

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE ÈS SCIENCES (BIOPHYSIQUE)

PAR

CHRISTIAN SALESSE

BACCALAURÉAT ÈS SCIENCES

CARACTÉRISATION DES PHOSPHOLIPIDES DES
SEGMENTS EXTERNES DES BATONNETS RÉTINIENS

Juin 1982

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

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

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

Résumé:*

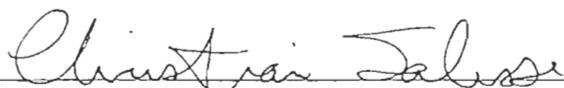
La majorité (80-90%) des lipides des SEB[¶] sont des phospholipides. Plus de la moitié des acides gras de ces phospholipides sont polyinsaturés, ce qui représente une situation unique parmi les membranes naturelles étudiées jusqu'à ce jour. C'est pourquoi nous avons décidé de caractériser ces phospholipides.

Nous avons isolé les SEB et purifié les phospholipides qu'ils contiennent par des chromatographies successives sur DEAE-cellulose et acide silicique. Par la suite, nous avons déterminé leurs propriétés physico-chimiques. Parmi les cinq propriétés étudiées, nous avons établi la composition en acides gras des SEB, de la PE_{SEB}, PC_{SEB} et PS_{SEB}. De plus, nous avons caractérisé le poids moléculaire de chacun des phospholipides. Des poids moléculaires moyens de 966g, 981g et 1042g pour la PE_{SEB}, PC_{SEB} et PS_{SEB} respectivement, ont été obtenus. Par ailleurs, lors de l'évaluation de leur comportement en chromatographie sur couche mince, nous nous sommes rendus compte que les phospholipides des SEB migraient plus rapidement que les phospholipides de référence. Suite aux mesures en spectroscopie d'absorption, nous avons calculé un coefficient d'extinction molaire à 200 nm de 39 000 l mol⁻¹ cm⁻¹ pour la PE_{SEB}, de 26 500 l mol⁻¹ cm⁻¹ pour la PC_{SEB} et de 44 900 l mol⁻¹ cm⁻¹ pour la PS_{SEB}. Enfin, par la caractérisation de l'isotherme de pression de surface de chacun des phospholipides, nous avons déterminé l'aire moléculaire limite de la PE_{SEB} (79 Å² molécule⁻¹), PC_{SEB} (72 Å² molécule⁻¹) et PS_{SEB} (80 Å² molécule⁻¹). De plus, ces isothermes nous montrent bien que ces phospholipides forment un film liquide. On associe un film liquide à une grande fluidité de la monocouche. Ainsi, les phospholipides du photorécepteur visuel contiennent un pourcentage très élevé en acides gras polyinsaturés et forment des films

* Le résumé doit être dactylographié à double interligne

monomoléculaires très fluides. Donc, ils confèrent un environnement très fluide au pigment visuel, la rhodopsine. Le relâchement ou la fluidité de la structure moléculaire de la membrane photoréceptrice est responsable de la rapidité de la relaxation rotationnelle (20 μ s, Cone, 1972) et de la vitesse translationnelle élevée (0,3 ms^{-1} , Liebman et Entine, 1974) de la rhodopsine.

Les propriétés physico-chimiques des différents phospholipides des SEB, seront utilisées dans la poursuite des travaux de recherche reliés à l'étude des interactions entre chacun de ces phospholipides et la rhodopsine. Pour y parvenir, on propose l'emploi d'un système modèle, c'est-à-dire l'étude en deux dimensions sur un bain de Langmuir. Cette première étape nous permettra de déterminer le type d'interaction, son ordre de grandeur et la propension de la rhodopsine à interagir avec un phospholipide donné. Par la suite, il serait intéressant de former des membranes symétriques et asymétriques en reconstituant, par étapes, la membrane photoréceptrice. Ainsi, en incorporant de la rhodopsine dans une membrane renfermant un seul type de phospholipide, on pourrait étudier la variation de la résistance, de la capacitance et du flux ionique (à la noirceur et sous l'effet de l'irradiation) en fonction de la composition lipidique. Par conséquent, on pourrait déterminer l'importance de chaque phospholipide des SEB dans l'hypothèse ionique de la vision.



Signature du candidat

Date: Le 26 août 1982



Signature du directeur de recherche

Date: Le 26 août 1982

Signature du co-auteur (s'il y a lieu)

Date:

Signature du co-directeur (s'il y a lieu)

Date:

AVANT-PROPOS

Dans un texte scientifique, on ne peut se permettre d'être métaphorique. Par contre, la préface est au scientifique ce que la fugue est au féal.

J'ai toujours cru que l'espoir, mon bouclier atomique, était omniprésent même si la situation ne s'y prêtait guère. Muni de ce bouclier et de l'encouragement local, j'ai pu réduire à néant les embûches se dressant sans cesse sur mon passage. Heureusement, le coefficient de difficulté associé aux débuts d'un programme de deuxième cycle qui doit faire ses preuves, est directement proportionnel à la force nette qu'on en retire. Sincèrement merci, Monsieur Leblanc, d'avoir toujours cru en moi. Merci Roger Leblanc, François et Pierre, d'avoir tracé ce sillon dont l'empreinte et la cadence me permit de dévaler les pentes de la frénésie et de me laisser emporter jusqu'à l'extase de résultats inédits. Merci François. Merci Pierre. Je ne saurais oublier Gaétan pour sa disponibilité et sa collaboration, surtout lors des mesures des propriétés monomoléculaires. Je désire remercier aussi tous les autres membres du Centre de recherche en photobiophysique, y incluant les secrétaires qui ont collaboré à la dactylographie de ce mémoire, sous la direction de Nicole, et les techniciens du département de Chimie-Biologie.

Enfin, merci Lise pour tes encouragements, ta patience et ta tolérance face à mon entêtement.

A ma femme Lise

et à mon fils Frédéric.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
AVANT-PROPOS	ii
TABLE DES MATIERES	iv
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xv
I - INTRODUCTION	1
1- Généralités	1
2- Composition des membranes des SEB	6
3- Importance des phospholipides des SEB	8
A- Effet de la diète sur la composition en acides gras	8
B- Effet de l'environnement lipidique sur les propriétés de la rhodopsine	10
a) La capacité de régénération de la rhodopsine	10
b) La séquence photolytique	13
c) Conclusion	14
4- But de notre travail	16
II - MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES	17
1- Matériel	17
2- Méthodes expérimentales	22
A- Dissection des yeux bovins	22
B- Isolation des SEB de la rétine	22
C- Extraction des lipides	24
D- Séparation et purification des phospholipides des SEB	25

	Page
a) Chromatographie sur DEAE-cellulose	25
i) Lavage de la DEAE-cellulose et montage de la colonne	26
ii) Adsorption des lipides et séquence d'élution	26
iii) Extraction de la PS	27
b) Chromatographie sur acide silicique	28
i) Lavage de l'acide silicique	28
ii) Montage de la colonne et application des phospholipides	29
iii) Passage des solvants, collection et évaporation des fractions	30
E- Caractérisation des acides gras par chromatographie en phase gazeuse	31
a) L'hydrolyse des phospholipides et la transméthylation de leurs acides gras	31
b) La programmation de l'appareil et l'in- jection des acides gras	33
F- Détermination du poids moléculaire des phospho- lipides et de leur teneur quantitative dans un échantillon donné	33
a) L'obtention d'un échantillon sec	34
b) La pesée des phospholipides et leur transfert quantitatif	34
c) Leur minéralisation et leur transvasement	35
d) La préparation de la courbe d'étalonnage	35
e) L'analyse quantitative des phospholipides	37
i) Détermination du poids moléculaire	37
ii) Estimation de la quantité de phospho- lipides dans un échantillon donné	38
- Transfert quantitatif des phospho- lipides	38

	Page
G- Comportement des phospholipides en chromatographie sur couche mince	39
a) La saturation de la cuve à développement et l'application des phospholipides	39
b) La migration et la révélation	39
H- La spectroscopie d'absorption des phospholipides	41
I- Propriétés monomoléculaires des phospholipides à l'interface air-eau	43
a) Choix du solvant d'étalement, de la sous-phase et de l'interface	44
i) Le solvant d'étalement	44
ii) La sous-phase	45
iii) L'interface	45
b) Compression des molécules, acquisition des données et calcul des résultats	47
c) Séchage et entreposage des phospholipides	48
III- RESULTATS ET DISCUSSION	49
1- Caractérisation des acides gras	49
2- Détermination du poids moléculaire	57
3- Comportement en chromatographie sur couche mince	61
4- Spectroscopie d'absorption	67
5- Détermination des propriétés monomoléculaires des phospholipides à l'interface air-eau	76
CONCLUSION	84
BIBLIOGRAPHIE	86
ANNEXE I	107

LISTE DES ABREVIATIONS

AG	Composition en acides gras déterminée par chromatographie en phase gazeuze
AGPI	Acide gras polyinsaturé
ArLiL	Arachidonoyl linoléoyl lécithine
BeSL	Béhénoyl stearoyl lécithine
BeLiL	Béhénoyl linoléoyl lécithine
BHT	2,6-Di-ter-butyl-p-crésol
BuOLL	Butyryl oléoyl lécithine
CCM	Chromatographie sur couche mince
DACL	Diacétyl lécithine
DARPC	Diarachidonoyl phosphoryl choline
DBeL	Dibéhénoyl lécithine
DBePC	Dibéhénoyl phosphatidyl choline
DBuL	Dibutyryl lécithine
DCaL	Dicapryl lécithine
DCaPE	Dicapryl phosphatidyl éthanolamine
DDeL	Didécanoyle lécithine
DDePC	Didécanoyle phosphatidyl choline
DElPC	Diélaïdoyle phosphatidyl choline
DElPE	Diélaïdoyle phosphatidyl éthanolamine
DHC	Dihexadécanoyle céphaline
DHL	Dihexadécanoyle lécithine
DHPC	Dihexadécanoyle phosphatidyl choline
DHeL	Diheptanoyle lécithine

DLaC	Dilauroyl céphaline
DLaL	Dilauroyl lécithine
DLaPC	Dilauroyl phosphatidyl choline
DLaPE	Dilauroyl phosphatidyl éthanolamine
DLaPG	Dilauroyl phosphatidyl glycérol
DLaPRC	Dilauroyl phosphoryl choline
DLaPS	Dilauroyl phosphatidyl sérine
DLiL	Dilinoléoyl lécithine
DLiPC	Dilinoléoyl phosphatidyl choline
DLiPRC	Dilinoléoyl phosphoryl choline
DLnL	Dilinolénoyl lécithine
DLnPRC	Dilinolénoyl phosphoryl choline
DMC	Dimyristoyl céphaline
DML	Dimyristoyl lécithine
DMPC	Dimyristoyl phosphatidyl choline
DMPE	Dimyristoyl phosphatidyl éthanolamine
DMPRC	Dimyristoyl phosphoryl choline
DNL	Dinonanoyl lécithine
DOcL	Dioctanoyl lécithine
DOlC	Dioléoyl lécithine
DOlPA	Dioléoyl acide phosphatidique
DOlPC	Dioléoyl phosphatidyl choline
DOlPE	Dioléoyl phosphatidyl éthanolamine
DOlPRC	Dioléoyl phosphoryl choline
DOlPRE	Dioléoyl phosphoryl éthanolamine

DOtPC	Dioctadécanoyl phosphatidyl choline
DPaC	Dipalmitoyl céphaline
DPaL	Dipalmitoyl lécithine
DPaPA	Dipalmitoyl acide phosphatidique
DPaPC	Dipalmitoyl phosphatidyl choline
DPaPE	Dipalmitoyl phosphatidyl éthanolamine
DPaPG	Dipalmitoyl phosphatidyl glycérol
DPaPRC	Dipalmitoyl phosphoryl choline
DPaPRE	Dipalmitoyl phosphoryl éthanolamine
DPeL	Dipentadécanoyl lécithine
DSL	Distearoyl lécithine
DSPA	Distearoyl acide phosphatidique
DSPC	Distearoyl phosphatidyl choline
DSPE	Distearoyl phosphatidyl éthanolamine
DSPRC	Distearoyl phosphoryl choline
DSPS	Distearoyl phosphatidyl sérine
DTL	Ditétradécanoyl lécithine
DTeL	Ditétracosanoyl lécithine
DUL	Diundécanoyl lécithine
DUDL	Diundécénoyl lécithine
DUDPC	Diundécénoyl phosphatidyl choline
ELSPC	Elaidoyl stearoyl phosphatidyl choline
F.I.	Force ionique
HEPES	N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthanesulfonique acide

LaSL	Lauroyl stearoyl lécithine
LiPaL	Linoléoyl palmitoyl lécithine
LiSL	Linoléoyl stearoyl lécithine
LnPaL	Linolénoyl palmitoyl lécithine
LnPaPE	Linolénoyl palmitoyl phosphatidyl éthanolamine
M	Poids moléculaire
OLSL	Oléoyl stearoyl lécithine
OLSPC	Oléoyl stearoyl phosphatidyl choline
OLSPE	Oléoyl stearoyl phosphatidyl éthanolamine
OtOLPC	Octadécanoyl oléoyl phosphatidyl choline
OtOLPE	Octadécanoyl oléoyl phosphatidyl éthanolamine
P	Poids
PA	Acide phosphatidique
PaArL	Palmitoyl arachidonoyl lécithine
PaArPC	Palmitoyl arachidonoyl phosphatidyl choline
PaBeL	Palmitoyl béhénoyl lécithine
PaDcL	Palmitoyl docosahexaénoyl lécithine
PaEcPC	Palmitoyl eicosanoyl phosphatidyl choline
PaErL	Palmitoyl érucoyl lécithine
PaLiL	Palmitoyl linoléoyl lécithine
PaLiPE	Palmitoyl linoléoyl phosphatidyl éthanolamine
PaLnL	Palmitoyl linolénoyl lécithine
PaLnPE	Palmitoyl linolénoyl phosphatidyl éthanolamine
PaOLL	Palmitoyl oléoyl lécithine
PaOLPC	Palmitoyl oléoyl phosphatidyl choline

PaSPC	Palmitoyl stearoyl phosphatidyl choline
PC	Phosphatidyl choline
PC _{SEB}	Phosphatidyl choline des SEB
PE	Phosphatidyl éthanolamine
PE _{SEB}	Phosphatidyl éthanolamine des SEB
PG	Phosphatidyl glycérol
phl	Phospholipide
Pi	Phosphore inorganique
PI	Phosphatidyl inositol
PS	Phosphatidyl sérine
PS _{SEB}	Phosphatidyl sérine des SEB
SArL	Stearoyl arachidonoyl lécithine
SArPC	Stearoyl arachidonoyl phosphatidyl choline
SArPE	Stearoyl arachidonoyl phosphatidyl éthanolamine
SDcL	Stearoyl docosahexaénoyl lécithine
SEB	Segment externe des bâtonnets
SE ^l PE	Stearoyl élaidoyl phosphatidyl éthanolamine
SLaL	Stearoyl lauroyl lécithine
SLaPS	Stearoyl lauroyl phosphatidyl sérine
SLiL	Stearoyl linoléoyl lécithine
SLiPC	Stearoyl linoléoyl phosphatidyl choline
SLnL	Stearoyl linolénoyl lécithine
SLnPC	Stearoyl linolénoyl phosphatidyl choline
SLnPE	Stearoyl linolénoyl phosphatidyl éthanolamine
SO ^l L	Stearoyl oléoyl lécithine

SO ℓ PC	Stearoyl oléoyl phosphatidyl choline
SO ℓ PE	Stearoyl oléoyl phosphatidyl éthanolamine
SO ℓ PRC	Stearoyl oléoyl phosphoryl choline
Sph	Sphingomyéline
SPtPE	Stearoyl pétrosélinoyl phosphatidyl éthanolamine
T	Trace
TES	N-tris (hydroxyméthyl)-méthyl-2-amino- éthanesulfonique acide
v	Volume

LISTE DES FIGURES

	Page
I-1 L'oeil	3
I-2 L'organisation de la rétine	4
I-3 Un bâtonnet	5
III-1 Chromatogramme en phase gazeuse de la PE _{SEB}	50
III-2 Courbe d'étalonnage du Pi	58
III-3 Comportement en chromatographie sur couche mince de la PE _{SEB}	63
III-4 Comportement en chromatographie sur couche mince de la PC _{SEB}	64
III-5 Comportement en chromatographie sur couche mince de la PS _{SEB}	65
III-6 Spectre d'absorption de la PE _{SEB}	68
III-7 Spectre d'absorption de la PC _{SEB}	69
III-8 Spectre d'absorption de la PS _{SEB}	70
III-9 Absorbance à 200 nm en fonction de la concentration de PE _{SEB}	71
III-10 Absorbance à 200 nm en fonction de la concentration de PC _{SEB}	72
III-11 Absorbance à 200 nm en fonction de la concentration de PS _{SEB}	73
III-12 Isotherme de pression de surface de la phosphatidyl éthanolamine des segments externes des bâtonnets à 20,0±0,5°C	77
III-13 Isotherme de pression et de potentiel de surface de la phosphatidyl éthanolamine des segments externes des bâtonnets à 20,0±0,5°C	78
III-14 Isotherme de pression et de potentiel de surface de la distearoyl phosphatidyl choline (DSPC) et de la phosphatidyl choline des segments externes des bâtonnets à 20,0±0,5°C.....	80
III-15 Isotherme de pression de surface de la phosphatidyl choline des segments externes des bâtonnets à 20,0±0,5°C.....	81

III-16	Isotherme de pression et de potentiel de surface de la phosphatidyl sérine des segments externes des bâtonnets à $20,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$	82
--------	---	----

LISTE DES TABLEAUX

		Page
I-1	Composition en phospholipides des SEB en tant que pourcentage du phosphore total	7
II-1	Caractéristiques des produits chimiques et solvants	18
II-2	Caractéristiques des appareils et instruments de mesure	20
II-3	Fréquence d'utilisation des solvants d'étalement	46
III-1	Composition en acides gras des segments externes des bâtonnets	51
III-2	Composition en acides gras de la PE _{SEB}	53
III-3	Composition en acides gras de la PC _{SEB}	54
III-4	Composition en acides gras de la PS _{SEB}	55
III-5	Détermination du poids moléculaire	59
III-6	Comportement en chromatographie sur couche mince	62
III-7	Détermination des coefficients d'extinction molaire	74

I- INTRODUCTION

1 - Généralités

L'oeil représente l'organe permettant d'obtenir le plus d'informations de notre environnement. Plus précisément, le tissu nerveux tapissant le fond du globe oculaire, appelé rétine (voir figure I-1), peut se désigner comme étant une partie du cerveau qui regarde le monde. Le reste de l'oeil la protège, la nourrit et amène les objets à produire une image nette sur sa surface. En l'examinant de plus près, on s'aperçoit qu'elle est organisée en couches (voir figure I-2). Les cellules photoréceptrices contenant le pigment visuel, sont au contact de l'épithélium pigmenté (portion postérieure de la rétine) et sont montées, du côté interne de l'oeil, par les couches de cellules nerveuses qui assurent le traitement de l'information visuelle. La lumière n'atteint donc le photorécepteur visuel qu'après avoir traversé toutes ces couches de cellules.

La rétine de la plupart des vertébrés contient deux sortes de cellules photoréceptrices: les bâtonnets qui sont les récepteurs de la lumière atténuée, et les cônes qui sont responsables de la vision photopique. L'ultrastructure d'un bâtonnet (voir figure I-3) montre qu'il consiste en deux segments cellulaires distincts: les segments interne et externe. Dans le segment interne, on retrouve tous les organites nécessaires au fonctionnement métabolique normal de la cellule: les mitochondries, l'appareil de Golgi, le reticulum endo-

plasmique et le noyau. Par contre, le segment externe comprend de 500 à 2 000 disques spécialisés dans la transduction visuelle. Les membranes de ces disques renferment le pigment photosensible, appelé rhodopsine, et les phospholipides.

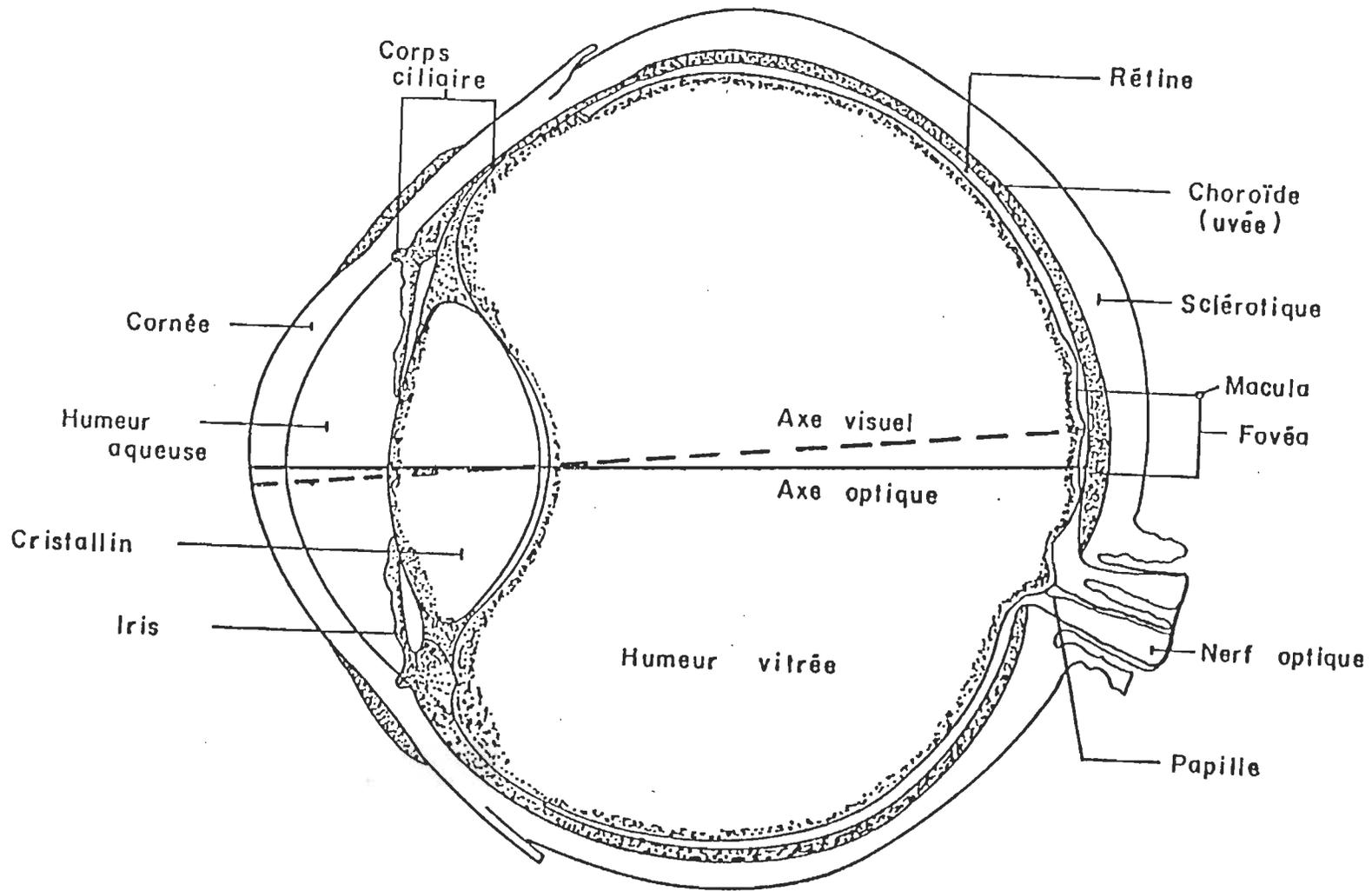


Fig. I - 1 L'oeil

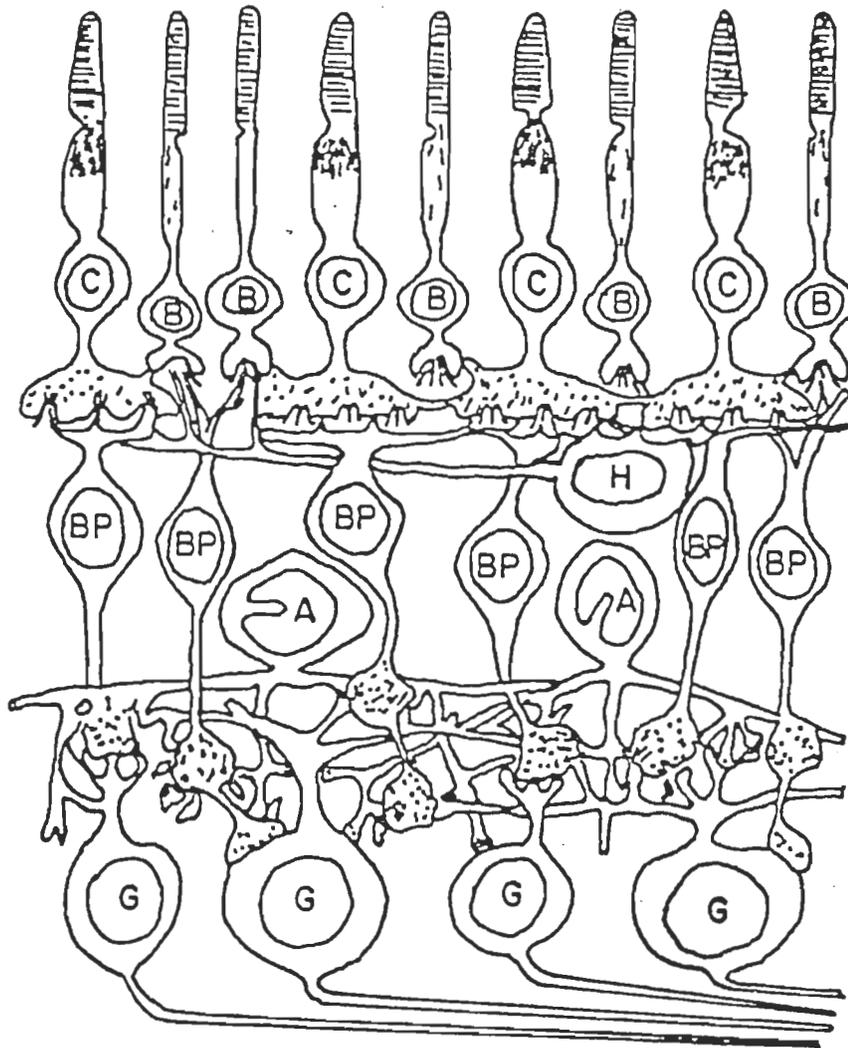


Fig. I-2 L'organisation de la rétine

- A : cellules amacrines
- B : bâtonnets
- BP: cellules bipolaires
- C : cones
- G : cellules ganglionnaires
- H : cellules horizontales

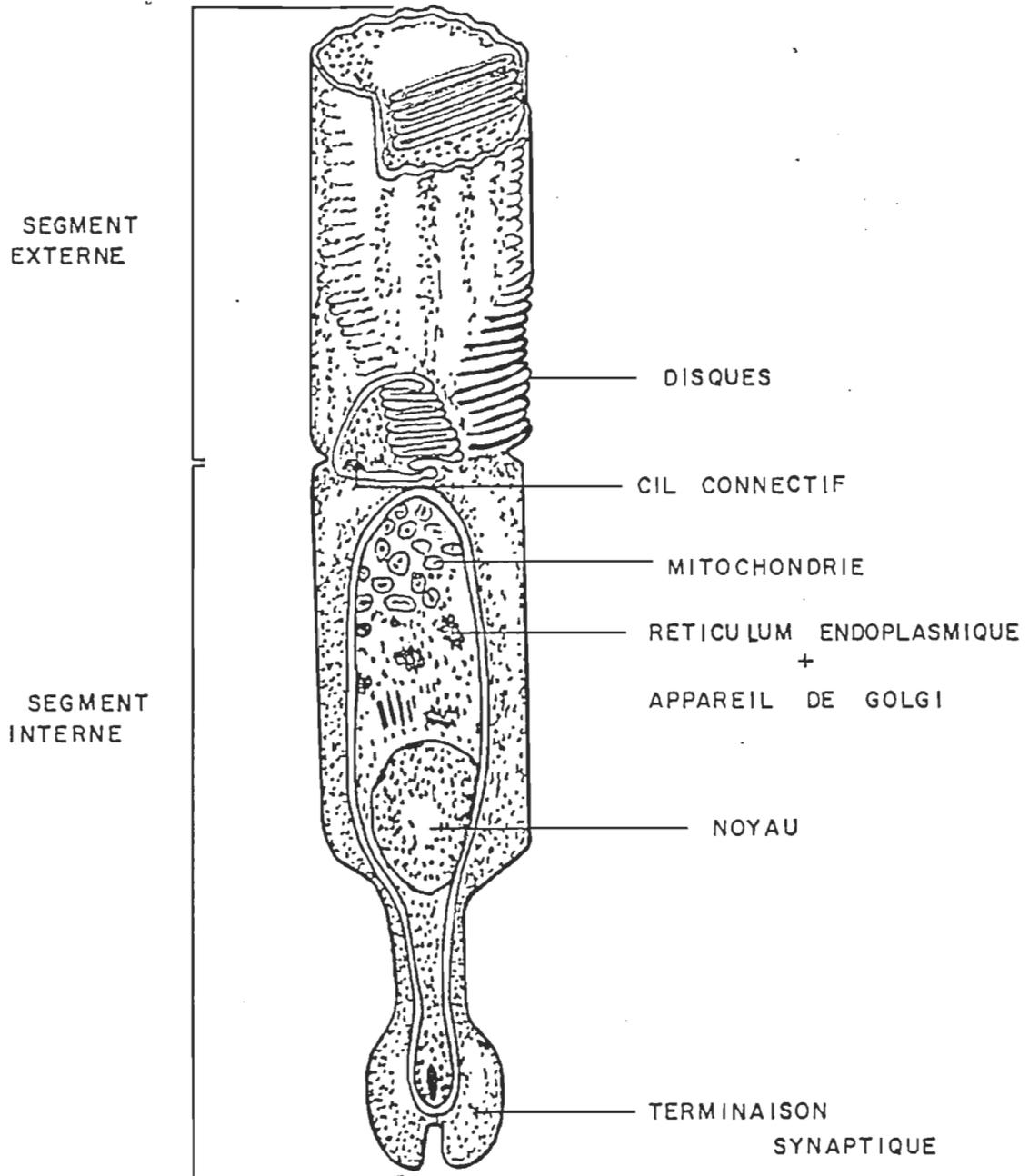


Fig. I-3 Un bâtonnet

2 - Composition des membranes des SEB

L'analyse des SEB révèle que ces membranes contiennent, en poids sec, des quantités équivalentes de lipides et de protéines (Daemen, 1973). De plus, la rhodopsine comprend 80 à 90% des protéines membranaires, alors que la majorité (80 - 90%) des lipides sont des phospholipides (Olive, 1980). Dans le tableau I-1, on a répertorié tous les auteurs ayant déterminé la composition en phospholipides des SEB, en tant que pourcentage du phosphore total. Ainsi, on remarque une prédominance de PE et PC, une quantité substantielle de PS puis, un peu de Sph et PI. Parmi les lipides des SEB, on retrouve aussi du cholestérol, à raison de 3% du poids sec (Sjostrand, 1959; Fleischer et Mc Connell, 1966; Borggreven et coll., 1970; Hendricks et coll., 1976) ou environ 9% des lipides totaux, des acides gras libres (environ 1.8% du poids sec ou 6.8% des lipides) et un faible taux de diglycéride, monoglycéride et de vitamine E (Miljanich, 1978).

De plus, les acides gras des membranes des SEB se caractérisent par leur important contenu en longues chaînes grandement insaturées. Plus de la moitié de ces acides gras sont polyinsaturés, ce qui représente une situation unique parmi les membranes naturelles étudiées jusqu'à ce jour. Dans la section III-1, on présente la détermination des acides gras des SEB, de la PE_{SEB} , PC_{SEB} et PS_{SEB} .

TABLEAU I - 1

Composition en phospholipides des SEB en tant que pourcentage du phosphore total.

