

N° d'ordre : 2896

# THÈSE

présentée à

**L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **Julie SACCANI**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : **Chimie Physique**

\*\*\*\*\*

**RÉALISATION DE SYSTÈMES MEMBRANAIRES MODÈLES ET ÉTUDE DE  
LEUR ORGANISATION PAR MICROSCOPIE À L'ANGLE DE BREWSTER,  
SPECTROSCOPIE PM-IRRAS ET DICHROÏSME CIRCULAIRE VIBRATIONNEL**

\*\*\*\*\*

Soutenue le : 11 septembre 2003

Après avis de :

**Mme P. BASSEREAU**  
**Mme A. RENAULT**

Directeur de recherche, CNRS, Institut Curie  
Directeur de recherche, CNRS, GMCM

**Rapporteurs**

Devant la commission d'examen formée de :

**M. A. BRISSON**  
**M. J. DUFOURCQ**  
**M. M. LAGUERRE**  
**M. B. DESBAT**

Professeur, Université Bordeaux I  
Directeur de recherche, CNRS, CRPP  
Directeur de recherche, CNRS, IECB  
Directeur de recherche, CNRS, LPCM

**Président**  
**Rapporteur**  
**Examineurs**



*À mes parents*



Le travail de cette thèse a été effectué au Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire (LPCM) de l'Université Bordeaux I et je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur Jean-Claude Rayez, son directeur, de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant ces trois années.

Je tiens à remercier Monsieur Alain Brisson d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse et de l'avoir présidé.

Je tiens également à exprimer mes sincères remerciements à Mesdames Patricia Bassereau et Anne Renault, qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, d'avoir bien voulu porter un regard critique sur mes résultats. Je leur suis tout particulièrement reconnaissante pour leurs remarques pertinentes et pour les discussions fructueuses que nous avons eues ensemble.

Je souhaite également remercier Monsieur Michel Laguerre pour sa participation au jury mais surtout pour m'avoir initié à la dynamique moléculaire. J'aimerais également associer à ces remerciements François Beaurain, son étudiant, qui m'a accordé de son temps pour la programmation. Je les remercie tous les deux pour leur accueil et leur gentillesse.

Je voudrais également remercier Jean Dufourcq d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse, alors que sa retraite avait commencé trois jours plus tôt... Je tiens également à le remercier pour m'avoir fait partager ses connaissances sur la mystérieuse mélittine.

Mes plus vifs remerciements vont à Monsieur Bernard Desbat qui a assuré la direction scientifique de cette thèse et sans qui ce travail n'aurait pu être mené à bien. J'ai été particulièrement sensible à ses très nombreuses connaissances scientifiques qu'il a su partager avec moi au cours de nombreuses discussions. Je lui suis également très reconnaissante pour sa patience, sa disponibilité et les échanges culturels que nous avons eus. À ses côtés, ces trois de thèse ont été un véritable plaisir.

Je tiens également à remercier Messieurs Daniel Blaudez, Thierry Buffeteau et Mademoiselle Sabine Castano de leur concours pour les nombreuses expériences et les discussions scientifiques fructueuses qui en ont découlé. Leur disponibilité et leur gentillesse ont également contribué au bon déroulement de cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier Monsieur Laurent Servant pour ses qualités humaines et les précieux conseils qu'il a su me prodiguer tant sur le plan scientifique que sur le plan pédagogique.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I _ LA SPECTROSCOPIE PM-IRRAS.....</b>	<b>5</b>
<b>I. PRÉSENTATION DE LA SPECTROSCOPIE PM-IRRAS .....</b>	<b>7</b>
I.1. LA SPECTROSCOPIE IRRAS.....	7
I.2. SPECTROSCOPIE PM-IRRAS.....	9
<b>II. PRINCIPES GÉNÉRAUX DE LA SPECTROSCOPIE PM-IRRAS.....</b>	<b>10</b>
II.1. LE MONTAGE OPTIQUE .....	10
II.2. TRAITEMENT ÉLECTRONIQUE DU SIGNAL .....	12
II.3. SIGNAL PM-IRRAS THÉORIQUE .....	13
<b>III. RÈGLE DE SÉLECTION À L'INTERFACE AIR - EAU .....</b>	<b>14</b>
<b>IV. DESCRIPTION D'UNE MÉTHODE POUR AUGMENTER LA DÉTECTIVITÉ DE LA SPECTROSCOPIE PM-IRRAS.....</b>	<b>18</b>
IV.1. SIGNAL PM-IRRAS THÉORIQUE .....	18
IV.2. RÈGLE DE SÉLECTION .....	20
IV.3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX .....	22
IV.3.1 Monocouche de DMPC .....	22
IV.3.2 Monocouche de PBG .....	23
IV.4. CONCLUSION .....	26
<b>CHAPITRE II _ FORMATION DE MULTICOUCHES À L'INTERFACE AIR-EAU .....</b>	<b>29</b>
<b>I. GÉNÉRALITÉS .....</b>	<b>34</b>
I.1. LES MOLÉCULES AMPHIPHILES .....	34
I.2. ISOTHERME DE COMPRESSION.....	35
<b>II. TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES .....</b>	<b>37</b>
II.1. MICROSCOPIE À L'ANGLE DE BREWSTER .....	37
II.1.1 Principe .....	37
II.1.2 Images Brewster .....	38
II.1.3 Expression de la réflectance .....	38
II.1.4 Procédure de calibration.....	39
II.2. SPECTROSCOPIE PM-IRRAS.....	40
<b>III. MONOCOUCHE DE LANGMUIR DE MOLÉCULES À LONGUE CHAÎNE CARBONÉE .....</b>	<b>40</b>
III.1. ÉTUDE DE L'ACIDE TRICONTANOÏQUE .....	41
III.2. MÉLANGE D'ACIDE TRICONTANOÏQUE ET DE DMPC .....	44
<b>IV. FORMATION DE MULTICOUCHES PAR LA MÉTHODE DE TRURNIT .....</b>	<b>48</b>
<b>V. FORMATION DE MULTICOUCHES PAR COMPRESSION AU-DELÀ DU COLLAPSE .....</b>	<b>50</b>
V.1. BICOUCHE DE DMPC .....	52

V.2.	TRICOUCHE DE DOPS .....	57
V.3.	RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX OBTENUS AVEC LE DOPC ET LE DOPG.....	62
V.4.	MÉLANGE DE DOPS ET DE DMPC .....	64
<b>VI.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>65</b>
VI.1.	BICOUCHE OU TRICOUCHE ?.....	66
VI.2.	SCINTILLEMENTS DU DOPC ET DU DOPG À LA SURFACE DE L'EAU .....	68
VI.3.	MÉCANISMES DE FORMATION DE MULTICOUCHES ORGANISÉES À L'INTERFACE AIR-EAU .....	69
<b>VII.</b>	<b>FORMATION DE BICOUCHES SUPPORTÉES PAR ÉCLATEMENT DE VÉSICULES À L'INTERFACE AIR-EAU .....</b>	<b>72</b>
VII.1.	PRINCIPE DE LA MÉTHODE.....	72
VII.2.	POLYMÉRISATION DU FILM D'OTMS .....	72
VII.3.	FORMATION DE LA BICOUCHE DE DMPC .....	74
VII.4.	SPECTRES PM-IRRAS .....	75
VII.5.	ÉTUDE EN MICROSCOPIE À L'ANGLE DE BREWSTER .....	78
VII.6.	CONCLUSION .....	82
<b>CHAPITRE III _ DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE .....</b>		<b>87</b>
<b>I.</b>	<b>GÉNÉRALITÉS SUR LES SIMULATIONS NUMÉRIQUES .....</b>	<b>87</b>
<b>II.</b>	<b>LA SIMULATION PAR DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE .....</b>	<b>88</b>
II.1.	ÉQUATIONS DU MOUVEMENT .....	90
II.2.	CONDITIONS INITIALES .....	90
II.3.	PÉRIODICITÉ .....	91
II.4.	DISTANCE DE TRONCATURE .....	92
II.5.	CHAMP DE FORCE .....	93
<b>III.</b>	<b>CONSTRUCTION DES SYSTÈMES.....</b>	<b>96</b>
III.1.	CONSTRUCTION DE LA MONOCOUCHE DE DMPC .....	97
III.2.	CONSTRUCTION DE LA BICOUCHE DE DMPC .....	99
<b>IV.</b>	<b>ANALYSE DES PARAMÈTRES STRUCTURAUX DES SYSTÈMES SIMULÉS .....</b>	<b>100</b>
IV.1.	AIRE MOLÉCULAIRE .....	100
IV.2.	RÉPARTITION DES ATOMES DANS LES COUCHES .....	101
IV.3.	INCLINAISON DES CHAÎNES CARBONÉES .....	104
IV.4.	CONFORMATIONS GAUCHE.....	108
IV.5.	ORIENTATION DU CARBONYLE DU GROUPEMENT ESTER.....	110
<b>V.</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>114</b>
<b>VI.</b>	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>115</b>
<b>CHAPITRE IV _ INTERACTION D'UN PEPTIDE MEMBRANAIRE, LA MÉLITTINE, AVEC LES MULTICOUCHES FORMÉES À L'INTERFACE AIR-EAU .....</b>		<b>117</b>
<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>117</b>
<b>II.</b>	<b>LES PROTÉINES.....</b>	<b>118</b>

