

ETUDE DE DIVERS IONOPHORES AU SEIN DE MODELES DE MEMBRANE : UNE APPROCHE BASEE  
SUR LA COUCHE MONOMOLECULAIRE

J. FERREIRA, J. CASPERS, E. GOORMAGHTIGH, R. BRASSEUR et J.-M. RUYSSCHAERT  
(Laboratoire de Chimie Physique des Macromolécules aux Interfaces, U.L.B. -  
CP.206/2, Bruxelles)

RESUME

Des ionophores carboxyliques sont étudiés à l'état de couches monomoléculaires par la mesure du potentiel de surface. Cette méthode permet l'accès aux valeurs des constantes de dissociation acido-basique et des constantes d'association ionophore-ion dans une situation restaurant les conditions d'anisotropie de la membrane biologique.

INTRODUCTION

Un grand nombre d'ionophores capables de modifier la perméabilité ionique des membranes biologiques sont pratiquement insolubles en milieu aqueux. En raison de cette situation, ces substances ont souvent fait l'objet d'études en milieu non aqueux, ou au sein de modèles de membranes biologiques (bicouches lipidiques planes, liposomes) (ref. 1-4). Le présent travail se propose d'aborder l'étude des propriétés de divers ionophores au sein de couches monomoléculaires étalées à l'interface air-eau. La couche étalée peut être constituée de l'ionophore lui-même ou de films mixtes lipides-ionophore (réf. 5-7). C'est la première de ces deux optiques qui sera développée ici. Si un tel modèle ne peut être utilisé lors de l'étude du transfert ionique lui-même, il peut en revanche fort bien convenir à l'étude de la réaction de complexion interfaciale. Dans le cas d'ionophores à fonctions carboxyliques, cette réaction s'écrira :



où IH représente l'ionophore non ionisé,  $\text{M}^{n+}$  un ion cation métallique et  $\text{I}_n\text{M}$  le complexe formé. C'est de cette catégorie particulière d'ionophores (comportant par exemple l'antibiotique A23187, la dianemycine, l'ionomycine) qu'il sera question dans les lignes qui suivent. La technique utilisée consiste en la mesure du potentiel de surface de la couche monomoléculaire étalée.

## MATERIEL ET METHODES

Des échantillons de A23187 et de dianemycine nous ont été offerts par la firme Eli Lilly (Dr De Bruyne, Eli Lilly Europe). Ces substances sont dissoutes dans le chloroforme et étalées à l'interface air-eau au moyen d'une microseringue Agla. La force ionique du support aqueux (eau tridistillée, tampons tris-HCl et acétate-acide acétique) est amenée à la valeur désirée par addition de NaCl ou de CaCl<sub>2</sub> (pro analysis). Le potentiel de surface du film étalé est mesuré par la technique de l'électrode vibrante (réf. 8,9). L'aire occupée par molécule au sein du film est déterminée par pression superficielle (réf. 5).

## RESULTATS EXPERIMENTAUX ET DISCUSSION

Lorsque la réaction (1) est envisagée à l'interface, les espèces IH et I<sub>n</sub><sup>M</sup> constituent la couche monomoléculaire. M<sup>n+</sup> et H<sup>+</sup> peuvent s'échanger avec le support aqueux sous-jacent. La constante d'équilibre de la réaction globale sera le produit de deux constantes d'équilibre, correspondant aux réactions interfaciales suivantes :

1) Etude de la réaction acido-basique

En absence de l'espèce M<sup>n+</sup>, la constante d'équilibre de la réaction d'ionisation (2) peut être obtenue séparément :

$$K_i = \frac{\alpha}{1-\alpha} (H^+)_s \quad (4)$$

$\alpha$  représente le degré d'ionisation de l'acide étalé et  $(H^+)_s$  la concentration en H<sup>+</sup> superficielle reliée à la concentration au coeur de phase  $((H^+)_\infty)$  par le facteur de Boltzmann :

$$(H^+)_s = (H^+)_\infty e^{-e\psi/kT} \quad (5)$$

$e$  représente la charge de l'électron et  $\psi$  le potentiel de double couche électrique, donné, dans le plan des charges superficielles, par la relation de Gouy-Chapman (réf. 9,10). A 25°C cette dernière s'écrit :

$$\psi = 50,4 \operatorname{sh}^{-1} \frac{136 \sigma}{c^{1/2}} \quad (6)$$

$\sigma$  est le nombre de charges par A<sup>2</sup> et  $c$  la concentration en ions monovalents du support (en moles/l).