AUTEUR (S)	PE	PC	PS	PI	Sph
Poincelot et Zull (1969)	38,5	51,7	7,2	-	1,5
Nielsen et coll. (1970)	42,7	38,8	13,8	1,7	1,5
Anderson et Maude (1970)	38,5	40,0	13,0	2,0	3,5
Borggreven et coll. (1970)	39,2	34,7	11,2	5,7	1,0
Dreyfus et coll. (1974)	42,8	36,5	13,5	2,0	2,0
Anderson et coll. (1975)	45,0	35,7	15,8	1,5	0,8
Miljanich (1978)	42,2	39,2	14,3	1,9	1,3
De Grip et coll. (1980)	45,0	38,0	14,0	-	-
Drenthe et coll. (1981)	44,1	36,0	15,2	-	-

3 - Importance des phospholipides des SEB

A- Effet de la diète sur la composition en acides gras

En 1971, Futterman et coll., ont alimenté des rats pendant 40 semaines avec une diète déficiente en acides gras essentiels (précurseurs des acides arachidonique et docosahexaénoïque). Ils n'ont remarqué que des changements mineurs dans la composition en acides gras de la rétine. Par contre, d'autres tissus (coeur, reins) étaient si sérieusement affectés que la mauvaise condition des animaux les obligea à arrêter l'expérience. En revanche, les paramètres morphologiques et électrophysiologiques montraient que l'oeil fonctionnait normalement.

Par la suite, Anderson et Maude (1972) ont confirmé la capacité unique des SEB et de la rétine de rat, à conserver leurs acides gras polyinsaturés. Ils ont observé, après dix semaines de carence en acides gras essentiels, des variations dramatiques dans la composition en acides gras des érythrocytes, du plasma, des poumons, des reins, des testicules et du foie. Cependant, les SEB et la rétine préservèrent leur contenu en AGPI.

Plus récemment, Anderson et coll. (1977) ont nourri sept groupes de rats avec soit de la nourriture de laboratoire, une diète sans acide gras, ou une diète contenant un seul type

ou un mélange des chaînes aliphatiques suivantes: 18:1 ω 9, 18:2 ω 6 et 18:3 ω 3. Après douze semaines de diète, ils ont déterminé la composition en acides gras de la PE_{SEB}, PC_{SEB}, PS_{SEB}, de la membrane photoréceptrice, du tissu adipeux, des globules rouges et du plasma de chaque groupe de rats. Ils ont remarqué que les rats dont les diètes renfermaient moins de 1% en lipide total, montraient des changements marqués dans la constitution en acides gras de leurs globules rouges, de leur tissu adipeux et de leur plasma. Par ailleurs, il existe une relation réciproque entre les acides gras ω 3 et ω 6 dans les SEB. Les groupes ayant reçu 0,85% et 1,7% de 18:2 ω 6 seulement, ont présenté une accumulation de 22:5 ω 6 qui a remplacé le 22:6 ω 3 des phospholipides de SEB. Cependant, le 22:5 ω 6 augmenta seulement lorsqu'aucune source de 18:3 ω 3 n'était disponible dans la diète. Ainsi, lorsqu'un groupe de rats est approvisionné en acides gras ω 3 et ω 6, on se rend compte que les acides ω 3 sont incorporés dans les phospholipides des SEB, jusqu'à l'exclusion presque totale des acides gras ω 6. La quantité de 22:6 ω 3 pourrait être réduite à 19% dans la PE_{SEB} de rats, mais seulement après plusieurs générations de carence en ω 3. Les données indiquent aussi qu'un supplément en 18:3 ω 3 (0,43 ou 0,85%), résulte en un enrichissement en 22:6 ω 3 des phospholipides de la membrane photoréceptrice, en comparaison avec les autres groupes.

Ces expériences démontrent donc que la composition en AGPI des phospholipides des SEB, est pratiquement indépendante de la diète. Par

conséquent, les AGPI des phospholipides des SEB doivent être très importants, pour que leur composition, différemment des autres tissus, reste pratiquement intacte sous l'effet de la diète.

B- Effet de l'environnement lipidique sur les propriétés de la rhodopsine.

Bien que de nature transmembranaire, la rhodopsine n'est, à première vue, que faiblement affectée par la solubilisation. La solubilisation complète de la membrane discale par des concentrations élevées de détergent, n'affecte que peu ou pas les propriétés spectrales ou stabilité thermique de la rhodopsine. (Applebury et coll., 1974; Shichi, 1977). Il en est toutefois autrement pour sa capacité de régénération et l'intégrité fonctionnelle de sa séquence photolytique.

a) La capacité de régénération de la rhodopsine

Dans la membrane des SEB, jusqu'à 90% de l'opsine formée après illumination peut être régénérée en rhodopsine en présence d'un excès de 11-cis rétinol. Cette capacité de régénération est atténuée dès que les SEB sont partiellement dépourvus de leurs phospholipides, ou solubilisés par un détergent. L'intégrité de la structure et de la composition de la membrane native n'est cependant pas absolument nécessaire au processus de régénération, puisqu'elle peut être réalisée dans des préparations de rhodopsine purifiée (sans phospholipide) recombinaisonnée

avec d'autres phospholipides dans des micelles obtenues par dialyse d'un détergent. C'est ainsi que la régénération de la rhodopsine a pu être réalisée à un haut degré d'efficacité (70 - 80%), aussi bien dans des micelles de phosphatidyl choline et de digalactosyl diglyceride (Hong et Hubbell, 1973) que dans des micelles formées à partir des phospholipides extraits des SEB (Shichi, 1971; Hong et Hubbell, 1973). De plus, l'efficacité de régénération est indépendante du degré d'insaturation des chaînes grasses des phospholipides.

Ces observations sont confirmées par des études réalisées sur des membranes discales de SEB traitées par la phospholipase C. Cet enzyme peut hydrolyser jusqu'à 90% des phospholipides de la membrane native. Les diglycerides formés au cours de cette réaction sont exclus de la membrane discale sous forme de gouttelettes d'huile et la membrane résiduelle consiste en agrégats bidimensionnels de rhodopsine (Olive et coll., 1978). La capacité de régénération de l'opsine de ces agrégats est diminuée de moitié par rapport à l'opsine des membranes discales natives, mais, elle peut être rétablie si les agrégats sont dispersés dans des bicouches de phospholipides (Van Breugel et coll., 1978).

En définitive, la régénération de la rhodopsine peut prendre place que lorsque la protéine est librement dispersée dans une bicouche stable ou dans des détergents formant des micelles très rigides, comme la digitonine et l'acide cholique (Shichi, 1971; Knudsen et Hubbell, 1978; McCaslin et Tanford, 1981a). On pourrait croire que cette nécessité

vient du fait qu'une libre dispersion de l'opsine dans un milieu relativement rigide prévient l'agrégation qui pourrait empêcher le 11-cis rétinale de diffuser librement vers son site. Il semble toutefois que l'ensemble des propriétés physico-chimiques des bicouches contribue à maintenir la capacité de régénération. La propriété de lier le 11-cis rétinale ne dépend pas seulement d'interactions directes entre la protéine et les phospholipides immédiatement voisins, puisqu'elle diminue dès qu'un faible pourcentage des phospholipides membranaires est enlevé. Toutefois, la méthodologie employée par Van Breugel et coll.(1978) ainsi que Stubbs et Litman(1978) ne permet pas de mesurer directement l'interaction rhodopsine-phospholipide. Il est donc difficile d'expliquer complètement la régénérabilité de l'opsine.

On n'a pas encore démontré expérimentalement l'hypothèse voulant que l'incapacité de l'opsine à se recombinaer au 11-cis rétinale, soit due à des modifications de sa structure secondaire, induites par la présence du détergent. D'autre part, dans l'acide cholique où la rhodopsine est efficacement régénérée, cette dernière existe sous des formes oligomériques (McCaslin et Tanford, 1981b). Cette observation pose la question de l'état de dispersion (d'agrégation) de la rhodopsine dans la membrane discalaire. A ce sujet, une étude récente suggère que l'unité fonctionnelle dans la membrane discalaire soit constituée d'un agrégat de rhodopsine pouvant atteindre la taille d'un dodécamère (Fatt, 1981).

b) La séquence photolytique

La séquence photolytique de la rhodopsine est influencée par l'environnement moléculaire. A notre connaissance, il n'existe pas de rapport concernant l'effet des phospholipides sur la vitesse d'apparition des premiers intermédiaires du cycle de décoloration de la rhodopsine. L'étape métarhodopsine I \rightarrow II a cependant été largement étudiée. La vitesse de cette réaction (de l'ordre de la ms) permet de l'étudier à l'aide d'une instrumentation conventionnelle. De plus, un changement conformationnel de l'opsine se produit au cours de cette étape (Liebman et coll., 1974a; Saibil et coll., 1976; Ostroy, 1977; Downer et Englander, 1977), ce qui la rend plus susceptible aux variations de l'environnement.

Dans la membrane discale, après un éclair de lumière, le temps de demi-vie de la métarhodopsine I est de 20 ms (Applebury et coll., 1974). En présence de détergent, la demi-vie de méta I diminue à moins de 1 ms dans l'Amoyx LO et l'octyl glucoside (Applebury et coll., 1974; Liebman et coll., 1981). Lorsque le détergent est enlevé par dialyse et que la préparation est exempte de phospholipides, la rhodopsine s'agrège et la réaction méta I \rightarrow II est bloquée. Le blocage de cette transition est également observé dans les membranes discales digérées par la phospholipase C (Van Breugel et coll., 1978). De la même manière que pour les processus de régénération, la transition méta I \rightarrow II réapparaît si la rhodopsine agrégée est dispersée dans une bicouche phospholipidique. Cependant, la composition en chaînes grasses des

phospholipides utilisés pour cette opération, va déterminer la vitesse de la réaction méta I \rightarrow II. C'est ainsi que la réaction sera ralentie par un facteur ~ 2 dans des micelles de DUDPC et par un facteur de plus de 150 dans des micelles de DMPC (O'Brien et coll., 1977) par rapport à la réaction dans des membranes discales. Cette observation pourrait indiquer qu'une fluidité membranaire minimale est requise pour permettre le changement conformationnel impliqué dans la transition méta I \rightarrow II.

Comme pour la régénération, la rapidité de la réaction méta I \rightarrow II ne semble pas être déterminée uniquement par la bicouche phospholipidique adjacente à la rhodopsine. En effet, Litman et coll. (1981) ont montré que l'enthalpie d'activation de la réaction méta I \rightarrow II augmentait linéairement avec la quantité de phospholipides associés à la rhodopsine, et ce, dans une gamme de rapports protéine/phospholipides supérieurs à celui nécessaire pour former une monocouche phospholipidique autour de la rhodopsine. On note qu'il est difficile d'expliquer les phénomènes observés puisque la méthodologie utilisée ne nous permet pas de mesurer directement l'interaction rhodopsine-phospholipide.

c) Conclusion

Dans la molécule de rhodopsine, la capacité de régénération et la vitesse de réaction Méta I \rightarrow II sont différemment influencées par l'environnement moléculaire. D'une façon générale, les milieux ri-

gides favorisent la régénérabilité et les milieux fluides l'atténuent: d'autre part, l'apparition de la métarhodopsine II est accélérée dans la mesure où l'environnement ne restreint pas les changements conformationnels de l'opsine. Sans doute que la membrane discale constitue un compromis entre deux états du milieu mettant en valeur deux propriétés différentes de la rhodopsine. Aucune de ces propriétés ne semble être le résultat d'interactions spécifiques entre la rhodopsine et un des autres constituants de la membrane discale. La régénérabilité et la vitesse de la séquence photolytique de la rhodopsine sont déterminés par les paramètres structuraux généraux de son environnement moléculaire.

4 - But de notre travail

Dans la section précédente, nous avons pu prendre conscience de l'unicité des phospholipides des SEB quant à leur importante insaturation. De plus, ces phospholipides pourraient jouer un rôle considérable dans le processus visuel. Ainsi, il appert essentiel d'étudier l'interaction entre la rhodopsine et ces phospholipides. Par contre, avant d'entreprendre cette étude, il faut caractériser ces phospholipides.

C'est pourquoi nous avons décidé de mettre au point une méthode pour séparer et purifier quantitativement les phospholipides des SEB. Par la suite, nous avons voulu déterminer leurs propriétés physico-chimiques, c'est-à-dire leur composition en acides gras, leur poids moléculaire, leur comportement en chromatographie sur couche mince, leur spectre d'absorption et leurs propriétés monomoléculaires. Nous pourrons ainsi poursuivre ce travail de recherche en utilisant des phospholipides bien caractérisés.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Dans ce chapitre, nous présentons la liste des produits employés et des appareils utilisés tout au long de notre recherche. Puis, nous décrivons les méthodes mises au point pour effectuer les expériences nécessaires à la caractérisation des phospholipides des SEB.

1 - Matériel

L'eau distillée utilisée pour préparer les solutions et nettoyer le matériel, provient d'un système Corning LD-2a.

On nettoie toute la verrerie avec de l'acide fluorhydrique, de l'acide sulfochromique ou du "No Chromix", selon l'emploi subséquent et le type de saleté à se débarrasser. Après ce passage à l'acide, on rince une fois à l'eau du robinet et au moins douze fois à l'eau distillée.

Par ailleurs, l'acide acétique glacial et les solvants organiques sont distillés avant leur utilisation. Par la suite, on vérifie la pureté des solvants par la méthode suggérée par Tancredi et coll., 1981.

Les produits chimiques, les solvants et le matériel sont présentés dans les deux tableaux suivants (II-1 et II-2)

Tableau II-1 Caractéristiques des produits chimiques et solvants

<u>PRODUITS CHIMIQUES</u>	<u>PROVENANCE</u>	<u>CARACTÉRISTIQUES</u>
Acide acétique glacial	Fisher Sci. Co.	Reagent 99.8%
L-acide ascorbique	Fisher Sci. Co.	Reagent grade
Acide chlorhydrique gazeux	St-Maurice Oxygène	Anhydre
Acide fluorhydrique	Fisher Sci. Co.	Reagent A.C.S.
Acide perchlorique	J.T. Baker	Analyzed Reagent
Acide silicique, n-hydrate	J.T. Baker	Analyzed Reagent
Acide sulfochromique	Fisher Sci. Co.	Reagent A.C.S.
Acide sulfurique	Fisher Sci. Co.	Reagent A.C.S.
Argon	St-Maurice Oxygène	Prépurifié
Azote	St-Maurice Oxygène	
Célite	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
Chlorure de calcium	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
Chlorure de sodium	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
DEAE-cellulose	Eastman Kodak	
Dichromate de potassium	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
Disodium ethylenediamine tetraacetate	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
2,6 Di-tert-butyl- p-crésol	BDH Chemicals	
DPaPE	Serdary Res. Co.	Synthétique
DSPC	Serdary Res. Co.	Synthétique
Ethylate de sodium	Matheson Coleman & Bell Manufacturing Chemists	Practical
Hydroxylamine HCl	Fisher Sci. Co.	Reagent A.C.S., 99.8%

<u>PRODUITS CHIMIQUES</u>	<u>PROVENANCE</u>	<u>CARACTÉRISTIQUES</u>
Iode	J.T. Baker	U.S.P.
Iodure de potassium	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
Molybdate d'ammonium	Fisher Sci. Co.	Certified A.C.S.
Molybdène métallique	Fisher Sci. Co.	100 Mesh, 99.8%
Ninhydrine	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
Nitrate de bismuth	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
No Chromix compound	Godax Laboratories	
Peroxyde d'hydrogène	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
Phosphate de sodium dibasique	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
Phosphate de sodium monobasique	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
PS	Serdary Res. Co.	Cerveau Boeuf
Sph	Serdary Res. Co.	Cerveau Boeuf
Standard P _i	Sigma	
Sucrose	J.T. Baker	Analyzed Reagent
Sulfate de sodium	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
Tartrate de potassium et d'antimoine	Fisher Sci. Co.	Reagent A.C.S., 99.8%
Trioxyde de molybdène	Fisher Sci. Co.	Certified, 100%
<u>SOLVANTS ORGANIQUES</u>	<u>PROVENANCE</u>	<u>CARACTÉRISTIQUES</u>
Chloroforme	Fisher Sci. Co.	Certified A.C.S.
Ethanol	Les Alcools de Commerce Ltée	
n-hexane	Fisher Sci. Co.	Certified, 99mol%
Méthanol	BDH Chemicals	Spécial pour spectroscopie

<u>SOLVANTS ORGANIQUES</u>	<u>PROVENANCE</u>	<u>CARACTÉRISTIQUES</u>
Méthanol	Fisher Sci. Co.	Certified A.C.S.
2-propanol	Fisher Sci. Co.	Certified, Spectranalyzed

Tableau II-2 Caractéristiques des appareils et instruments de mesure

<u>MATERIEL</u>	<u>PROVENANCE</u>	<u>CARACTÉRISTIQUES</u>
Adsorbant	Chromatographic Specialities	Chromosorb W AW, 10% p/p, SP-2330, 100-120 Mesh
Appareil à microdigestion Kjelhdal	Lab. Con. Co.	
Cellules optiques	Fisher Sci. Co.	Suprasil, 1 cm
Centrifugeuse	Sorvall	RC2-B
Chromatographe en phase gazeuse	Varian	3 700
Colonne	Chromatographic specialities	Verre, 8', i.d. 2mm, o.d. 1/4"
Cuves à développement	Desaga Heidelberg	
Electrobalance	Cahn	RG 2 000
Etuve	Blue M	
Intégrateur	Varian	CDS111
Lyophilisateur	Virtis Res. Equip.	
Plaques de CCM	Mandel Sci. Co.	Silica gel G, 250 microns, 5x20 cm
Pompe mécanique	Precision Apparatus	1×10^{-4} Torr ($1,3 \times 10^{-2}$ Pa)
Pompe à diffusion	O.H. Johns Scientific	1×10^{-6} Torr ($1,3 \times 10^{-2}$ Pa)

<u>MATÉRIEL</u>	<u>PROVENANCE</u>	<u>CARACTÉRISTIQUES</u>
Roto-évaporateur	Brinkmann Instruments Ltd	
Seringue	Hamilton	10 μ l, 100 μ l
Spectrophotomètre	Varian	Cary 17D
Spectrophotomètre	Pye Unicam	SP8-100
Système de distillation	Brinkmann Instru- ments Ltd	B-18, Quartz

2 - Méthodes expérimentales

Dans cette section, nous expliciterons les méthodes utilisées pour disséquer les yeux bovins, et ainsi en retirer les rétines dont nous isolons les segments externes des bâtonnets, pour en extraire les lipides et séparer les phospholipides suivants: phosphatidyl éthanolamine, phosphatidyl choline, et phosphatidyl sérine. En second lieu, on définira les propriétés physico-chimiques de ces phospholipides, c'est-à-dire la caractérisation de leur composition en acides gras, la détermination de leur poids moléculaire, leur comportement en chromatographie sur couche mince, leur spectre d'absorption et leur propriété monomoléculaire à l'interface air-eau.

A - Dissection des yeux bovins

Nous procédons à la dissection immédiatement après la réception des yeux bovins (Abattoir de la Mauricie, St-Louis de France). En présence de la lumière rouge atténuée ($\lambda > 620$ nm), on coupe la cornée (voir Figure 1) et on inverse le globe oculaire. Par cette manipulation, on libère la rétine que l'on excise en son point d'attache avec l'oeil, soit le nerf optique.

B - Isolation des SEB de la rétine

Nous avons adopté la méthode de Makino et coll., 1977. On procède à l'isolation sous la lueur de deux fluorescents rouges (Westinghouse, 40 W, Red tube).

Après la dissection, on immerge cent rétines dans le tampon d'isolement: tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8 contenant 1% de NaCl (P/v), 0,1 mM d'EDTA et 0,15 mM de CaCl_2 (1 ml par rétine). Puis, on procède de la façon suivante :

- Agiter vigoureusement les rétines pendant 2 minutes afin d'en détacher les SEB;
- Filtrer l'homogénat à travers quatre épaisseurs de gaze;
- Sédimenter par centrifugation (15 000 rpm pendant 30 minutes);
- Reprendre le culot de cette centrifugation dans le tampon d'isolement contenant 40% de sucrose (P/v);
- Centrifuger pendant 20 minutes à 12 000 rpm;
- Recueillir les SEB qui flottent sur la solution de sucrose (les SEB ont une densité plus faible que le sucrose);
- Laver par sédimentation dans le tampon d'isolement (30 minutes à 15 000 rpm);
- Répéter ce cycle de flottation-sédimentation jusqu'à ce que le spectre d'absorption ne laisse plus voir de bande significative à 420 nm. La présence d'une bande à cette longueur d'onde indique une contamination importante par des mitochondries;
- Laver les cellules par centrifugations avec de l'eau distillée (30 minutes à 18 000 rpm);
- Congeler les culots en scellant avec plusieurs épaisseurs de "Parafilm" et en saturant l'atmosphère avec de l'argon.

C - Extraction des lipides

Nous utilisons la méthode de Folch et coll. (1957), modifiée par Miljanich, 1978.

- 1- Remettre le culot de SEB en suspension dans de l'eau distillée;
- 2- Peser assez d'hydroxylamine 0,1 M (pH 7) afin d'obtenir un excès molaire de 100 à 1 avec le rétinol;
- 3- Brasser la suspension et centrifuger à 1 300 rpm pendant 20 minutes dans des tubes coniques en verre;
- 4- Jeter le surnageant et immerger les tubes dans de l'eau froide;
- 5- Exposer ces SEB à une lumière blanche de 60 W pendant 10 minutes;
- 6- Verser 0,5 ml de méthanol par milligramme de membrane (le méthanol contient 50 µg/ml de BHT et est saturé d'argon);
- 7- Homogénéiser la dispersion avec un Potter-Elvehjem, puis centrifuger à 1 300 rpm pendant 20 minutes;
- 8- Recueillir le surnageant dans une fiole à décantation, saturer avec de l'argon et fermer hermétiquement;
- 9- Répéter les manipulations 6 à 8, deux fois, en extrayant avec du chloroforme:méthanol (1:1) contenant 50 µg/ml de BHT et saturé d'argon;
- 10- Regrouper les surnageants et y ajouter assez de chloroforme (50 µg/ml de BHT) et de NaCl 0,9% (0,1 mM EDTA) pour atteindre un rapport en chloroforme:méthanol:eau de 8:4:3 (v:v:v). Agiter le mélange et laisser décanter;

- 11- Récupérer la phase inférieure (organique) et réextraire deux fois avec du chloroforme:méthanol (2:1, v:v);
- 12- Evaporer la majorité du solvant sous vide avec un roto-évaporateur (Ramener à la pression atmosphérique avec de l'argon) et poursuivre la dernière étape de l'évaporation par entraînement à l'argon;
- 13- Soutirer quelques microlitres de phospholipides pour analyser l'extrait total par CCM (voir section II-2-G);
- 14- Procéder immédiatement à la chromatographie sur DEAE-cellulose puisque la liaison entre le rétinol et l'hydroxylamine (rétinaloxime) semble instable (Miljanich et coll., 1979); en l'absence de ce complexe (rétinaloxime), le rétinol forme une base de Schiff avec la phosphatidyl éthanolamine et empêche leur séparation complète.

D - Séparation et purification des phospholipides des SEB

Suite à notre expérience passée (Salesse, 1979), et à la publication récente (Miljanich et coll., 1979) d'un article relatant, de façon très sommaire, la séparation des phospholipides des SEB, nous avons décidé de procéder à des chromatographies successives sur DEAE-cellulose et acide silicique.

a) Chromatographie sur DEAE-cellulose

La chromatographie sur DEAE-cellulose nous permet de séparer la PS du mélange PE, PC et Sph. Cette technique comprend les trois étapes suivantes : (i) lavage de la DEAE-cellulose et montage de la colonne, (ii)

adsorption des lipides et séquence d'élution, (iii) extraction de la PS.

i) Lavage de la DEAE-cellulose et montage de la colonne.

Les manipulations du lavage de la DEAE et du montage de la colonne se font selon la méthode de Rouser et coll., 1969.

On lave 8 grammes de DEAE-cellulose par des filtrations successives d'acide et de base. On sèche la cellulose en la lyophilisant pendant 12 heures, puis on l'entasse dans une colonne (14 cm de haut et 2 cm de diamètre).

On lave la colonne avec 100 ml de chloroforme (50 µg/ml de BHT) saturé d'argon afin d'éliminer l'oxygène de la DEAE. Après ce conditionnement, la colonne peut servir à la purification de 100 mg de lipides.

ii) Adsorption des lipides et séquence d'élution.

On solubilise les lipides dans 2 ml de chloroforme. On les adsorbe sur la cellulose et on chasse tout le solvant. Pendant toute la chromatographie, on sature les solvants d'élution avec de l'argon.

Voici la séquence d'élution de 100 mg de lipides pour un débit de 3 ml par minute:

- 200 ml de chloroforme:
cholestérol, acides gras, rétinoloxime et BHT;

- 150 ml de chloroforme:méthanol (99:1, v:v):
impuretés;
- 300 ml de chloroforme:méthanol (1:1, v:v):
PE, PC et Sph;
- 100 ml de chloroforme:acide acétique
glacial (3:1, v:v):
impuretés;
- 150 ml d'acide acétique glacial:
PS.

On débute l'évaporation des solvants organiques avec un roto-évaporateur sous atmosphère d'argon, et on termine par entraînement à l'argon. Après l'élution de chaque portion de 50 ml de chloroforme et/ou de méthanol, on vérifie la présence ou l'absence de phospholipides par chromatographie sur couche mince (pour plus de détails, voir section II-2-G). L'acide acétique glacial ne peut être évaporé comme un solvant organique, la section suivante décrit une autre méthode pour éliminer ce solvant.

iii) Extraction de la PS.

Nous utilisons la méthode d'Ansell et Spanner (1971) modifiée dans notre laboratoire.

On ajoute assez de chloroforme pour obtenir une proportion de 1 à 6 avec l'acide acétique glacial. Puis, on brasse la solution avec un volume de NaCl 0,9% égal à celui d'acide acétique

glacial. On récupère la phase organique. On réextrait deux fois la phase aqueuse avec du chloroforme, à raison de 1:10 du volume total. Puis, on évapore le chloroforme comme décrit dans le dernier paragraphe de la section précédente. On rajoute du chloroforme et on réévapore jusqu'à éliminer toute trace d'acide. Par chromatographie sur couche mince, on confirme la présence unique de phosphatidyl sérine.

b) Chromatographie sur acide silicique.

La chromatographie sur acide silicique nous permet de séparer le mélange PE et PC, alors que la Sph reste adsorbée sur la colonne.

La technique choisie comporte trois étapes: (i) le lavage de l'acide silicique, (ii) le montage de la colonne et l'adsorption des lipides, (iii) le passage des solvants, la collection et l'évaporation des fractions.

i) Lavage de l'acide silicique.

Suite à des travaux effectués dans notre laboratoire (Tancredi et coll., 1981), il semble impératif d'obtenir la désorption complète de toutes les molécules tensio-actives adsorbées sur l'acide silicique. Sans cela, on risque de contaminer fortement notre échantillon; le poids pesé avec l'électrobalance ne correspondrait pas à celui des phospholipides. Un poids erroné fausserait donc toutes les propriétés physico-chimiques mesurées, en particulier l'isotherme de pression de surface.

Voici le protocole proposé par Carreau et coll. (1969)
pour purifier l'acide silicique:

- 1- Traiter 100 g d'acide silicique pendant 30 minutes à 60-70°C par 400 ml d'éthylate de sodium à 0,2%;
- 2- Essorer et traiter pendant 30 minutes à 60-70°C par 200 ml d'acide acétique à 20% dans l'éthanol;
- 3- Filtrer;
- 4- Laver abondamment à l'éthanol;
- 5- Sécher pendant 2 heures à 100°C (activation);
- 6- Répéter les étapes 1 à 5 pour purifier 100 g de célite.
La célite empêche l'acide silicique de s'agglomérer trop fortement. Cette substance favorise un débit convenable (2 ml par minute) des solvants d'élution.

A notre avis cette méthode est la seule qui peut nettoyer quantitativement l'acide silicique.

ii) Montage de la colonne et application des phospholipides.

Afin de ne pas surcharger l'adsorbant, on doit peser un gramme d'acide silicique pour chaque portion de 5 milligrammes de phospholipides à séparer. Dans la section II-2-F, on énonce les détails concernant la méthode et les calculs pour déterminer la quantité de phospholipides dans un échantillon donné.

On place de la laine de verre dans le bas de notre colonne de 40 cm de long et de 2,0 cm de diamètre. On verse un peu de chloroforme pour la coller au verre.

On pèse la quantité d'acide silicique nécessaire, immédiatement après sa sortie de l'étuve; on y ajoute la célite à raison de la moitié du poids pesé en acide silicique. On immerge tout de suite le mélange dans du chloroforme saturé d'argon. On verse toute cette suspension dans la colonne. On laisse écouler le solvant jusqu'au lit de l'adsorbant.

Ensuite on fait passer 100 ml de chloroforme (contenant 50 $\mu\text{g/ml}$ de BHT) saturé d'argon, afin d'éliminer l'oxygène dans la colonne. Suit alors, l'application des phospholipides, dissous dans deux millilitres de chloroforme, directement sur l'acide silicique.

iii) Passage des solvants, collection et évaporation des fractions.

Comme dans le cas de la chromatographie précédente, on surmonte notre colonne d'un réservoir de 500 ml, et on sature les solvants d'élution avec de l'argon. Nous présentons ici le patron d'élution de 90 mg de phospholipides, séparés à l'aide d'une colonne de 16,5 cm de hauteur et 2 cm de diamètre contenant 18 g d'acide silicique et 9 g de célite.

- 225 ml de chloroforme:méthanol (95:5, v:v):
cholestérol;

- 50 ml de chloroforme: méthanol (9:1, v:v):
impuretés;
- 400 ml de chloroforme: méthanol (4:1, v:v):
PE;
- 200 ml de chloroforme: méthanol (3:2, v:v):
PC;

On collecte des fractions de 50 ml que l'on barbote avec de l'azote tout au long de l'élution. On évapore la majorité du solvant avec le roto-évaporateur, et la dernière partie de l'évaporation par entraînement à l'argon. On évalue qualitativement le contenu en phospholipides des différentes fractions par CCM (Voir section II-2-G).

E - Caractérisation des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

On sait que les phospholipides des SEB se distinguent par leur important contenu en acides gras polyinsaturés. Ainsi, il est essentiel de déterminer la composition en acides gras de la PE, PC et PS afin de vérifier si nos résultats corroborent ceux des études déjà publiées.

La méthode se divise en deux étapes: (a) l'hydrolyse des phospholipides et la transméthylation de leurs acides gras, (b) la programmation de l'appareil et l'injection des acides gras.

- a) L'hydrolyse des phospholipides et
la transméthylation de leurs acides gras.

- Transférer entre 500 µg et 1 mg de phospholipide dans un flacon de 5 ml;
 - Ajouter 4 ml de HCl-CH₃OH (3,5 à 5,0% d'acide chlorhydrique concentré dans du méthanol) fraîchement préparé et brasser;
- Le HCl méthanolique se prépare de la manière suivante: on barbote du HCl gazeux dans 48 ml de méthanol jusqu'à ce que le poids total ait augmenté de 2 grammes;
- Boucher hermétiquement;
 - Mettre dans une étuve à 100^oC pendant 1½ heure;
 - Retirer et laisser refroidir;
 - Transférer le contenu dans une éprouvette munie d'un bouchon dont l'intérieur est recouvert de Téflon;
 - Rincer deux fois avec de l'hexane, puis une autre fois avec 0.9 % de NaCl;
 - Pour extraire, agiter par inversion 12 fois, déboucher et laisser les phases se rétablir;
 - Pipetter l'hexane (phase supérieure) dans le même type d'éprouvette (15-20 ml);
 - Laver l'interface deux fois avec un peu d'hexane;
 - Sécher avec du Na₂SO₄ anhydre;

- Transvider dans un ballon de 25 ml;
- Evaporer avec un roto-évaporateur, reprendre trois fois avec de l'hexane;
- Pipetter dans un flacon de 1 ml;
- Evaporer à sec par entraînement à l'argon;
- Solubiliser avec 20 μ l d'hexane, agiter.

b) La programmation de l'appareil et l'injection des acides gras.

Les détails concernant le chromatographe, l'intégrateur, la colonne et l'adsorbant se trouvent dans le tableau II-2.

On programme l'intégrateur comme suit: Les 15 premières minutes après l'injection, la colonne reste à une température de 170°C. Puis, elle augmente de 2 degrés par minute jusqu'à 200°C. Ensuite, elle conservera cette température pendant 25 minutes.

L'intégrateur devra éliminer tous les pics ayant un temps de rétention moins grand que deux minutes (pic du solvant). Après l'enregistrement du chromatogramme, l'intégrateur fournit les données suivantes pour chaque pic: le temps de rétention, l'aire occupée et le pourcentage.

F - Détermination du poids moléculaire des phospholipides et de leur teneur quantitative dans un échantillon donné.