II.1.	LES ACIDES AMINÉS .....	118
II.2.	STRUCTURE DES PROTÉINES .....	120
II.2.1	<i>Structure primaire et aspect conformationnel de la liaison peptidique</i> .....	120
II.2.2	<i>Structures secondaires</i> .....	122
II.2.3	<i>Structure tertiaire</i> .....	125
II.2.4	<i>Structure quaternaire</i> .....	126
II.3.	SPECTROSCOPIE INFRAROUGE DES PROTÉINES .....	127
II.3.1	<i>Modes de vibration de la liaison peptidique</i> .....	127
II.3.2	<i>Modes de vibration en fonction de la conformation des protéines</i> .....	128
<b>III.</b>	<b>LA MÉLITTINE</b> .....	<b>131</b>
III.1.	STRUCTURES DE LA MÉLITTINE .....	132
III.2.	ACTION DE LA MÉLITTINE SUR LES MEMBRANES .....	133
III.3.	ORIENTATIONS DE LA MÉLITTINE DANS LES MEMBRANES .....	135
<b>IV.</b>	<b>INTERACTION DE LA MÉLITTINE AVEC LES SYSTÈMES MODÈLES FORMÉS À L'INTERFACE AIR-EAU</b> .....	<b>138</b>
IV.1.	TRICOUCHE DE DOPS .....	138
IV.2.	SYSTÈME MIXTE DOPS-DMPC .....	144
IV.3.	BICOUCHE SUPPORTÉE DE DMPC SOUS UNE MONOCOUCHE D'OTMS POLYMÉRISÉ .....	146
<b>V.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>147</b>
 <b>CHAPITRE V _ SPECTROSCOPIE VCD</b> .....		<b>151</b>
<b>I.</b>	<b>THÉORIE DU DICHROÏSME CIRCULAIRE VIBRATIONNEL</b> .....	<b>156</b>
I.1.	DÉFINITION ET EXPRESSION .....	156
I.2.	RAPPORT D'ANISOTROPIE .....	160
<b>II.</b>	<b>APPROCHE EXPÉRIMENTALE DU DICHROÏSME CIRCULAIRE VIBRATIONNEL</b> .....	<b>160</b>
II.1.	MONTAGE OPTIQUE .....	161
II.2.	SIGNAL VCD .....	163
II.3.	CALIBRATION .....	164
<b>III.</b>	<b>RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX</b> .....	<b>166</b>
III.1.	ÉTAT DES CONNAISSANCES .....	167
III.2.	SPECTRE VCD DE RÉFÉRENCE .....	170
III.3.	SPECTRES VCD DE PHOSPHOLIPIDES .....	172
III.3.1	<i>Cas des solutions</i> .....	173
III.3.2	<i>Cas des vésicules</i> .....	174
III.3.3	<i>Cas des émulsions</i> .....	175
III.3.4	<i>Cas des multicouches supportées</i> .....	179
III.4.	SPECTRE VCD D'UN POLYPEPTIDE NATUREL, LA MÉLITTINE .....	182
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>185</b>
 <b>CONCLUSION</b> .....		<b>189</b>



*"La tâche de la science, commencée depuis des millénaires, est de poursuivre une adaptation de plus en plus précise de notre esprit à la réalité, de construire une représentation de plus en plus adéquate du monde qui nous entoure et auquel nous appartenons, pour le comprendre d'abord, et puis pour passer de la compréhension à la prévision et ensuite à l'action. "*

*Paul Langevin*

L'homme est curieux de tout. Depuis l'antiquité, il cherche à élucider les phénomènes qui se passent autour de lui. Du modèle de Bohr à la théorie ondulatoire de Louis de Broglie, de la pomme de Newton à la théorie de la relativité restreinte d'Albert Einstein, du tableau de Mendéléev à la découverte du polonium et du radium par Pierre et Marie Curie, l'Homme ne s'est pas contenté des premières découvertes, il s'est appliqué à aller au-delà des connaissances acquises. Il a été aussi toujours intrigué par son propre corps. Cependant, il a fallu attendre les progrès en physique et en chimie pour que la médecine et la biochimie prennent leur essor et deviennent des sciences à part entière. C'est grâce notamment au microscope que Schwann et Müller découvrent en 1838 que la cellule est l'élément fondamental des tissus vivants. Les connaissances en chimie organique et le développement d'instruments d'analyse puissants (microscopie électronique, ultracentrifugation, électrophorèse) ont permis également la découverte des principaux constituants des cellules (acides aminés, protéines) aboutissant dans les années 1950-1960 à la mise en évidence du rôle essentiel de l'ADN et de sa structure. Malgré les avancées faites au cours du 19<sup>e</sup> et 20<sup>e</sup> siècles dans le domaine de la biologie et de la biochimie, il n'en reste pas moins encore aujourd'hui à élucider et préciser de nombreux phénomènes. Ainsi, un des objectifs de la recherche actuelle consiste à mieux comprendre le fonctionnement des cellules, l'unité fondamentale du vivant à l'origine du bon et du mauvais fonctionnement de l'organisme. Les chercheurs s'intéressent notamment à la membrane, enveloppe entourant la cellule, puisqu'elle est le siège des protéines impliquées dans la plupart des processus cellulaires. La complexité de structure et d'organisation des membranes réelles oblige à travailler sur des systèmes modèles. Cependant, la véracité des résultats obtenus sera d'autant plus convaincante si ces systèmes se rapprochent le plus possible de la réalité.

C'est dans cette perspective que ma thèse aborde la stabilisation de multicouches phospholipidiques à l'interface air-eau par la présentation des méthodes de réalisation puis par

l'étude de leurs propriétés physico-chimiques. L'épaisseur hydrophobe de ces nouveaux systèmes modèles leur confère une structure proche de celle des membranes naturelles, qui les différencient des monocouches de Langmuir. Cette propriété est susceptible de modifier la nature de l'interaction avec des peptides. La sous-phase aqueuse est une caractéristique essentielle de ces systèmes pour étudier l'influence de facteurs comme le pH et la force ionique sur leur stabilité. L'interface air-eau permet d'envisager leur étude par les méthodes de spectroscopie optiques (IR, Raman, UV-visible), notamment par les deux techniques d'analyse de surface du laboratoire : la microscopie à l'angle de Brewster et la spectroscopie PM-IRRAS.

La microscopie à l'angle de Brewster caractérise à l'échelle microscopique l'état de la surface (homogène, fluide) et son épaisseur alors que la spectroscopie PM-IRRAS renseigne sur l'orientation et l'organisation des molécules constituant ces multicouches. La pertinence de cette technique réside dans la qualité des spectres obtenus. C'est pourquoi, dans la continuité des travaux déjà réalisés au laboratoire, nous avons développé une méthode simple pour améliorer la détectivité du montage optique. Le principe de la méthode est décrit dans le chapitre 1.

Le chapitre 2 est consacré à la présentation des différentes méthodes qui nous ont permis d'observer, après de nombreux essais, des multicouches à l'interface air-eau. Les caractéristiques des systèmes formés sont présentées à travers les résultats obtenus en microscopie à l'angle de Brewster et en spectroscopie PM-IRRAS. Afin de préciser la structure des systèmes obtenus à l'interface air-eau et de comprendre leur différence de stabilité, une étude en dynamique moléculaire, présentée chapitre 3, a été menée pour une monocouche et une bicouche de DMPC.

Dans le chapitre 4, sont exposés les premiers résultats obtenus sur des multicouches stabilisées à l'interface air-eau. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux effets de la mélittine, un peptide cytotoxique du venin d'abeille, sur ces systèmes et aux différences observées par rapport aux résultats obtenus sur les monocouches et d'autres systèmes modèles (vésicules, multicouches supportées).

La compréhension des interactions membranes-protéines requiert la contribution de nombreuses techniques expérimentales. C'est dans cette perspective que nous avons développé au laboratoire une nouvelle méthode d'investigation, la spectroscopie circulaire vibrationnelle, l'homologue de la spectroscopie circulaire électronique en infrarouge. Cette technique est décrite dans le chapitre 5. Les résultats préliminaires obtenus sur les phospholipides et deux peptides synthétiques, le poly-benzyl-glutamate et la mélittine y sont également présentés.

Nous verrons en conclusion que l'ensemble des méthodes et techniques d'analyse présentées dans cette thèse apporte de nouveaux outils pour une meilleure compréhension des membranes réelles.



## CHAPITRE I \_ LA SPECTROSCOPIE PM-IRRAS

La spectroscopie infrarouge a particulièrement été mise à profit ces dernières années pour l'étude des systèmes bidimensionnels. En effet, à l'inverse des autres méthodes d'analyses de surfaces, la spectroscopie infrarouge est une technique non destructive dont les méthodes d'échantillonnage sont relativement faciles à mettre en œuvre. Les informations que renferme un spectre infrarouge (positions en fréquence, intensité des bandes d'absorption) font de cette spectroscopie un outil de choix dans la compréhension de la structure et de l'orientation moléculaire puisque l'absorption est fonction de l'orientation du moment de transition par rapport au champ électrique. La spectroscopie infrarouge est également bien adaptée à l'étude des systèmes biologiques et notamment des systèmes modèles des membranes biologiques. En effet, les modes de vibration des molécules les composant (phospholipides, protéines, sucres, ...) sont intenses en infrarouge.