Si les ions de  
remplacé par 1

$$\sigma = \frac{1}{272} [Z_i c_i]$$

Dans l'un et l'  
(réf. 5) :

$$\sigma = \frac{\alpha}{A}$$

cù A représente

On voit que la

et de K<sub>i</sub> (rela

Le potentiel d

$$\Delta V = \frac{12\pi}{A} u_1$$

u<sub>1</sub> et u<sub>2</sub> (en m

résultant des

Lorsque le fil

$$\Delta V_0 = \frac{12\pi u_1}{A}$$

Lorsque le fil

$$\Delta V_m = \frac{12\pi u_2}{A}$$

La combinai

$$\Delta V = \alpha (\Delta V_m - \Delta V_0)$$

Le tracé de l

La relation l

de pK<sub>i</sub> (réf. 1

tion de valeu

Une valeur pr

et 9, sur 10<sup>7</sup>

les résultats

(réf. 14).

Si des ions de valences différentes sont présents, cette expression doit être remplacée par la relation dite de Grahame (réf. 11) :

$$\sigma = \frac{1}{272} \left[ \sum_i c_i (e^{-z_i e\psi/kT} - 1) \right]^{1/2} \quad (7)$$

Dans l'un et l'autre cas,  $\sigma$  sera relié au degré d'ionisation par la relation (réf. 5) :

$$\sigma = \frac{\alpha}{A} \quad (8)$$

où  $A$  représente l'aire d'un groupe ionisable dans le film étalé.

On voit que la connaissance de  $\psi$  autorise la détermination de  $\alpha$ , de  $(H^+)_s$  et de  $K_1$  (relations 4 à 8).

Le potentiel de surface mesuré comporte les termes suivants (réf.12,13) :

$$\Delta V = \frac{12\pi}{A} \mu_1 (1-\alpha) + \frac{12\pi}{A} \mu_2 \alpha + \psi \quad (9)$$

$\mu_1$  et  $\mu_2$  (en mD) sont les contributions verticales au moment dipolaire résultant des formes IH et I<sup>-</sup>.  $\Delta V$  et  $\psi$  sont exprimés en mV.

Lorsque le film n'est pas ionisé ( $\alpha = 0$ ), la relation 9 s'écrit simplement :

$$\Delta V_0 = \frac{12\pi\mu_1}{A} \quad (10)$$

Lorsque le film est totalement ionisé ( $\alpha = 1$ ), la relation 9 s'écrit :

$$\Delta V_m = \frac{12\pi\mu_2}{A} + \psi_m \quad (11)$$

La combinaison des relations 9 à 11 permet d'écrire :

$$\Delta V = \alpha(\Delta V_m - \Delta V_0 - \psi_m) + \Delta V_0 + \psi \quad (12)$$

Le tracé de la courbe  $\Delta V = f(\text{pH})$  permet la détermination de  $\Delta V_0$  et de  $\Delta V_m$ .

La relation 12 et les relations 4,5,6 et 8 conduisent alors à la détermination de  $\text{p}K_1$  (réf. 13). Un critère de validité de cette méthode consiste en l'obtention de valeurs de  $\text{p}K_1$  indépendantes de  $\alpha$  et de la force ionique du support.

Une valeur proche de 5.5 a été obtenue dans le cas de A23187 étudié entre pH 2 et 9, sur  $10^{-2}$  ou  $10^{-1}$  M en NaCl (réf. 13). Cette valeur est en bon accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs par des techniques différentes (réf. 14).

