color fluorescence probes for dipole potential in phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 11219-11224.
- [148]. Chattopadhyay, A. and London, E. (1987) Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids. *Biochemistry.* **26**: 39-45.
- [149]. Abrams, F. S. and London, E. (1993) Extension of the parallax method analysis of membrane penetration depth to the polar region of model membranes: use of fluorescence quenching by a spin-label attached to the phospholipid polar headgroup. *Biochemistry.* **32**: 10826-10831.
- [150]. Wiener, M. C. and White, S. H. (1992) Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer determined by joint refinement of x-ray and neutron diffraction data. III Complete structure. *Biophys J.* **61**: 434-447.
- [151]. Kachel, K., Asuncion-Punzalan, E. and London, E. (1998) The location of fluorescence probes with charged groups in model membranes. *Biochim Biophys Acta.* **1374**: 63-76.
- [152]. Asuncion-Punzalan, E. and London, E. (1995) Control of the depth of molecules within membranes by polar groups: determination of the location of anthracene-labeled probes in model membranes by parallax analysis of nitroxide-labeled phospholipids induced fluorescence quenching. *Biochemistry.* **34**: 11460-11466.
- [153]. Hubner, W. and Blume, A. (1998) Interactions at the lipid-water interface. *Chem. Phys. Lipids.* **96**: 99-123.
- [154]. Loew, L. M. (1988). How to choose a potentiometric membrane probe. In Spectroscopic membrane probes, Boca Raton, FL., CRC Press.
- [155]. Reichardt, C. (1994) Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chem Rev.* **94**: 2319-2358.
- [156]. Weber, G. and Farris, F. J. (1979) Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* **18**: 3075-3078.
- [157]. Catalan, J., Perez, P., Laynez, J. and Blanco, F. G. (1991) Analysis of the solvent effect on the photophysics properties of 6-propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene (PRODAN). *J Fluorescence.* **4**: 215-223.

- [158]. Cerezo, F. M., Rocafort, S. C., Sierra, P. S., Garcia-Blanco, F., Oliva, C. D. and Sierra, J. C. (2001) Photophysical study of the probes acrylodan (1-[6-(dimethylamino)naphthalene-2-yl]prop-2-en-1-one), ANS (8-anilino-naphthalene-1-sulfonate) and prodan (1-[6-(dimethylamino)naphthalene-2-yl]propan-1-1) in aqueous mixtures of various alcohols. *Helv Chim Acta*. **84**: 3306-3312.
- [159]. Krasnowska, E. K., Gratton, E. and Parasassi, T. (1998) Prodan as a membrane surface fluorescence probe: partitioning between water and phospholipid phases. *Biophys J*. **74**: 1984-1993.
- [160]. Massey, J. B. (1998) Effect of cholesteryl hemisuccinate on the interfacial properties of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta*. **1415**: 193-204.
- [161]. Bondar, O. P. and Rowe, E. S. (1999) Preferential interactions of fluorescent probe Prodan with cholesterol. *Biophys J*. **76**: 956-962.
- [162]. Chong, P. L. (1988) Effects of hydrostatic pressure on the location of PRODAN in lipid bilayers and cellular membranes. *Biochemistry*. **27**: 399-404.
- [163]. Zeng, J. and P. L. Chong (1995) Effect of ethanol-induced lipid interdigitation on the membrane solubility of Prodan, Acdan, and Laurdan. *Biophys J*. **68**: 567-573.
- [164]. Bartucci, R., Guzzi, R., Marsh, D. and Sportelli, L. (2003) Intramembrane polarity by electron spin echo spectroscopy of labeled lipids. *Biophys J*. **84**: 1025-1030.
- [165]. Kurad, D., Jeschke, G. and Marsh, D. (2003) Lipid membrane polarity profiles by high-field EPR. *Biophys J*. **85**: 1025-1033.
- [166]. Klymchenko, A. S., Duportail, G., Demchenko, A. P. and Mely, Y. (2004) Bimodal distribution and fluorescence response of environment-sensitive probes in lipid bilayers. *Biophys J*. **86**: 2929-2941.
- [167]. Asuncion-Punzalan, E., Kachel, K. and London, E. (1998) Groups with polar characteristics can locate at both shallow and deep locations in membranes: the behavior of dansyl and related probes. *Biochemistry*. **37**: 4603-4611.
- [168]. Kaiser, R. D. and London, E. (1998) Determination of the depth of BODIPY probes in model membranes by parallax analysis of fluorescence quenching. *Biochim Biophys Acta*. **1375**: 13-22.
- [169]. Ira, Koti, A. S. R., Krishnamoorthy, G. and Periasamy, N. (2003) TRANES spectra of fluorescence probes in lipid bilayer membranes: an assessment of population heterogeneity and dynamics. *J Fluorescence*. **13**: 95-103.
- [170]. Doroshenko, A. O., Sychevskaya, L. B., Grygorovych, A. V. and Pivovarenko, V. G. (2002) Fluorescence probing of cell membranes with azacrown-substituted ketocyanine dyes. *J Fluorescence*. **12**: 455-464.
- [171]. Chong, P. L. G., Capes, S., and Wongs, P. T. T. (1989) Effects of hydrostatic pressure on the location of PRODAN in lipid bilayers: a FT-IR study. *Biochemistry*. **28**: 8358-8363.
- [172]. Alakoskela, J.-M. I. and Kinnunen, P. K. J (2001) Probing phospholipid main phase transition by fluorescence spectroscopy and a surface redox reaction. *J Phys Chem B*. **105**: 11294-11301.