Cette spectroscopie s'est particulièrement développée ces dernières années grâce notamment à l'utilisation de spectromètres infrarouge à transformée de Fourier. Par exemple, la spectroscopie IRRAS (InfraRed Reflexion-Absorption Spectroscopy) est devenue une méthode très utilisée pour l'étude de films minces sur substrat métallique. L'anisotropie et l'exaltation du champ électrique créées à la surface d'un métal sont exploitées pour tirer des informations sur l'orientation des molécules à la surface. Cependant, cette technique ne permet pas de discriminer les absorptions surfaciques des absorptions volumiques. Il est donc nécessaire de normaliser le spectre de l'échantillon par le spectre du substrat seul afin de faire ressortir les absorptions dues uniquement au film. L'enregistrement non simultané des deux spectres introduit des fluctuations inévitables du montage optique (source infrarouge, interféromètre,...) et de l'environnement qui affectent la qualité du spectre IRRAS. Cet inconvénient rend alors difficile la détection des absorptions de films ultra-minces (d'épaisseur inférieure à 100 Å) déposés sur une surface à cause de leurs signaux trop faibles.

Pour pallier ces inconvénients, des techniques différentielles sont apparues comme la spectroscopie PM-IRRAS (Polarization Modulation-InfraRed Reflexion-Absorption

Spectroscopy). Cette spectroscopie permet ainsi d'obtenir des spectres normalisés en temps réels où seules les absorptions de surface sont détectées.

Par ailleurs, au cours de ma thèse, nous avons montré qu'il était encore possible d'améliorer le rapport signal sur bruit des spectres PM-IRRAS en favorisant une des deux réflectivités  $R_p$  ou  $R_s$  grâce à une légère modification du montage optique.

Je présenterai dans un premier temps les principes théoriques et expérimentaux de la spectroscopie PM-IRRAS puis je décrirai la méthode qui a permis d'améliorer la détectivité de ce type de spectroscopie.

# I. Présentation de la spectroscopie PM-IRRAS

## I.1. La spectroscopie IRRAS

La spectroscopie IRRAS développée par Greenler dans les années 60 [1, 2] a permis d'améliorer la détectivité de films minces (dont l'épaisseur est supérieure à  $100\text{\AA}$ ) déposés sur un substrat métallique. Le principe de cette spectroscopie est basé sur l'anisotropie du champ électrique  $\mathbf{E}$  à la surface d'un métal. La réflexion d'une onde électromagnétique à la surface d'un métal introduit un déphasage  $\delta$  du champ électrique incident qui dépend de l'état de polarisation du champ électrique incident et de l'angle d'incidence  $i$  (schéma 1).

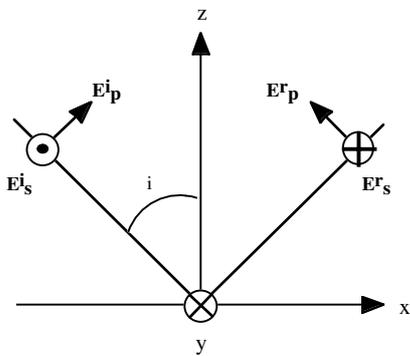


Schéma 1 : Champs électriques incidents et réfléchis à la surface d'un métal.

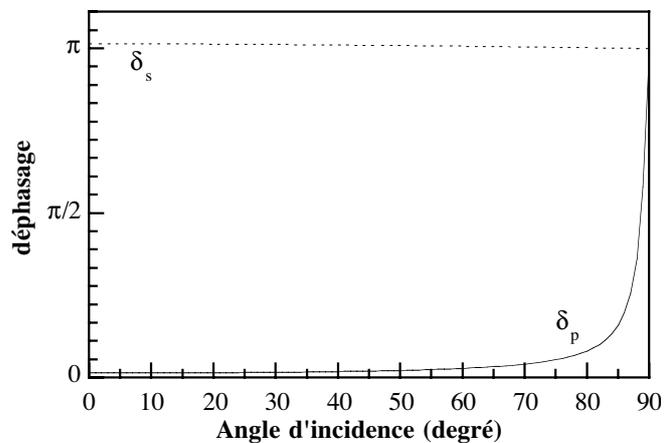


Figure 1 : Déphasages subis par les champs électriques polarisés p et s à la surface d'un substrat d'or.

Pour un champ électrique incident  $\mathbf{E}^i$  perpendiculaire au plan d'incidence (polarisation s), le déphasage est indépendant de l'angle d'incidence et est égal à environ 180 degrés (figure 1). Ce qui signifie que le champ électrique total ( $\mathbf{E}_s^i + \mathbf{E}_s^r$ ) est nul à la surface du métal. Pour un champ électrique incident parallèle au plan d'incidence (polarisation p), le déphasage varie avec l'angle d'incidence et cette variation est d'autant plus forte que l'angle d'incidence est proche d'une incidence rasante. Les simulations des intensités des différentes composantes des champs électriques  $\mathbf{E}_p$  et  $\mathbf{E}_s$  à la surface d'un métal en fonction de la distance  $z$  au métal (figure 2) et de l'angle d'incidence (figure 3) montrent en effet que seule l'intensité de la composante  $z$  du champ électrique est non nulle au voisinage du métal et qu'elle est exaltée pour un angle d'incidence proche de  $80^\circ$ .

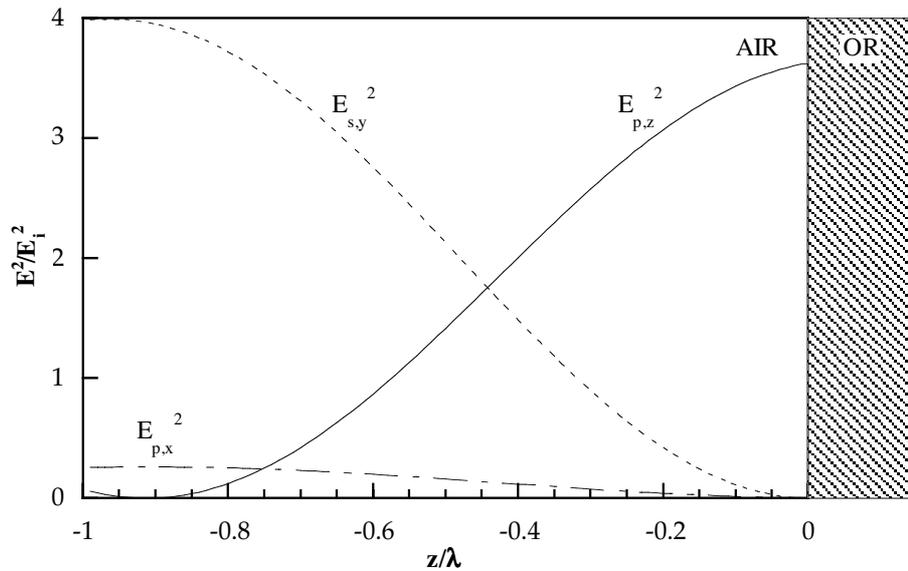


Figure 2 : Intensité des composantes du champ électrique en fonction de la longueur d'onde du rayonnement incident à la surface d'un substrat d'or pour un angle d'incidence de  $75^\circ$ .

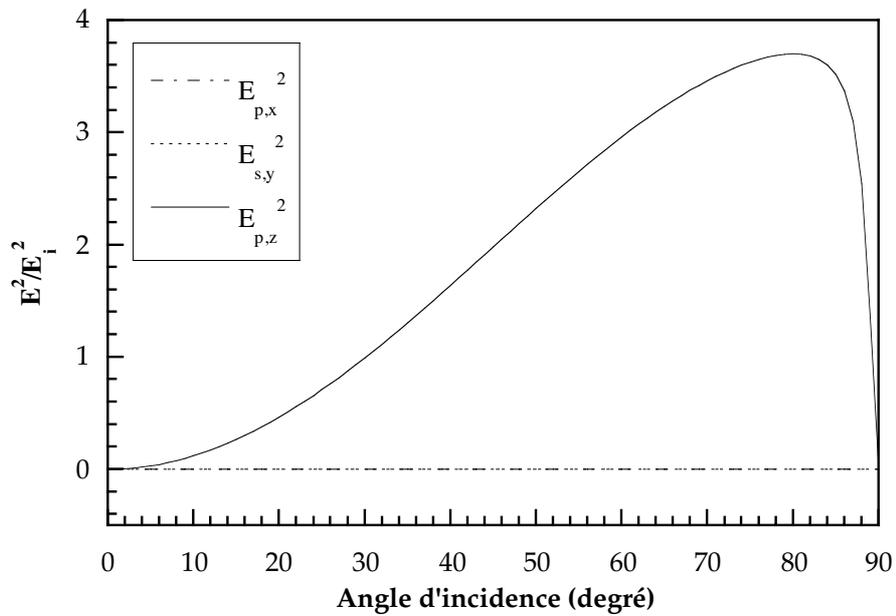


Figure 3 : Intensité des composantes du champ électrique à la surface d'un substrat d'or en fonction de l'angle d'incidence.