2) Etude de la réaction d'association  $I^- - M^{n+}$ 

La constante d'équilibre de la réaction d'association (3) avec, par exemple, un ion bivalent ( $Ca^{2+}$ ), s'écrira :

$$K_c = \frac{(I_2Ca)}{(I^-)^2 (Ca^{2+})_s} \quad (13)$$

Définissons les quantités suivantes :

$$Q = (IH) + (I^-) + 2(I_2Ca) \quad (14)$$

$$\alpha = \frac{(I^-)}{(I^-) + (IH)} \quad (15)$$

$$\beta = \frac{2(I_2Ca)}{Q} \quad (16)$$

En combinant les relations 13 à 16, on obtient (réf. 5) :

$$K'_c = 2QK_c = \frac{\beta}{\alpha^2 (1-\beta)^2 (Ca^{2+})_s} \quad (17)$$

$(Ca^{2+})_s$  est relié à la concentration au coeur de phase par la relation :

$$(Ca^{2+})_s = (Ca^{2+})_\infty e^{-2e\psi/kT} \quad (18)$$

La densité de charge superficielle (en nombre de charges par  $\text{Å}^2$ ) de ce système est donnée par la relation :

$$\sigma = \frac{\alpha(1-\beta)}{A} \quad (19)$$

A pH suffisamment basique,  $\alpha$  est égal à l'unité (réf. 5).

Par analogie avec les équations 9 à 11, on écrira, pour le potentiel de surface mesuré (réf. 6,15) :

$$\Delta V = \frac{12\pi}{A} \mu_2 (1-\beta) + \frac{12\pi}{A} \mu_3 \beta + \psi \quad (20)$$

$\mu_2$  et  $\mu_3$  sont les contributions verticales au moment dipolaire résultant des formes  $I^-$  et  $I_2Ca$ . Lorsque  $Ca^{2+}$  n'est pas introduit ( $\beta = 0$ ), on a simplement :

$$\Delta V_m = \frac{12\pi\mu_2}{A} + \psi_m \quad (21)$$

Lorsque l

$$\Delta V'_m = \frac{12\pi\mu_2}{A} + \psi_m$$

La combin

$$\Delta V = \beta (\Delta V'_m)$$

Le tracé

et une ex

calcium u

tions 7,2

ionophore

La figure

films de

dianemyca

significa

-120

-100

-60

-100

-120

-60

-40

Fig. 1. EV

concentra

tions 7,1

de  $Ca^{2+}$ 

14 et 16

 $\beta = (IH)/Q$ 

A = aire

Lorsque le degré d'association  $\beta$  tend vers l'unité, on écrit :

$$\Delta V'_m = \frac{12\pi\mu_3}{A} \tag{22}$$

(13)

La combinaison des relations 20 à 22 permet d'écrire :

$$\Delta V = \beta(\Delta V'_m - \Delta V_m + \Psi_m) + \Delta V_m - \Psi_m + \Psi \tag{23}$$

(14)

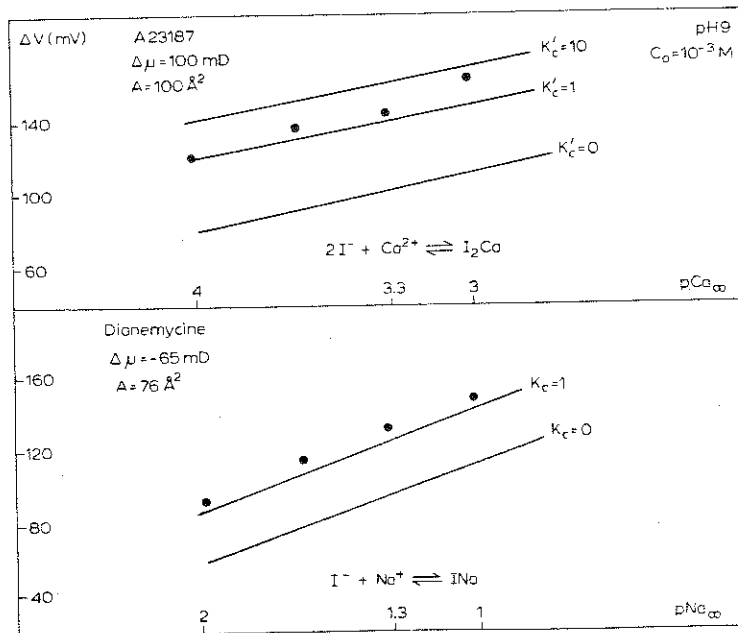
Le tracé de la courbe  $\Delta V = f(\text{Ca}^{2+})_\infty$  autorise la détermination de  $\Delta V_m$  et une extrapolation de la valeur de  $\Delta V'_m$  (la limite de la solubilité du sel de calcium utilisé constitue un facteur limitatif). La relation 23 et les relations 7, 17, 18, 19 permettent l'évaluation de la constante d'association ionophore-ion.