- [173]. Samanta, A. and Fessenden, R. W. (2000) Excited state dipole moment of PRODAN as determined from transient dielectric loss measurements. *J Phys Chem A*. **104**: 8972-8975.
- [174]. Dobretsov, G. E., Petrov, V. A., Deev, A. I. and Vladimirov, I. A. (1976) Distribution of small hydrophobic molecules in membranes. II. Heterogeneity of binding centers on a phospholipid bilayer surface. *Biofizika*. **21**: 459-462.
- [175]. Lakowicz, J. R. (1983). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York, Plenum Press.
- [176]. Chattopadhyay, A. and Mukherjee, S. (1999) Depth-dependent solvent relaxation in membranes: wavelength-selective fluorescence as a membrane dipstick. *Langmuir*. **15**: 2142-2148.
- [177]. Loew, L. M. (1982) Design and characterization of electrochromic membrane probes. *J. Biochem. Biophys. Methods*. **6**: 243-260.
- [178]. Klymchenko, A. S., Mely, Y., Demchenko, A. P. and Duportail, G. (2004) Simultaneous probing of hydration and polarity of lipid bilayers with 3-hydroxyflavone fluorescent dyes. *Biochim Biophys Acta*. **1665**: 6-19.
- [179]. Duportail, G., Klymchenko, A. S., Mely, Y. and Demchenko, A. P. (2002) On the coupling between surface charge and hydration in biomembranes: experiments with 3-hydroxyflavone probes. *J Fluorescence*. **12**: 181-185
- [180]. Langner, M. and Kubica, K. (1999) The electrostatics of the lipid surfaces. *Chem. Phys. Lipids*. **101**: 3-35.
- [181]. Pasenkiewicz-Gierula, M., Takaoka, Y., Miyagawa, H., Kitamura, K. and Kusumi, A. (1997) Hydrogen bonding of water to phosphatidylcholine in the membrane as studied by a molecular dynamics simulation: location, geometry, and lipid-lipid bridging via hydrogen-bonded water. *J Phys Chem A*. **101**: 3677-3691.
- [182]. Clarke, R. J., Zouni, A. and Holzwarth, J. F. (1995) Voltage sensitivity of the fluorescent probe RH421 in a model membrane system. *Biophys J*. **68**: 1406-1415.
- [183]. Clarke, R. J. (1997) Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim Biophys Acta*. **1327**: 269-278.
- [184]. Gawrisch, K., Ruston, D., Zimmerberg, J., Parsegian, V. A., Rand, R. P. and Fuller, N. (1992) Membrane dipole potentials, hydration forces, and the ordering of water at membrane surfaces. *Biophys J*. **61**: 1213-1223.
- [185]. Zheng, C. and Vanderkooi, G. (1992) Molecular origin of the internal dipole potential in lipid bilayers: calculation of the electrostatic potential. *Biophys J*. **63**: 935-941.
- [186]. Slavik, J. (1982) Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim Biophys Acta*. **694**: 1-25.
- [187]. Campbell, R. B., Balasubramanian, S. V. and Straubinger, R. M. (2001) Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties. *Biochim Biophys Acta*. **1512**: 27-39.
- [188]. Marrink, S.-J., Tieleman, D. P., van Buuren, A. R. and Berendsen, H. J. C. (1996) Membranes and water: an interesting relationship. *Faraday Disc*. **103**: 191-201.