Ces résultats ont été mis à profit pour réaliser le montage expérimental relatif à l'étude de couches minces à la surface d'un métal par spectroscopie IRRAS. Une lumière infrarouge polarisée p est envoyée sous incidence quasi-rasante ( $i = 75^\circ$ ) sur une couche mince d'épaisseur  $e$  déposée sur un substrat métallique. Dans ces conditions, on enregistre le spectre de réflectivité de la couche  $R_p(d)$  que l'on normalise ensuite par le spectre de réflectivité du

substrat seul  $R_p(0)$  afin d'extraire les absorptions dues uniquement à la couche. On obtient après traitement le signal IRRAS normalisé :

$$S_{\text{IRRAS}}(d) = 1 - \frac{R_p(d)}{R_p(0)} \quad (1)$$

où  $R_p = \frac{E_r^2}{E_i^2}$ .

L'exaltation du champ électrique à l'interface induit une sensibilité suffisante pour l'étude de films minces d'épaisseur supérieure à 100 Å. Dans ce cas, la spectroscopie IRRAS permet d'obtenir des spectres avec un bon rapport signal sur bruit et donc de tirer des informations d'ordre moléculaire pertinentes sur la couche étudiée. Cependant, la valeur de ce rapport est limitée du fait de l'enregistrement non simultané du spectre de l'échantillon et du spectre de référence (substrat seul). Cet inconvénient inhérent aux spectroscopies dites "simple faisceau" est lié aux dérives et aux instabilités temporelles du montage optique (source, interféromètre, système de purge, ...) qui interviennent entre l'enregistrement du spectre de l'échantillon et celui du substrat seul.

D'autre part, bien que l'utilisation d'un substrat métallique n'introduise pas de bandes d'absorption supplémentaires, la spectroscopie IRRAS ne permet pas de s'affranchir des absorptions liées à l'environnement (vapeur d'eau, CO<sub>2</sub>, ...). Cet inconvénient fait apparaître les limites de détectivité de la spectroscopie IRRAS notamment lorsque l'on veut étudier des films ultra-minces (épaisseur inférieure à 100 Å). Il s'est donc avéré nécessaire de développer une nouvelle spectroscopie infrarouge basée sur une méthode d'analyse différentielle afin de minimiser les effets d'instabilités temporelles et de discriminer les signaux d'absorptions de la couche de ceux du milieu environnant.

## **I.2. Spectroscopie PM-IRRAS**

Cette nouvelle spectroscopie, dont l'idée s'est développée aux États-Unis dans les années 80 [3, 4], a été mise au point au Laboratoire de Physico-Chimie Moléculaire du Centre de Recherche de Chimie Moléculaire à l'Université Bordeaux I par l'équipe de B. Desbat et de J. M. Turllet du Centre de Physique Moléculaire, Optique et Herzienne. Un travail préliminaire a été effectué au cours de la thèse de T. Buffeteau [5] sur les substrats

métalliques et a été poursuivi par D. Blaudez [6] qui a élargi cette spectroscopie à l'étude de substrats diélectriques et plus particulièrement aux monocouches à l'interface air-eau [7, 8, 9].

La spectroscopie PM-IRRAS combine trois techniques :

- la spectroscopie IRRAS
- un modulateur photoélastique dont la fonction est de moduler rapidement la polarisation du champ électrique incident entre les polarisations s et p
- le traitement électronique qui va permettre de filtrer, démoduler et de traiter mathématiquement le signal reçu par le détecteur. On obtient ainsi le signal de réflectivité différentiel normalisé :

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s}. \quad (2)$$

Avec la normalisation en temps réel du signal de surface, la spectroscopie PM-IRRAS s'affranchit des fluctuations temporelles du montage optique et de l'échantillon. De plus, en discriminant les absorptions anisotropes de la couche à l'interface des absorptions isotropes de l'environnement, elle permet d'améliorer la détectivité du signal par rapport à la spectroscopie IRRAS.

## **II. Principes généraux de la spectroscopie PM-IRRAS**

### **II.1. Le montage optique**

Le montage optique est présenté figure 4 dans le cadre de l'étude de couches ultra-minces à l'interface air-eau.

Il est constitué d'un spectromètre à transformée de Fourier (Thermooptek, Nexus 870), composé : d'une source infrarouge qui émet un spectre continu dans le moyen infrarouge (400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) et d'un interféromètre de Michelson. Le déplacement du miroir mobile à la vitesse  $v$  engendre des interférences qui créent une variation périodique de l'intensité lumineuse en fonction de la différence de marche. Cet interférogramme est ensuite traduit en signal électrique par le détecteur. Sa transformée de Fourier permet d'obtenir un signal qui varie en fonction du nombre d'onde. Ainsi à un nombre d'onde donné  $\bar{\nu}_i$  correspond une fréquence de modulation  $f_i$  du signal donnée par la relation  $f_i = 2v_i$ . Pour la plupart des expériences, la vitesse du miroir est fixée à 0,4747  $\text{cm s}^{-1}$ . Ce qui correspond à des fréquences

de modulation variant entre 0,76 et 3,8 kHz pour un domaine de nombres d'onde compris entre 800 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

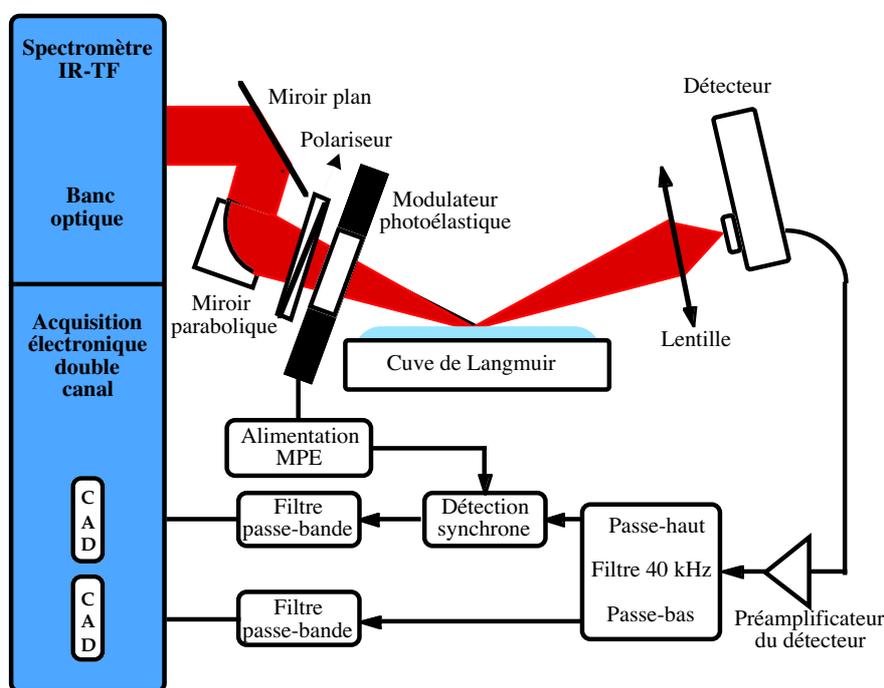


Figure 4 : Montage expérimental de la spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air-eau

La spectroscopie PM-IRRAS n'étant pas sensible aux absorptions de l'environnement, les expériences sur les cuves de Langmuir sont réalisées *in situ* à l'extérieur du spectromètre. Le faisceau infrarouge est alors envoyé à l'extérieur à l'aide d'un miroir basculant.

Le faisceau parallèle est réfléchi sur un miroir parabolique (qui permet de focaliser le faisceau à la surface de l'eau). Il traverse ensuite un polariseur (tel que seule la polarisation *s* du champ électrique soit conservée) et un modulateur photoélastique (PEM).

L'application d'une tension sinusoïdale, de fréquence  $f_m$ , au modulateur photoélastique<sup>1</sup> permet de moduler la polarisation du faisceau infrarouge entre les polarisations linéaires *s* et *p* à une fréquence fixe  $2 f_m$ .

<sup>1</sup> La tension sinusoïdale, de fréquence imposée par le constructeur  $f_m \sim 50$  kHz, appliquée au modulateur photoélastique crée une contrainte mécanique par l'intermédiaire de quartz piézo-électriques sur le cristal de ZnSe. Sous l'action de cette contrainte, le cristal devient biréfringent et introduit un déphasage  $\phi(t) = \phi_0 \sin(\omega_m t)$  entre les deux composantes *s* et *p* du champ électrique. Pour un nombre d'onde de travail fixé, la contrainte est ajustée telle que le modulateur photoélastique se comporte comme une lame cristalline  $\lambda/2$ . La polarisation du faisceau infrarouge d'entrée est ainsi modulée entre les polarisations linéaires *s* et *p* [10].