Pour obtenir une détermination précise du poids moléculaire et de la concentration d'un échantillon, on doit franchir les étapes suivantes: (a) l'obtention d'un échantillon sec, (b) la pesée des phospholipides et leur transfert quantitatif, (c) leur minéralisation et leur transvasement, (d) la préparation de la courbe d'étalonnage et (e) l'analyse quantitative des phospholipides.

a) L'obtention d'un échantillon sec.

Dans la section II-2-I-c, on expose comment atteindre ce but en utilisant une rampe à vide.

b) La pesée des phospholipides et leur transfert quantitatif.

- 1 - Peser entre 300 et 400 μg de phospholipides dans une cupule d'aluminium à l'aide d'une électrobalance, sous atmosphère d'azote;
- 2 - Déposer cette cupule au fond d'un tube Kjeldahl;
- 3 - Verser quelques ml de chloroforme et de méthanol pour solubiliser les phospholipides;
- 4 - Retirer ladite cupule et rincer abondamment avec du chloroforme: méthanol (1:1);
- 5 - Evaporer le solvant par entraînement à l'azote;
- 6 - Reprendre les manipulations de 2 à 5 en utilisant une cupule vide afin d'avoir un témoin.

c) Leur minéralisation et leur transvasement.

- 1 - Prélever exactement quatre millilitres d'une solution standard de phosphore (10 mg/100 ml) et vider dans un ballon Kjeldhal (étalon).
- 2 - Verser quatre gouttes d'acide perchlorique concentré dans chaque tube Kjeldhal, afin de minéraliser le phosphore (hydrolyse acide);
- 3 - Chauffer doucement en employant l'appareil à microdigestion Kjeldhal, jusqu'à l'apparition d'une fumée blanche; les phospholipides se noircissent tandis que l'étalon et le témoin demeurent incolores;
- 4 - Ajouter deux gouttes de peroxyde d'hydrogène, 30%; les solutions redeviennent claires;
- 5 - Rincer cinq fois tous les ballons avec de l'eau distillée;
- 6 - Transvaser la solution étalon dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter au trait de jauge (Solution A);
- 7 - Transvider les eaux de rinçage de tous les autres tubes Kjeldhal dans leur propre ballon jaugé de 50 ml, ajouter 10 ml de solution colorante (voir (d) de la présente section) et remplir jusqu'au trait de jauge.

d) La préparation de la courbe d'étalonnage.

Suivant la méthode de l'"American Society for Testing and Materials" (1977), on doit faire une solution Mère qui servira à préparer une solution colorante utilisée pour déterminer la concentration en P_i des phospholipides par le biais d'une courbe d'étalonnage. Il faut procéder de la façon suivante pour faire la solution Mère et la solution colorante:

Solution Mère

- peser 0,13 g de tartrate de potassium et d'antimoine et 5,6 g de molybdate d'ammonium
- dissoudre dans 700 ml d'eau distillée;
- ajouter 70 ml de H_2SO_4 concentré en brassant;
- refroidir et diluer à 1 litre.

Solution colorante

Solubiliser 0,5 g d'acide ascorbique dans 100 ml de solution Mère. Préalablement aux mesures d'absorbance présentées dans le tableau qui suit, il est nécessaire d'observer les conditions expérimentales dans la préparation des diverses solutions. Les étapes sont les suivantes:

Pipetter le volume requis de solution A (étalon) diluer jusqu'à 50 ml, verser dans un Erlenmeyer, transvider 10 ml de la solution colorante. Au moins dix minutes plus tard et au plus trente minutes, mesurer l'absorbance à 880 nm dans une cellule de 1 cm en employant un spectrophotomètre Cary

17D. L'ajustement de l'absorbance au zéro est fait en utilisant le témoin.

TUBE #	Sol. A (ml)	Solution colorante (ml)	H ₂ O (ml)	µg de P _i	Dilution	Conc. (·10 ⁻⁵ M)	Absorbance
1	2	10	48	8	1/30	0,43	0,10
2	4	10	46	16	1/15	0,86	0,20
3	6	10	44	24	1/10	1,3	0,30
4	8	10	42	32	2/15	1,7	0,40
5	10	10	40	40	1/6	2,2	0,50
6	12	10	38	48	1/5	2,6	0,60
Témoin	-	10	40	-	-	-	0,00

e) L'analyse quantitative des phospholipides.

i) Détermination du poids moléculaire.

Suite à la lecture de l'absorbance des solutions étalons, on mesure ensuite celle de chacune des solutions de phospholipides. Puis on interpole ces données sur la courbe d'étalonnage pour en déduire les concentrations correspondantes en phosphore.

Le poids moléculaire (M) de chaque phospholipide est déterminé par la relation suivante:

$$M = \frac{\text{poids sec phl (g)}}{\text{concentration } P_i \text{ des phl (mol } \ell^{-1})} \cdot \frac{1}{\text{Volume } P_i \text{ des phl (}\ell)}$$

ii) Estimation de la quantité de phospholipides dans un échantillon donné.

On sait que lors d'une chromatographie sur acide silicique, il est essentiel de connaître précisément la quantité de phospholipides à séparer afin d'éviter de surcharger la colonne.

Dans ce but, nous décrivons ci-dessous la façon d'exécuter le transfert quantitatif des phospholipides, par contre les différentes étapes de minéralisation et de transvasement (voir II-2-F-c), de même que la préparation de la courbe d'étalonnage (II-2-F-d), resteront les mêmes.

- Transfert quantitatif des phospholipides.

Après la chromatographie, on rassemble toutes les fractions de même contenu et on évapore jusqu'à 2 ml. On en soustre 10 μ l que l'on transfère dans un ballon Kjeldhal. On rince les parois avec du chloroforme et on évapore à sec.

Suite à la minéralisation, au transvasement et à la préparation de la courbe d'étalonnage, on interpole les absorbances mesurées comme dans le cas de la détermination du poids moléculaire. Puis, on estime la quantité de phospholipides (g) dans un échantillon donné par la relation suivante:

$$\text{Concentration Pi phl (mol l}^{-1}\text{)} \cdot \text{Volume Pi phl (l)} \cdot \frac{\text{Volume total phl (ml)} \cdot M(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})}{\text{Volume phl prélevé (ml)}}$$

G - Comportement des phospholipides en chromatographie
sur couche mince.

Nous employons la méthode de chromatographie sur couche mince pour déterminer la reproductibilité de la composition en lipides des SEB, pour suivre l'élution d'un phospholipide lors d'une chromatographie sur colonne et pour caractériser la qualité de la séparation. Par le terme qualité, nous définissons un terme relatif à la présence d'une seule espèce lipidique ce qui exclut la présence de produits d'oxydation. Cette technique nous permet d'identifier les différents phospholipides grâce à la valeur du R_f . Cette valeur représente le rapport entre la longueur de migration du produit et celle du solvant sur une plaque de chromatographie.

Les manipulations comportent deux étapes: (a) la saturation de la cuve à développement et l'application des phospholipides sur une plaque de chromatographie, (b) la migration et la révélation de la plaque.

- a) La saturation de la cuve à développement
et l'application des phospholipides.

Quelques heures avant la chromatographie, on fixe des papiers filtres le long des parois de la cuve en laissant baigner leur portion inférieure dans le solvant. Cette procédure accélère la saturation. Suite à l'évaporation d'une fraction provenant de la chromatographie sur colonne, on solubilise les phospholipides dans un ml de chloroforme dont on extrait 10 μ l pour dépôt sur la plaque.

- b) La migration et la révélation.

Pour s'assurer de l'identité d'un phospholipide, la migration doit se faire sur la plus grande distance possible sans atteindre l'extrémité du gel. De plus, on vérifie les propriétés de migration (R_f) en employant différents solvants. Dans notre cas, on tire parti des deux systèmes suivants:

- (α) chloroforme:méthanol:eau (65:25:4, v:v:v)
- (β) chloroforme:méthanol:acide acétique glacial:eau
(25:15:4:2, v:v:v:v).

La PE, la PC, la Sph et le cholestérol se déplacent de manière relativement semblable, d'un système à l'autre. Par contre, avec le système (α), la PS forme une traînée qui empêche de repérer adéquatement sa présence et celle des autres phospholipides. Cependant, dans le système (β), la PS se délimite en une seule tache bien définie.

Voici la liste des substances révélatrices utilisées et leurs caractéristiques :

- Réactif de Dittmer et Lester (1964), modifié par Ryu et Mac Coss, 1979. Il colore les phospholipides (phosphate) en bleu. En chauffant la plaque, il hydrolyse tous les lipides;
- $K_2Cr_2O_7$, 0,6 % dans H_2SO_4 , 55%. Il hydrolyse tous les lipides après chauffage;
- Réactif de Dragendorff (Skidmore et Entenman, 1962). Il colore les groupements choline en orange (PC);

- Ninhydrine, 0,2 % dans l'acétone. Sensible aux groupes amine libre (PE, PS);
- Vapeurs d'iode (Skidmore et Entenman, 1962). Détecte la plupart des lipides.

H - La spectroscopie d'absorption des phospholipides.

La spectroscopie d'absorption a été utilisée préalablement pour caractériser la formation de produits d'oxydation des phospholipides (Lea, 1955; Klein, 1970; Farnsworth et Dratz, 1976).

En 1977, Geurts Van Kessel et coll. ont présenté le spectre d'absorption de quelques phospholipides (dioléoyl phosphatidyl éthanolamine, dioléoyl phosphatidyl choline et dipalmitoyl phosphatidyl choline). Ils utilisent un mélange de n-hexane:2-propanol:eau (6:8:1, v:v:v) comme solvant. En examinant soigneusement les spectres, on note que les phospholipides commencent à absorber à partir de 220 nm. De plus, à 200 nm l'absorption diminue abruptement jusqu'à absorbance nulle. Ce résultat ne peut être qu'un effet de solvant, c'est-à-dire que ce solvant absorbe toute l'énergie de la lampe à 200 nm. On corrobore cette interprétation en enregistrant le spectre du solvant avec le spectrophotomètre Cary 17D. Pour travailler dans cette région spectrale, on a fait les manipulations suivantes: on augmente la sensibilité du photomultiplicateur et on diminue la vitesse de déroulement des longueurs d'onde. Ensuite, on vérifie la réponse du spectrophotomètre en prenant le spectre d'absorption de l'air et des cellules optiques de parcours de 1 cm entre 300 et 186 nm.

Dans les deux cas, on obtient une ligne de base horizontale.

On sait que les phospholipides des SEB absorbent à partir de 220 nm. De plus, nous voulons déterminer le coefficient d'extinction de ces phospholipides à 200 nm. Nous avons donc besoin d'un solvant qui n'absorbe pas dans cette région et qui solubilise tous les phospholipides.

Nous avons donc décidé d'utiliser le méthanol pour mesurer les spectres d'absorption de la PE et la PC que nous avons séparé lors de la première chromatographie. Par contre, le méthanol n'a pas dissout la PE, la PC ou la PS provenant de la seconde chromatographie. Donc nous avons opté pour le n-hexane.

Nous décrivons maintenant la méthodologie utilisée pour préparer les solutions et pour mesurer le coefficient d'extinction des phospholipides à 200 nm.

On pèse au moins trois fois un poids sec de phospholipide avec une électrobalance, sous atmosphère d'azote. Chaque pesée, après dissolution dans 4 ml de solvant, sert de solution mère. Suite aux dilutions précises, on obtient des solutions dont on prend le spectre d'absorption. Le tableau suivant décrit, de façon typique, la préparation des solutions et l'absorbance correspondante :

Poids pesé (μg)	Dilution	Volume final (ml)	Concentration ($\cdot 10^{-5}\text{M}$)	Absorbance à 200 nm
114		4		
	1/3	3	1,58	0,485
	1/4	4	1,19	0,310
383		4		
	1/8	4	1,50	0,605
	1/5	5	2,39	1,000

Poids pesé (μg)	Dilution	Volume final (ml)	Concentration ($\cdot 10^{-5}\text{M}$)	Absorbance à 200 nm
346	1/4	4	2,99	1,240
	1/3	3	3,99	1,600
		4		
	1/8	4	1,35	0,380
	1/6	3	1,80	0,740
	1/4	4	2,7	1,100
	1/3	3	3,61	1,460

Ensuite, on trace le graphique de l'absorbance à 200 nm en fonction de la concentration. Si la courbe présente une relation linéaire passant par l'origine, on peut en déduire que l'absorbance ne provient que des phospholipides. La relation suivante donne la pente de cette courbe, c'est-à-dire le coefficient d'extinction à 200 nm dans une cellule de 1 cm:

$$A = \epsilon b c$$

$$\epsilon = \frac{A}{b \cdot c} = \frac{\ell}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$$

A = absorbance
 ϵ = coefficient d'extinction
 ($\ell \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
 b = parcours optique
 (1 cm)
 c = concentration
 ($\text{mol } \ell^{-1}$)

I - Propriétés monomoléculaires des phospholipides à l'interface air-eau.

Par la technique des monocouches, nous allons caractériser les phospholipides des SEB. A chaque phospholipide correspond un isotherme de pression et de potentiel de surface à partir desquels nous déterminons une aire limite et un collapse bien précis.

Dans notre étude, nous mettons à profit deux bains de Langmuir différents; l'un pour les phospholipides synthétiques et l'autre pour

les phospholipides des SEB. Le premier est très bien décrit dans la thèse de C.N. Kossi (1975) et respectivement, le second est présenté dans un article récent (Dijkmans et coll., 1981). Pour plus de détails techniques, on peut consulter le travail de G. Munger (1979).

Pour mesurer un isotherme de pression et de potentiel de surface, on doit choisir un solvant d'étalement, une sous-phase et une interface adéquats. Puis, en comprimant les molécules, on acquiert les données nécessaires pour porter en graphique la pression ou le potentiel de surface en fonction de l'aire moléculaire.

a) Choix du solvant d'étalement, de la sous-phase et de l'interface.

i) Le solvant d'étalement.

Un solvant d'étalement doit posséder les propriétés suivantes (Gaines, 1966): solubiliser les phospholipides, être volatile et peu soluble dans l'eau (sous-phase). Plusieurs auteurs ont étudié l'effet du solvant d'étalement sur la monocouche de DPaL. Munden et Swarbrick (1973a) ont remarqué que les variations des isothermes peuvent être reliés à la solubilité du solvant d'étalement dans la sous-phase. Ils ont noté que plus on augmente la proportion d'hexane dans le solvant d'étalement, plus on retient le DPaL à la surface. Par contre, lorsque le solvant d'étalement comprend une grande proportion de méthanol ou d'éthanol, il y a une perte significative de DPaL dans la sous-phase. L'étude de Cadenhead et coll. (1974) réitère ces conclusions. Cadenhead et Kellner (1974) ont déterminé que l'hexane:éthanol (9:1, v:v) était le solvant d'étalement ayant le moins d'effet sur l'isotherme du DPaL. Ils basent leur conclusion sur l'étude de l'isotherme de

pression et de potentiel de surface du DPAL en fonction du solvant d'étalement. De plus, en Annexe I, on a fait la compilation de tous les articles où les propriétés monomoléculaires des phospholipides ont été étudiées. A partir de l'Annexe I, on a compilé la fréquence d'utilisation des solvants d'étalement dans le Tableau II-3. En examinant ce tableau, on se rend compte que les deux solvants les plus employés sont les suivants: hexane:éthanol (54) et chloroforme (36). Par contre, la solubilité du chloroforme dans l'eau complique son utilisation (Cadenhead et Kellner, 1974). On a donc décidé d'étaler les phospholipides avec l'hexane:éthanol (9:1, v:v).

ii) La sous-phase

La majorité (2/3) des auteurs répertoriés en Annexe I, utilisent une sous-phase de NaCl (0,1M) (68) ou d'eau pure (52) de pH 5,6-6,0. De plus, nous avons déterminé, dans notre laboratoire, qu'il n'y avait aucune différence significative, entre l'isotherme de pression de surface de la PE des SEB mesuré avec les deux sous-phases suivantes: tampon phosphate (10^{-3} M, pH 7,1) et NaCl (0,1 M, pH 5,6). Toutes les propriétés monomoléculaires ont donc été déterminées avec une sous-phase contenant 0,1 M en NaCl.

iii) L'interface

Dans le cas des phospholipides synthétiques (DSPC), nous avons travaillé à l'interface air-eau. Par contre, pour les phospholipides des SEB, nous avons remplacé l'air par l'argon pour éliminer toute possibilité d'oxydation.

Tableau II-3 Fréquence d'utilisation des solvants d'étalement

Année	H	H:E	H:C H:E:C H:M:C	C	C:M	C:E	B	B:C B:E B:P B:C:M	ET	ET:E ET:C ET:P	F F:E	Cc Cc:C	E E:H M M:H	Autre	# total d'articles (cf. annexe I)
1981	1	3		4	1	2		1		2				1	12
1980	5	8		2	5			1		1		1		1	22
1979	2	6	3	3	2		2	2		2				1	22
1978	2	5		6	2			1							16
1977	1	5		4	1	1			1		1				11
1976		2			1	1					1				6
1975		4		2	1				1	1					10
1974	1	4		2	2		1				3		5	2	6
1973	2	4		5	4		1	1		1			2		18
1972	1	1		2	1		1	1							7
1971	2	1		2			1	1							6
1970		1		1				1				1			6
1969	1	3	1	1		1	2			1		1			9
1968		4				1	1		1	3			2		10
1967		2	5	1	1	2	1		1	2					15
1966						1	1		1	1					5
1965		1		1				1		1					3
1962									1						2
1955								1							1
<u>TOTAL</u>	<u>18</u>	<u>54</u>	<u>9</u>	<u>36</u>	<u>21</u>	<u>9</u>	<u>11</u>	<u>11</u>	<u>6</u>	<u>15</u>	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>9</u>	<u>5</u>	<u>187</u>

B : Benzène
 C : Chloroforme
 Cc : Tétrachlorure de carbone
 E : Ethanol
 ET : Ether de pétrole

F : Fréon, fréon TC, TE, TF et TMC
 H : Hexane
 M : Méthanol
 P : Propanol

- b) Compression des molécules, acquisition des données et calcul des résultats

Nous comprimons les molécules de façon régulière et continue (vitesse de compression $35 \text{ sec} \cdot \text{cm}^{-1}$), en déplaçant la barrière mobile à une température de $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Au cours de ce déplacement on note la distance parcourue et l'angle du fil de torsion. Ainsi, on obtient un tableau de données présentées sous la forme suivante.

Angle (degré)	Distance (cm)
1,5	12,0
5,0	11,5
13,0	11,0
15,5	10,8
19,5	10,6
24,5	10,4
29,0	10,2
35,0	10,0
45,0	9,8
68,0	9,5
98,0	9,0
125,0	8,6

En utilisant ces résultats, on peut calculer l'aire moléculaire et la pression grâce aux relations suivantes:

$$\text{Aire moléculaire} = \frac{\text{Longueur (distance, cm)} \cdot \text{Largeur (14,7 cm)}}{\text{nombre de molécules}} \cdot \frac{10^{16} \text{ } \overset{\circ}{\text{A}}^2}{\text{cm}^2}$$

Pression = Angle \cdot sensibilité (déterminée lors de l'étalonnage du bain, voir Munger, 1979).

Puis on trace l'isotherme de pression de surface en se basant sur les résultats du tableau suivant:

Pression (mN m^{-1})	Aire moléculaire ($\text{Å}^2 \text{ molécule}^{-1}$)
0,5	58,8
1,7	56,4
4,3	54,0
5,2	53,0
6,5	52,0
8,1	51,0
9,6	50,0
11,6	49,0
15,0	48,0
22,6	46,7
32,5	44,0
41,5	42,2

c) Séchage et entreposage des phospholipides

La rampe à vide sert à atteindre un vide poussé de l'ordre de 10^{-6} Torr ou $1,3 \times 10^{-4}$ Pa. Ce vide est nécessaire pour pouvoir obtenir un échantillon de phospholipide sec ainsi que de pouvoir sceller l'échantillon sous-vide. Le séchage de l'échantillon est fait en évaporant en premier lieu le solvant par entraînement à l'argon, puis on termine l'évaporation en laissant dégazer l'échantillon pendant au moins huit heures sur la rampe à vide. Ensuite on procède au scellage sous-vide de l'échantillon.

III- RESULTATS ET DISCUSSION

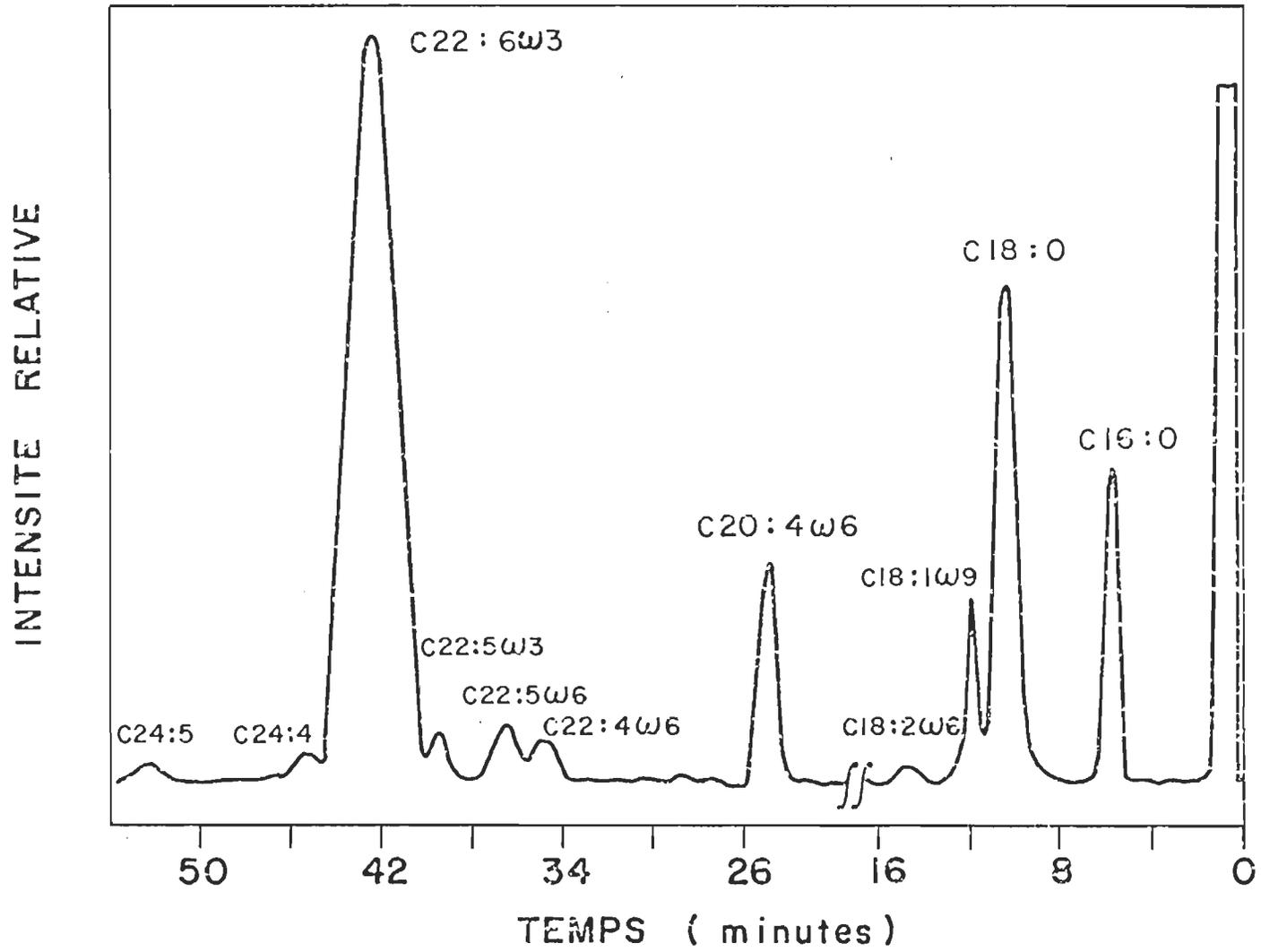
Dans ce chapitre, nous présentons les résultats expérimentaux des propriétés physico-chimiques des phospholipides des SEB, pour trois purifications différentes. Il est important de noter que nous n'avons pas obtenu de PS lors de la première purification. De plus, préalablement à la présentation des résultats, il faut signaler le peu de mesures expérimentales reproductibles en ce qui a trait aux propriétés physico-chimiques de la PC_{SEB} . On l'explique par les difficultés techniques rencontrées lors de la purification de ce phospholipide. Etant donné que la PC_{SEB} est le dernier phospholipide élué lors de la seconde chromatographie, il est très probable qu'une certaine portion reste adsorbée plus fortement au gel. Si on augmente la polarité du solvant d'éluion, on risque de la contaminer avec la sphingomyéline. Des études ultérieures devront être entreprises pour obtenir une reproductibilité des résultats.

1 - Caractérisation des acides gras

Dans la figure III-1, on reproduit un chromatogramme en phase gazeuse de la PE_{SEB} . Cet exemple montre la position et la proportion relatives des acides gras retrouvés dans les phospholipides des SEB. Ainsi, on remarque la principale composante, le 22:6 ω 3, à 42,2 minutes.

Dans le tableau III-1, on a répertorié les analyses du contenu en acides gras des lipides des SEB bovins publiés ces quinze dernières années. Plus de la moitié des acides gras sont polyinsaturés et l'acide

FIGURE III - 1



CHROMATOGRAMME EN PHASE GAZEUSE DE LA PE_{SEB}

TABLEAU III - 1

Composition en acides gras des segments externes des bâtonnets.

Acide gras	Purification				Drenthe et coll. (1981)	Stone et coll. (1979)	Hendricks et coll. (1976)	Dreyfus et coll. (1974)	Borggreven et coll. (1970)	Nielsen et coll. (1970)	Poincelot et Abrahamson (1970)
	G *	1**	2**	3**							
14:0 - 15:0	—	—	—	—	—	0,9	—	0,2	—	1,0	—
16:0	12,4	19,3	17,1	21,5	16,9	13,7	13,0	13,7	19,4	10,8	18,6
18:0	21,0	22,8	21,9	24,2	20,8	18,8	19,3	22,8	23,1	16,2	23,5
18:1 ω 9	2,5	10,6	7,2	0,6	3,1	4,4	3,2	3,5	6,4	4,0	7,6
18:2 ω 6	0,5	0,5	0,2	0,9	<0,1	0,4	0,7	1,3	1,4	1,0	0,8
20:4 ω 6	3,7	7,1	6,4	3,6	4,8	3,6	5,4	4,0	6,0	8,5	7,0
22:4 ω 6	1,1	2,4	2,1	1,7	1,8	0,9	} 8,2	—	1,5	7,2	—
22:5 ω 6	1,3	2,3	2,2	1,3	2,5	0,6		} 0,7	} 1,2	—	—
22:5 ω 3	2,0	1,5	1,8	1,5	2,1	1,5	48,2			40,9	34,3
22:6 ω 3	49,5	27,7	36,0	34,3	46,7	50,7	—	—	—	—	—
24:4	0,7	5,0	4,0	2,9	1,4	0,2	—	—	—	—	—
24:5	2,8	0,85	1,6	1,5	1,4	2,9	—	—	—	—	—
% Total AGPI	61,6	47,4	54,3	47,7	59,3	60,8	62,5	46,9	44,4	53,5	28,4

* SEB purifiés par gradient continu

** SEB purifiés par flottation sur sucrose

gras le plus abondant est l'acide docosahexaénoïque (22:6 ω 3). L'analyse du tableau III-1 révèle une grande dispersion des données, notamment en ce qui a trait au 22:6 ω 3. Cette variation trouve son origine dans trois sources: a) l'emploi ou non d'antioxydants (Farnsworth et Dratz, 1976), b) la variation des spécimens du cheptel (Stone et coll., 1979), c) et surtout la variation des méthodes utilisées pour purifier les SEB. En effet, des segments externes de pureté apparemment équivalente, du moins à en juger par leurs spectres d'absorption entre 250 et 700 nm, montrent des variations de 100% dans la proportion de 22:6 ω 3, selon qu'ils ont été purifiés par flottation sur sucrose (voir section II-2-B) ou par centrifugation sur gradient continu (voir tableau III-1). La méthode de Stone et coll. (1979) est utilisée pour purifier les SEB par gradient continu, avec la seule différence que nous procédons à une flottation sur sucrose avant le gradient continu.

Le poids % des acides gras de la PE_{SEB}, PC_{SEB} et PS_{SEB} sont présentés respectivement, dans les tableaux III-2, III-3 et III-4. Dans chaque tableau, on a inséré les valeurs obtenues pour chaque purification et celles de la littérature. Ainsi, de façon générale, ces tableaux montrent que la PE_{SEB}, PC_{SEB} et PS_{SEB} comprennent un pourcentage très élevé d'acides gras polyinsaturés. On constate aussi que la PE_{SEB} et la PS_{SEB} sont plus insaturés que la PC_{SEB}. L'acide docosahexaénoïque comporte le plus important pourcentage parmi les acides gras de chaque phospholipide. De plus, on distingue la PS_{SEB} par sa teneur substantielle en 24:4 et 24:5.

En examinant ces tableaux de plus près, on prend conscience de la reproductibilité des résultats de nos purifications de la PE_{SEB} et PS_{SEB}.

TABLEAU. III - 2

Composition en acides gras de la PE_{SEB}

Acide gras	Purification			Drenthe et coll. (1961)	Miljanich et coll. (1979)	Anderson et coll. (1975)	Anderson et Sperling (1971)	Anderson et Maude (1970)	Poincelot et Abrahamson (1970)
	1	2	3						
16:0	8,1	10,1	9,2	10,7	12,3	13,4	11,2	8,8	15,3
18:0	24,0	25,5	24,4	23,5	25,2	27,8	24,9	20,7	19,4
18:1 ω 9	4,8	4,3	4,6	3,9	3,0	4,3	5,7	5,7	6,4
18:2 ω 6	1,99	0,96	0,9	0,8	0,5	0,8	0,5	2,1	1,0
20:4 ω 6	7,4	5,5	6,2	2,4	2,7	3,0	6,5	5,1	9,4
22:4 ω 6	3,2	2,3	2,1	0,9	0,8	1,6	2,9	3,8	—
22:5 ω 6	2,1	2,99	1,8	1,6	0,7	4,7	5,2	6,2	—
22:5 ω 3	2,8	1,9	2,3	1,5	1,2	0,7	0,4		—
22:6 ω 3	43,8	45,6	46,6	54,5	51,4	43,1	41,8	34,5	29,3
24:4	1,1	0,3	0,23	<0,1	T	—	—	1,7	—
24:5	0,7	0,5	0,66	<0,1	0,4	—	—		—
% Total AGPI	63,1	60,1	60,8	61,7	57,7	53,9	57,3	53,4	39,7

TABLEAU III - 3

Composition en acides gras de la PC_{SEB}

Acide gras	Purification			Drenthe et coll. (1981)	Miljanich et coll. (1979)	Anderson et coll. (1975)	Anderson et Sperling (1971)	Anderson et Maude (1970)	Poincelot et Abrahamson (1970)
	1	2	3						
16:0	46,7	26,1	36,6	26,8	30,1	32,2	30,6	29,1	26,2
18:0	28,2	18,8	17,9	18,8	15,6	21,4	17,3	17,7	22,7
18:1 ω 9	18,7	8,1	13,8	4,3	5,5	4,6	11,0	10,6	8,9
18:2 ω 6	0,6	0,7	0,6	0,9	0,4	0,7	0,9	1,8	0,9
20:4 ω 6	0,7	5,6	3,6	2,8	2,7	3,7	5,9	4,6	8,2
22:4 ω 6	0,6	1,3	0,9	0,5	0,5	1,5	1,8	1,3	—
22:5 ω 6	0,8	1,8	0,8	1,0	0,3	3,6	2,8	2,3	—
22:5 ω 3	0,5	1,3	1,2	1,6	1,2	0,5	0,7		—
22:6 ω 3	3,2	35,4	24,4	40,2	39,3	29,8	26,3	23,8	16,6
24:4	—	0,8	0,22	<0,1	0,7	—	—	T	—
24:5	—	1,2	—	<0,1	1,2	—	—	T	—
% Total AGPI	6,4	48,1	31,7	47,0	46,3	39,8	38,4	33,8	25,7

TABLEAU III - 4

Composition en acides gras de la PS_{SEB}

Acide gras	Purification		Drenthe et coll. (1981)	Miljanich et coll. (1979)	Anderson et coll. (1975)	Anderson et Sperling (1971)	Anderson et Maude (1970)	Poincelot et Abrahamson (1970)
	1	2						
16:0	0,5	0,8	3,3	3,8	1,1	3,2	2,7	11,8
18:0	23,7	25,9	18,7	24,9	18,1	26,1	17,6	14,3
18:1 ω 9	2,3	7,3	1,3	2,1	0,9	4,1	4,9	8,5
18:2 ω 6	<0,1	<0,1	<0,1	T	0,2	0,5	1,7	1,2
20:4 ω 6	1,5	1,3	4,1	5,1	0,9	1,0	3,0	4,7
22:4 ω 6	5,2	3,5	3,1	2,0	0,2	5,2	7,3	—
22:5 ω 6	3,4	2,2	1,7	0,3	6,0	2,4	6,0	—
22:5 ω 3	2,5	2,8	3,4	3,0	2,0	—		—
22:6 ω 3	45,8	44,9	49,5	45,0	48,1	47,3	33,7	16,8
24:4	7,6	3,9	4,4	3,1	10,1	10,2	11,9	—
24:5	7,6	7,6	10,5	9,7	5,2	—		—
% Total AGPI	73,6	66,2	76,7	68,2	72,7	66,6	63,6	22,7

De plus, ces mesures se comparent avantageusement à celles de la littérature citée. Par contre, les trois purifications de la PC_{SEB} ne s'avèrent pas homogènes. Cependant, nous ne pouvons tenir compte des données de la première purification, puisque nous avons remarqué la présence de produits d'oxydation par chromatographie sur couche mince et spectroscopie d'absorption (voir III-C et III-D). Par ailleurs, on discerne une différence significative (11%) entre le pourcentage de 22:6 ω 3 retrouvé dans la deuxième et la troisième purification de la PC_{SEB}. En outre, les purifications des deux autres phospholipides donnent des résultats reproductibles. Alors la seule explication logique concerne la chromatographie sur acide silicique. Lors de cette séparation, on élue la PC_{SEB} en dernier lieu. Il apparaît donc probable qu'une élution incomplète soit la cause de cet écart. Néanmoins, les données de ces deux dernières purifications se rapprochent de celles de la littérature.