- [189]. Tieleman, D. P., Marrink, S. J., Berendsen, H. J. C. (1997) A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. *Biochim Biophys Acta*. **1331**: 235-270.
- [190]. Brockman, H. (1994) Dipole potential of lipid membranes. *Chem Phys Lipids*. **73**: 57-79.
- [191]. Liberman, E. A. and Topaly, V. P. (1969) Permeability of bimolecular phospholipid membranes for fat-soluble ions. *Biofizika*. **14**: 452-461.
- [192]. Bechinger, B. and Seelig, J. (1991) Interaction of electric dipoles with phospholipid head groups. A ²H and ³¹P NMR study of phloretin and phloretin analogues in phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry*. **30**: 3923-3929.
- [193]. Diaz, S., Lairion, F., Arroyo, J., Biondi de Lopez, A. C. and Disalvo, E. A. (2001) Contribution of phosphate groups to the dipole potential of dimyristoylphosphatidylcholine membranes. *Langmuir*. **17**: 852-855.
- [194]. Wiener, M. C., Suter, R. M. and Nagle, J. F. (1989) Structure of the fully hydrated gel phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophys J*. **55**: 315-325.
- [195]. Jendrsiak, G. L., Smith, R. L. and McIntosh, T. J. (1997) The effect of phloretin on the hydration of egg phosphatidylcholine multilayers. *Biochim Biophys Acta*. **1329**: 159-168.
- [196]. Cseh, R. and Benz, R. (1999) Interaction of phloretin with lipid monolayers: relationship between structural changes and dipole potential change. *Biophys J*. **77**: 1477-1488.
- [197]. Cseh, R., Hetzer, M., Wolf, K., Kraus, J., Bringmann, G. and Benz, R. (2000) Interaction of phloretin with membranes: on the mode of action of phloretin at the water-lipid interface. *Eur Biophys J*. **29**: 172-183.
- [198]. Simon, S. A., McIntosh, T. J., Magid, A. D. and Needham, D. (1992) Modulation of the interbilayer hydration pressure by the addition of dipoles at the hydrocarbon/water interface. *Biophys J*. **61**: 786-799.
- [199]. Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Duportail, G., Demchenko, A. P. and Mely, Y. (2005) Two-color fluorescent probes for imaging the dipole potential of cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*. **1712**: 128-136.
- [200]. Schlegel, R.A. and Williamson, P. (2001) Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ*. **8**: 551-563.
- [201]. Balasubramanian, K. and Schroit, A. J. (2003) Aminophospholipid asymmetry: A matter of life and death. *Annu Rev Physiol*. **65**: 701-734.
- [202]. Balasubramanian, K., Bevers, E. M., Willems, G. M. and Schroit, A. J. (2001) Binding of annexin V to membrane products of lipid peroxidation. *Biochemistry*. **40**: 8672-8676.
- [203]. Meers, P. and Mealy, T. (1993) Calcium-dependent annexin V binding to phospholipids: stoichiometry, specificity, and the role of negative charge. *Biochemistry*. **32**: 11711-11721.
- [204]. Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Kunzelmann, C., Duportail, G., Demchenko, A. P., Freyssinet, J-M, and Mely, Y. (2007) Two-color fluorescent probe for monitoring apoptotic changes at the plasma membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **129**: 2187-2193