Le faisceau infrarouge réfléchi est alors focalisé grâce à une lentille en séléniure de zinc sur un détecteur de type MCT<sup>2</sup> [10] associé à un préamplificateur. En fonction de l'intensité du signal, on pourra modifier l'amplification ou la fréquence de coupure du détecteur pour ajuster au mieux la dynamique du signal.

## II.2. Traitement électronique du signal

L'intensité reçue par le détecteur peut s'écrire [5] :

$$I_d^S(\bar{v}_i, t) = \frac{1}{2} I_0^S(\bar{v}_i) [(R_p + R_s) - (R_p - R_s) \cos \phi(t)] \quad (3)$$

avec :

- $R_p$  et  $R_s$  les réflectivités des composantes p et s du champ électrique
- $I_0^S(\bar{v}_i)$  intensité lumineuse du champ électrique après le polariseur orienté s à la sortie du spectromètre
- $\phi(t)$  déphasage introduit par le modulateur photoélastique entre les deux composantes du champ électrique.

En limitant électroniquement la détection aux fréquences comprises entre 0 et  $2f_m$  et après développement du  $\cos(\phi(t))$  sur la base des fonctions de Bessel<sup>3</sup>, l'expression de l'intensité détectée devient :

$$I_d^S(\bar{v}_i, t) = \frac{1}{2} I_0^S(\bar{v}_i) \left\{ [(R_p + R_s) - (R_p - R_s) J_0(\phi_0)] - 2(R_p - R_s) J_2(\phi_0) \cos(2\omega_m t) \right\} \quad (4)$$

où  $J_0(\phi_0)$  et  $J_2(\phi_0)$  sont respectivement les fonctions de Bessel à l'ordre 0 et 2 au maximum du déphasage.

L'intensité détectée est donc la somme de deux signaux :

- $I_{BF}(\bar{v}_i) = \frac{1}{2} I_0^S(\bar{v}_i) [(R_p + R_s) - (R_p - R_s) J_0(\phi_0)]$  modulé aux basses fréquences  $f_i$  du spectromètre et

<sup>2</sup> C'est un détecteur photovoltaïque refroidi à l'azote liquide (77K) pour limiter le bruit thermique. Le signal à sa sortie est directement relié au nombre d'électrons qui passent de la bande de valence du semi-conducteur vers la bande de conduction sous l'action de la lumière infrarouge. La réponse du détecteur est suffisamment rapide pour transmettre sans intégration préalable les signaux modulés à la pulsation  $2\omega_m$ . L'avantage de ce détecteur est qu'il allie une large réponse spectrale avec un fort rendement optique.

<sup>3</sup>  $\cos(\phi_0 \sin(\omega_m t)) = J_0(\phi_0) + 2 \sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}(\phi_0) \cos(2k\omega_m t)$

-  $I_{\text{HF}}(\bar{\nu}_i) = -I_0^S(\bar{\nu}_i)(R_p - R_s)J_2(\phi_0)\cos(2\omega_m t)$  doublement modulé, aux fréquences  $f_i$  et à la haute fréquence  $2f_m$  imposé par le modulateur photoélastique.

Ces deux signaux modulés à des fréquences très différentes peuvent être séparés par des filtres électroniques. Le signal  $I_{\text{HF}}$  est ensuite démodulé par un appareil de détection synchrone<sup>4</sup> qui permet d'extraire l'interférogramme proportionnel à  $I_0^S(\bar{\nu}_i)(R_p - R_s)J_2(\phi_0)$ . La constante de temps  $\tau$  du filtre passe-bas de la détection synchrone est choisie suffisamment faible ( $100 \mu\text{s}$ ) afin que seules les composantes sinusoïdales de fréquence  $2f_m$  soient intégrées et que toutes les fréquences  $f_i$  correspondant au domaine spectral étudié soient transmises. D'autre part, ce filtre passe-bas (circuit RC) atténue plus les hautes fréquences que les basses fréquences. L'atténuation varie approximativement comme  $e^{-2\nu\bar{\nu}_i\tau}$ . Le signal à la sortie de la détection synchrone est donc proportionnel à :

$$I_{\text{DS}}(\bar{\nu}_i) = I_0^S(\bar{\nu}_i)e^{-2\nu\bar{\nu}_i\tau}(R_p - R_s)J_2(\phi_0) \quad (6)$$

### II.3. Signal PM-IRRAS théorique

Les signaux  $I_{\text{BF}}$  et  $I_{\text{DS}}$  sont ensuite filtrés électroniquement afin de limiter leur bande passante au domaine spectral choisi.

Le rapport de leur transformée de Fourier donne directement le signal PM-IRRAS pour un film ultra-mince d'épaisseur  $d$  à l'interface air-eau. Il faut noter que la correction de phase de Mertz choisie ici implique que seule la valeur absolue des signaux  $I_{\text{BF}}$  et  $I_{\text{DS}}$  est prise en compte lors du traitement informatique. Le signal PM-IRRAS expérimental a donc pour expression :

$$S_{\text{PM-IRRAS}} = \left( \frac{\text{TF}(I_{\text{DS}})}{\text{TF}(I_{\text{BF}})} \right)_{\text{film}} = e^{-2\nu\bar{\nu}_i\tau} \frac{g|(R_p(d) - R_s(d))J_2(\phi_0)|}{|(R_p(d) + R_s(d)) + (R_p(d) - R_s(d))J_0(\phi_0)|} \quad (7)$$

où  $g$  est une constante qui tient compte de la sensibilité de la détection synchrone et des différents gains des filtres électroniques.

---

<sup>4</sup> Le principe de la détection synchrone est basé sur une technique de détection de phase qui consiste à ne laisser passer à l'entrée de la détection synchrone que les signaux de fréquence identique à la fréquence de référence  $2f_m$  fournie par l'alimentation du modulateur photoélastique.

Contrairement aux substrats métalliques, dans le cas d'un substrat diélectrique les réflectivités  $R_p(d)$  et  $R_s(d)$  sont très différentes. L'expression du signal PM-IRRAS ne peut donc être simplifiée. De plus, la contribution due au substrat est beaucoup plus forte que celle due au film. Il est donc nécessaire d'effectuer le rapport du spectre PM-IRRAS de l'échantillon avec celui du substrat seul pour extraire les contributions dues uniquement au film.

### III. Règle de sélection à l'interface air - eau

L'expression théorique du signal PM-IRRAS étant établie, nous allons montrer qu'à partir des spectres PM-IRRAS expérimentaux il est possible de remonter à l'orientation des groupements moléculaires constituant les molécules à la surface.

En spectroscopie infrarouge, l'intensité d'une bande d'absorption associée à un mode de vibration  $i$  est proportionnelle à la quantité de molécules constituant le système étudié et à  $|\mathbf{M}_i \cdot \mathbf{E}|^2 = |\mathbf{M}_i \cdot \mathbf{E}|^2 \cos^2 \theta$  où  $\mathbf{M}_i$  est le moment de transition<sup>5</sup> associé au mode de vibration  $i$  et  $\mathbf{E}$  le champ électrique exciteur (schéma 2).

L'intensité d'une bande d'absorption est donc directement reliée à l'angle que fait le moment de transition avec la direction du champ électrique produit à l'interface.

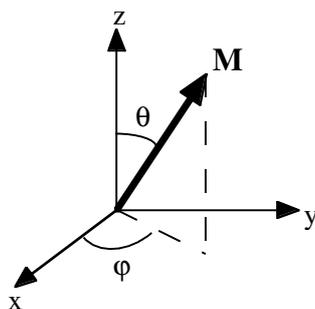


Schéma 2 : Orientation du moment de transition par rapport à la normale à l'interface

Contrairement au cas d'un substrat métallique caractérisé par une anisotropie unidirectionnelle du champ électrique à l'interface (seule la composante du champ électrique

<sup>5</sup>  $\mathbf{M}_i = \langle \psi_{v'} | \boldsymbol{\mu}_i | \psi_v \rangle$  où  $\psi_v$  et  $\psi_{v'}$  sont respectivement les fonctions d'onde des états vibrationnels inférieur et supérieur et  $\boldsymbol{\mu}_i$  l'opérateur moment dipolaire associé à la vibration  $i$  d'une liaison chimique donnée.

perpendiculaire est non nulle à la surface), pour un substrat diélectrique les trois composantes du champ électrique sont différentes et non nulles à l'interface (figure 5).