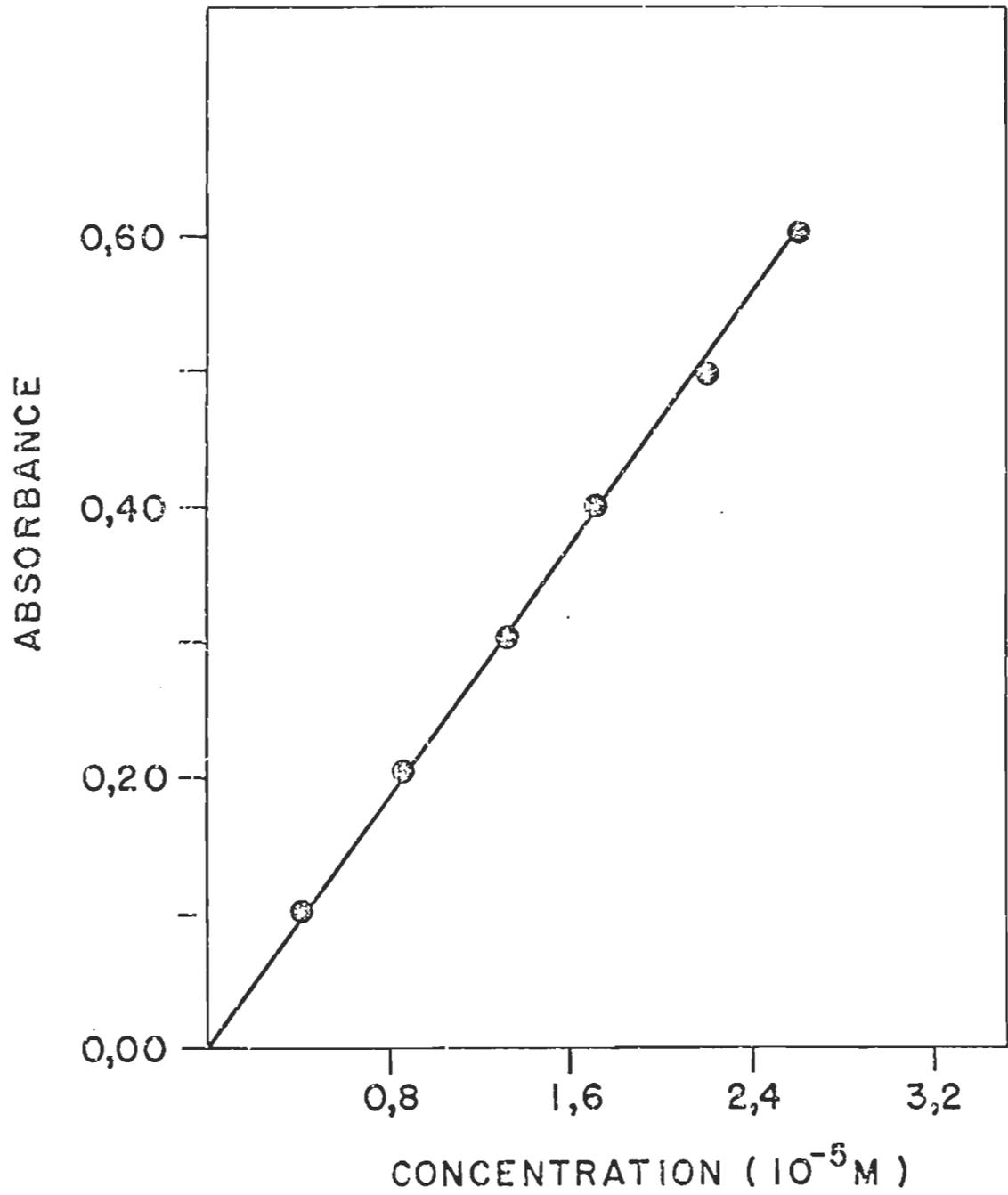
De plus, il est nécessaire de signaler que tous les auteurs mentionnés dans les tableaux III-2, III-3 et III-4, ont déterminé les acides gras des phospholipides des SEB, après avoir purifié ces phospholipides par chromatographie sur couche mince. Ainsi, malgré la grande différence entre nos méthodes de purification (voir chapitre II-2) il est possible d'obtenir des résultats comparables. Finalement, afin d'uniformiser les unités, il faut noter que les données en mole % des auteurs suivants, ont été transformées en poids % : Anderson et Maude (1970), Anderson et Sperling (1971), Anderson et coll. (1975) et Drenthe et coll. (1981).

2 - Détermination du poids moléculaire

Jusqu'à maintenant, aucune mesure expérimentale n'a été répertoriée concernant la détermination du poids moléculaire des phospholipides. Par contre, dans la littérature, on retrouve plusieurs approximations du poids moléculaire des phospholipides des SEB: 775 g (Hendricks et coll., 1976), 800 g (Daemen, 1973) et 840 g (Miljanich, 1978). Par conséquent, nous avons voulu établir une valeur expérimentale du poids moléculaire de la PE, PC et PS des SEB.

La figure III-2 montre la courbe d'étalonnage du phosphore inorganique. Il importe de souligner l'excellente reproductibilité de cette droite. Par la suite, nous avons vérifié la fiabilité de la méthode nous permettant de déterminer le poids moléculaire. Dans ce but, nous avons commencé par caractériser le poids moléculaire d'un phospholipide synthétique, la DPaPE. Nous présentons ces résultats dans le tableau III-5. La valeur moyenne obtenue de 708 ± 15 g est comparable à celle du poids moléculaire calculé (692 g). Nous avons donc décidé de poursuivre avec les phospholipides des SEB. Dans le tableau III-5, on montre les résultats suivants: les déterminations du poids moléculaire de chaque phospholipide pour chaque purification, la valeur moyenne pour chaque phospholipide et le poids moléculaire calculé en tenant compte de la contribution de chaque acide gras (nous avons utilisé la composition en acides gras de Miljanich et coll., 1979). La valeur moyenne de la PE_{SEB} est 966 ± 157 g. Par contre, si on néglige la donnée la plus élevée (1 400 g), on réduit l'écart-type de moitié (922 ± 80 g) et on se rapproche du poids

FIGURE III - 2



COURBE D'ETALONNAGE DU P_i

TABLEAU III - 5

Détermination du poids moléculaire

Phospholipide	Purification	M (g)						< M(g)>	M(g) calculé
DPPE _q		693	689	731	703	716	715	708	692
PE _{SEB}	1	963	902	849	863	856		966	793
	2	1026	1400	1105					
	3	870	893	894					
PC _{SEB}	1	979	976	986				981	813
	2	1014	977	827					
	3	1003	959	1230	863				
PS _{SEB}	1	941						1042	873
	2	1022	1069	1135					

moléculaire calculé, c'est-à-dire 793 g. Dans le cas de la PC_{SEB} , le poids moléculaire moyen équivaut à 981 ± 101 g en comparaison à 813 g (M calculé). En comparant les poids moléculaires des trois purifications de la PC_{SEB} , on se rend compte que la présence de produits d'oxydation détectée lors de la première purification, ne semble pas affecter la valeur du poids moléculaire. Par ailleurs, le poids moléculaire moyen de la PS_{SEB} est de $1\ 042 \pm 71$ g alors que le M calculé égale 873 g.

3 - Comportement en chromatographie sur couche mince

Le tableau III-6 présente les valeurs de R_f pour nos mesures et celles de la littérature, dans deux solvants de migration différents. En examinant ce tableau, on note que les phospholipides des SEB migrent plus rapidement (R_f plus grand) que les phospholipides de référence (DPaPE, DSPC et PS du cerveau de boeuf). De plus, on remarque que les R_f des phospholipides de référence correspondent à ceux de la littérature citée, excepté le cas de la DPaPE dans le solvant de migration II; c'est le R_f de la PE_{SEB} qui équivaut à celui mentionné par Tamai et coll. (1971). Les figures III-3, III-4 et III-5 représentent respectivement, les chromatogrammes de la PE_{SEB} (DPaPE), PC_{SEB} (DSPC) et PS_{SEB} (PS du cerveau de boeuf) dans les deux solvants de migration définis dans le tableau III-6. A la figure III-3, on se rend compte que la PE_{SEB} semble vouloir se séparer en deux éléments distincts. De la même façon, en figure III-4, la PC_{SEB} s'est dissociée en trois composantes. Par ailleurs, la PS_{SEB} (figure III-5) a migré en une seule portion. Miljanich et coll. (1979) ont accentué ce phénomène en optimisant les conditions expérimentales (Tableau III-6). Ainsi, ils ont séparé la PE_{SEB} , PC_{SEB} et PS_{SEB} en 3, 5 et 2 taches, respectivement. Après l'analyse des acides gras de chacune des taches, ils ont établi que, par exemple, la PC_{SEB} ayant migré le plus rapidement, contenait presque exclusivement des acides gras polyinsaturés, alors que la composante la plus lente était constituée majoritairement d'acides gras saturés. Du reste, les taches de vitesse intermédiaire comprenaient des quantités à peu près égales d'acides gras saturés et polyinsaturés. Par conséquent, il est logique que la DPaPE migre plus lentement que la PE_{SEB} qui

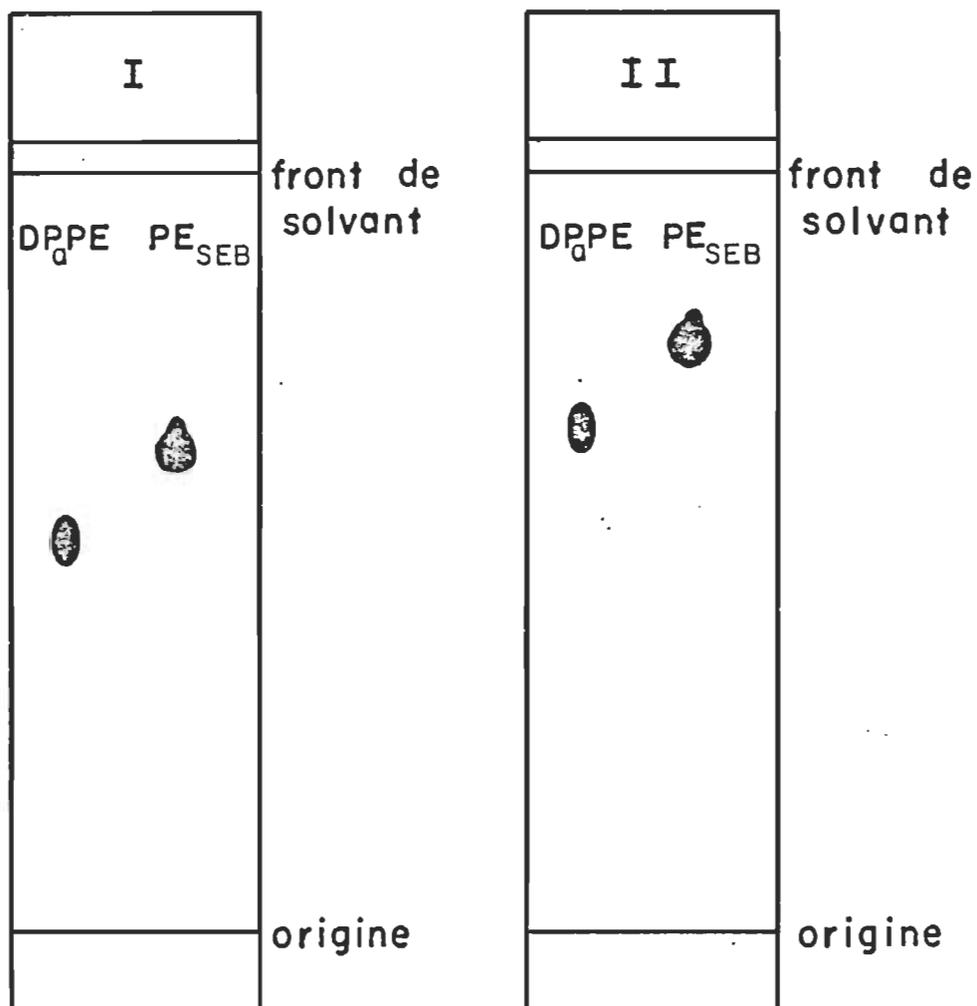
TABLEAU III - 6

Comportement en chromatographie sur couche mince

Phospholipide	I	II	I Cherayil et Scaria (1970)	II Tamai et coll. (1971)	Miljanich [*] et coll. (1979)
PE			0,49 - 0,52	0,77 - 0,82	
DPPE	0,52	0,67			
PE _{SEB}	0,63	0,78			0,46 - 0,50
PC			0,31 - 0,35	0,37 - 0,38	
DSPC	0,35	0,43			
PC _{SEB}	0,33-0,38-0,45	0,43-0,50-0,58			0,22 - 0,32
PS			0,06	0,59 - 0,60	
PS (cerveau boeuf)	Trainée	0,59			
PS _{SEB}	Trainée	0,64			0,17 - 0,19

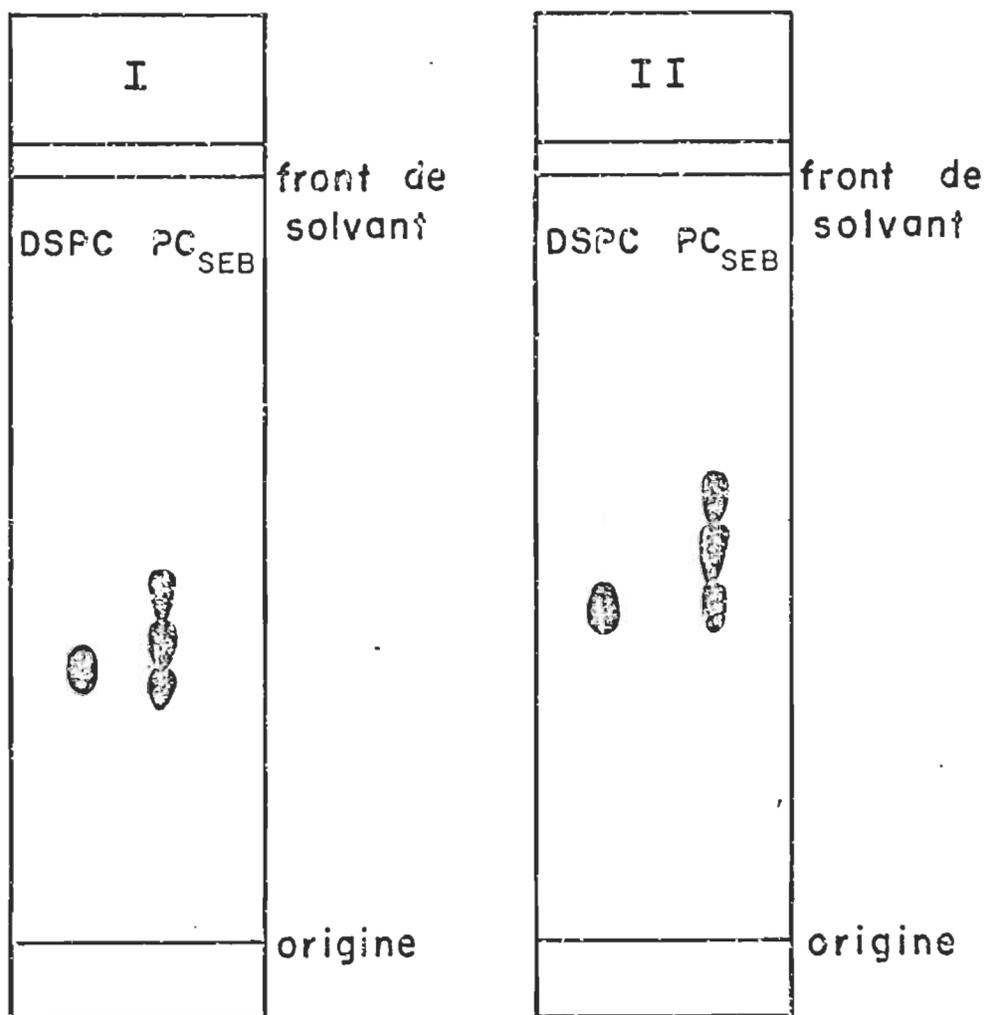
*CHCl₃ : CH₃OH : H₂O (65 : 25 : 5 , v:v:v) / gel de silice HSolvant de migration I : CHCl₃ : CH₃OH : H₂O (65 : 25 : 4 , v:v:v)Solvant de migration II : CHCl₃ : CH₃OH : CH₃COOH : H₂O (25 : 15 : 4 : 2 , v:v:v:v)

FIGURE III - 3



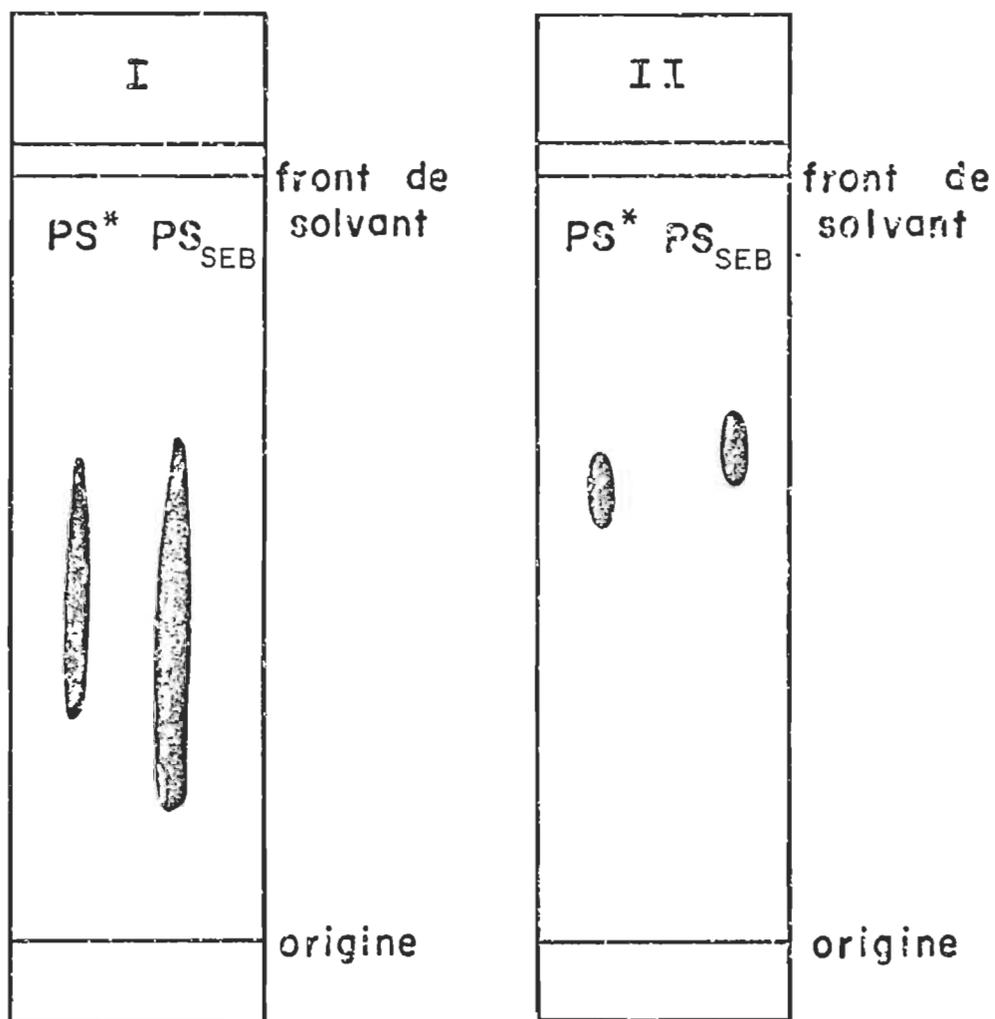
COMPORTEMENT EN CHROMATOGRAPHIE SUR
COUCHE MINCE DE LA PE_{SEB}

FIGURE III - 4



COMPORTEMENT EN CHROMATOGRAPHIE SUR
COUCHE MINCE DE LA PC_{SEB}

FIGURE III - 5



* de cerveau de boeuf

COMPORTEMENT EN CHROMATOGRAPHIE SUR
COUCHE MINCE DE LA PS_{SEB}

contient seulement 10% de 16:0 (palmitoyl). De la même façon, dans le solvant de migration I, la DSPC se retrouve à mi-chemin entre les deux dernières taches de la PC_{SEB} . En consultant le tableau III-3, on se rend compte que le palmitoyl (16:0) est l'acide gras saturé le plus important de la PC_{SEB} . De plus, selon les résultats de Miljanich et coll. (1979), la PC contenant du stearoyl (18:0) migre plus rapidement que celle constituée de palmitoyl. Donc, la dernière tache dans le solvant de migration I doit être composée majoritairement de palmitoyl et d'une certaine portion de stearoyl. Par ailleurs, étant donné son R_f moins grand, la PS du cerveau de boeuf doit être moins insaturée que la PS_{SEB} .

Lors de la première purification, nous avons remarqué la présence d'une traînée sur le chromatogramme de la PC_{SEB} . Cette traînée qui part de l'origine et se rend jusqu'à la première tache de PC_{SEB} , indique la formation de produits d'oxydation.

4 - Spectroscopie d'absorption

Les figures III-6, III-7 et III-8 montrent respectivement les spectres d'absorption de la PE_{SEB} , PC_{SEB} et PS_{SEB} . Ces trois phospholipides présentent la même forme de spectre pour chaque purification. Par contre, lors de la première purification de la PC_{SEB} , on a remarqué la présence de pics d'absorption à 230 et 270 nm. Ces pics d'absorption indiquent la formation de produits d'oxydation (Lea, 1955; Klein, 1970; Farnsworth et Dratz, 1976). Ainsi, nous ne discuterons pas les résultats de cette purification de la PC_{SEB} .

Après la mesure des spectres d'absorption, on trace le graphique de l'absorbance à 200 nm en fonction de la concentration. Les figures III-9, III-10 et III-11 en présentent un exemple type. Ces graphiques montrent une relation linéaire passant par l'origine. Ainsi, la pente de ces courbes représente le coefficient d'extinction molaire à 200 nm. Les valeurs de ces coefficients d'extinction molaire pour chaque purification, apparaissent au tableau III-7. En examinant ce tableau, on se rend compte que le coefficient d'extinction pour la première purification de la PE_{SEB} , est de 7 à 8 % moins élevé que pour les deux purifications subséquentes. On attribue cet écart à l'utilisation de deux solvants différents (méthanol et hexane). Par contre, on ne remarque aucune différence significative entre les données répertoriées pour les deux purifications de la PS_{SEB} .

Par ailleurs, on peut expliquer l'inégalité entre les coefficients d'extinction molaire des deuxième et troisième purifications de la PC_{SEB} ,