(15)

(16)

La figure 1 représente les résultats obtenus lors de l'étude (à pH 9) des films de A23187 étalés sur des concentrations croissantes en  $\text{Ca}^{2+}$  et de dianemycine étalés sur des concentrations croissantes en  $\text{Na}^+$  (aucun effet significatif n'est observé lors de l'étalement de A23187 sur  $\text{Na}^+$ ).

(17)



relation :

(18)

$\frac{\Delta V}{A}$  de ce

(19)

entiel de

(20)

résultant des  
on a simplement :

(21)

Fig.1. Evolution expérimentale de  $\Delta(\Delta V) = \Delta V - \Delta V_m$  (relation 23) en fonction de la concentration ionique du support. Les droites sont calculées à partir des équations 7, 17, 18, 19 et 23 pour diverses valeurs arbitraires imposées à  $K'_c$  (addition de  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou à  $K_c$  (addition de  $\text{Na}^+$ ) (Lors de l'addition de  $\text{Na}^+$ , les relations 13, 14 et 16 deviennent respectivement :  $K_c = \frac{(\text{INa})}{(\text{I}^-)(\text{Na}^+)}$ ;  $Q = (\text{IH}) + (\text{I}^-) + (\text{INa})$ ;  $\beta = \frac{(\text{INa})}{Q}$ .  $\Delta\mu = \mu_3 - \mu_2$ ;  $C_0 =$  concentration ionique initiale (tris/HCl,  $10^{-3}$  M);  $A =$  aire occupée par l'ionophore dans le film.

Ces résultats montrent que l'ordre de grandeur de la constante d'association de la réaction interfaciale ionophore carboxylique-ion est comparable à celui de la constante de la réaction ionophore neutre-ion (Valinomycine- $K^+$ , Antamanide- $Na^+$ , Trinactine- $K^+$ ) (réf. 6,7).

Dans le cas de A23187, une vérification de la valeur de  $K'_C$  (relation 17) a été obtenue au moyen de l'isotope radioactif  $^{45}Ca^{2+}$  introduit dans le support aqueux, à pH variable (réf. 5).

### 3) Réaction globale à l'interface membrane-eau

Une interprétation du comportement des ionophores carboxyliques aux interfaces biologiques peut être envisagée en termes d'un problème d'équilibre, à l'aide des résultats obtenus dans les paragraphes précédents. A cette fin, nous définirons le modèle suivant : une membrane asymétrique dont la densité de charge (négative) du côté "intérieur" est supérieure à la densité de charge (négative) du côté "extérieur" sépare deux compartiments aqueux. Ces deux derniers sont à pH 7 et renferment une concentration en ions monovalents égale de  $10^{-1}$  M. La concentration en  $Ca^{2+}$  libre vaut  $10^{-3}$  M du côté extérieur et  $10^{-6}$  M du côté intérieur (globalement, cette situation est comparable à celle de la membrane biologique). On admet que la valeur de  $pK_1$  de l'ionophore vaut 5.5 et que l'aire occupée par un lipide membranaire (chargé ou non) est de  $60 \text{ \AA}^2$ . On admet que le nombre de molécules IH introduites dans ce système est faible et ne modifie pas la densité de charge superficielle initiale. Les équations 4,5,7,17,18 et 19 (avec les conditions  $0 < \alpha < 1$  et  $0 < \beta < 1$ ) sont résolues en vue de déterminer les valeurs des degrés d'association avec  $Ca^{2+}$  ( $\beta = 2(I_2Ca)/Q$ ) et avec  $H^+$  ( $\gamma = (IH)/Q$ ), pour différentes valeurs arbitraires imposées à  $K'_C$  (de  $10^{-1}$  à  $10^4$ ).