- [205]. Shih, T. Y. and Fasman, G. D. (1972) Circular dichroism studies of histone-deoxyribonucleic acid complexes. A comparison of complexes with histones I (f-1), histone IV (f2a1), and their mixtures. *Biochemistry*. **11**: 398-404.
- [206]. Siano, D. B. and Metzler, A. E. (1969) Band shapes of the electronic spectra of complex molecules. *J. Chem. Phys.* **51**: 1856-1861.
- [207]. Itoh, M., Fujiwara, Y., Sumitani, M. and Yoshihara, K. (1986) Mechanism of intramolecular excited-state proton transfer and relaxation process in the ground and excited states of 3-hydroxyflavones and related compounds. *J. Phys. Chem.* **90**: 5672-5678.
- [208]. Pivovarenko, V. G., Wroblewska, A. and Blazejowski, J. (2005) 2-[4-(dimethylamino) phenyl]-3-hydroxy-4H-chromene-4-one: a H-bond-sensitive fluorescent probe for investigating binary mixtures of organic solvents. *Anal. Chim. Acta.* **545**: 74-78.
- [209]. Klymchenko, A. S. and Demchenko, A. P. (2002) Probing AOT reverse micelles with two-color fluorescence dyes based on 3-hydroxychromone. *Langmuir*. **18**: 5637-5639.
- [210]. Shynkar, V. V., Klymchenko, A. S., Mély, Y. Duportail, G. and Pivovarenko, V. G. (2004) Anion formation of 4'-(dimethylamino)-3-hydroxyflavone in phosphatidyl-glycerol vesicles induced by HEPES buffer: a steady-state and time-resolved fluorescence investigation. *J. Phys. Chem B.* **108**: 18750-18755.
- [211]. O'Shea, P. (2003) Intermolecular interactions with/within cell membranes and the trinity of membrane potentials: Kinetics and imaging. *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 990-996.
- [212]. Klymchenko, A. S and Mély, Y. (2004). 7-(2-Methoxycarbonylvinyl)-3-hydroxychromones: new dyes with red shift shifted dual emission. *Tetrahedron Lett.* **45**: 8391-8394.
- [213]. Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P. and Slotte, J.P. (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res.* **41**: 66-97.
- [214]. Field, K. A., Holowka, D. and Baird, B. (1997) Compartmentalized activation of the high affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains. *J Biol Chem.* **272**: 4276-4280.
- [215]. Brown, D. A., and London, E. (1998) "Functions of Lipid Rafts in Biological Membranes", *Ann. Rev. Cell Dev. Bio.* **14**: 111-136.
- [216]. Simons, K and Ikonen, E. (2000) How cells handle cholesterol. *Science.* **290**: 1721-1726.
- [217]. Veatch, S. L. and Keller, S. L. (2003) Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys J.* **85**: 3074-3083.
- [218]. Baumgart, T., Hess, S. T and Webb, W.W. (2003) Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature.* **425**: 821-824.
- [219]. Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K. and Gratton, E. (2001) Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J.* **80**: 1417-1428.
- [220]. Ahmed, S. N, Brown, D. A and London, E. (1997) On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry.* **36**: 10944-10953.