FIGURE III - 6

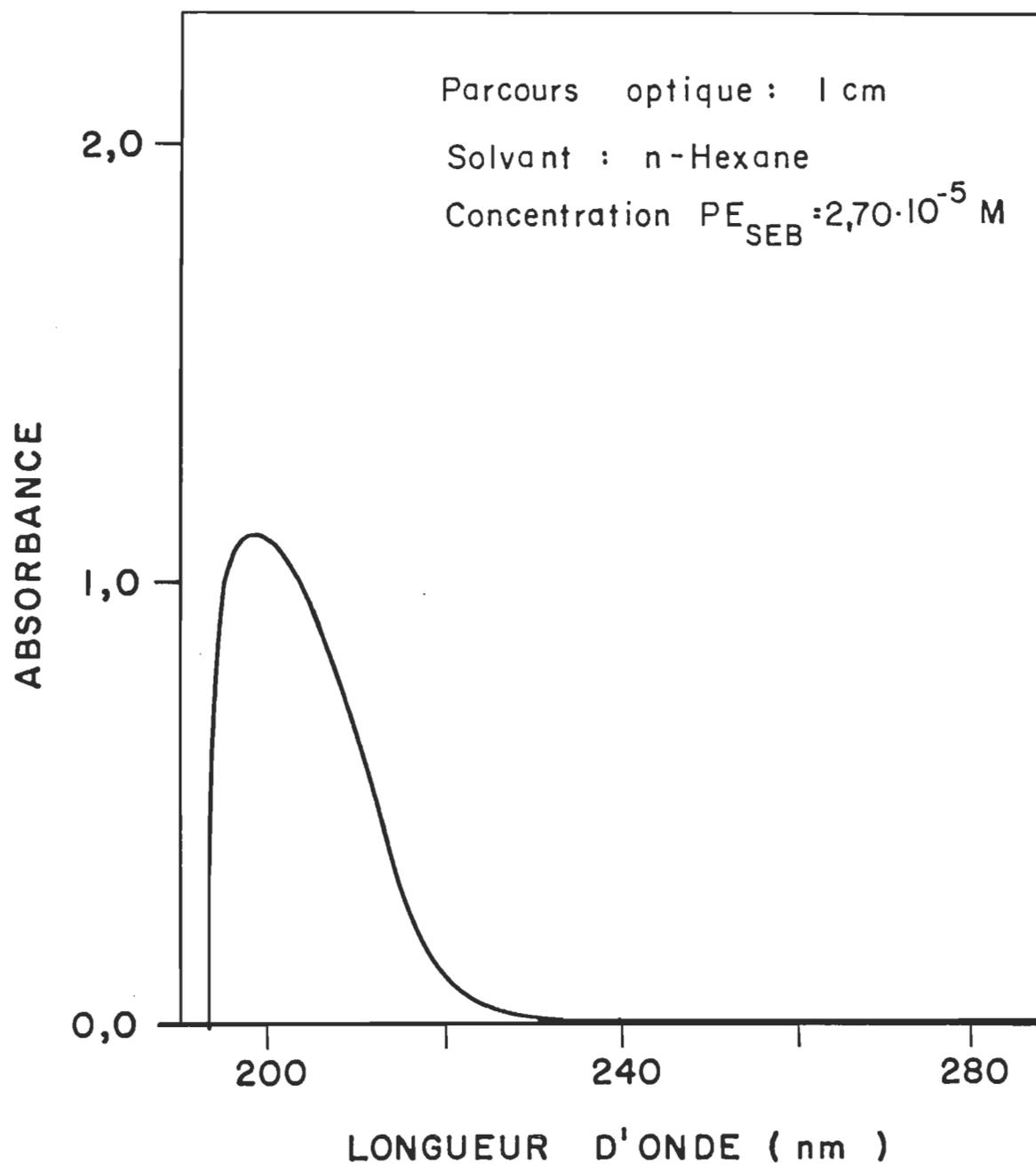
SPECTRE D'ABSORPTION DE LA PE_{SEB}

FIGURE III - 7

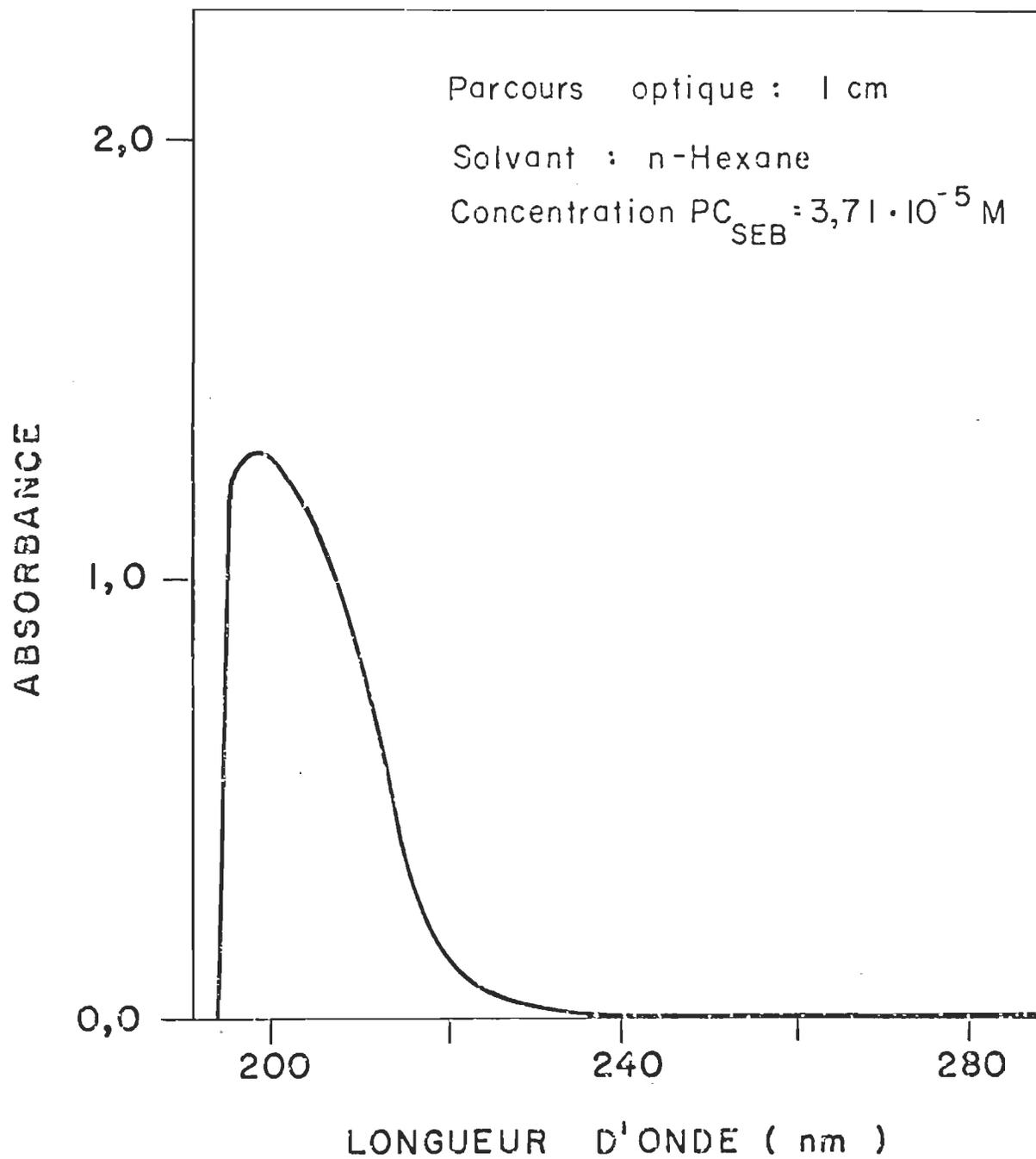
SPECTRE D'ABSORPTION DE LA PC_{SEB}

FIGURE III - 8

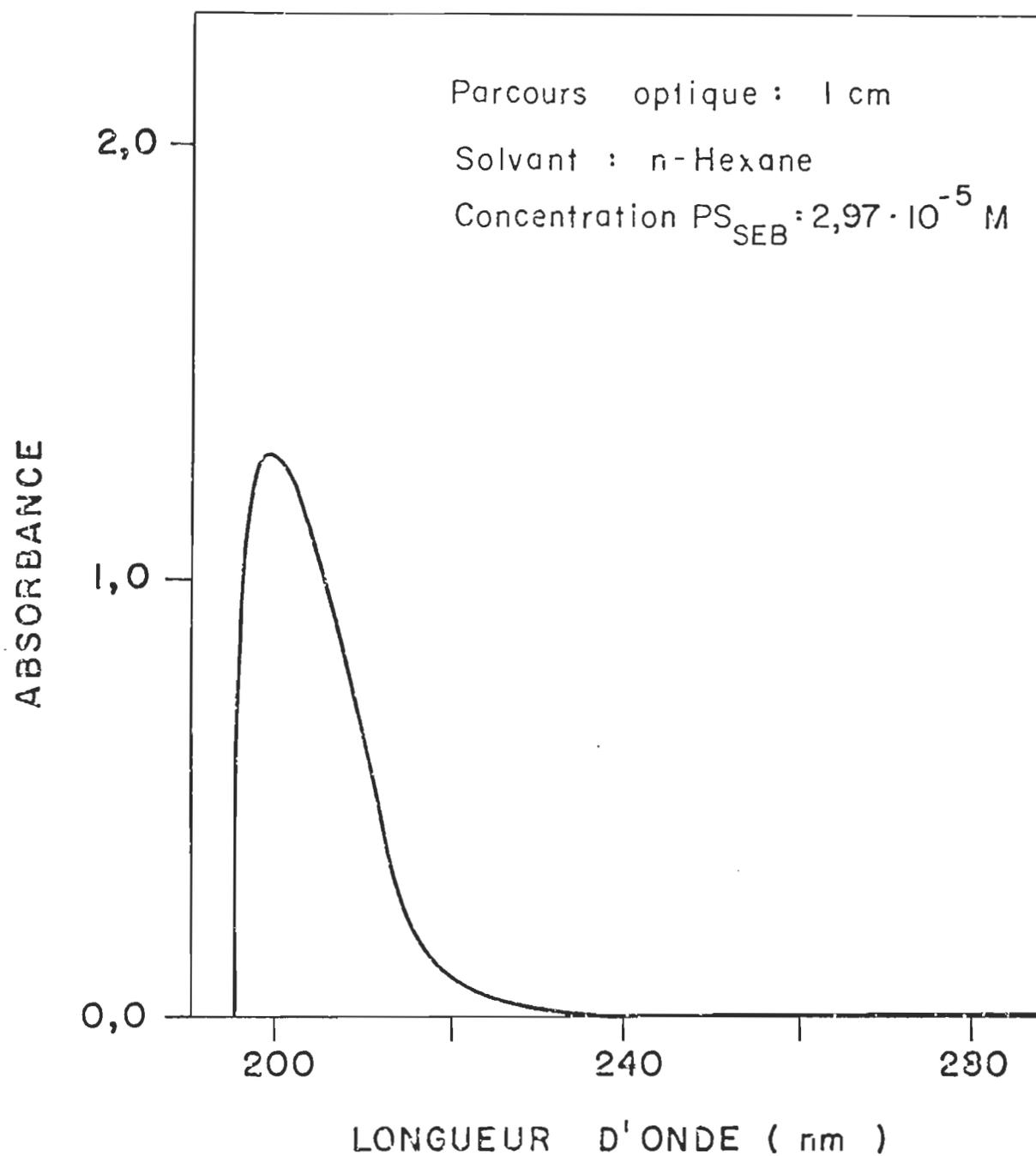
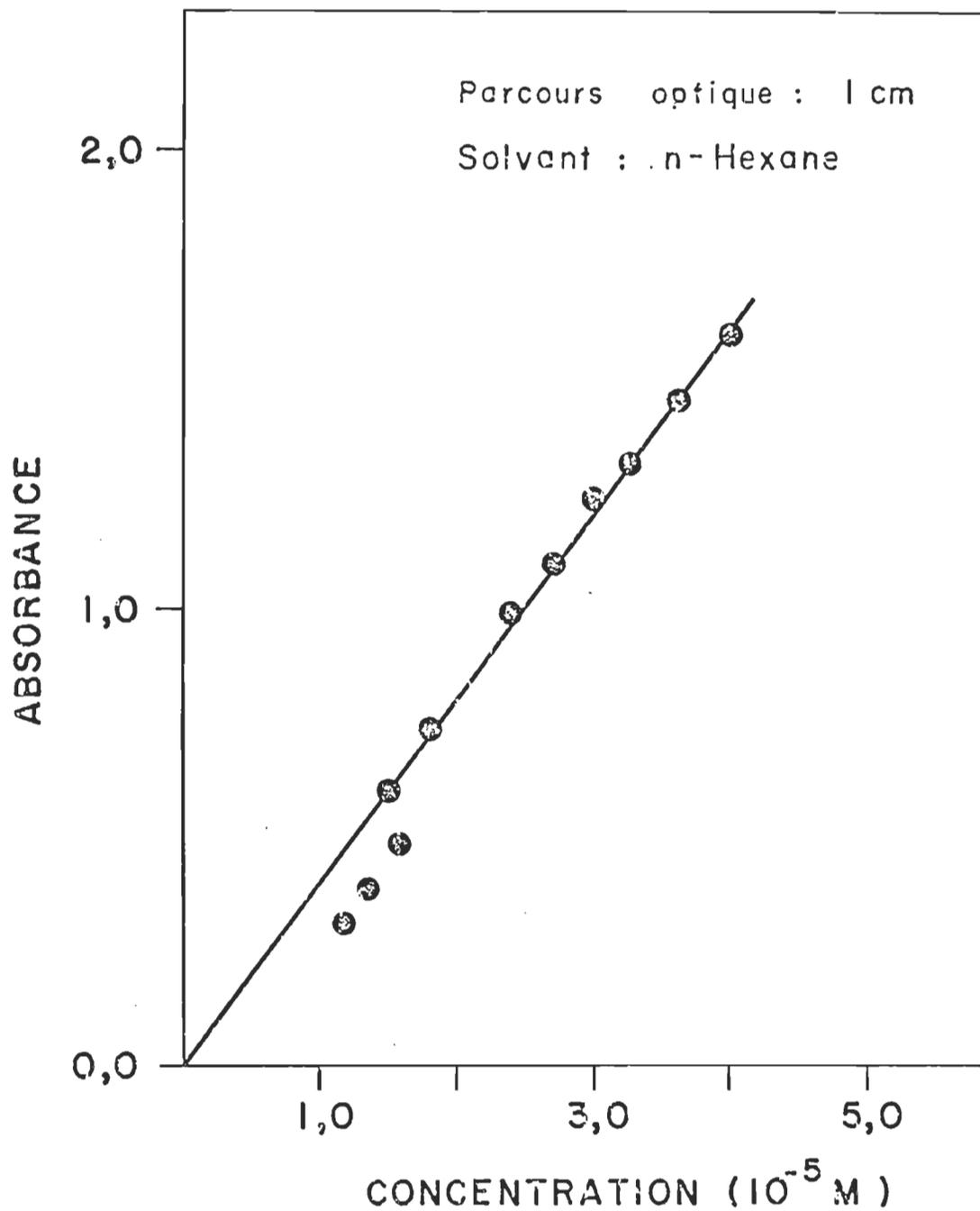
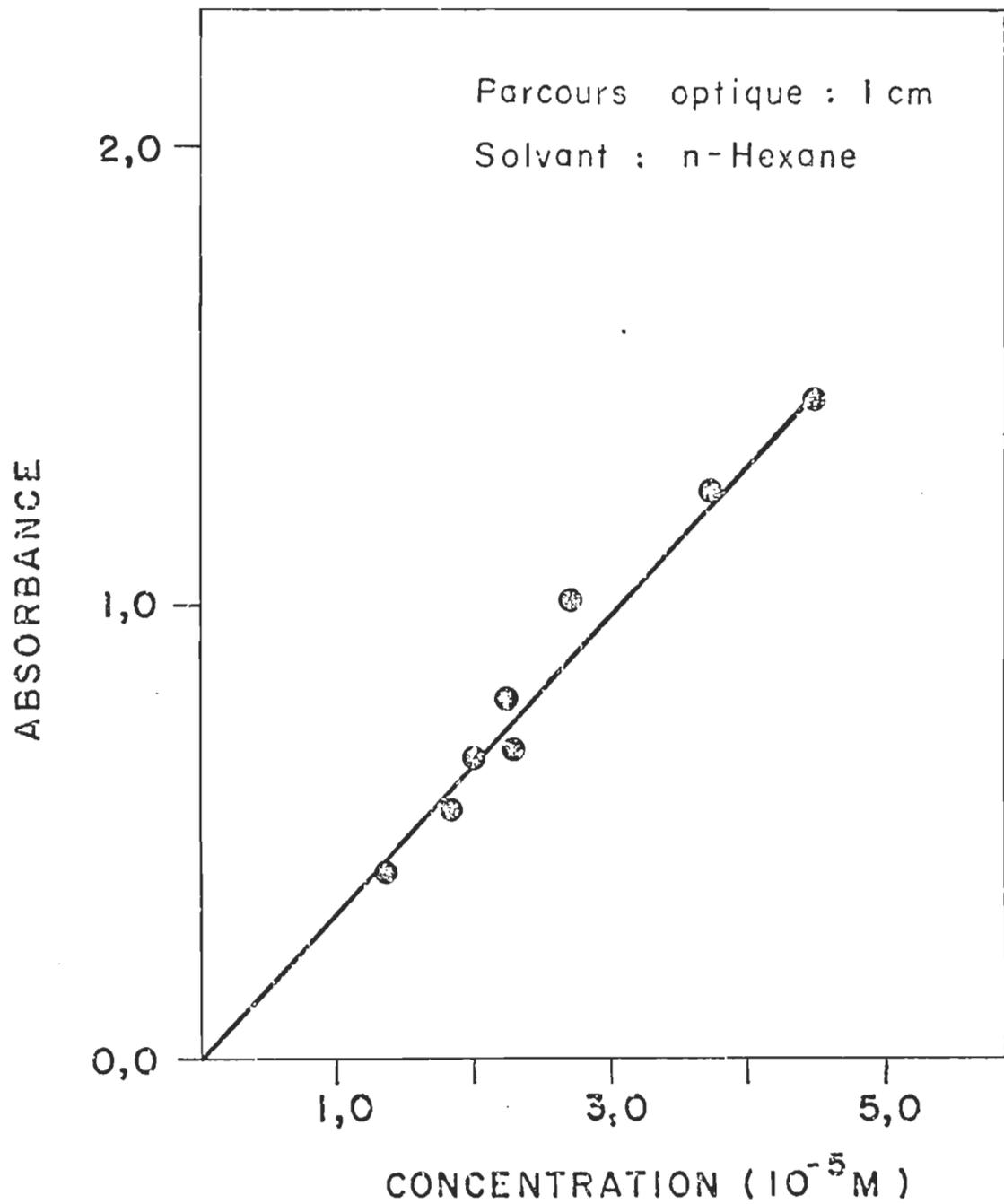
SPECTRE D'ABSORPTION DE LA PS_{SEB}

FIGURE III - 9



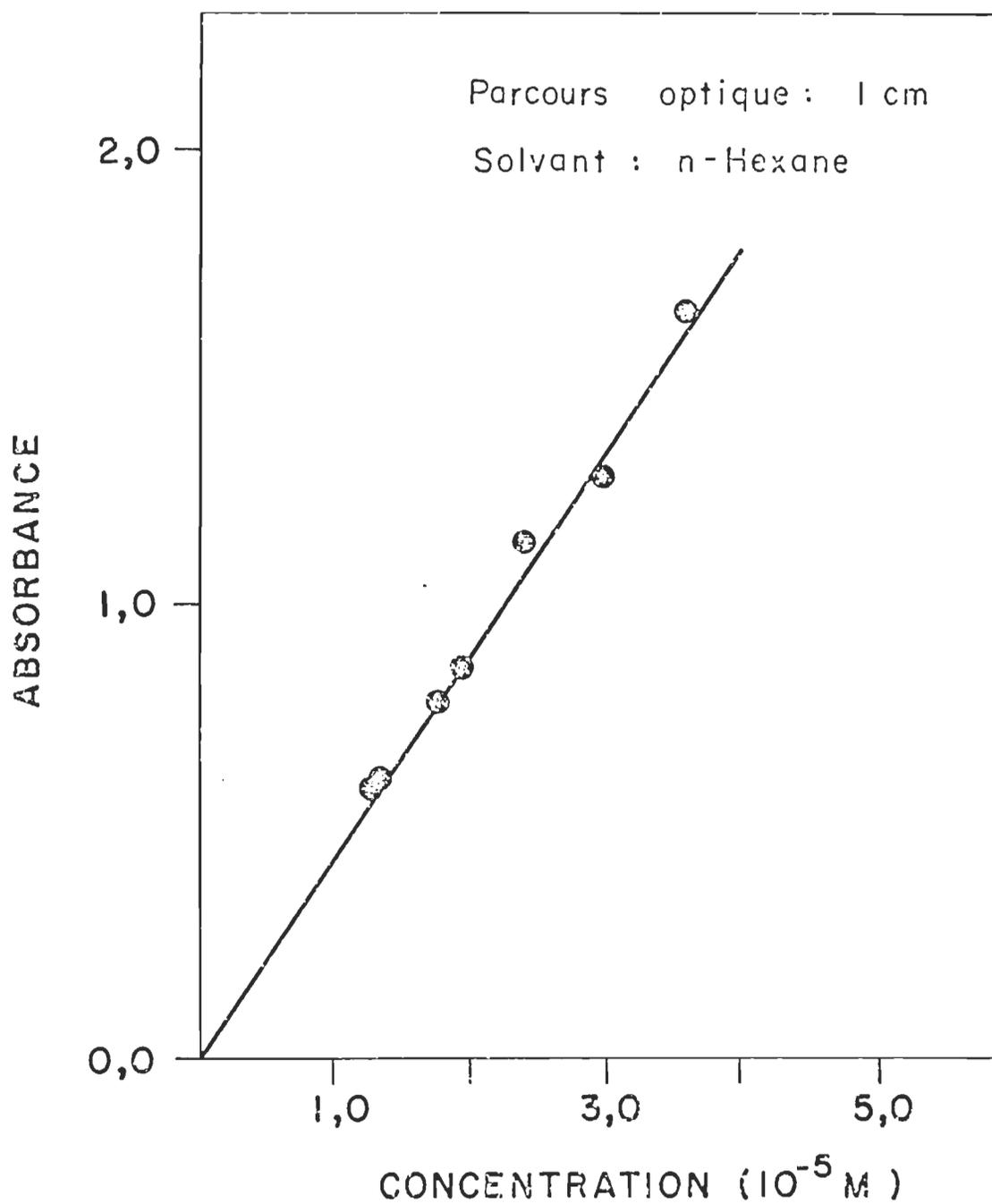
ABSORBANCE A 200 nm EN FONCTION DE LA
CONCENTRATION DE PE_{SEB}

FIGURE III - 10



ABSORBANCE A 200 nm EN FONCTION DE LA
CONCENTRATION DE PC_{SEB}

FIGURE III - 11



ABSORBANCE A 200 nm EN FONCTION DE LA
CONCENTRATION DE PS_{SEB}

TABLEAU III - 7

Détermination des coefficients d'extinction molaire

Phospholipide	Purification	Solvant	ϵ (l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
PE _{SEB}	1	Méthanol	36750
	2	Hexane	40500
	3	Hexane	39750
PC _{SEB}	1	Méthanol	9900
	2	Hexane	32750
	3	Hexane	21000
PS _{SEB}	1	Hexane	45250
	2	Hexane	44500

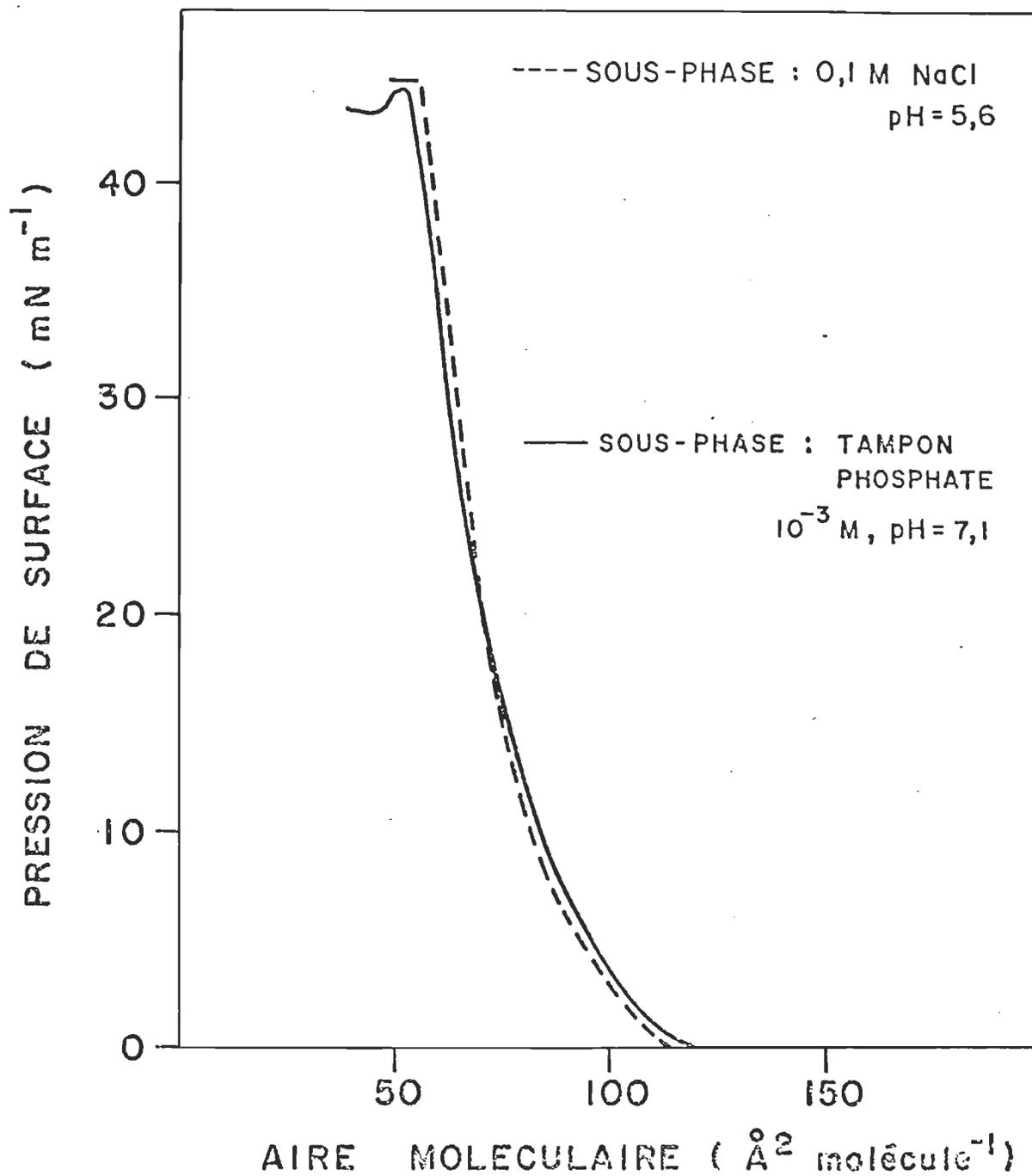
par leur contenu en acides gras polyinsaturés. Ainsi, à des pourcentages d'AGPI de 48 (deuxième purification) et 32 (troisième purification) correspondent respectivement les coefficients d'extinction molaire suivants: 32 750 et 21 000 $\ell \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Par conséquent, plus on accroît le pourcentage d'acides gras polyinsaturés, plus on augmente le coefficient d'extinction molaire.

5 - Détermination des propriétés monomoléculaires des phospholipides à l'interface air-eau

Tel que montré en annexe I, il existe un grand nombre d'études portant sur les propriétés monomoléculaires des phospholipides. Par contre, les phospholipides des SEB n'ont jamais été caractérisés par cette méthode. Toutefois, cette première étape s'avère essentielle, si l'on veut déterminer les interactions entre chaque phospholipide des SEB et le pigment visuel, la rhodopsine, par la méthode des monocouches. Cependant, l'étude de ces interactions doit s'effectuer à un pH physiologique. Ainsi, nous avons voulu vérifier si les isothermes présentés dans cette section (0,1 M NaCl, pH 5,6), se comparaient à ceux mesurés au pH retrouvé dans les SEB (10^{-3} M tampon phosphate, pH 7,1). La figure III-12 montre qu'il n'existe aucune différence significative dans la mesure des isothermes de pression de surface de la PE_{SEB} , avec ces deux types de sous-phase. Ces isothermes et tous les autres de cette section ont été reproduits au moins trois fois.

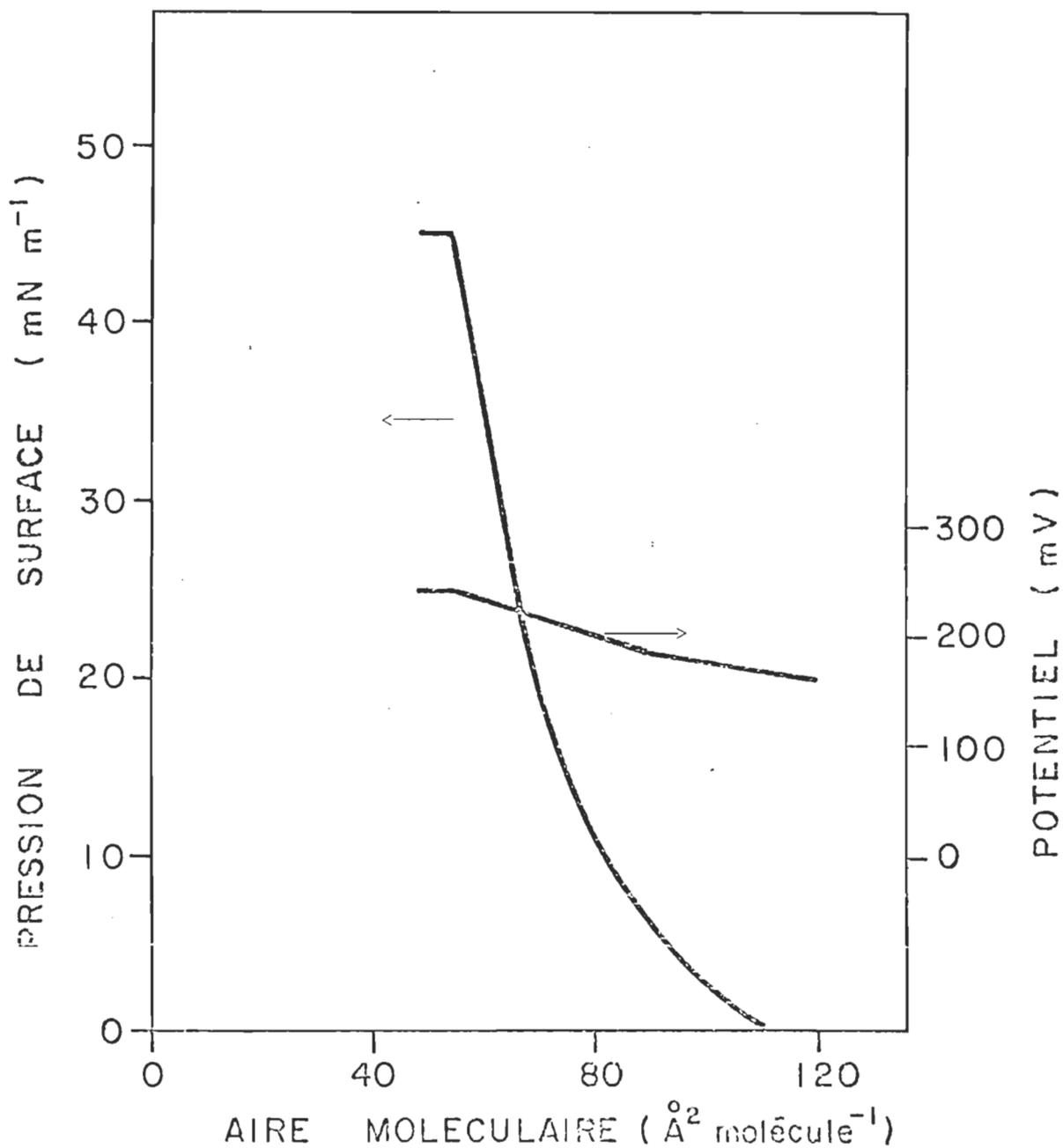
La figure III-13 donne l'isotherme de pression et de potentiel de surface de la PE_{SEB} . Par extrapolation, on trouve une aire moléculaire limite de $79 \pm 2 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ pour les trois purifications. On observe le collapse de ce film liquide à 45 mN m^{-1} . Par ailleurs, l'isotherme de potentiel de surface varie avec la nature de la monocouche; le potentiel commence à augmenter lorsqu'il passe de l'état gazeux à l'état liquide-expansé, puis on remarque un changement de pente lors du passage à l'état liquide-condensé. Par la suite, le potentiel cesse de s'accroître lorsqu'on atteint le collapse.

FIGURE III - 12



ISOTHERME DE PRESSION DE SURFACE DE LA PHOSPHATIDYL ETHANOLAMINE DES SEGMENTS EXTERNES DES BATONNETS A $20,0 \pm 0,5$ °C.

FIGURE III - 13

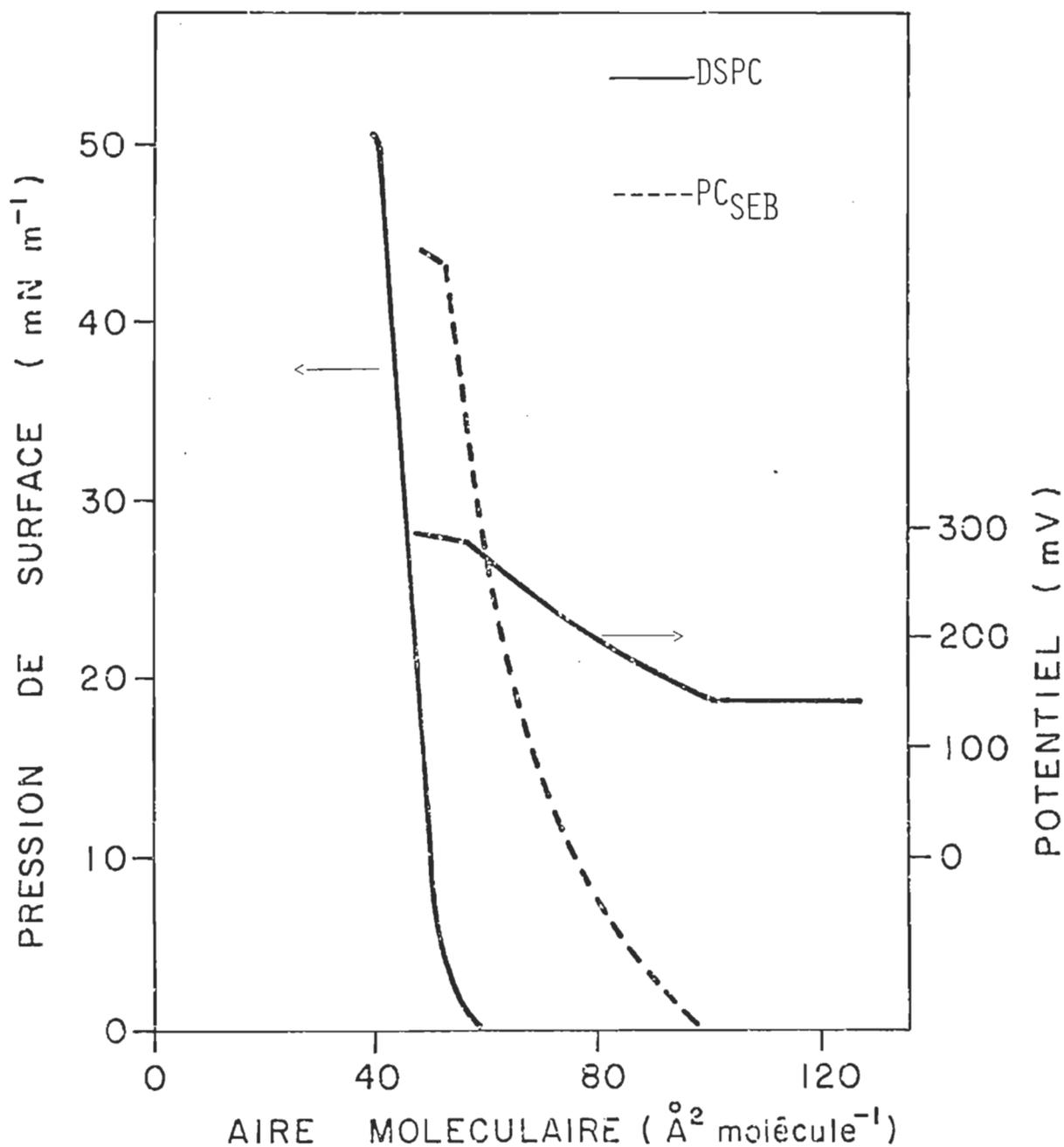


ISOTHERME DE PRESSON ET DE POTENTIEL DE SURFACE DE LA PHOSPHATIDYL ETHANOLAMINE DES SEGMENTS EXTERNES DES BÂTONNETS A $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$

La figure III-14 nous fait voir les isothermes de pression et de potentiel de surface de la PC_{SEB} , pour la deuxième purification. On situe l'aire moléculaire limite et le collapse à $72 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ et $43,5 \text{ mN m}^{-1}$, respectivement. L'isotherme de potentiel de surface nous révèle les mêmes renseignements que nous avons observé dans le cas de la PE_{SEB} . Sur la même figure, on discerne l'isotherme de pression de surface de la DSPC. Ce film solide dont l'aire moléculaire limite correspond à $51 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$, coïncide avec les valeurs de la littérature (Van Deenen et coll., 1962; Demel et coll., 1967; Phillips et Chapman, 1968; Phillips et coll., 1970; Demel et coll., 1972). Une aire limite de $80 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ est calculée pour l'isotherme de pression de surface de la PC_{SEB} (troisième purification), présenté à la figure III-15. La chromatographie sur couche mince de cette solution, dans le solvant de migration I, nous a révélé la présence unique de la composante qui se déplace le plus rapidement (R_f de 0,46, voir tableau III-6). Comme on le sait, cette tache contient presque exclusivement des acides gras polyinsaturés (Miljanich et coll., 1979). Sachant que l'aire moléculaire augmente avec l'insaturation (Kunau et Hollman, 1977), il est logique d'obtenir un isotherme de pression de surface avec une aire limite plus grande que celle de la deuxième purification. L'isotherme de pression de surface de la première purification n'apparaît pas, puisque cette PC_{SEB} renfermait des produits d'oxydation.