La figure 2 présente les résultats obtenus. On constate que pour de trop faibles valeurs de la constante d'association ionophore-ion ( $K'_C \leq 0,1$ ), seule l'association avec  $H^+$  prend des valeurs significatives de part et d'autre de la membrane asymétrique. Pour des valeurs de  $K'_C$  comprises entre 1 et 10, le degré d'association avec  $Ca^{2+}$  augmente du côté extérieur, mais reste pratiquement nul du côté intérieur, où seul  $\gamma$  possède une valeur significative. Pour des valeurs plus élevées de  $K'_C$ ,  $\beta$  augmente au détriment de  $\gamma$  des deux côtés de la membrane asymétrique. Si  $K'_C > 10^4$ , la valeur de  $\gamma$  cessera d'être significative du côté intérieur aussi bien que du côté extérieur. Dans les conditions de pH et de concentrations ioniques retenues dans cet exemple, une constante d'association ( $K'_C$ ) trop faible ne pourra donc entraîner l'existence de l'espèce  $I_2Ca$  à l'interface "externe", où cette espèce doit en principe apparaître (pour que le transfert ionique ait lieu). A l'inverse, une constante d'association trop élevée ne pourra entraîner le retour à la forme IH à l'interface "interne", où l'ion  $Ca^{2+}$  doit en principe être libéré.

La figure 2 montre les résultats obtenus dans l'étude du transfert ionique à travers la membrane, en tenant compte de la prise

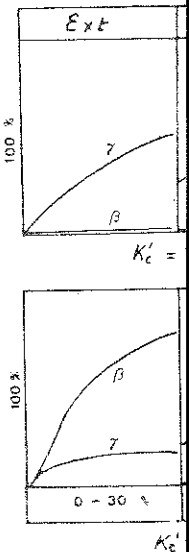


Fig. 2. Evolution de la constante d'association A23187 en fonction de la membrane asymétrique entre 0 et 30%  $pH_{ext} = 7$ ,  $p(Na^+) = 7$ .

### 4) Conformation

Les valeurs de la constante d'association présentées dans ce travail sont en accord avec d'autres auteurs (réf. 16,17). Des valeurs de la constante d'association des ionophores sont obtenues que de l'environnement certainement à l'interface. Les différences de conformation de l'ionophore à la situation

La figure 2 montre que les valeurs de  $K'_C$  relativement faibles ( $1 < K'_C < 10$ ) obtenues dans le présent travail ne sont pas incompatibles avec l'existence du transfert ionique. (Une étude du phénomène complet nécessiterait bien entendu la prise en considération de facteurs cinétiques).