- [221]. Schroeder, R. J., Ahmed, S. N., Zhu, Y., London, E. and Brown, D. A. (1998) Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem.* **273**: 1150–1157.
- [222]. Cevc, G. and Marsh, D. (1987) in Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models, John Wiley & Sons, New-York.
- [223]. Brown, D. A. and London, E. (1998) Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. *J Membr Biol.* **164**: 103-114.
- [224]. Silvius, J.R., del Giudice, D. and Lafleur, M. (1996) Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipids of differing acyl chain length. *Biochemistry.* **35**: 15198-15208.
- [225]. Polozov, I.V. and Gawrisch, K. (2006) Characterization of the liquid-ordered state by proton MAS NMR. *Biophys. J.* **90**: 2051-2061.
- [226]. Verma, S. P. and Wallach, D. F. H. (1973) Effects of cholesterol on the infrared dichroism of phosphatide multibilayers. *Biochim. Biophys. Acta* **330**: 122-131
- [227]. Sankaram, M. B. Thompson, T. E. (1991) Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**: 8686-8690.
- [228]. Bhattacharya, S., and Haldar, S. (2000) Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage. *Biochim. Biophys. Acta.* **1467**: 39–53.
- [229]. Bittman, R., Kasireddy, C. R., Mattjus, P. and Slotte, J. P. (1994) Interaction of cholesterol with sphingomyelin in monolayers and vesicles. *Biochemistry.* **33**: 11776–11781.
- [230]. Talbott, C. M., Vorobyov, I., Borchman, D., Taylor, K. G., DuPre, D. B. and Yappert, M. C. (2000) Conformational studies of sphingolipids by NMR spectroscopy. II. Sphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1467**: 326–337.
- [231]. Mombelli, E., Morris, R., Taylor, W. and Fraternali, F. (2003) Hydrogenbonding propensities of sphingomyelin in solution and in a bilayer assembly: a molecular dynamics study. *Biophys. J.* **84**: 1507–1517.
- [232]. Niemela, P., Hyvonen, M. T. and Vattulainen, I. (2004) Structure and dynamics of sphingomyelin bilayer: insight gained through systematic comparison to phosphatidylcholine. *Biophys. J.* **87**: 2976–2989.
- [233]. Bohdana, T., Heczko, R. and Slotte, J. P. (2005) On the importance of the phosphocholine methyl groups for sphingomyelin/cholesterol interactions in membranes: A study with ceramide phosphoethanolamine. *Biophys. J.* **88**: 2661-2669
- [234]. Boggs, J. M. (1987) Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *Biochim Biophys Acta.* **906**: 353-404.
- [235]. Ho, C. and Stubbs, C. D. (1992) Hydration at the membrane protein-lipid interface. *Biophys J.* **63**: 897-902.

- [236]. Parasassi, T., Di Stefano, M., Loiero, M., Ravagnan, G. and Gratton, E. (1994) Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: a fluorescence study using Laurdan probe. *Biophys J.* **66**: 763-768.
- [237]. Vincent, M. and Gallay, J. Steroid-lipid interactions in sonicated DPPC vesicles: A steady-state and time-resolved fluorescence anisotropy study with all trans-1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene as probe. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **113**: 799-810.
- [238]. Genz, A., Holzwarth, J. F. and Tsong, T.Y. (1986) The influence of cholesterol on the main phase transition of unilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. *Biophys. J.* **50**: 1043-1051.
- [239]. Xu, X., Bittman, R., Duportail, G., Heissler, D., Vilcheze, C. and London, E. (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebrosides, and ceramide. *J Biol Chem.* **276**: 33540-33546.

Résumé : Les dérivés de la 4'-dialkylamino-3-hydroxyflavone (3HF) sont apparus très intéressants comme sondes fluorescentes ratiométriques étant donné leur fluorescence duale résultant d'une réaction de transfert intramoléculaire de proton à l'état excité. La position des maxima de fluorescence et le rapport d'intensité des formes tautomères N* et T* varient en fonction de la polarité, de la facilité à former des liaisons hydrogène et de l'hydratation de l'environnement. En outre, leur caractère hydrophobe en fait des sondes membranaires idéales.