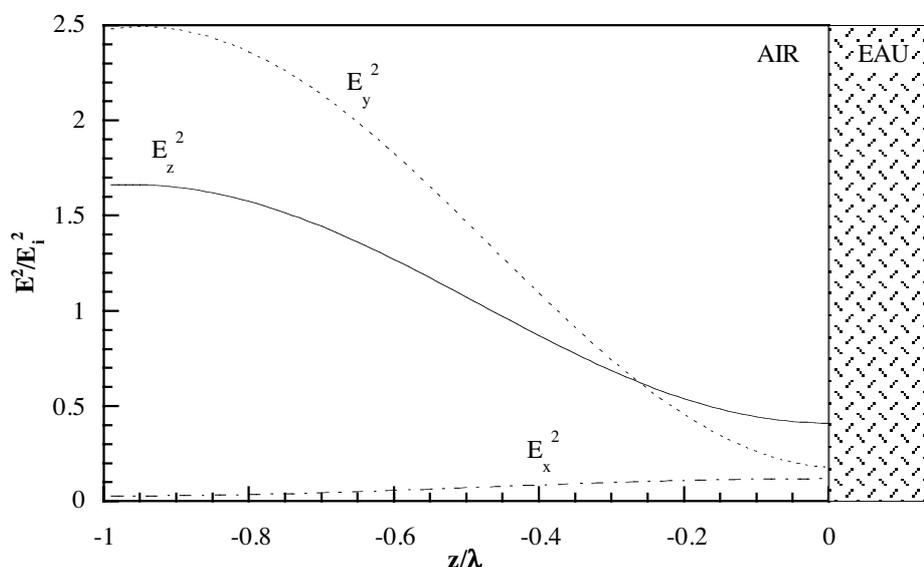


Figure 5 : Intensités des composantes du champ électrique à la surface de l'eau pour un angle d'incidence de 75°.

Par ailleurs, la simulation (figure 6) du signal PM-IRRAS en fonction de l'angle d'incidence pour un moment de transition parallèle (x,y) et perpendiculaire (z) à l'interface montre que, quelle que soit l'orientation du moment de transition (x, y ou z), il existe deux angles d'incidence pour lesquels le signal PM-IRRAS est extrémum. Bien que la valeur absolue du signal théorique soit quasiment identique pour ces deux angles, il s'avère qu'expérimentalement c'est l'angle d'incidence proche de 75° qui donne le meilleur rapport signal sur bruit. On peut voir en effet sur le diagramme de Fresnel (figure 7) que les réflectivités sont plus faibles pour un angle proche de 40°.

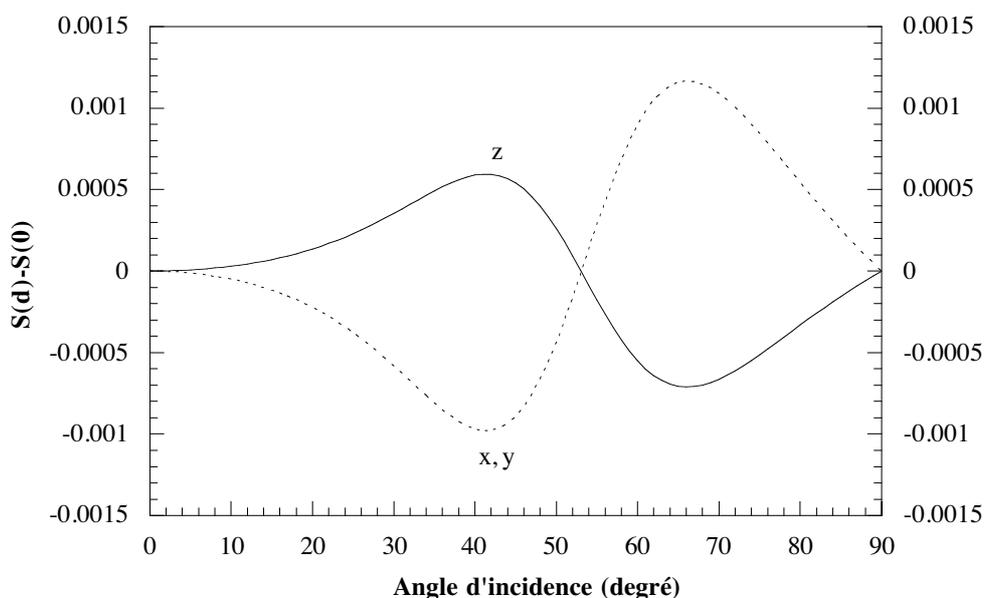


Figure 6 : Signal PM-IRRAS différence en fonction de l'angle d'incidence pour un moment de transition orienté parallèlement (x,y) ou perpendiculairement (z) au plan de l'interface.

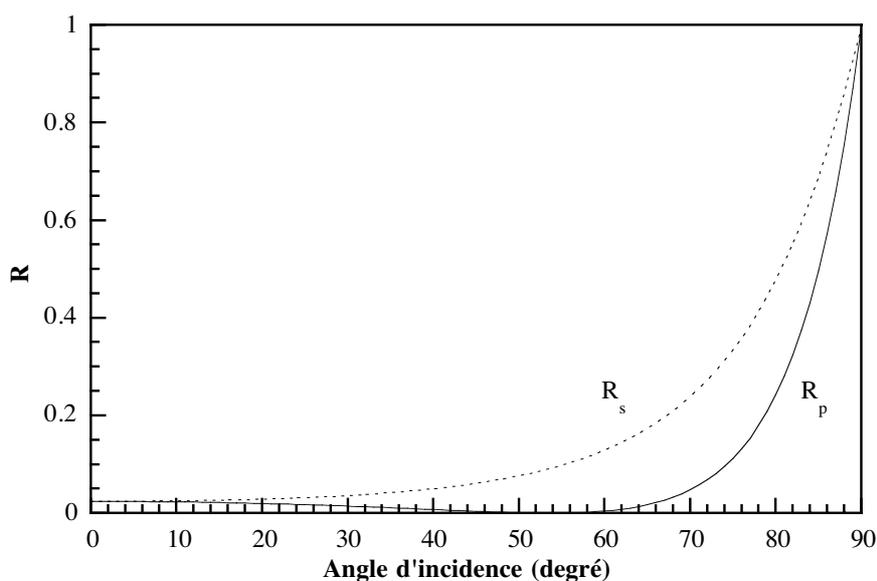


Figure 7 : Réflectivité des composantes s et p sur l'eau.

Afin de préciser la règle de sélection de la spectroscopie PM-IRRAS pour un substrat diélectrique pour un angle d'incidence de  $75^\circ$ , nous avons réalisé les simulations numériques du signal PM-IRRAS (figure 8) d'une bande d'absorption en fonction de la direction de son moment de transition par rapport à la normale à l'interface. La bande d'absorption est modélisée par une bande de profil à 90% lorentzien et 10% gaussien centrée à  $1500 \text{ cm}^{-1}$  et de largeur à mi-hauteur  $\Delta\bar{\nu} = 30 \text{ cm}^{-1}$ . Les coefficients d'extinction sont choisis tel que  $k_{\text{max}} = 0,4$ .

Le système modèle est un film uniaxe d'épaisseur 20 Å déposé sur une surface d'eau non absorbante d'indice de réfraction  $n_s = 1,33$ . Les résultats de la simulation permettent d'écrire les règles de sélection suivantes :

- à un moment de transition d'un groupement moléculaire parallèle au plan de l'interface correspond une bande d'absorption orientée vers le haut
- à un moment de transition d'un groupement moléculaire perpendiculaire au plan de l'interface correspond une bande d'absorption orientée vers le bas
- pour une orientation particulière du moment de transition par rapport au plan de l'interface ( $\theta \sim 40^\circ$ ), il y a extinction de la bande d'absorption.

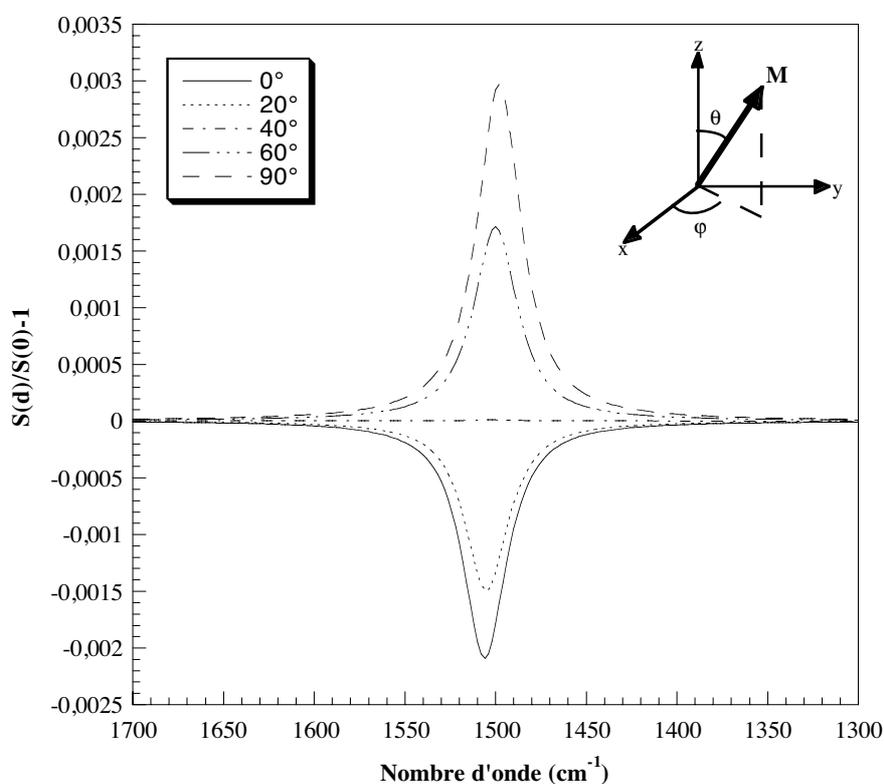


Figure 8 : Orientation d'une bande d'absorption en fonction de l'orientation du moment de transition par rapport à la normale à l'interface air-eau.