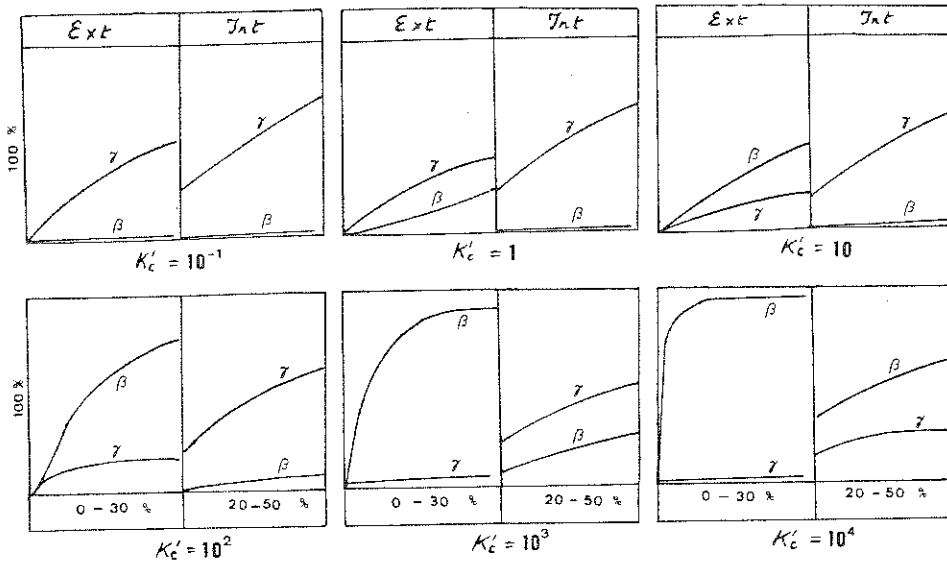


Fig.2. Evolution calculée des degrés d'association  $\beta$  et  $\gamma$  (voir texte) de A23187 en fonction de la densité de charge superficielle de part et d'autre de la membrane asymétrique (on admet que le nombre de lipides chargés est compris entre 0 et 30% du côté "extérieur" et entre 20 et 50% du côté "intérieur").  $pH_{\infty} = 7$ ,  $p(Na+K)_{\infty} = 1$ ;  $pCa_{\infty}^{ext} = 3$ ;  $pCa_{\infty}^{int} = 6$ ;  $pK_1(A23187) = 5.5$ .

#### 4) Conformation du complexe interfacial

Les valeurs des constantes d'association ionophore-ion déterminées dans le présent travail sont du même ordre de grandeur que les valeurs obtenues par d'autres auteurs pour l'association phospholipide- $Ca^{2+}$  à l'interface membrane-eau (réf. 16,17).

Des valeurs beaucoup plus élevées sont généralement obtenues lorsque les ionophores sont étudiés en phase volumique (réf. 18). La constante diélectrique de l'environnement de la molécule ainsi que la solvation de l'ion sont certainement à prendre en compte lors d'une tentative d'explication de ces différences. Un autre facteur important concerne la possible modification conformationnelle de l'ionophore lors du passage de la situation "interfaciale" à la situation "au coeur de la phase lipidique".

Afin d'envisager cette possibilité, une méthode de calcul permettant la simulation de l'interface lipide-eau a été développée (réf. 19). Cette méthode prend en considération, en plus de l'énergie de Van der Waals, de l'interaction électrostatique et du potentiel de torsion, une altération des forces électrostatiques attribuable à la modification de la constante diélectrique à l'interface et l'énergie de transfert associée au déplacement du complexe de l'interface vers le coeur de la phase lipidique.

Les résultats de cette analyse montrent que la forme la plus probable du complexe  $A_{23187}-Ca^{2+}$  à l'interface est caractérisée par un axe de symétrie d'ordre 2, l'ion  $Ca^{2+}$  occupant le centre d'un système constitué par deux molécules d'ionophore dont seules les extrémités carboxyles et les atomes adjacents au benzoxazole, sont orientés vers la phase aqueuse (réf. 19). (Des mesures d'échange tritium-hydrogène à l'interface, obtenues à partir de molécules marquées rendent plausible cette hypothèse (réf. 5)). Cette géométrie du "dimère" formé à l'interface est complètement différente de la forme dérivée d'une analyse aux rayons X (réf. 20) dont on admet généralement qu'elle correspond à la géométrie du complexe au sein de la membrane lipidique.

#### CONCLUSIONS

L'étude d'ionophores carboxyliques sous forme de couches monomoléculaires insolubles permet l'accès à la valeur des constantes de dissociation acido-basique et des constantes d'association ionophore-ion dans une situation restaurant au moins partiellement les conditions d'anisotropie de la membrane biologique. L'absence d'une bicouche lipidique (laquelle permettrait au complexe formé de se mouvoir entre les deux interfaces) permet de "bloquer" l'ionophore dans une situation autorisant une étude des réactions interfaciales proprement dites. Le mécanisme de transport qui dans une membrane réelle intervient consécutivement à la formation du complexe à l'interface, implique vraisemblablement une modification importante de la conformation de ce dernier.