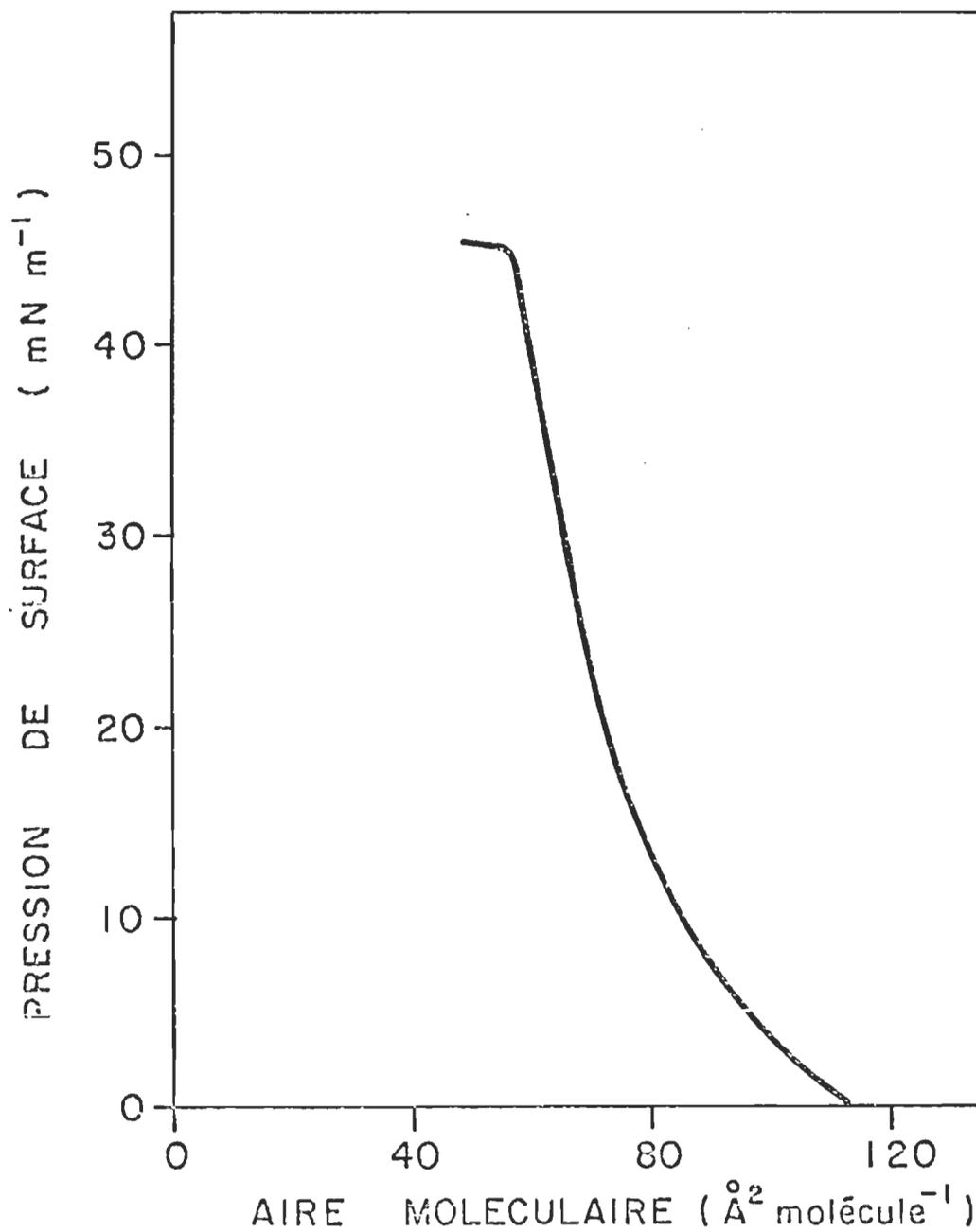
La figure III-16 montre l'isotherme de pression et de potentiel de surface de la PS_{SEB} dont l'aire moléculaire et le collapse, pour les deux purifications, sont respectivement de $80 \pm 2 \text{ \AA}^2 \text{ molécule}^{-1}$ et $43,5 \text{ mN m}^{-1}$. De plus, on peut tirer les mêmes conclusions du potentiel de

FIGURE III - 14



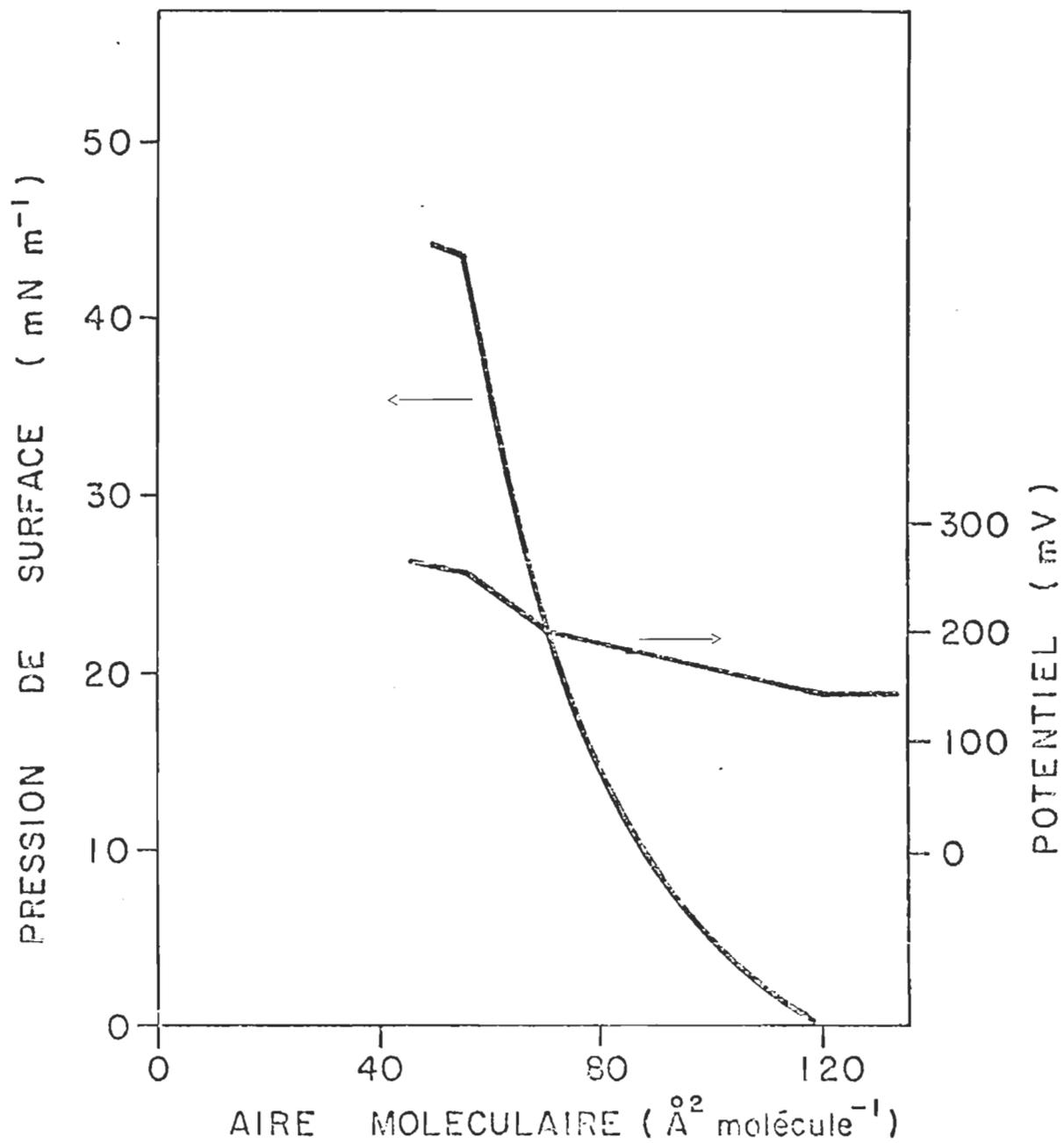
ISOTHERME DE PRESSION ET DE POTENTIEL DE SURFACE DE LA DISTEAROYL PHOSPHATIDYL CHOLINE (DSPC) ET DE LA PHOSPHATIDYL CHOLINE DES SEGMENTS EXTERNES DES BÂTONNETS A $20,0 \pm 0,5$ °C.

FIGURE III - 15



ISOTHERME DE PRESSION DE SURFACE DE LA PHOSPHATIDYL
CHOLINE DES SEGMENTS EXTERNES DES BÂTONNETS A $20,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

FIGURE III - 16



ISOTHERME DE PRESSION ET DE POTENTIEL DE SURFACE
DE LA PHOSPHATIDYL SERINE DES SEGMENTS EXTERNES
DES BÂTONNETS A $20,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

surface de la PS_{SEB} que dans le cas de la PE_{SEB} et PC_{SEB} .

La différence entre l'isotherme de pression de surface de la DSPC et ceux de la PE_{SEB} , PC_{SEB} et PS_{SEB} , est du même type que celle qui existe entre un film liquide et un film solide. On associe un film liquide à une grande fluidité de la monocouche. Par conséquent, on peut extrapoler ces données à la bicouche phospholipidique des SEB et affirmer que la rhodopsine baigne dans un environnement très fluide.

CONCLUSION

Comme nous avons pu nous en rendre compte, la particularité la plus saisissante des phospholipides de la membrane discale, est leur important contenu en longues chaînes hautement insaturées. De plus, il est généralement accepté que la fluidité lipidique est déterminée par le degré d'insaturation des acides gras. Par ailleurs, le contenu en cholestérol des SEB se trouve parmi les plus bas rencontrés dans les membranes de vertébrés (Daemen, 1973). Des mesures expérimentales suggèrent que le cholestérol diminue l'amplitude du mouvement des chaînes grasses dans la bicouche lipidique (Hsia et coll., 1972; Mendelsohn, 1972), et augmente l'ordre et l'organisation de la membrane (Smith, 1971; Smith et coll., 1978). Donc, la membrane photoréceptrice qui contient un faible taux de cholestérol et un pourcentage très élevé en acides gras polyinsaturés, se présente comme un milieu très fluide. De plus, les mesures des propriétés monomoléculaires des phospholipides des SEB, corroborent cette affirmation. Ainsi, les phospholipides du photorécepteur visuel confèrent un environnement très fluide à la rhodopsine et lui permet une grande liberté de diffusion rotationnelle et latérale (Brown, 1972; Cone, 1972; Liebman et Entine, 1974b; Poo et Cone, 1973 et 1974).

Cette diffusion pourrait s'avérer importante dans les modèles de transduction visuelle, où la rhodopsine excitée devrait diffuser pour activer d'autres enzymes. Ces considérations illustrent bien l'importance d'une connaissance détaillée de la physico-chimie membranaire afin de comprendre les relations structure-fonction dans la membrane photoréceptrice.

Les propriétés physico-chimiques des différents phospholipides des SEB, seront utilisées dans la poursuite des travaux de recherche reliés à l'étude des interactions entre chacun de ces phospholipides et la rhodopsine. Pour y parvenir, on propose l'emploi d'un système modèle, c'est-à-dire l'étude en deux dimensions sur un bain de Langmuir. Cette première étape nous permettra de déterminer le type d'interaction, son ordre de grandeur et la propension de la rhodopsine à interagir avec un phospholipide donné. Par la suite, il serait intéressant de former des membranes symétriques et asymétriques en reconstituant, par étapes, la membrane photoréceptrice. Ainsi, en incorporant de la rhodopsine dans une membrane renfermant un seul type de phospholipide, on pourrait étudier la variation de la résistance, de la capacitance et du flux ionique (à la noirceur et sous l'effet de l'irradiation) en fonction de la composition lipidique. Par conséquent, on pourrait déterminer l'importance de chaque phospholipide des SEB dans l'hypothèse ionique de la vision. Encore plus, on pourrait mesurer la polarisation de fluorescence (Jost et Griffith, 1980) de membranes asymétriques renfermant un ou des phospholipides des SEB, de la rhodopsine et un phospholipide dont une chaîne grasse serait de l'acide parinarique. Cette méthode nous permettrait d'évaluer sous un autre angle, l'interaction rhodopsine-phospholipide à la noirceur et sous l'effet de l'irradiation.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamson, E.W. and R.S. Fager (1973) Chemistry of vertebrate and invertebrate visual photoreceptors. In "Current topics in bioenergetics" (Edit. by D.R. Sanadi), vol. 5, pp. 125-200. Academic Press, New York.
- Albrecht, O., H. Gruler and E. Sackmann (1978) Polymorphism of phospholipid monolayers. *Le Journal de Physique* 39(3), 301-313.
- Albrecht, O., H. Gruler and E. Sackmann (1981) Pressure-composition phase diagrams of cholesterol/lecithin, cholesterol/phosphatidic acid, and lecithin/phosphatidic acid mixed monolayers: A Langmuir film balance study. *J. Colloid Interface Sci.* 79(2), 319-338.
- Almog, R. and D.S. Berns (1981) The role of polar groups in the interaction of dipalmitoyl phosphatidylcholine with chlorophyll a in monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 81(2), 332-340.
- American Society for Testing and Materials (ASTM) (1977) Method A-Colorimetric ascorbic acid reduction method. In "Annual book of ASTM standards" (edit. by ASTM), part 31, pp. 449-451. ASTM, Philadelphia.
- Anderson, P.J. and B.A. Pethica (1955) Surface chemistry of synthetic lecithin. In "Biochemical problems of lipids" (edit. by J. Popjak and E. Le Breton), Proc. Intern. Conf., 2nd, Ghent, pp. 24-29, Butterworths Scientific Publications, London.
- Anderson, R.E. and M.B. Maude (1970) Phospholipids of bovine rod outer segments. *Biochemistry* 9(18), 3624-3628.
- Anderson, R.E. and L. Sperling (1971) Lipids of ocular tissues-VII. Positional distribution of the fatty acids in the phospholipids of bovine retina rod outer segments. *Arch. Biochem. Biophys.* 144, 673-677.
- Anderson, R.E. and M.B. Maude (1972) Lipids of ocular tissues -VIII. The effects of essential fatty acid deficiency on the phospholipids of the photoreceptor membranes of rat retina. *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 270-276.
- Anderson, R.E., M.B. Maude and W. Zimmerman (1975) Lipids of ocular tissues -X. Lipid composition of subcellular fractions of bovine retina. *Vision Res.* 15, 1087-1090.
- Anderson, R.E., R.M. Benolken, M.B. Jackson and M.B. Maude (1977) The relationship between membrane fatty acids and the development of the rat retina. In "Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 83, Function and Biosynthesis of Lipids" (edit. by N.G. Bazan, R.R. Brenner and N.M. Giusto), pp. 547-559. Plenum Press, New York.

- Ansell, G.B. and S. Spanner (1971) Purification and assay of phospholipids. In "Methods of Neurochemistry", vol. 1 (edit. by R. Fried) pp. 36, Marcel Dekker, New York.
- Applebury, M.L., D.M. Zuckerman, A.A. Lamola and T.M. Jovin (1974) Rhodopsin. Purification and recombination with phospholipids assayed by the metarhodopsin I — metarhodopsin II transition. *Biochemistry* 13(17), 3448-3458.
- Bangham, A.D. and D. Papahadjopoulos (1966) Biophysical properties of phospholipids .I. Interaction of phosphatidyl serine monolayers with metal ions. *Biochim. Biophys. Acta* 126(1), 181-184.
- Belmonte, A.A. and J. Swarbrick (1973) Surface behavior of dibenzanthracene with lipid monolayers. *Biochem. Biophys. Acta* 323(4), 647-652.
- Bishop, D.G., E.M. Berers, G. Van Meer, J.A.F. Op Den Kamp and L.L.M. Van Deenen (1979) A monolayer study of the reaction of trinitrobenzene sulfonic acid with amino phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 551, 122-128.
- Blume, A. (1979) A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 557(1), 32-44.
- Bonting, S.L., P.J.G.M. Van Breugel and F.J.M. Daemen (1977) Influence of the lipid environment of the properties of rhodopsin in the photoreceptor membrane. In "Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 83, Function and Biosynthesis of Lipids" (edit. by N.G. Bazan, R.R. Brenner and N.M. Giusto), pp. 175-189. Plenum Press, New York.
- Borggreven, J.M.P.M., F.J.M. Daemen and S.L. Bonting (1970) Biochemical aspects of the visual process. IV. The lipid composition of native and hexane-extracted cattle rod outer segments. *Biochim. Biophys. Acta* 202, 374-381.
- Bougis, P., H. Rochat, G. Piéron and R. Verger (1981) Penetration of phospholipid monolayers by cardiotoxin. *Biochemistry* 20(17), 4915-4920.
- Brody, S.S. (1973) Reactions of retinals in model membrane system. *Z. Naturforsch., Teil, C.* 28(3-4), 157-164.
- Brown, P.K. (1972) Rhodopsin rotates in the visual receptor membrane. *Nature New Biol.* 236(63), 35-38.
- Cadenhead, D.A., R.J. Demchak and M.C. Phillips (1967) Monolayer characteristics of 1,2-dimyristin, 1,2-dimyristoyl-3-cephalin and 1,2-dimyristoyl-3-lecithin at the air-water interface. *Kolloid Z.Z. Polym.* 220, 59-64.
- Cadenhead, D.A., F. Muller-Landau and B.M.J. Kellner (1974) Bilayers at the air-water interface ? *Nature* 252, 694-696.

- Cadenhead, D.A. and B.M.J. Kellner (1974) Some observations on monolayer spreading solvents with special reference to phospholipid monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 49(1), 143-145.
- Cadenhead, D.A., B.M.J. Kellner and M.C. Phillips (1976) The miscibility of dipalmitoyl lecithin and cholesterol in monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 57(2), 224-227.
- Cadenhead, D.A., B.M.J. Kellner, K. Jacobson and D. Papahadjopoulos, D. (1977) Fluorescent probes in model membranes. I: Anthroyl fatty acid derivatives in monolayers and liposomes of dipalmitoyl phosphatidyl choline. *Biochemistry* 16(24), 5387-5392.
- Cadenhead, D.A. and F. Muller-Landau (1979) Molecular packing in steroid-lecithin monolayers Part III: Mixed films of 3-doxyl cholestane and 3-doxyl-M-hydroxyl androstane with dipalmitoylphosphatidyl choline. *Chem. Phys. Lipids* 25, 329-343.
- Carreau, J.P., D. Lapous et J. Roulin (1969) Artéfacts expérimentaux pouvant survenir lors de la chromatographie en couche mince des lipides membranaires. *J. Chromatogr.* 42, 422-425.
- Chapman, D., N.F. Owens and D.A. Walker (1966) Physical studies of phospholipids. II. Monolayer studies of some synthetic 2,3-diacyl-DL-phosphatidyl ethanolamine, and phosphatidyl choline, containing trans double bonds. *Biochim. Biophys. Acta* 120, 148-155.
- Chapman, D., N.F. Owens, M.C. Phillips and D.A. Walker (1969) Mixed monolayers of phospholipids and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 183, 450-465.
- Chatelain, P., F. Defrise-Quertain, J.M. Ruysschaert and M. Delmelle (1979) Properties of mixed monolayers of lecithin and spin probe. *J. Colloid Interface Sci.* 72(2), 287-293.
- Chaudhury, M. and S. Ohki (1981) Correlation between membrane expansion and temperature-induced membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 642, 365-374.
- Cherayil, G.D. and K.S. Scaria (1970) Thin-layer chromatography of tissue lipids without extraction. *J. Lipid Res.* 11, 379-381.
- Chifu, E. and M. Tomoiaia-Cotisel (1979) Insoluble monolayers of lecithin and carotenoids pigments. *Rev. Roum. Chim.* 24(7), 979-986.
- Colacicco, G. (1971) Lipid monolayers: surface potential of dipalmitoyl lecithin with regard to ion sorption and Ca binding. *Biochim. Biophys. Acta* 266(2), 313-319.
- Colacicco, G. (1973) Lipid monolayers: ionic impurities and their influence on the surface potentials of neutral phospholipids. *Chem. Phys. Lipids* 10, 66-72.

- Colacicco, G., A.R. Jr. Buckelew and E.M. Scarpelli (1974) Lipid monolayers: Surface viscosity of dipalmitoyl lecithin in relation to surface potential and ion binding. *J. Colloid Interface Sci.* 46(1), 147-151.
- Colacicco, G., M.K. Basu and E.M. Scarpelli (1976) pH, temperature, humidity and the dynamic force-area curve of dipalmitoyl lecithin. *Respir. Physiol.* 27, 169-186.
- Colacicco, G. and M.K. Basu (1977) Effects of cholesterol and cholesteryl ester in dynamic surface tension of dipalmitoyl lecithin. *J. Colloid Interface Sci.* 61(3), 516-518.
- Colacicco, G. and M.K. Basu (1978a) Effect of serum albumin on dynamic force-area curve of dipalmitoyl lecithin. *Respir. Physiol.* 32, 265-279.
- Colacicco, G. and M.K. Basu (1978b) Surface potentials and ion sorption of dimiristoyl, dipalmitoyl and distearoyl phosphatidyl choline films on NaCl and CaCl₂ solutions. *Biochim. Biophys. Acta* 509(2), 230-238.
- Colacicco, G., M.K. Basu and F.A. Tansey (1980) Electrical properties of membrane systems: On mechanisms of interaction of Ca with dipalmitoyl lecithin at the air-water interface. *Adv. Chem. Ser.* 188, 57-73.
- Cone, R.A. (1972) Rotational diffusion of rhodopsin in the visual receptor membrane. *Nature New Biol.* 236(63), 39-43.
- Cornell, B.A., M.M. Sacré, W.E. Peel and D. Chapman (1978) The modulation of lipid bilayer fluidity by intrinsic polypeptides and proteins. *FEBS Lett.* 90(1), 29-35.
- Daemen, F.J.M. (1973) Vertebrate rod outer segment membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 300, 255-288.
- DeGrip, W.J., F.J.M. Daemen and S.L. Bonting (1980) Isolation and purification of bovine rhodopsin. In: "Methods in Enzymology" (edit. by D.B. McCormick and L.D. Wright), vol. 67, pp. 301-320, Academic Press, New York.
- DeKruyff, B., R.A. Demel, A.J. Slotboom, L.L.M. Van Deenen and A.F. Rosenthal (1973) The effect of the polar head groups on the lipid-cholesterol interaction: a monolayer and differential scanning calorimetry study. *Biochim. Biophys. Acta* 307(1), 1-19.
- Demel, R.A., L.L.M. Van Deenen and B.A. Pethica (1967) Monolayer interactions of phospholipids and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 135, 11-19.
- Demel, R.A., F.J.L. Crombag, L.L.M. Van Deenen and S.C. Kinsky (1968) Interaction of polyene antibiotics with single and mixed lipid monomolecular layers. *Biochim. Biophys. Acta* 150(1), 1-14.

- Demel, R.A. and P. Joos (1968) Interaction between lecithins and cholesterol at the air-water and oil-water interfaces. *Chem. Phys. Lipids* 2, 35-46.
- Demel, R.A., K.R. Bruckdorfer and L.L.M. Van Deenen (1972a) Structural requirements of sterols for the interaction with lecithin at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 255(1), 311-320.
- Demel, R.A., W.S.M. Geurts Van Kessel and L.L.M. Van Deenen (1972b) The properties of polyunsaturated lecithins in monolayers and liposomes and the interactions of these lecithins with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 266(1), 26-40.
- Demel, R.A., W.S.M. Geurts Van Kessel, R.F.A. Zwaal, B. Roelofsen and L.L.M. Van Deenen (1975) Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 406(1), 97-107.
- Dijkmans, H., G. Munger, J. Aghion and R.M. Leblanc (1981) Interactions of CF_1 , the coupling factor of phosphorylations, with chloroplast lipids. Monolayer studies. *Can. J. Biochem.* 59(5), 328-331.
- Dimitrov, D.S., I. Panaitov, P. Richmond and L. Ter-Minassian-Saraga (1978) Dynamics of insoluble monolayers .I. Dilatationnal or elastic modulus, friction coefficient and Marangoni effect for dipalmitoyl lecithin monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 65(3), 483-494.
- Dittmer, J.C. and R.L. Lester (1964) A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.* 5, 126-127.
- Dorfler, H.D. and W. Rettig (1980) Temperature dependance of compression behavior of phospholipid monolayers .2. *Colloid and Polym. Sci.* 258(7), 839-848.
- Downer, N.W. and S.W. Englander (1977) Hydrogen exchange study of membrane-bound rhodopsin .II. Light-induced protein structure change. *J. Biol. Chem.* 252(22), 8801-8804.
- Dreher, K.D., J.H. Schulman, O.R. Anderson and O.A. Roels (1967) The stability and structure of mixed lipid monolayers and bilayers .1. Properties of lipid and lysoprotein monolayers on OsO_4 solutions and the role of cholesterol, retinol, and tocopherol in stabilizing lecithin monolayers. *J. Ultrastruct. Res.* 19, 586-599.
- Drenthe, E.H.S., A.A. Klomp makers, S.L. Bonting and F.J.M. Daemen (1981) Transbilayer distribution of phospholipid fatty acyl chains in photoreceptor membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 641, 377-385.

- Dreyfus, H., G. Rebel, S. Edel-Harth and P.F. Urban (1974) The effect of light stimulation on phospholipids of calf rod outer segments. *Brain Res.* 66, 139-146.
- Ebrey, T.G. and B. Honig (1975) Molecular aspects of photoreceptor function. *Q. Rev. Biophys.* 8(2), 129-184.
- El Mashak, E.M., C. Poolette and J.F. Tocanne (1979) Interactions between ellipticine and some derivatives and phospholipids in model membranes. *FEBS Lett.* 107(1), 155-159.
- El Mashak, E.M. and J.F. Tocanne (1980a) Polymixin B phosphatidyl glycerol interactions. A monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta* 596, 165-179.
- El Mashak, E.M. and J.F. Tocanne (1980b) Interactions between ellipticine and phospholipids. Effect of ellipticine and 9-methoxyellipticine on the phase behaviour of phosphatidyl glycerol. A monolayer study. *Eur. J. Biochem.* 105, 593-601.
- Evans, R.W. and J. Tinoco (1978) Monolayers of sterols and phosphatidylcholines containing a 20-carbon chain. *Chem. Phys. Lipids* 22, 207-220.
- Evans, R.W., M.A. Williams and J. Tinoco (1980) Surface viscosities of phospholipids alone and with cholesterol in monolayers at the air-water interface. *Lipids* 15(7), 524-533.
- Faiman, R., K. Larsson and B. Szalontai (1976) Lecithin-diglyceride interaction in surface films on water and in aqueous systems. *Acta Chem. Scand., Ser. A* A30(4), 281-284.
- Farnsworth, C.C. and E.A. Dratz (1976) Oxidative damage of retinal rod outer segment membranes and the role of vitamin E. *Biochim. Biophys. Acta* 443, 556-570.
- Fatt, P. (1981) Proteins of vertebrate rod outer segments: a possible role for multiple forms of rhodopsin. *Exp. Eye Res.* 33, 31-45.
- Felmeister, A., M. Amanat and N.D. Weiner (1968) Interaction of nitrogen dioxide-olefin gas mixtures with lecithin monolayer films. *Environ. Sci. Technol.* 2(1), 40-43.
- Felmeister, A. and R. Schaubman (1969) Photoinduced interaction of phenothiazine drugs with a lecithin monomolecular film. *J. Pharm. Sci.* 58(1), 64-67.
- Finer, E.G. and M.C. Phillips (1973) Factors affecting molecular packing in mixed lipid monolayers and bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 10(3), 237-252.
- Fleischer, S. and D.G. McConnell (1966) Preliminary observations on the lipids of bovine retinal outer segment disks. *Nature* 212(5068), 1366-1367.

Folch, J., M. Lee and G.A. Sloane-Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

Fried, V.A. and L.I. Rothfield (1978) Interactions between lipopolysaccharide and phosphatidyl ethanolamine in molecular monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 514(1), 69-82.

Futterman, S., J.C. Downer and A. Hendrickson (1971) Effect of essential fatty acid deficiency on the fatty acid composition, morphology, and electroretinographic response of the retina. *Invest. Ophthalmol.* 10(2), 151-156.

Gaines, G.L. Jr. (1966) *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Interscience Publishers, New York.

Galdston, M. and D.O. Shah (1967) Surface properties and hysteresis of dipalmitoyl phosphatidyl choline in relation to the alveolar lining layer. *Biochim. Biophys. Acta* 137, 255-263.

Gershfeld, N.L. and R.E. Pagano (1972) Physical chemistry of lipid films at the air-water interface .III. The condensing effect of cholesterol A critical examination of mixed-film studies. *J. Phys. Chem.* 76(9), 1244-1249.

Gershfeld, N.L. and K. Tajima (1977) Energetics of the transition between lecithin monolayers and bilayers. *J. Colloid Interface Sci.* 59(3), 597-604.

Geurts Van Kessel, W.S.M., W.M.A. Hax and J. DeGier (1977) High performance liquid chromatographic separation and direct ultraviolet detection of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 486, 524-530.

Ghosh, D., R.L. Lyman and J. Tinoco (1971) Behavior of specific natural lecithins and cholesterol at the air-water interface. *Chem. Phys. Lipids* 7, 173-184.

Ghosh, D. and J. Tinoco (1972) Monolayer interactions of individual lecithins with natural sterols. *Biochim. Biophys. Acta* 266(1), 41-49.

Ghosh, D., M.A. Williams and J. Tinoco (1973) The influence of lecithin structure on their monolayer behavior and interactions with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 291(2), 351-362.

Gutkowski, P., J. Haber and J. Pawelek (1980) Influence of lysolecithin on surface properties of dipalmitoyl lecithin monolayer. *J. Colloid Interface Sci.* 78(2), 289-294.

Handa, T. and M. Nakagaki (1979) Miscibility of phospholipids and cholesterol acetate in mixed monolayers on aqueous surfaces. *Colloid Polym. Sci.* 257, 374-381.

- Hanssens, I. and F.H. Van Couvelaert (1978). Shielding of phospholipid monolayers from phospholipase C by α -lactalbumine adsorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84(4), 1088-1096.
- Hauser, H.J. and R.M.C. Dawson (1967) Stability of unimolecular films of ^{32}P -labelled lecithin. *Biochem. J.* 105(1), 401-407.
- Hauser, H. and M.C. Phillips (1973) Adsorption of calcium to phospholipid monolayers. In "Chemie, Physikalische Chemie und Anwendungstechnik der Grenzflächenaktiven Stoffe", Berlin Int. Kong., 6th, Teil 1, pp. 371-380.
- Hauser, H., M.C. Phillips, B.A. Levine and R.J.P. Williams (1975) Ion-binding to phospholipids: interaction of calcium and lanthanide ions with phosphatidyl choline. *Eur. J. Biochem.* 58(1), 133-144.
- Hawco, M.W., K.P. Coolbear, P.J. Davis and K.M.W. Keough (1981a) Exclusion of fluid lipid during compression of monolayers of mixtures of dipalmitoyl phosphatidylcholine with some other phosphatidylcholines. *Biochim. Biophys. Acta* 646(1), 185-187.
- Hawco, M.W., P.J. Davis and K.M.W. Keough (1981b) Lipid fluidity in lung surfactant: monolayers of saturated and unsaturated lecithins. *J. Appl. Physiol. Respiratory Environ. and Exercise. Physiol.* 51(2), 509-515.
- Hayashi, M., T. Muramatsu and I. Hara (1972) Surface properties of synthetic phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 255, 98-106.
- Hayashi, M., T. Muramatsu, and I. Hara (1973) Surface properties of synthetic phospholipids .II. Thermal phase transitions in monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 291, 335-343.
- Hayashi, M., T. Muramatsu, I. Hara and T. Seimiya (1975) Phase transitions of phospholipids in monolayers and surface viscosity. *Chem. Phys. Lipids* 15(2), 209-215.
- Hendricks, Th., A.A. Klomp makers, F.J.M. Daemen and S.L. Bonting (1976) Biochemical aspects of the visual process .XXXII. Movement of sodium ions through bilayers composed of retinal and rod outer segment lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 433, 271-281.
- Hendrickx, Y. et L. Ter-Minassian-Saraga (1973) Couches monomoléculaires obtenues par étalement ou par compression. *C.R. Acad. Sci., Ser. C* 276(13), 1065-1067.
- Hersh, L. (1967) The interaction of local anesthetics with lecithin monolayers. *Mol. Pharmacol.* 3, 581-585.
- Hong, K. and W.L. Hubbell (1973) Lipid requirements for rhodopsin regenerability. *Biochemistry* 12(22), 4517-4523.

- Horn, L.W. and N.L. Gershfeld (1977) Equilibrium and metastable states in lecithin films. *Biophys. J.* 149, 597-608.
- Hsia, J.C., R.A. Long, F.E. Hruska and H.D. Gesser (1972) Steroid-phosphatidyl choline interactions in oriented multibilayers-A spin label study. *Biochim. Biophys. Acta* 290(1), 22-31.
- Hui, S.W., M. Cowden, D. Papahadjopoulos and P.F. Parsons (1974) Electron diffraction study of hydrated phospholipids single bilayers. Effects of temperature, hydration and surface pressure of the precursor monolayer. *Biochim. Biophys. Acta* 382(3), 265-275.
- Hupfer, B., H. Ringsdorf and H. Schupp (1981) Polyreactions in oriented systems. 21. Polymeric phospholipid monolayers. *Makromol. Chem.* 182(1), 247-253.
- Hyono, A. and S. Kuriyama (1966) Properties and structures of lecithin monolayers containing potassium ions and acetyl choline. *Nature* 210 (5033), 300-301.
- Jackson, R.L., F. Pattus and R.A. Demel (1979) Interactions of plasma apolipoproteins with lipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 556(3), 369-387.
- Joos, P. and R.A. Demel (1969) The interaction energies of cholesterol and lecithin in spread mixed monolayers at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 183(3), 447-457.
- Joos, P. (1970) Cholesterol as liquifier in phospholipid membranes studied by surface viscosity measurements of mixed monolayers. *Chem. Phys. Lipids* 4, 162-168.
- Jost, P.C. and O.H. Griffith (1980) Lipid-lipid and lipid-protein interactions in membranes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13(1), 155-165.
- Kamel, A.M., N.D. Weiner and A. Felmeister (1970) Interaction of nitrogen dioxide with cholesterol-lecithin mixed monolayers. *Atmos. Environ.* 4, 475-480.
- Kimizuka, H. and K. Koretsu (1962) Binding of calcium ion to lecithin film. *Nature* 196(4859), 995-996.
- Kimizuka, H., T. Nakahara, H. Vejo and A. Yamauchi (1967) Cation exchange properties of lipid films. *Biochim. Biophys. Acta* 137, 549-556.
- Klappauf, E. and D. Schubert (1977) Band 3-protein from human erythrocyte membranes strongly interacts with cholesterol. *FEBS Lett.* 80(2), 423-425.