Ces résultats sont résumés sur le schéma suivant :

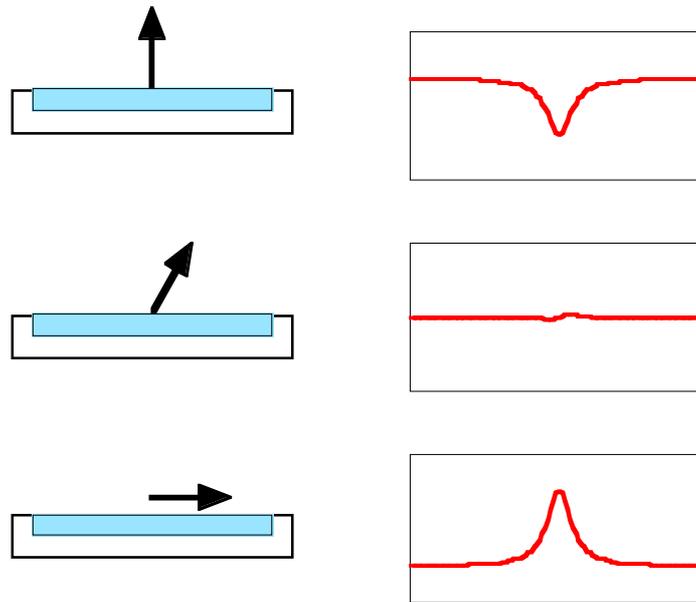


Schéma 3 : Règle de sélection de la spectroscopie PM-IRRAS à l'interface air-eau.

Ainsi pour une quantité fixée de molécules à l'interface, l'orientation d'une bande d'absorption sur un spectre PM-IRRAS permettra de remonter à l'orientation des moments de transition des groupements moléculaires présents à la surface.

#### **IV. Description d'une méthode pour augmenter la détectivité de la spectroscopie PM-IRRAS**

Dans cette dernière partie, nous allons montrer qu'il est possible d'augmenter la sensibilité de la spectroscopie PM-IRRAS par le simple ajout d'un polariseur après l'échantillon dans le montage présenté dans la partie II. Ce résultat qui a également été démontré dans le cas de substrats de verre et de substrats semi-conducteurs [12] sera présenté ici pour des monocouches à l'interface air-eau.

##### **IV.1. Signal PM-IRRAS théorique**

Notre démarche a été suggérée par l'analyse du signal PM-IRRAS théorique. En effet, contrairement au cas des substrats métalliques, pour une interface air-eau et plus généralement pour les substrats diélectriques, la contribution du substrat au spectre PM-IRRAS du système

{film + substrat} est importante à cause des valeurs très différentes des réflectivités  $R_p(d)$  et  $R_s(d)$ . Par conséquent, comme nous l'avons vu précédemment, il est nécessaire de normaliser le signal par le spectre du substrat seul pour extraire les absorptions dues uniquement au film.

Cependant, il est possible d'envisager de réduire la différence entre les réflectivités afin de réduire la contribution du substrat et ainsi d'exalter la contribution du film pour le signal PM-IRRAS du système {film + substrat}. De cette façon, le rapport signal sur bruit du spectre normalisé sera également amélioré. Cette condition sera notamment réalisée en ajoutant un polariseur après l'échantillon qui va modifier le poids des réflectivités  $R_p$  et  $R_s$  sur le signal PM-IRRAS. En effet, pour une direction de polarisation différente de  $45^\circ$  (qui correspond au cas où les polarisations p et s sont transmises de la même façon), on introduit des facteurs d'efficacité  $C_p$  et  $C_s$  qui traduisent le fait que les polarisations ne sont pas transmises de la même façon. Ainsi, dans l'expression théorique du signal PM-IRRAS, les termes réflectivités  $R_p(d)$  et  $R_s(d)$  sont remplacés respectivement par réflectivités  $C_p R_p(d)$  et  $C_s R_s(d)$ . En introduisant le rapport  $\gamma = C_p/C_s$ , l'expression de la formule (7) devient :

$$S_{\text{PM-IRRAS}, \gamma}^{\text{film}} = e^{-2\nu\bar{v}_i\tau} \frac{g \left| (\gamma R_p(d) - R_s(d)) J_2(\phi_0) \right|}{\left| (\gamma R_p(d) + R_s(d)) + (\gamma R_p(d) - R_s(d)) J_0(\phi_0) \right|} \quad (8)$$

Le facteur  $\gamma$  est directement relié à l'angle de polarisation  $\alpha$  par la formule<sup>6</sup> :

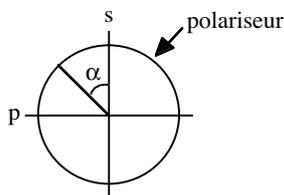
$$\gamma = \tan^2 \alpha. \quad (9)$$

Ainsi, il est possible en faisant varier  $\alpha$  d'ajuster le facteur  $\gamma$  tel que la valeur de  $\gamma R_p(d)$  tende vers celle de  $R_s(d)$ . Le deuxième terme du dénominateur de l'expression (8) peut alors être négligé devant le terme de  $\gamma R_p(d) + R_s(d)$ , soit :

$$S_{\text{PM-IRRAS}, \gamma}^{\text{film}} = e^{-2\nu\bar{v}_i\tau} \frac{g \left| (\gamma R_p(d) - R_s(d)) J_2(\phi_0) \right|}{\left| (\gamma R_p(d) + R_s(d)) \right|} \quad (10)$$

---

6



$$\tan \alpha = \frac{E_p}{E_s}$$

$$\gamma = \frac{C_p}{C_s} = \frac{I_p}{I_s} = \left( \frac{E_p}{E_s} \right)^2 = \tan^2 \alpha$$

Bien que cette expression soit similaire à celle obtenue pour un substrat métallique, il est néanmoins nécessaire d'effectuer la normalisation de ce signal par celui du substrat seul afin de s'affranchir du facteur  $e^{-2\nu\bar{\nu}_i\tau_g}$  et de la fonction de Bessel  $J_2$ . Le spectre PM-IRRAS du substrat seul étant effectué dans les mêmes conditions, le signal PM-IRRAS normalisé s'écrit de la façon suivante :

$$S_{\text{PM-IRRAS}, \gamma}^{\text{film}} = \frac{\left| \gamma R_p(d) - R_s(d) \right|}{\left| \gamma R_p(d) + R_s(d) \right|} \left| \frac{\gamma R_p(0) + R_s(0)}{\gamma R_p(0) - R_s(0)} \right| \quad (10)$$

On peut remarquer que l'expression diverge lorsque  $\gamma = \gamma_{\text{div}} = \frac{R_s(0)}{R_p(0)}$  et qu'elle change de

signe pour  $\gamma = \gamma_{\text{inv}} = \frac{R_s(d)}{R_p(d)}$ . Pour les films ultramines ( $d < 100 \text{ \AA}$ ), ces deux valeurs sont

sensiblement identiques (par exemple, dans le cas d'un film de  $100 \text{ \AA}$  d'épaisseur d'indice de réfraction  $n_{\text{film}} = 1,45$  et en considérant une sous-phase aqueuse d'indice de réfraction  $n_{\text{eau}} = 1,3$ , les calculs des réflectivités donnent  $\gamma_{\text{div}} = 2,67739$  et  $\gamma_{\text{inv}} = 2,67748$ ) et d'après l'expression des réflectivités, vont dépendre uniquement de l'indice du substrat et de l'angle d'incidence.

## IV.2. Règle de sélection

Avant de réaliser les expériences, nous avons étudié l'influence du facteur  $\gamma$  sur la règle de sélection à l'interface air-eau. Pour cela, nous avons effectué la simulation du signal PM-IRRAS d'une monocouche sur une surface d'eau ( $n = 1,3$ ). La monocouche a été modélisée par un film uniaxial d'indice optique  $n = 1,5$  et de  $20 \text{ \AA}$  d'épaisseur. Les bandes d'absorption ont été modélisées par deux bandes de profil à 90% lorentzien et 10% gaussien centrées à  $1500$  et  $1600 \text{ cm}^{-1}$  et de largeur à mi-hauteur égale à  $30 \text{ cm}^{-1}$ . Les coefficients d'extinction ont été choisis égaux à  $k_x = k_y = 0$  et  $k_z = 0,4$  pour la bande à  $1500 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à un moment de transition perpendiculaire à l'interface et à  $k_x = k_y = 0,2$  et  $k_z = 0$  pour la bande à  $1600 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à un moment de transition parallèle à l'interface. La figure 1 montre, pour un angle d'incidence de  $75^\circ$  et pour une fréquence de modulation de  $1550 \text{ cm}^{-1}$ , l'évolution du signal PM-IRRAS normalisé pour  $\gamma$  variant de 1 à 5.