#### REFERENCES

1. G.D. CASE, J.M. VANDERKOOI and A. SCARPA; Arch.Biochem.Biophys. 162 (1974) 174-185.
2. M.S. KAFKA and R.W. HOLZ; Biochim.Biophys.Acta 426 (1976) 31-37.
3. A. HYONO, Th. HENDRIKS, F.J. DAEMEN and S.L. BONTING; Biochim.Biophys.Acta 389 (1975) 34-46.
4. J. WULF and W.G. POHL; Biochim.Biophys.Acta 465 (1977) 471-485.
5. J. FERREIRA, J. CASPERS, R. BRASSEUR and J.M. RUYSSCHAERT; J.Colloid Interface Sci., 81 (1981) 158-168.
6. J. CASPERS, M. LANDUYT-CAUFRIEZ, J. FERREIRA, E. GOORMAGHTIGH and J.M. RUYSSCHAERT; J.Colloid Interface Sci., 81 (1981) 410-418.
7. G. KEMP and Ch. WENNER; Biochim.Biophys.Acta 321 (1973) 161-166.
8. C.D. KINLOCH and A.I. McMULLEN; J.Sci.Instrum. 36 (1959) 347-350.

9. G.L.  
New  
10. J.T.  
New  
11. S.  
Aca  
12. E.D.  
13. J.  
and  
14. R.F.  
242  
15. T.  
Bio  
16. S.  
17. S.  
18. D.R.  
19. R.  
Aca  
20. G.R.

DUFOUR  
commen  
l'ionopho

CASPER  
publicati

PTAK -

CASPER  
première  
thermod  
comme  
trouvent  
de ces et

DUPEY  
effet, m  
d'acide  
reste tr  
probable  
"coopér  
en mod



calcul permettant la simula-  
 (19). Cette méthode prend  
 is, de l'interaction  
 ation des forces électro-  
 te diélectrique à l'inter-  
 t du complexe de l'inter-  
 la plus probable du comple-  
 xne de symétrie d'ordre 2,  
 ar deux molécules d'iono-  
 mes adjacents au benzo-  
 (Des mesures d'échange  
 olécules marquées  
 métrie du "dimère" formé  
 dérivée d'une analyse  
 correspond à la géométrie

9. G.L. GAINES in Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, Interscience New-York, 1966, pp. 188.
10. J.T. DAVIES and E.K. RIDEAL in Interfacial Phenomena, Academic Press, New York, 1963, pp. 56.
11. S. Mc.LAUGHLIN in Current Topics in Membrane and Transport, Vol. 9, Academic Press, New York, 1977, pp. 71-145.
12. E.D. GODDARD; Advances in Colloid Interface Science 4 (1974) 45-78.
13. J. CASPERS, E. GOORMAGTIGH, J. FERREIRA, R. BRASSEUR, M. VANDENBRANDEN and J.M. RUYSSCHAERT; J. Colloid Interface Sci. (in press)
14. R.F. KAUFFMAN, R.W. TAYLOR and D.R. PFEIFFER; Biochemistry 21 (1982) 2426-2435.
15. T. GUILMIN, E. GOORMAGTIGH, R. BRASSEUR, J. CASPERS and J.M. RUYSSCHAERT; Biochim.Biophys.Acta 685 (1982) 169-176.
16. S. Mc.LAUGHLIN, G. SZOBO and G. EISENMAN; J.Gen.Physiol. 58 (1971) 667-687.
17. S. OHKI and R. KURLAND; Biochim.Biophys.Acta 645 (1981) 170-176.
18. D.R. PFEIFFER, P.W. REED and A. LARDY; Biochemistry 13 (1974) 4007-4014.
19. R. BRASSEUR, M. DELEERS, W.J. MALAISSE and J.M. RUYSSCHAERT; Proc.Natl. Acad.Sci., USA, 79 (1982) 2895-2897.
20. G.B. SMITH and W.L. DUAX; J.Am.Chem.Soc. 98 (1976) 1578-1580

ches monomoléculaires.  
 dissociation acido-  
 ans une situation  
 tropie de la membrane  
 ie permettrait au com-  
 met de "bloquer"  
 réactions interfaciales  
 e membrane réelle  
 l'interface, implique  
 ormation de ce dernier.

m.Biophys. 162 (1974)  
 976) 31-37.  
 Biochim.Biophys.Acta  
 ) 471-485.  
 EERT; J.Colloid Inter-  
 MAGHTIGH and  
 410-418.  
 3) 161-166.  
 59) 347-350.