Dans ce travail nous avons d'abord étudié de nouveaux dérivés. Le premier dérivé est la 2-[4-di(2-hydroxyéthyl)aminophényl]-3-hydroxy-4H-4-chroménone (FHE), pourvue de deux groupements hydroxyéthyl permettant son ancrage au niveau de la membrane sans nécessité d'une interaction électrostatique. L'étude de FHE dans les solvants et les liposomes a montré que cette sonde est solvatochromique, sensible au potentiel dipolaire et à la présence de polyanions tels que l'ATP. Elle présente la particularité de ne pas posséder de forme hydratée.

Nous avons ensuite étudié deux dérivés pour lesquels le noyau phényle a été remplacé par le noyau thiophène. Leur étude dans les solvants et les liposomes a montré leur grande sensibilité à la basicité du solvant et un excellent rendement quantique. L'intérêt majeur de ces sondes est leur grande sensibilité au potentiel membranaire de surface ainsi qu'un déplacement des spectres d'absorption vers le rouge, permettant ainsi leur utilisation à l'excitation avec des sources laser conventionnelles.

La dernière partie du travail a porté sur l'application de telles sondes en biophysique membranaire. Nous avons d'abord confirmé l'applicabilité des sondes 3-HF à la mesure du potentiel dipolaire membranaire en prenant en compte leur forme hydratée dont l'interférence possible dans la mesure était jusqu'alors ignorée. Enfin, nous avons pu montrer pour la première fois la différence d'hydratation entre une phase liquide ordonnée caractéristique des radeaux lipidiques (sphingomyéline + cholestérol) et une phase gel classique (sphingomyéline seule), l'hydratation se révélant nettement moins importante dans le cas de la phase liquide ordonnée.

Mots clés : Dérivés de la 3-Hydroxyflavone - Sondes Fluorescentes - Biophysique Membranaire - Vésicules Lipidiques.

Abstract : Derivatives of the 4'-dialkylamino-3-hydroxyflavone appeared particularly interesting as fluorescent probes in regard to their dual fluorescence resulting from an excited state intramolecular proton transfer reaction. The position of their fluorescence maximum as well as the intensity ratio of N* and T* tautomer forms vary according to the polarity, the ability to form hydrogen bonds and the hydration of the environment. Their hydrophobic character is making them ideal membrane probes. In this work we first studied new derivatives. The first one is 2-[4-di(2-hydroxyéthyl)aminophényl]-3-hydroxy-4H-4-chroménone (FHE), with two hydroxyethyl groups allowing the anchoring of the probe at the membrane interface without the need of any electrostatic interaction. The study of FHE in solvents and liposomes showed its solvatochromicity, its sensitivity to dipole potential and to the presence of polyanions (ATP), and also the absence of any hydrated form.

Then, we studied two derivatives in which the phenyl ring was replaced by a thiophene ring. Their study in solvents and liposomes showed a greater sensitivity to the basicity of the solvent and an improved quantum yield. The main advantage of these probes is their great sensitivity to the surface membrane potential and their red-shifted absorption, making them excitable by conventional laser sources.

The last part of the work concerned the application of 3-HF derivatives in membrane biophysics. First, we confirmed the applicability of these probes for the measurement of the membrane dipole potential by taking into account their hydrated form, which was up to now ignored. Finally, we were able to show for the first time the difference in hydration between the liquid ordered phase (sphingomyelin + cholesterol) characterizing the lipidic rafts and the

classical so-called gel phase (sphingomyelin alone), the liquid ordered phase being clearly less hydrated.

Key words: 3-Hydroxyflavone Derivatives - Fluorescent Probes - Membrane Biophysics - Lipidic Vesicles.