- Klappauf, E. and D. Schubert (1979) Interactions of band 3-protein from human erythrocyte membranes with cholesterol and cholesterol analogues. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1225-1235.
- Klein, R.A. (1970) The detection of oxidation in liposome preparations. Biochim. Biophys. Acta 210, 486-489.
- Knudsen, P. and W.L. Hubbell (1978) Stability of rhodopsin in detergent solutions. Membr. Biochem. 1 (3-4), 297-322.
- Kossi, C.N. (1975) Propriétés physico-chimiques d'extraits purifiés de rhodopsine à l'état de monocouche. Thèse de Maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.
- Kunau, W.-H. and R.T. Holman (1977) Polyunsaturated fatty acids. American Oil Chemist's Society, Champaign.
- Kwong, C.N., R.E. Heikkila and D.G. Cornwell (1971) Properties of cholesteryl esters in pure and mixed monolayers. J. Lipid Res. 12(1), 31-35.
- Lea, C.H. (1955) Some observations on the preparation and properties of phosphatidyl ethanolamine. In "Biochemical problems of lipids" (edit. by J. Popjak and E. LeBreton) Proc. Intern. Conf., 2nd, Ghent, pp. 81-90. Butterworths Sci. Publications, London.
- Lecompte, M.-F. and I.R. Miller (1980) Interaction of prothrombin and Ca^{++} with phospholipid monolayers containing phosphatidyl serine. Adv. Chem. Ser. 188, 117-127.
- Lecompte, M.F., I.R. Miller, J. Elion and R. Benarous (1980a) Interaction of prothrombin and its fragments with monolayers containing phosphatidyl serine .1. Binding of prothrombin and its fragment I to phosphatidyl serine containing monolayers. Biochemistry 19(15), 3434-3439.
- Lecompte, M.F. and I.R. Miller (1980b) Interaction of prothrombin and its fragments with monolayers containing phosphatidyl serine .2. Electrochemical determination of lipid layer perturbation by interacting prothrombin and its fragments. Biochemistry 19(15), 3439-3446.
- Liebman, P.A., W.S. Jagger, M.W. Kaplan and F.G. Bargott (1974a) Membrane structure changes in rod outer segment associated with rhodopsin. Nature 251 (5470), 31-36.
- Liebman, P.A. and G. Entine (1974b) Lateral diffusion of visual pigment in photoreceptor disk membrane. Science 183, 457-459.
- Lin, H.-C., I. Veda, S.H. Lin, D.D. Shieh, H. Kamaya and H. Eyring (1980) Surface activities of tertiary amine local anesthetics at air-water interface in the presence and absence of phospholipid monolayers. Biochim. Biophys. Acta 598, 51-65.

- Litman, B.J., O. Kalisky and M. Ottolenghi (1981) Rhodopsin-phospholipid interaction: Dependence of the rate of the Meta I to the Meta II transition on the level of associated disk phospholipid. *Biochemistry* 20(3), 631-634.
- Llopis, J., A. Albert, J.L. Sain and D. Alonso (1973) Mixed monolayers of cholic acid and lecithin. In "Chemie, Physikalische Chemie und Anwendungstechnik der Grenzflächenaktiven Stoffe", Ber. Inst. Kong., 6th, Teil 1, pp. 339-350.
- Lodhi, S., N.D. Weiner and J. Schacht (1979) Interactions of neomycin with monomolecular films of polyphosphoinositides and other lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 557(1), 1-8.
- Luellmann, H., H. Plosch and A. Ziegler (1980) Ca replacement by cationic amphiphilic drugs from lipid monolayers. *Biochem. Pharmacol.* 29(21), 2969-2974.
- Lundberg, B. and S. Ekman (1979) Mixed monolayers containing phosphatidyl choline, cholesterol, oleic acid, mono- and triolein. *Acta Chem. Scand. B33*, 395-399.
- Maggio, B. and J.A. Lucy (1975) Studies on mixed monolayers of phospholipids and fusogenic lipids. *Biochem. J.* 149, 597-608.
- Maggio, B. and J.A. Lucy (1976) Polar-group behaviour in mixed monolayer of phospholipid and fusogenic lipids. *Biochem. J.* 155(2), 353-364.
- Maggio, B., A.T. Diplock and J.A. Lucy (1977) Interactions of tocopherols and ubiquinones with monolayers of phospholipids. *Biochem. J.* 161(1), 111-121.
- Maggio, B. and J.A. Lucy (1978) Interactions of fusogens with phospholipids in monolayers. *FEBS Lett.* 94(2), 301-304.
- Makino, M., T. Hamanaka, Y. Orii and Y. Kito (1977) Fractionation of rhodopsin and other components in the rod outer segment membrane by ammonium sulfate salting-out. *Biochim. Biophys. Acta* 495, 299-311.
- McCaslin, D.R. and C. Tanford (1981a) Effects of detergent micelles on the recombination reaction of opsin and 11-cis-retinal. *Biochemistry* 20, 5207-5212.
- McCaslin, D.R. and C. Tanford (1981b) Different states of aggregation for unbleached and bleached rhodopsin after isolation in two different detergents. *Biochemistry* 20, 5212-5221.
- Mendelsohn, R. (1972) Laser-Raman spectroscopic study of egg lecithin and egg lecithin-cholesterol mixtures. *Biochim. Biophys. Acta* 290(1), 15-21.

- Miljanich, G.P. (1978) Studies of the molecular organization of the vertebrate photoreceptor membrane. Ph.D. Dissertation, University of California, Santa Cruz.
- Miljanich, G.P., L.A. Sklar, D.L. White and E.A. Dratz (1979) Disaturated and dipolyunsaturated phospholipids in the bovine retinal rod outer segment disk membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 552, 294-306.
- Minones Trillo, J., G. Fernandez and P.S. Sanz Pedrero (1968) Studies on monolayers: mixed films of cholesterol lecithin with bile acids. *J. Colloid Interface Sci.* 26(4), 518-531.
- Minones, J., M.I. Sandez Macho, E. Iribarnegaray and J.Y.P. Sanz Pedrero (1979a) Effect of silicic acid on phospholipid monolayers .II. Interaction with synthetic cephalins. *Med. Segun. Trab.* 27 (106), 28-40.
- Minones, J., M.I. Sandez Macho, E. Iribarnegaray and J.Y.P. Sanz Pedrero (1979b) Effect of silicic acid on phospholipid monolayers .I. Interaction with synthetic lecithins. *Med. Segun. Trab.* 27(106), 40-47.
- Minones, J., M.I. Sandez Macho, E. Iribarnegaray and J.Y.P. Sanz Pedrero (1981a) Phospholipid monolayers .I. A comparative study of synthetic lecithin and cephalin monolayers spread on substrates of different pH. *Colloid Polym. Sci.* 259(3), 382-390.
- Minones, J., M.I. Sandez Macho, E. Iribarnegaray and J.Y.P. Sanz Pedrero (1981b) Phospholipid monolayers .II. Synthetic lecithin and cephalin monolayers on silicic acid substrates of different pH. *Colloid Polym. Sci.* 259(3), 450-461.
- Mombers, C., I. Degier, R.A. Demel and L.L.M. Van Deenen (1980) Spectrin-phospholipid interaction. A monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta* 603 (1), 52-62.
- Muller-Landau, F. and D.A. Cadenhead (1979a) Molecular packing in steroid-lecithin monolayers, Part I: Pure films of cholesterol, 3-doxyl-cholestane, 3-doxyl-17-hydroxyl-androstane, tetradecanoic acid and dipalmitoyl-phosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids* 25, 299-314.
- Muller-Landau, F. and D.A. Cadenhead (1979b) Molecular packing in steroid-lecithin monolayers, Part II: Mixed films of cholesterol with dipalmitoyl-phosphatidylcholine and tetradecanoic acid. *Chem. Phys. Lipids* 25, 315-328.
- Munden, J.W. and J. Swarbrick (1973a) Effect of spreading solvent on monolayer characteristics of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *J. Colloid Interface Sci.* 42, 657-659.
- Munden, J.W. and J. Swarbrick (1973b) Time dependent surface behavior of dipalmitoyl lecithin and lung alveolar surfactant monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 291, 344-350.

Munger, G. (1979) Détermination du poids moléculaire de protéine à l'interface air-eau par un nouveau système à faible pression de surface. Thèse de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.

Nakahara, H., K. Fukuda, H. Akutsu et Y. Kyogoku (1978) Monolayers and multilayers of phosphatidyl ethanolamine: Effects of spreading solvent, monovalent cations and substrate pH. *J. Colloid Interface Sci.* 65(3), 517-526.

Nejmeh, M. and N. Pilpel (1978) The effect of the photodecomposition of chlorpromazine on lecithin monolayers. *J. Pharm. Pharmacol.* 30, 748-753.

Nielsen, N.C., S. Fleischer and D.G. McConnell (1970). Lipids composition of bovine retinal outer segment fragments. *Biochim. Biophys. Acta* 211(1), 10-19.

Notter, R.H., S. Holcomb and R.D. Mavis (1980a) Dynamic surface properties of phosphatidyl glycerol-dipalmitoyl phosphatidyl choline mixed films. *Chem. Phys. Lipids* 27(4), 305-319.

Notter, R.H., S.A. Tabak, S. Holcomb and R.D. Mavis (1980b) Postcollapse dynamic surface pressure relaxation in binary surface films containing dipalmitoyl phosphatidyl choline. *J. Colloid Interface Sci.* 74(2), 370-377.

Notter, R.H., S.A. Tabak and R.D. Mavis (1980c) Surface properties of binary mixtures of some pulmonary surfactant components. *J. Lipid Res.* 21(1), 10-22.

O'Brien, D.F., L.F. Costa and R.A. Ott (1977) Photochemical functionality of rhodopsin-phospholipid recombinant membranes. *Biochemistry* 16(7), 1295-1303.

Ohki, S. and R. Sauve (1978) Surface potential of phosphatidyl serine monolayers .I. Divalent ion binding effect. *Biochim. Biophys. Acta* 511(3), 377-387.

Ohki, S. and N. Duzgunes (1979) Divalent cation-induced interaction of phospholipid vesicle and monolayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 552(3), 435-449.

Ohki, S. and R. Kurland (1981) Surface potential of phosphatidyl serine monolayers .II. Divalent and monovalent ion binding. *Biochim. Biophys. Acta* 645(2), 170-176.

Olive, J., E.L. Benedetti, P.J.G.M. Van Breugel, F.J.M. Daemen and S.L. Bonting (1978) Biochemical aspects of the visual process .XXXVII. Evidence for lateral aggregation of rhodopsin molecules in phospholipase-C treated bovine photoreceptor membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 509(1), 129-135.

- Olive, J. (1980) The structural organization of mammalian retinal disc membrane. *Int. Rev. Cytol.* 64, 107-169.
- Ostroy, S.C. (1977) Rhodopsin and the visual process. *Biochim. Biophys. Acta* 463, 91-125.
- Pagano, R.E. and N.L. Gershfeld (1973) Phase separation in the cholesterol-dipalmitoyl lecithin mixed films and the condensing effect. *J. Colloid Interface Sci.* 44(2), 382-383.
- Paltauf, F., H. Hauser and M.C. Philipps (1971) Monolayer characteristics of some 1,2-diacyl, 1-alkyl-2-acyl and 1,2-dialcyl phospholipids at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 249, 539-547.
- Panaiotov, I. (1973) Elasticité des films étalés monomoléculaires de l' α -dipalmitil lécithine et de cholestérol. In "Chemie, Physikalische Chemie Und Anwendungstechnik der Grenzflächenaktiven Stoffe", Ber. Int. Kong., 6th, Teil 1, 123-130.
- Panaiotov, I., D.S. Dimitrov and G.A. Georgiev (1980) Viscoelastic relaxation in mixed dipalmitoyl lecithin-serum albumin monolayers modelling the lung surface film. *Stud. Biophys.* 78(2), 95-102.
- Papahadjopoulos, D. (1968) Surface properties of acidic phospholipids: interaction of monolayers and hydrated liquid crystals with uni- and bivalent metal ions. *Biochim. Biophys. Acta* 163(2), 240-254.
- Patil, G.S., N.J. Dorman and D.G. Cornwell (1979) Effects of ionization and counterion binding on the surface areas of phosphatidic acids in monolayers. *J. Lipid Res.* 20, 663-668.
- Phillips, M.C. and D. Chapman (1968) Monolayer characteristics of saturated 1,2-diacyl phosphatidylcholine (lecithins) and phosphatidyl ethanolamine at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 163, 301-313.
- Phillips, M.C., B.D. Ladbrooke and D. Chapman (1970) Molecular interactions in mixed lecithin systems. *Biochim. Biophys. Acta* 196(1), 35-44.
- Phillips, M.C., M.T.A. Evans and H. Hauser (1973) Adsorption of a hydrophobic protein at the air-water interface and at liquid monolayers. In "Chemie, Physikalische Chemie Und Anwendungstechnik der Grenzflächenaktiven Stoffe", Ber. Int. Kong., 6th, Teil 1, pp. 381-391.
- Phillips, M.C. and H. Hauser (1974) Spreading of solid glycerides and phospholipids at the air-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 49(1), 31-39.
- Phillips, M.C., M.T.A. Evans and H. Hauser (1975a) Interaction of proteins with phospholipid monolayers. *Adv. Chem. Ser* 144, 217-230.
- Phillips, M.C., H. Hauser, R.B. Leslie and D. Oldam (1975b) A comparison of the interfacial interactions of the apoprotein from high density lipoprotein and B-casein with phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 406(3), 402-414.

- Poincelot, R.P. and J.Z. Zull (1969) Phospholipid composition and extractability of light- and dark-adapted bovine retinal rod outer segments. *Vision Res.* 9(6), 647-651.
- Poincelot, R.P. and E.W. Abrahamson (1970) Fatty acid composition of bovine rod outer segment and rhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* 202, 382-385.
- Poo, M. and R.A. Cone (1973) Lateral diffusion of rhodopsin in Necturus rods. *Exp. Eye Res.* 17(6), 503-510.
- Poo, M. and R.A. Cone (1974) Lateral diffusion of rhodopsin in the photoreceptor membrane. *Nature* 247(5441), 438-441.
- Proudfoot, S.G. and B.H. Davdani (1973) Observation on the time-dependent behaviour of monolayers of 1,2-dipalmitoyl-L-3-phosphatidyl ethanolamine. *J. Pharm. Pharmacol.* 25, Suppl. 159 p.
- Quinn, P.J. and R.M.C. Dawson (1969) Interactions of cytochrome c with monolayers of phosphatidylcholine, phosphatidic acid and cardiolipin. *Biochem. J.* 115, 65-75.
- Quinn, P.J. and R.M.C. Dawson (1970) An analysis of the interaction of protein with lipid monolayers at the air-water interface. *Biochem. J.* 116(4), 671-680.
- Quinn, P.J. (1980) The interaction of coenzyme Q with phospholipid monolayers. *Biochem. Int.* 1(1), 77-83.
- Ries, H.E. Jr., M. Matsumoto, N. Oyeda and E. Siato (1975) Electron microscope studies of monolayers of lecithin. *Adv. Chem. Ser.* 144, 286-293.
- Ries, H.E. Jr. (1979) Monolayers of mitochondrial and bacterial cardiolipins. *J. Colloid Interface Sci.* 71(3), 625-627.
- Roels, O.A. and D.O. Shah (1969) Molecular interactions in lecithin-retinol monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 29(2), 279-287.
- Rogeness, G.A., L.G. Krugman and L.G. Abood (1966) The interaction of the psychomimetic glycolate esters with adenosine triphosphate, calcium and lecithin monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 125, 319-327.
- Rojas, E. and J.M. Tobias (1965) Membrane model: Association of inorganic cations with phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 94, 394-404.
- Rojas, E., J.Y. Lettrin and W.F. Pickard (1966) A demonstration of ion-exchange phenomena in phospholipid mono-molecular films. *Nature* 209 (5026), 886-887.

- Rouser, G., G. Kritchevsky, A. Yamamoto, G. Simon, C. Galli, and A.J. Bauman (1969) DEAE and TEAE cellulose column chromatographic procedures for phospholipids, glycolipids and pigments. In "Methods in Enzymology" (edit. by J.M. Lowenstein), vol. 14, pp. 272-317. Academic Press, New York.
- Ryu, E.K. and M. MacCoss (1979) Modification of the Dittmer-Lester reagent for the detection of phospholipid derivatives in thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.* 20(5), 561-563.
- Saibil, H., M. Chabre and D. Worcester (1976) Neutron diffraction studies of retinal rod outer segment membranes. *Nature* 262 (5566), 266-270.
- Salesse, C. (1979) Isolation et purification des phospholipides des segments externes des bâtonnets des rétines bovines. Rapport de stage, Université du Québec à Trois-Rivières.
- Schaubman, R. and A. Felmeister (1968) Interaction of a photosensitizer with dipalmitoyl lecithin. *J. Pharm. Sci.* 57(1), 178-180.
- Schubert, D. and E. Klappauf (1980) Interactions of band 3-protein from human erythrocyte membranes with phospholipid monolayers at the air-water interface. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1171-1177.
- Seelig, J., R. Dijkman and G.H. de Haas (1980) Thermodynamic and conformational studies on Sn-2-phosphatidyl cholines in monolayers and bilayers. *Biochemistry* 19, 2215-2219.
- Seimiya, T. and S. Ohki (1972) Absorption and desorption studies of phospholipid at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 274(1), 15-21.
- Seimiya, T. and S. Ohki (1973) Ionic structure of phospholipid membranes and binding of calcium ions. *Biochim. Biophys. Acta* 298(3), 546-561.
- Seimiya, T., M. Ashida, Y. Heki, T. Muramatsu, I. Hara and M. Hayashi (1976) Critical structure formation in ampholytic phospholipid monolayers as analysed by calcium binding characteristics. *J. Colloid Interface Sci.* 55(2), 388-395.
- Seimiya, T., M. Ashida, T. Muramatsu, I., I. Hara and M. Hayashi (1978) Temperature dependent ionic structure of phospholipid monolayers on aqueous phase. *Chem. Phys. Lipids* 22, 221-226.
- Seimiya, T., Y. Keki and H. Oohinata (1981) The interaction among the polar head groups in ampholytic phospholipid monolayer as analyzed by surface potential and radio tracer measurements of counterion binding. *Colloid Surf.* 3, 37-50.

- Shah, D.O. and J.H. Schulman (1965) Binding of metal ions to monolayers of lecithins, plasmalogen, cardiolipin and diacetyl phosphate. *J. Lipid Res.* 6, 341-349.
- Shah, D.O. and J.H. Schulman (1967a) Influence of calcium, cholesterol and unsaturation on lecithin monolayers. *J. Lipid Res.* 8(3), 215-226.
- Shah, D.O. and J.H. Schulman (1967b) The ionic structure of lecithin monolayers. *J. Lipid Res.* 8(3), 227-238.
- Shah, D.O. and J.H. Schulman (1967c) The ionic structure of sphingomyelin monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 135, 184-187.
- Shah, D.O. and J.H. Schulman (1967d) Interaction of calcium ions with lecithin and sphingomyelin monolayers. *Lipids* 2(1), 21-27.
- Shah, D.O. and J.H. Schulman (1967e) Enzymic hydrolysis of various lecithin monolayers employing surface pressure and potential technique. *J. Colloid Interface Sci.* 25(1), 107-119.
- Shah, D.O. (1969) Interaction of uranyl ions with phospholipid and cholesterol monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 29, 210-215.
- Shah, D.O. (1970) The effect of potassium permanganate on lecithin and cholesterol monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 211(2), 358-361.
- Shichi, H. (1971) Biochemistry of visual pigments. II. Phospholipid requirement and opsin conformation for regeneration of bovine rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 246(20), 6178-6182.
- Shichi, H., S. Kawamura, C.G. Muellenberg and T. Yoshizawa (1977) Isochromic forms of rhodopsin. Isolation and photochemical properties. *Biochemistry* 16, 5376-5380.
- Shimojo, T. and T. Ohnishi (1967) Studies on membrane model. I. Surface pressure and surface potential of pure phospholipid monolayers. *J. Biochem.* 61(1), 89-95.
- Simon, S.A., L.J. Lis, J.W. Kauffman and R.C. MacDonald (1975) A calorimetric and monolayer investigation of the influence of ions on the thermodynamic properties of phosphatidyl choline. *Biochim. Biophys. Acta* 375, 317-326.
- Simpson, P.B. and R.C. Oppenheim (1977) Phospholipid monolayers and systemic *lupus erythematosus*. *N. Z. Med. J.* 86(591), 19-20.
- Sjostrand, F.S. (1959) The ultrastructure of the retinal receptors of the vertebrate eye. *Ergeb. Biol.* 21, 128-160.
- Skidmore, W.D. and C. Entenman (1962) Two-dimensional thin-layer chromatography of rat liver phosphatides. *J. Lipid Res.* 3(4), 471-475.

Smith, I.C.P. (1971) A spin label study of the organization and fluidity of hydrated phospholipid multibilayers - a model membrane system. *Separam of Chimia* 25(11), 349-360.

Smith, I.C.P., A.P. Tulloch, G.W. Stockton, S. Schreier, A. Joyce, K.W. Butler, Y. Boulanger, B. Blackwell and L.G. Bennett (1978) Determination of membrane properties at the molecular level by carbon-13 and deuterium magnetic resonance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 308, 8-28.

Smith, R.D. and J.C. Berg (1980) The collapse of surfactant monolayers at the air-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 74(1), 273-285.

Snik, A.F.M., A.J. Kruger and P. Joos (1978) Dynamical behaviour of monolayers of dipalmitoyl lecithin and cholesterol. *J. Colloid Interface Sci.* 66(3), 435-439.

Standish, M.M. and B.A. Pethica (1967) Interactions in phospholipid cholesterol mixed monolayers at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 144(3), 659-665.

Standish, M.M. and B.A. Pethica (1968) Surface pressure and surface potential study of a synthetic phospholipid at the air-water interface. *Trans. Faraday Soc.* 64(4), 1113-1122.

Stoffel, W. and H.-D. Pruss (1969) Monolayer studies with synthetic saturated mono- and polyunsaturated mixed 1,2-diglycerides, 1,2 diacyl-phosphatidyl ethanolamines and phosphatidyl cholines at the air-water interface. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350, 1385-1393.

Stone, W.L., C.C. Farnsworth and E.W. Dratz (1979) A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog retinal rod outer segments. *Exp. Eye Res.* 28, 387-397.

Stubbs, G.W. and B.J. Litman (1978) Effect of alterations in the amphipathic microenvironment on the conformational stability of bovine opsin .2. Rate of loss of rhodopsin regenerability. *Biochemistry* 17(2), 220-225.

Tabak, S.A. and R.H. Notter (1977) Effect of plasma proteins on the dynamic π -A characteristics of saturated phospholipid films. *J. Colloid Interface Sci.* 59(2), 293-300.

Tabak, S.A., R.H. Notter and J.S. Ultman (1977) Relaxation effects in the surface pressure behavior of dipalmitoyl lecithin. *J. Colloid Interface Sci.* 60(1), 117-125.

Tamai, Y., S. Matsukawa and M. Salake (1971) Lipid composition of nerve cell *perikarya*. *Brain Res.* 26, 149-157.

Tancrède, P., G. Chauvette and R.M. Leblanc (1981) General method for the purification of lipids for surface pressure studies. Application to monogalactosyldiglyceride. *J. Chromatogr.* 207, 387-393.

- Taylor, J.L. and D.A. Haydon (1965) The interaction of progesterone with lipid films at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 94, 488-493.
- Teissié, J., J.F. Tocanne and A. Baudras (1976) Phase transitions in phospholipid monolayers at the air-water interface: A fluorescence study. *FEBS Lett.* 70(1), 123-126
- Teissié, J. (1979a) A fluorescence study with polarised incident light of the compression of phospholipid monolayers spread at the air-water interface: orientation processes in the glycerol region. *Chem. Phys. Lipids* 15(2), 209-215.
- Teissié, J. (1979b) Fluorescence studies of 1,8-anilino-naphthalene sulfonate binding to lecithin monolayers spread at the air-water interface: Effects of the compression state of the film and of the ionic content of the sub-phase. *J. Colloid Interface Sci.* 70(1), 90-96.
- Ter-Minassian-Saraga, L., I. Panaiotov and J.S. Abitoul (1979) Dynamics of insoluble monolayers. III. Dynamic surface potentials of elastic and viscoelastic monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* 72(1), 54-58.
- Ter-Minassian-Saraga, L. (1981) Cooperativity of an acid phospholipid reaction with basic hydrophobic polyelectrolytes or with the apoprotein proteolysed from myelin. II. Collapse and respreading of the mixed films. *J. Colloid Interface Sci.* 79(1), 222-236.
- Thomas, C. and L. Ter-Minassian-Saraga (1978) Mixed films of a structural myelin protein and acidic phospholipid. Part II. Effect of lipid/protein ratio monolayer surface potential. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 5, 363-387.
- Tinoco, J. and D.J. McIntosh (1970) Interactions between cholesterol and lecithins in monolayers at the air-water interface. *Chem. Phys. Lipids* 4, 72-84.
- Tocanne, J.F., P.H.J. Th. Ververgaert, A.J. Verklei and L.L.M. Van Deenen (1974) A monolayer and freeze-etching study of charged phospholipids .1. Effects of ions and pH on the ionic properties of phosphatidyl glycerol and lysophosphatidyl glycerol. *Chem. Phys. Lipids* 12, 201-219.
- Torosian, G. and A.P. Lemberger (1969) Studies on surface films of soybean lecithin III: the effect of lysolecithin monolayers at the air-water interface. *J. Pharm. Sci.* 58(7), 864-866.
- Turcotte, J.G., A.M. Sacco, J.M. Steim, S.A. Tabak and R.H. Notter (1977) Chemical synthesis and surface properties of an analog of the pulmonary surfactant dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 488, 235-248.

Van Breugel, P.J.G.M., P.H.M. Geurts, F.J.M. Daemen and S.L. Bonting (1978) Biochemical aspects of the visual process .XXXVIII. Effect of lateral aggregation on rhodopsin phospholipase-C treated photoreceptor membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 509, 136-147.

Van Deenen, L.L.M., U.M.T. Houstmuller, G.H. de Haas and E. Mulder (1962) Monomolecular layers of synthetic phosphatides. *J. Pharm. Pharmacol.* 14, 429-444.

Vilallonga, F.A., R. Altschul and M.S. Fernandez (1967) Free energy of mixing phospholipids and cholesterol at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 135, 557-559.

Vilallonga, F.A. (1968) Surface chemistry of L- α -dipalmitoyl lecithin at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta* 163, 290-300.

Vilallonga, F.A., M. Fernandez, C. Rotanno and M. Cereijido (1969) The interactions of L- α -dipalmitoyl lecithin monolayers with Na⁺, K⁺, Li⁺, and its possible role in membrane phenomena. *Biochim. Biophys. Acta* 183(1), 98-109.

Vilallonga, F.A., E.R. Garrett and M. Cereijido (1972) Kinetics and mechanisms of monolayer interactions I: cetyl sulfate and citremonium ions interacting with dipalmitoyl lecithin and dipalmitoyl glycerol. *J. Pharm. Sci.* 61(1), 1720-1727.

Vilallonga, F.A. and E.R. Garrett (1973) Kinetics and mechanisms of monolayer interactions II: Effect of chain length of alkyl ionic surfactant and their interaction with dipalmitoyl glycerol, dipalmitoyl phosphatidylethanolamine and dipalmitoyl lecithin. *J. Pharm. Sci.* 62(10), 1605-1609.

Vilallonga, F.A., E.R. Garrett and J.S. Hunt (1977) Kinetics and mechanisms of monolayer interactions IV: Surface activity of alkanols and energies of their interaction with dipalmitoyl lecithin and dipalmitoyl phosphatidylethanolamine. *J. Pharm. Sci.* 66, 1229-1234.

Vilallonga, F.A. and E.W. Phillips (1978) Interaction of doxoribicin with phospholipid monolayers. *J. Pharm. Sci.* 67(6), 773-775.

Vilallonga, F.A. and E.W. Phillips (1979) Surface activities of procaine, lidocaine, and tetracaine and their interaction energies with phospholipid monolayers. *J. Pharm. Sci.* 68(3), 314-316.

Vilallonga, F.A. and E.W. Phillips (1980a) Kinetics and mechanisms of monolayer interactions V: Surface activities of alkylamides, alkylmonocarboxylic acids and alkylketones and their interaction energies with phospholipid monolayers. *J. Pharm. Sci.* 69(1), 65-71.

Vilallonga, F.A. and E.W. Phillips (1980b) Surface activities of barbital, phenobarbital and pentobarbital and their interaction energies with phospholipid monolayers. *J. Pharm. Sci.* 69(1), 102-104.

Watkins, J.C. (1968) The surface properties of pure phospholipids in relation to those of lung extracts. *Biochim. Biophys. Acta* 152, 293-306.

Weiner, N.D., I. Chawdry and A. Felmeister (1971) Interaction of 3-methylcholanthrene with lecithin-cholesterol mixed films. *J. Pharm. Sci.* 60, 425-428.

Yckowski, N. and S.S. Brody (1974) Interactions of monomolecular films of retinal at alkaline pH. *Z. Naturforsch., Teil C* 29(7-8), 327-335.

Zatz, J.L. and G.W. Cleary (1975) Molecular arrangement in monolayers containing cholesterol and dipalmitoyl lecithin. *J. Pharm. Sci.* 64(9), 1534-1537.

Zografis, G., R. Vergen and G.H. de Haas (1971) Kinetic analysis of the hydrolysis of lecithin monolayers by phospholipase A. *Chem. Phys. Lipids* 7, 185-206.

ANNEXE I

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Anderson et Pethica (1955)	20	1 M et 5 M NaCl, pH: 5, 7, 8 et 10	Benzène:propanol(95:5, v:v)	Lécithine
Kimizuka et Koretsu (1962)	--	Bicarbonate de sodium pH 8,2±0,1	Ether de pétrole	DPaL Lécithine (animale)
van Deenen et coll. (1962)	21-24	Tampon phosphate, pH 7,4 ou tampon phosphate-citrate, pH 4,0	CHCl ₃	DACL, DBuL, DHeL, DDeL, DTL, DPeL, DSL, DTeL, DUdL, DOLL, SL ₂ L, LaSL, OLSL, SOLL, DSPE, SOLPE, OLSPE, DSPS, SLaPS, DSPA
Rojas et Tobias (1965)	25±2	H ₂ O, pH 5,7	CHCl ₃	PE, PS et PC (naturelles)
Shah et Schulman (1965)	25	0,02 M NaCl pH 5,6	Hexane:éthanol (4:1, v:v)	DPaPC, Lécithine (oeuf), cardiolipine, lécithine (yeast)
Taylor et Haydon (1965)	25	H ₂ O	CHCl ₃ - benzène, éther de pétrole-éthanol (10%, v:v)	PC (ev ovo) DPaPC
Bangham et Papahadjopoulos (1966)	--	1 M CaCl ₂ ou MgCl ₂ et 130 mM KCl, NaCl ou LiCl et 14,5 mM Tris-HCl, pH 7,4	Ether de pétrole	PS (cerveau boeuf)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Chapman et coll. (1966)	20	0,5 M NaCl pH 5,3	CHCl ₃ :éthanol (70:30, v:v)	SELPE, OLSPE, DELPC, ELSPC, OLSPC, DOLPE, DELPE
Hyono et Kariyama (1966)	--	KCl, BaCl ₂ , NaCl, CaCl ₂	Benzène	Lécithine (oeuf)
Rogeness et coll. (1966)	25±1	NaCl, F.I. 10,5 Sodium phosphate, pH 7,6 HCl, pH 3	Ether de pétrole: propanol (5%)	DPaL
Rojas et coll. (1966)	--	0,1 m mole CaCl ₂ pH 6,00	--	PS
Cadenhead et coll. (1967)	1,0-13,1-23,4 et 37,4 (DCM) 0,8-5,0-12,3 et 23,5 (DML)	0,15 M NaCl pH 5,3 10 ⁻⁵ M CaCl ₂ et EDTA, pH 5,7	Hexane:éthanol (10:1, v:v)	DMC et DML
Demel et coll. (1967)	22	H ₂ O, pH 5,4	CHCl ₃ , CHCl ₃ :éthanol (7:3, v:v)	DPaPE, DSL, DTL, SLaL, DDeI, SOLL, BuOLL, DOLL, DLiL, LiSL, DLnL, SOLPE, PaLiPE, PaLnPE, LnPaPE
Dreher et coll. (1967)	--	0,01 M NaCl OsO ₄ (0,5 à 2 %)	--	DPaL et lécithine (oeuf)
Galdston et Shah (1967)	25±1	0,9 % NaCl pH 5,6	CHCl ₃ :méthanol (1:3, v:v)	DPaL

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Hauser et Dawson (1967)	-	H ₂ O, pH 5,5 ou 0,9% NaCl	CHCl ₃ :éther	Lécithine (yeast), PA
Hersh (1967)	25,3±0,3	Tampon phosphate 5 mM, pH 6,8	Hexane-éthanol (4:1, v:v)	DPaL
Kimizuka et coll.(1967)	25±1	NaHCO ₃ et NH ₄ Cl pH 2-10	Ether de pétrole, éther de pétrole:propa- nol (2%)	Lécithine (oeuf, anima- le), PE,C (graine de soja), DPaL
Shah et Schulman (1967a)	25	0,02 M NaCl ou 0,01 M CaCl ₂ , pH 5,6	CHCl ₃ :CH ₃ OH:Hexane (1:1:3, v:v:v)	PC (oeuf) DPaPC, PA
Shah et Schulman (1967b)	25	10 ⁻¹ M NaCl et/ou 10 ⁻⁴ M CaCl ₂ , pH 5,6	CHCl ₃ :CH ₃ OH:Hexane (1:1:3, v:v:v)	PC (oeuf), DPaPC, PA
Shah et Schulman (1967c)	25	0,02 M NaCl, 0,01 M de CaCl ₂ MgCl ₂ , SnCl ₂ ou CaCl ₂ et 0,0066 M AlCl ₃ , pH 5,6	CHCl ₃ :CH ₃ OH:Hexane (1:1:3, v:v:v)	DPaPC et Sph
Shah et Schulman (1967d)	25	0,02 M NaCl, 0,01 M CaCl ₂ , pH 5,6	CHCl ₃ :CH ₃ OH:Hexane (1:1:3, v:v:v)	DPaL et Sph
Shah et Schulman (1967e)	25	Tris-citrate 0,05 M, pH 7,2+ 0,02 M NaCl 0,01 M CaCl ₂	CHCl ₃ :CH ₃ OH:Hexane (1:1:3, v:v:v)	DPaL, lécithine (AG, oeuf et de soja) DOLL

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-Phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Shimojo et Ohnishi (1967)	20	Tris-HCl 1 mM, pH 7,0	Benzène	PC(oeuf), PE et PI(foie boeuf), PS et Sph(érythrocyte boeuf), cardiolipine (coeur boeuf)
Standish et Pethica (1967)	20	145 mM NaCl, pH 7,4 et 0,1 M NaCl, pH 5,4	CHCl ₃ :éthanol (2,5:1,0, v:v), CHCl ₃	DSPE, DMPC
Vilallonga et coll. (1967)	20	Tampon phosphate pH 7,2 F.I. 0,15	éther de pétrole:éthanol (20%, v:v)	DPaL, DPaC
Demel et coll. (1968)	22	H ₂ O	-	SOLPC, lécithine (oeuf)
Demel et Joos (1968)	-	H ₂ O	-	SOLL, DPaL
Felmeister et coll. (1968)	25±1	0,9% NaCl	Hexane:éthanol (95:5, v:v) hexane:éthanol (99:1, v:v)	DPaL, lécithine (oeuf)
Minones Trillo et coll. (1968)	-	pH ajusté avec HCl	Ether de pétrole:éthanol (80:20, v:v) +0,2% (v) amyl alcool	DPaL
Papahadjopoulos (1968)	-	145 mM KCl, NaCl ou LiCl, 14,5 mM Tris-HCl, pH 7,4 1 M CaCl ₂ , MgCl ₂ ou BaCl ₂	éther de pétrole	PS et PI (cerveau boeuf) PA, PC et PE (oeuf)
Phillips et Chapman (1968)	6,2; 12,4; 16,8; 21,1; 22,0; 26,0; 29,5; 34,6	0,1 M NaCl	Hexane:éthanol (4:1, v:v)	DBeL, DCaL, DML, DSPE, DSL, DMPE, DPaL, DLaPE et DCaPE

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-Phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Schaubman et Felmeister (1968)	25	0,001 M HCl, pH 3,0 ou tampon acétate, 0,1 M, pH 6,0	Hexane:éthanol (95:5, v:v)	DPaPC
Standish et Pethica (1968)	23	0,01 M NaCl, Al ₂ (SO ₄) ₃ , UO ₂ (NO ₃) ₂ , CaCl ₂ , KCl; pH 1,0-11,0	CHCl ₃ :éthanol (2,5:1,0, v:v)	DPaPE
Vilallonga (1968)	25,35,45	H ₂ O, pH 5,6-5,8	Ether de pétrole:éthanol (8:2, v:v)	DPaPC
Watkins (1968)		160 mM NaCl	Ether de pétrole:CHCl ₃ (1:2,3, v:v), méthanol, éthanol, benzène	DPaPC, DSPC, DMPC, DMPE, DSPE, Sph, PC (oeuf)
Chapman et coll. (1969)	24	0,1 M NaCl	Hexane, hexane:éthanol, CHCl ₃ :éthanol	DMPE, SOLPE, SPtPE
Feilmeister et Schaubman (1969)	25	Tampon acétate, pH 5,9, F.I.:0,1	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaL
Joos et Demel (1969)	20	H ₂ O, pH 5,4	CHCl ₃ ou CCl ₄	DLiL, DPaL, DLaL, DML, DSL, DDeL, DUL, DNL, DOcL, OLSL, DOLL
Quinn et Dawson (1969)	17	10 mM NaCl	-	PC(oeuf), PA et cardioline
Roels et Shah(1969)	25	0,02 M NaCl, pH 6,0	Hexane:éthanol (8:2, v:v)	DPaL, lécithine (oeuf)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Shah (1969)	25	10^{-3} M uranyl acetate, pH 4,8 $2 \cdot 10^{-3}$ M NaCl, pH 6,0	CHCl ₃ :CH ₃ OH:hexane (1:1:3, v:v)	DPaL, DPaPA, lécithine (oeuf)
Stoffel et Pruss (1969)	25	H ₂ O, pH 5,8	Benzène	DSPE, SOLPE, DOLPE, SLnPE, DSPC, SOLPC, DOLPC, SLnPC, SLiPC, SArPC, SArPE, DPaPE
Torosian et Lemberger (1969)	25,0±0,5	H ₂ O	Benzène	Lécithine (graine de soja)
Vilallonga et coll. (1969)	25,0 35,0 45,0 ± 0,2	H ₂ O, pH 5,6-5,8 0,15 M KCl, NaCl, LiCl	Ethanol:éther de pétrole (2:8, v:v)	DPaL
Joos (1970)	-	-	CCl ₄	DSL, OLSL
Kamel et coll. (1970)	-	Tampon phosphate 0,065 M, pH 7,0	Hexane:éthanol (95:5, v:v)	DPaL, lécithine (oeuf)
Phillips et coll. (1970)	22	0,1 M NaCl	-	DOLPC, DSPC, DPaPC
Quinn et Dawson (1970)	-	Tampon phosphate 40 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl	-	PC et PE (oeuf)
Shah (1970)	25	0,02 M NaCl, pH 6,0	-	DPaL, lécithine (oeuf)
Tinoco et McIntosh (1970)	-	H ₂ O, pH 5,2	CHCl ₃ ou CHCl ₃ :benzène	DPaL, SLiL, PaLiL, DSL, lécithine (foie de rat, AG)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Colacicco (1971)	25	0,01 M NaCl, 0,01 M CaCl ₂	-	DPaL, DML
Ghosh et coll. (1971)	22±1	H ₂ O, pH 5,2	CHCl ₃ ou CHCl ₃ :benzène	DPaL, DSL, PaLiL, PaLnL, PaArL, SLnL, SArL
Kwong et coll. (1971)	25-27	0,01 M NaCl	Hexane	PC (oeuf)
Paltauf et coll. (1971)	22,5±0,5	0,1 M NaCl pH 5	Hexane:éthanol	OtOlPE, DHPC, DOtPC, OtOlPC, DPaL, DSL, DOlL, SOlL, SOLPE
Weiner et coll. (1971)	-	0,9 % NaCl	Hexane	Lécithine (oeuf)
Zografis et coll. (1971)	25	H ₂ O	CHCl ₃ , benzène	PC
Demel et coll. (1972a)	25	H ₂ O	CHCl ₃	OlSL
Demel et coll. (1972b)	22	H ₂ O	CHCl ₃	DSL, OlSL, SOlL, PaLiL, LiPaL, PaLnL, PaArL, PaDcL, DLiL, DLnL
Gershfeld et Pagano (1972)	23±1	H ₂ O, pH 5,8 et ajusté à pH 2,0 avec HCl lorsque nécessaire	-	DPaL
Ghosh et Tinoco (1972)	22±1	H ₂ O	Benzène:CHCl ₃	DPaL, PaOlL, PaLiL, PaLnL, PaArL, DSL, SLiL, SLnL.

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Hayashi et coll. (1972)	22±1	0,1 M NaCl et 0,1 M tampon, pH 2,4; 5,0; 5,4; 9,5	CHCl ₃ :CH ₃ OH (8:2, v:v) Hexane:éthanol (8:2, v:v)	DPaPE, DPaPC
Seimiya et Ohki (1972)	25-45	H ₂ O, pH 5,5-6,0	Benzène	PS (cerveau boeuf, AG)
Vilallonga et coll. (1972)	22±1	H ₂ O, pH 5,6-6,0	Hexane saturée d'eau	DPaPC, DPaPG
Belmonte et Swarbrick (1973)	25	0,9% NaCl ou H ₂ O	CHCl ₃	DPaPC
Brody (1973)	15	Tampon phosphate pH 6,0 et NaCl, F.I.: 0,1	Hexane	PE
Colacicco (1973)	25	0,01 M NaCl ou 0,01 M CaCl ₂ et 0,001 M NaCl	Hexane:éthanol (80:20, v:v) CHCl ₃ :CH ₃ OH (85:15, v:v)	PC (oeuf), Sph (coeur de boeuf)
De Kruyff et coll. (1973)	22	H ₂ O, pH 5,4	CHCl ₃	PaO _l PC, DPaPC, DSPC, DO _l PC, SO _l PC, DE _l PC, PaSPC
Finer et Phillips (1973)	22,0±0,2	0,1 M NaCl, pH 5	Hexane:éthanol (4:1, v:v), CHCl ₃	DLaPE, DSL, DML, lécithine (oeuf)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Ghosh et coll. (1973)	22±1	H ₂ O, pH 5,4	CHCl ₃ :CH ₃ OH	DPaL, PaArL, DLiL, DLnL, LnPaL, SLnL, SDcL, BeLiL, SARL, ArLiL, PaDcL, PaErL, PaBeL, BeSL, DSL, SLiL, PaLiL
Hauser et Phillips (1973)	20±1	NaCl, CaCl ₂	-	Lécithine (oeuf), PS (cerveau boeuf)
Hayashi et coll. (1973)	10-35	0,1 M NaCl, 0,01 M Tampon acétate, pH 5,5	CHCl ₃ :CH ₃ OH (8:2, v:v)	DPaPE, DPaPC, DPaPA
Hendrikkx et Terminassian-Saraga (1973)	-	0,1 M KH ₂ PO ₄ -NaOH pH 7,0	Cyclohexane	Lécithine (oeuf)
Llopis et coll. (1973)	20,30,35,40	3 M NaCl-0,01 M HCl, pH 1,5	Amyl alcool:éther de pétrole	Lécithine, DPaPC
Munden et Swarbrick (1973a)	25	H ₂ O	Hexane:CHCl ₃ (1:1, v:v) CHCl ₃ :benzène (1:3, v:v) CH ₃ OH:hexane (3:2, v:v) Ethanol:hexane(3:2, v:v) CHCl ₃ CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:3, v:v)	DPaPC
Munden et Swarbrick (1973b)	25	0,9% NaCl	Hexane-éthanol (9:1, v:v)	DPaPC

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Pagano et Gershfeld (1973)	25	H ₂ O, pH 5,8	-	DPaL
Panaiotov (1973)	20,0±0,5	0,1 M NaCl, pH 6	CHCl ₃	DPaL
Phillips et coll. (1973)	23±1	Tampon phosphate pH 7	Hexane:éthanol	DML, DBeL
Proudfoot et Davdani (1973)	25,0±0,2	0,1 M HCl	-	DPaPE
Seimiya et Ohki (1973)	25±1	pH contrôlé avec Tris-HCl	Benzène	PS (cerveau boeuf), PE et PC (oeuf)
Vilallonga et Garrett (1973)	22	H ₂ O, pH 5,6-6	Hexane saturé d'eau	DPaPE, DPaPC et DPaPG
Cadenhead et coll. (1974)	20,5 21,5	pH 6 et pH 2 avec HCl	Hexane:éthanol (10:0, 9:1, 66:44, 1:1, 2:3, 3:7, 1:9, 0:10, v:v)	DPaPC
Cadenhead et Kellner (1974)	22	H ₂ O	CHCl ₃ , Freon TF:éthanol, Hexane:éthanol (9:1, v:v) Freon TMC, Freon TC	DPaPC
Colacicco et coll. (1974)	25	150 mM NaCl ou 75 mM CaCl ₂	CHCl ₃ :CH ₃ OH (85:15, v:v)	DPaL, lécithine (oeuf)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Phillips et Hauser (1974)	20,0-70,0±0,2	0,1 M NaCl	Hexane:éthanol (4:1, v:v)	DMPE, DLaPE, DELPE, DML, DLaL, DOlL
Tocanne et coll. (1974)	20	10 mM tampon AcOH- Tris, pH 2-10, 100 mM NaCl	CHCl ₃ :CH ₃ OH (8:2, v:v)	PG PG (<i>S. aureus</i>)
Yckowski et Brody (1974)	15	Tampon glycine pH 10,5, F.I.:0,1	Benzène, CHCl ₃	PE et PS
Demel et coll. (1975)	37	10 ⁻² M Tris-acétate, pH 7,4, 1 et 10 mM CaCl ₂ , 0,1 mM ZnCl ₂ , 0,25 mM MgCl ₂	-	PS et Sph (cerveau porc), PaOlPC
Hauser et coll. (1975)	20±1	H ₂ O, pH 5,5	Hexane:éthanol (4:1, v:v)	Lécithine (oeuf)
Hayashi et coll. (1975)	25 24,3	0,1 M NaCl, pH 5,5 et tampon acétate	-	DPaPE, DSPC
Hui et coll. (1975)	9-44	10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 2 mM TES, 2 mM His- tidine, pH 7,4	CHCl ₃ :CH ₃ OH (9:1, v:v)	DPaPC
Maggio et Lucy (1975)	23±1	145 mM NaCl, pH 5,6	Ether de pétrole CHCl ₃	DPaPRE, DPaPRC, SOlPC, DSPRC, PC et PE (oeuf), Sph (cerveau boeuf)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Phillips et coll. (1975a)	22,0±0,2	Tampon phosphate, pH 7	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DBeL, DPaC, lécithine (oeuf), PE, PS (cerveau boeuf)
Phillips et coll. (1975b)	22±2	0,01 M Na ₂ HPO ₄ , pH 8,3	Hexane:éthanol	PS (cerveau boeuf), PC(oeuf) DMPE, DBePC, DSPC, DPaPC, DMPC, DDePC
Ries et coll. (1975)	20,0; 24,6; 26,9; 27,6	H ₂ O, pH 7,0	CHCl ₃	DPaL
Simon et coll. (1975)	16,0-44,0±0,3	H ₂ O, 10 ⁻⁴ M HCl (pH 4,0), 1 M LiCl et NaCl, 1 et 3,5 M KCl, 1 et 3 M KI, 1 et 5 M KSCN, 1 M acétate, 1 M MgCl ₂ , SrCl ₂ et BaCl ₂ , 10 ⁻⁴ , 10 ⁻³ , 10 ⁻² , 10 ⁻¹ , 1, 2 et 3 M CaCl ₂ , 10 ⁻³ , 10 ⁻² , 10 ⁻¹ , 1 et 2 M CdCl ₂	Ether de pétrole:éthanol (9:1, v:v)	DPaL, DML
Zatz et Cleary (1975)	25, 37	0,9 % NaCl	Hexane:éthanol (4:1, v:v)	DPaL
Cadenhead et coll. (1976)	23	H ₂ O	Freon-TE	DPaPC
Colacicco et coll. (1976)	-	0,15 M NaCl	CHCl ₃ :CH ₃ OH (85:15, v:v)	DML, DPaL, DSL
Faiman et coll. (1976)	-	H ₂ O	Hexane-éthanol (9:1, v:v)	DPaL

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Maggio et Lucy (1976)	23±1	145 mM NaCl, pH 5,6	-	DPaPRC, DPaPRE
Seimiya et coll. (1976)	30	pH ajusté avec (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃) et HCl	CHCl ₃ :éthanol (3:1, v:v)	DPaPE
Teissié et coll. (1976)	20,0±0,5	0,1 M NaCl, pH 6,0	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC
Cadenhead et coll. (1977)	23, 39	H ₂ O	Hexane:éthanol (10:1, v:v)	DPaPC
Colacicco et Basu (1977)	25, 37	0,15 M NaCl	CHCl ₃ :CH ₃ OH (85:15, v:v)	DPaL
Gershfeld et Tajima (1977)	25,5 et 20-30	H ₂ O, pH 5,8	CHCl ₃	DML
Horn et Gershfeld (1977)	7,4-42	H ₂ O	CHCl ₃	DPaPC, DMPC
Klappauf et Schubert (1977)	22±0,5	100 mM NaCl et tampon phosphate 100 mM, pH 7,1	CHCl ₃	PC et PE (oeuf) Sph (bovine) PS (moelle épinière)
Maggio et coll. (1977)	27±1	H ₂ O	CHCl ₃ , éther de pétrole	DPaPRE, DPaPRC, DOlPRE, DSPRC, SOlPRC, DOlPRC, DLiPRC, DLnPRC, DArPRC, DLaPRC, DMPC

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Simpson et Oppenheim (1977)	37,0±0,5	-	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC
Tabak et Notter (1977)	23, 37	H ₂ O, pH 6,5	Hexane:éthanol (95:5, v:v) CHCl ₃ :éthanol (9:1, v:v)	DPaL, DPaPE
Tabak et coll. (1977)	25	H ₂ O	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaL
Turcotte et coll. (1977)	23, 37	-	Hexane:éthanol (95:5, v:v)	DPaPC
Vilallonga et coll. (1977)	21±1	H ₂ O, pH 5,6-6	Hexane	DPaL, DPaPE
Albrecht et coll. (1978)	3 à 48	H ₂ O, pH 5,5 et 11,5	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC, DMPC
Colacicco et Basu (1978a)	25, 37	0,15 M NaCl	-	DPaL
Colacicco et Basu (1978b)	25	150 mM NaCl, 75 mM CaCl ₂	-	DPaPA, DMPC, DSPC, DPaPC
Cornell et coll. (1978)	22, 23	-	CHCl ₃	DPaL, PC (oeuf)
Dimitrov et coll. (1978)	21,5	0,01 M NaCl	CHCl ₃	DPaL

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Evans et Tinoco (1978)	22,0±0,2	H ₂ O, pH 5,1	Benzène:CHCl ₃ :CH ₃ OH (90:10:6, v:v:v)	PaEcPC, PaArPC
Fried et Rothfield (1978)	27,5±0,5	20 mM Tris-HCl, pH 8,5	CHCl ₃ :CH ₃ OH (85:15, v:v)	PE (<i>S. typhimurium</i>)
Hanssens et Van cauwelaert (1978)	27,5	Tampon acétate, 0,01 M, pH 3-6. Tris-HCl, 0,01 M, pH 7-10	CHCl ₃	DPaPC, PS (cerveau boeuf) Cardiolipine (coeur boeuf)
Maggio et Lucy (1978)	-	145 mM NaCl, pH 5,6	CHCl ₃	DPaPRC, DPaPRE
Nakahara et coll. (1978)	20,0±0,3	0,1 M NaCl, pH 2 à 11, ajusté avec 1 N KCl et 1 N NaOH, KOH ou RbOH	Hexane:éthanol (3:2, v:v) ou (4:1, v:v), CHCl ₃	DPaPC, DPaPE
Nejmeh et Pilpel (1978)	21	H ₂ O, pH 5,8	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC
Ohki et Sauvé (1978)	21	0,09 M NaCl et 0,01 M Tris-HCl pH 7,4 0,1 mM de CaCl ₂ , MgCl ₂ ou MnCl ₂	Hexane	PS (cerveau)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Seimiya et coll. (1978)	25,30,32,35, 40	Tris-HCl	CHCl ₃	DPaPE
Snik et coll. (1978)	21,0±0,5	H ₂ O	Hexane:éthanol (5:1, v:v)	DPaL
Thomas et Ter- Minassian-Saraga (1978)	22±1	10 ⁻² M NaCl, pH 5,5 2 · 10 ⁻⁶ M CaCl ₂	CHCl ₃ :CH ₃ OH (9:1, v:v)	PI
Vilallonga et Phillips(1978)	20±1	0,15 M NaCl	Hexane	DPaL, DPaPE
Bishop et coll. (1979)	24	Tampon phosphate 50 mM, pH 8,4	CHCl ₃	PE, PG
Blume (1979)	5-50	H ₂ O, pH 5-6	Dichlorométhane	DLaPE, DMPE, DMPC, DPaPC
Chatelain et coll. (1979)	25	10 ⁻² M Tris-HCl pH 7,4	CHCl ₃	DPaPC
Chifu et Tomoiaia- Cotisel (1979)	22±2	H ₂ O	Benzène	Lécithine (oeuf)
El Mashak et coll. (1979)	20	10 mM NaCl pH 6	CHCl ₃ :CH ₃ OH (5:1, v:v)	PE (<i>E. coli</i>), PS(cerveau boeuf), PA (boeuf), PI et cardiolipine (<i>Micrococcus luteus</i>)
Handa et Nakagaki (1979)	25	H ₂ O ou 100 mM CaCl ₂	Benzène, benzène:CHCl ₃ (3:1, v:v)	DMPC, PS (cerveau boeuf)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Jackson et coll. (1979)	37	0,05 M Tris-HCl pH 7,4	CHCl ₃ :CH ₃ OH (9:1, v:v)	DPaPC, PI, PC (oeuf)
Klappauf et Schubert (1979)	22,0±1,0	100 mM NaCl, 10 mM phosphate de sodium, pH 7,1	CHCl ₃	PC (oeuf)
Lodhi et coll. (1979)	25±3	50 mM HEPES pH 7,0 F.I.:0,2 (avec NaCl)	Hexane:éthanol (95:5, v:v) Hexane:éthanol:CHCl ₃ (80:5:15, v:v:v)	PS, PI, PA, Cardiolipine
Lundberg et Ekman (1979)	25	Tampon phosphate 0,04 M, 0,01 M NaCl, pH 7,0 et 0,001% BHT	Hexane:CH ₃ OH:CHCl ₃ (3:1:1, v:v:v)	PC (oeuf)
Minones et coll. (1979a)	20	Tampon citrate-phosphate, 5 · 10 ⁻³ M	Ethanol:éther de pétrole (3:7, v:v) + 0,5 % amyl alcool	DLaC, DOlC, DPaC, DMC
Minones et coll. (1979b)	20	Tampon citrate-phosphate, 5 · 10 ⁻³ M	Ethanol:éther de pétrole (2:8, v:v) + 0,5 % amyl alcool	DLaL, DML, DPaL, DOlL
Muller-Landau et Cadenhead (1979a)	20	H ₂ O	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC
Muller-Landau et Cadenhead (1979b)	21	H ₂ O	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Cadenhead et Muller-Landau (1979)	21	H ₂ O	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC
Ohki et Düzgunes (1979)	24±1	100 mM NaCl, 5 mM HEPES, 0,01 mM EDTA, pH 7,4 (NaOH) CaCl ₂ , MnCl ₂ , SrCl ₂ , BaCl ₂	Hexane	PS (cerveau), PC (oeuf)
Patel et coll. (1979)	24-26	0,1 M NaCl, 0,1 N HCl, pH 1,2 ou 0,1 N NaOH, pH 12,8 ou 0,01 M Tris-HCl, 0,01 mM EDTA	Hexane:CHCl ₃ (80:20, v:v)	DPaPA, DOlPA, PA (oeuf)
Ries (1979)	-	H ₂ O	Benzène avec 2% CHCl ₃	Cardiolipine
Teissié (1979a)	20,0±0,5	0,1 M NaCl ou 100 mM NaCl, pH 6	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC, PA
Teissié (1979b)	20,0±0,5	1 mM, 10 mM et 100 mM NaCl, pH 6	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	Lécithine (oeuf), DPaL
Ter-Minassian- Saraga et coll. (1979)	-	H ₂ O	CHCl ₃	DPaL
Vilallonga et Phillips (1979)	20±1	0,15 M NaCl	Hexane	DPaL, DPaPE

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Colacicco et coll. (1980)	25	NaCl, CaCl ₂ , pH 5,6	-	DPaL, DML, DSL, DPaPA
Dorfler et Rettig (1980)	12, 17, 22, 27, 32, 35, 40, 45	0,1 M NaCl	1,2-dichlorofluoro-1,2-difluorochloro-éthane: CH ₃ OH : CHCl ₃ (8,5:0,5:1, v:v:v)	DPaPC, DSPC
El Mashak et Tocanne (1980a)	20	H ₂ O, pH 6 ou 1 mM NaCl	CHCl ₃ :CH ₃ OH (5:1, v:v)	PG
El Mashak et Tocanne (1980b)	20	10 mM NaCl, pH 5,6	CHCl ₃ :CH ₃ OH (5:1, v:v)	DPaPG, DLaPG, PG (Micrococcus luteus)
Evans et coll. (1980)	22±2	H ₂ O, pH 5,2	Benzene:CHCl ₃ :CH ₃ OH (90:10:6, v:v:v)	DPaPC, DPaPA, DPaPG, DPaPE, DSPC
Gutkowski et coll. (1980)	23	0,9% NaCl ou 10 ⁻⁴ M lysolecithine, ou albumine, ou plasma humain	CH ₃ OH:CHCl ₃ (85:15, v:v), CCl ₄ :CHCl ₃ (5:1, v:v)	DPaL
Lecompte et Miller (1980a)	-	10 ⁻³ N Tris-HNO ₃ , 0,1 M KNO ₃ , pH 7,6-7,8	Hexane	PS
Lecompte et coll. (1980)	-	10 ⁻³ M Tris, 0,1 M NaCl, pH 7,8	Hexane	PS, PC

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Lecompte et Miller (1980b)	-	10^{-3} M Tris, 0,1 M NaCl, pH 7,8	Hexane	PS, PC
Lin et coll. (1980)	25,0±0,1	Tampon phosphate 0,1 M, 0,1 N NaOH	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaL
Luellman et coll. (1980)	24	Tampon TES-histidine, 2 mM, ajuste pH avec NaOH ou HCl, $1,2 \cdot 10^{-5}$ M $CaCl_2$	$CHCl_3$	PS, PC, PE
Momers et coll. (1980)	31,0±1,5	Tris-20 mM NaH_2PO_4 140 mM NaCl, pH 6,0	$CHCl_3:CH_3OH$ (9:1, v:v)	DMPC, PA, PS (cerveau), PC et PE (oeuf)
Notter et coll. (1980a)	23	0,15 M NaCl	Hexane:éthanol (90:10, v:v) ou (95:5, v:v)	DPaPC, PG (AG)
Notter et coll. (1980b)	23,25	H_2O	Hexane:éthanol (9:1, v:v) (95:5, v:v)	DPaL, DOL
Notter et coll. (1980c)	23,37	H_2O	Hexane:éthanol (9:1, v:v) ou (95:5, v:v)	DPaL, DOL
Panaïotov et coll. (1980)	19,0±0,5	0,01 M NaCl	$CHCl_3$	DPaL

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Quinn(1980)	19,0±0,5	10 mM NaCl	Ether de pétrole: CHCl ₃ (4:1, v:v)	Lécithine (soja)
Schubert et Klappauf (1980)	-	Tampon phosphate 10 mM, 100 mM NaCl, pH 7,1 ou tampon glycine-HCl, 100 mM NaCl, pH 3,0	-	PE et PC (oeuf), PS (moelle épinière bovine) PG, PA et Sph (bovine) PI (graine de blé), DLaPC, DMPC, DPaPC, DSPC, DOLPC, DLiPC
Seelig et coll. (1980)	14, 20	0,1 M NaCl, pH 6,0	CHCl ₃ :CH ₃ OH	DPaPC
Smith et Berg (1980)	20, 9	0,9% NaCl, pH 2 (0,01 N HCl)	Hexane:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC
Vilallonga et Phillips (1980a)	21±1	H ₂ O, pH 5,6-6,0	Hexane saturé d'eau	DPaL, DPaPE
Vilallonga et Phillips (1980b)	20±1	0,15 M NaCl	Hexane	DPaL, DPaPE
Albrecht et coll. (1981)	12-45	H ₂ O, pH 5,5	Hexane:éthanol (9:1, v:v), Dibutyl éther, CHCl ₃	DMPA, DPaPC, DHPC
Almog et Berns (1981)	21,5	Tampon phosphate, 10 ⁻³ M, pH 7,8	Benzène:éthanol (9:1, v:v)	DPaPC
Bougis et coll. (1981)	25	10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 0,5 mM KCl, 0,8 mM MgCl ₂ , 2,5 mM CaCl ₂ pH ajusté à 7,5 avec 20 mM Tris-acétate	CHCl ₃	DLaPC, DLaPS, DLaPE, DLaPG, PC(oeuf), PS(cerveau boeuf)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Chaudhury et Ohki (1981)	-22 à 70	0,2 M NaCl, 1 mM Tris-HCl, pH 7,0 et 1 mM citrate de sodium (pH 3,0 et 5,5)	CHCl ₃	DMPC, DPaPC, DOlPC, PC (oeuf), PS (cerveau boeuf)
Hawco et coll. (1981a)	36±1	0,15 M NaCl, pH entre 5 et 6	Hexane:éthanol (98:2, v:v)	DLaPC, DPaPC, SLiPC, PaOlPC, SOlPC
Hawco et coll. (1981b)	0-50±1	0,15 M NaCl, pH 6,0±0,2	Hexane:CH ₃ OH (98:2, v:v)	DPaPC, DMPC, DLaPC, PaOlPC, SOlPC, OlSPC
Hupfer et coll. (1981)	2, 20, 40	0,01M NaOH et 1 M HCl	-	DSL, DSC, DPaPA
Minones et coll. (1981a)	20, 21	Citrate de sodium, borate de sodium pH ajusté avec 0,1 N HCl, pH:1,6, 3,1, 5,1, 7,0, 9,6, 11,0	Ethanol:éther de pétrole (2:8, v:v) et 0,5% amyl alcool (lécithine), CHCl ₃ :éthanol (7:3, v:v) et 0,5% amyl alcool (céphaline)	DML, DLaL, DPaL, DSL, DMC, DLaC, DPaC, DHC, DHL
Minones et coll. (1981b)	20	Citrate de sodium, phosphate de sodium, borate de sodium, pH ajusté avec 0,1N HCl et 5 · 10 ⁻³ M de SiO ₂	Idem	Idem
Ohki et Kurland (1981)	24±2	0,1 M NaCl ou 0,1 M (Me) ₄ N contenant 1 mM Histidine-TES pH 7,4	Hexane	PS (cerveau boeuf)

Auteur(s)	Température (°C)	Sous-phase	Solvant d'étalement	Phospholipide(s) utilisé(s)
Seimiya et coll. (1981)	30±1 35	10, 30, 69 ou 109 mM NaCl ou Tris-HCl, pH 7,0±0,2 et $8,63 \cdot 10^{-7}$ M CaCl ₂	CHCl ₃	DMPE, DPaPE
Ter-Minassian- Saraga (1981)	22-23	10^{-3} M KCl, 10^{-5} M HCl	CHCl ₃ :CH ₃ OH (1:1, v:v)	PI