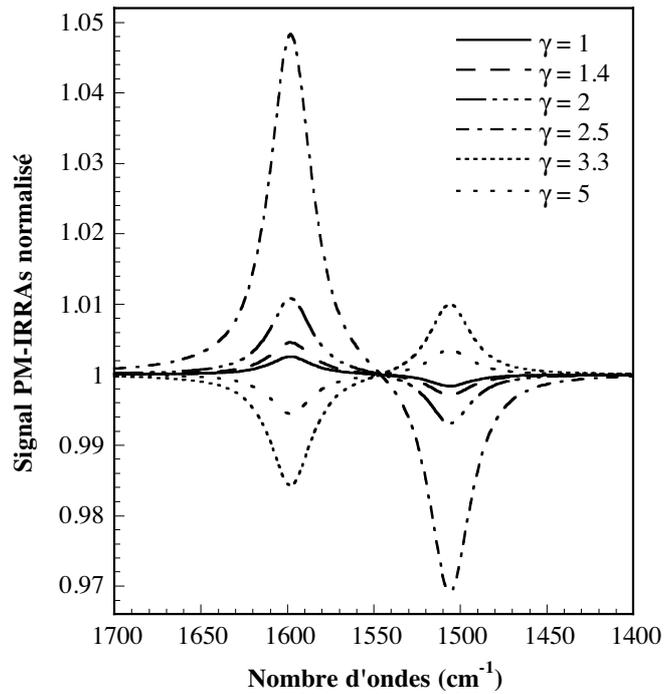


Figure 9 : Spectres PM-IRRAS normalisés calculés pour une monocouche modèle déposée sur un substrat de verre pour différentes valeurs de  $\gamma$ .

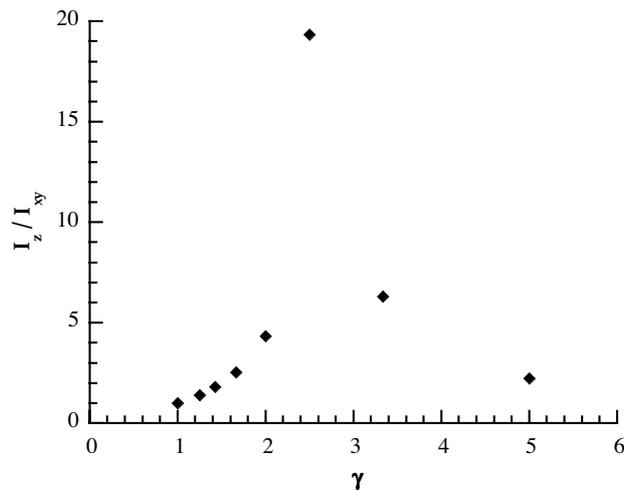


Figure 10 : Rapport des intensités des bandes d'absorption situées à  $1500 \text{ cm}^{-1}$  (moment de transition selon  $z$  perpendiculaire à l'interface) et  $1600 \text{ cm}^{-1}$  (moment de transition dans le plan  $xy$  parallèle à l'interface) en fonction de  $\gamma$ .

On retrouve bien pour  $\gamma = 1$  (correspondant à  $\alpha = 45^\circ$  ou à un montage sans polariseur) une bande positive pour un moment de transition perpendiculaire à l'interface et une bande négative pour un moment de transition parallèle à l'interface. On constate que le signe des bandes ne change pas jusqu'à  $\gamma = 2,5$  et que leur intensité relative augmente légèrement (voir figure 10). Pour une valeur de  $\gamma$  comprise entre 2,5 et 3,3, le signe des bandes s'inverse et

qu'au-delà de cette valeur, l'intensité relative des bandes diminue pour des valeurs croissantes de  $\gamma$ .

Comme le montre la théorie, bien qu'il existe une valeur de  $\gamma$ ,  $\gamma_{inv}$ , pour laquelle le signe des bandes s'inversent sans modifier de façon dramatique le rapport des intensités, on peut conclure que la règle de sélection à l'interface air-eau reste inchangée suite à l'ajout d'un polariseur de sortie. À l'issue de cette observation, nous avons entrepris l'étude expérimentale d'une monocouche de DMPC et d'une monocouche de poly-benzyl-glutamate (PBG) à l'interface air-eau.

### IV.3. Résultats expérimentaux

#### IV.3.1 Monocouche de DMPC

La monocouche de DMPC a été réalisée dans les conditions habituelles ; la solution de DMPC dans le chloroforme de concentration  $3 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  a été épanchée sur une sous-phase d'eau ultrapure telle que la pression de surface soit de  $25 \text{ mNm}^{-1}$ . À cette pression, les bandes de vibration antisymétrique et symétrique de la liaison C-H des groupements  $\text{CH}_2$  du DMPC sont parfaitement résolues. Elles sont situées respectivement à 2920 et 2850  $\text{cm}^{-1}$  sur les spectres PM-IRRAS normalisés (par rapport au spectre de l'eau seule) enregistrés pour différentes valeurs de  $\gamma$  (figure 11).

Pour  $\gamma = 1$ , ces deux bandes sont positives signifiant d'après la règle de sélection qu'en moyenne les moments de transition sont parallèles à l'interface correspondant à des chaînes carbonées orientées préférentiellement de façon perpendiculaire à l'interface ou légèrement inclinées. De nouveau, l'intensité des deux bandes et leur rapport augmentent avec  $\gamma$  jusqu'à une certaine valeur de  $\gamma$  comprise entre 2,3 et 2,5 pour laquelle il se produit une inversion du signe des bandes s'accompagnant d'une forte augmentation de leur intensité. Cependant, la valeur expérimentale de  $\gamma_{inv}$  est différente de la valeur 3,2 évaluée par la simulation pour un angle d'incidence de  $75^\circ$ . Cette différence provient du montage expérimental construit tel que le faisceau lumineux soit focalisé sur l'échantillon. De ce fait, il se produit une déviation de l'angle d'incidence de  $\pm 5^\circ$  sur sa valeur de  $75^\circ$  initialement réglée. Ce qui provoque une

variation des rapports des réflectivités  $R_p$  et  $R_s$  et par conséquent une variation sur  $\gamma_{inv}$  (égal à 5,6 pour  $\alpha = 70^\circ$  et 2,1 pour  $\alpha = 80^\circ$ ). De plus, la méthode expérimentale pour trouver l'angle du polariseur correspondant à  $\gamma = 1$ , qui consiste à enregistrer le spectre PM-IRRAS brut sans polariseur et à ajuster le polariseur tel que le spectre obtenu coïncide avec celui obtenu sans polariseur, introduit une approximation sur l'angle du polariseur conduisant à une incertitude sur la valeur de  $\gamma$  expérimentale.

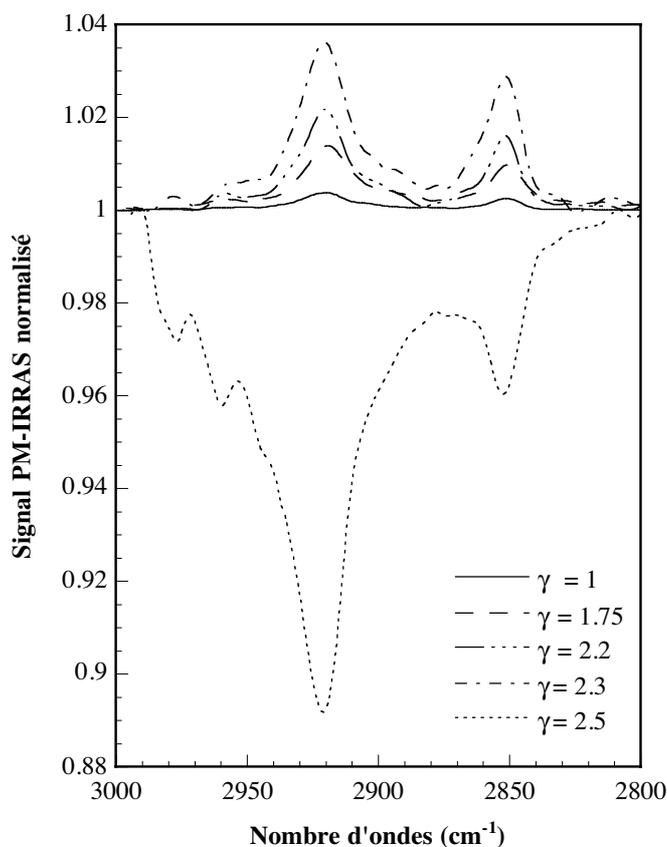


Figure 11 : Spectres PM-IRRAS normalisés d'une monocouche de DMPC formée à l'interface air-eau enregistrés pour différentes valeurs de  $\gamma$ .

#### IV.3.2 Monocouche de PBG

Nous avons choisi d'étudier le PBG, un polypeptide de structure secondaire uniquement en hélice- $\alpha$  pour tester la méthode avec le polariseur de sortie dans le domaine de fréquence du mode amide I. On sait que la monocouche de ce polypeptide à l'interface air-eau est constituée d'hélices- $\alpha$  orientées parallèlement à l'interface [13]. La monocouche, réalisée à

partir d'une solution de PBG dans le chloroforme de concentration  $4.10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ , a été étudiée à une pression de surface de  $7 \text{ mNm}^{-1}$ .

Les spectres PM-IRRAS bruts de la monocouche de PBG (figure 12) présentent vers  $1660 \text{ cm}^{-1}$  une forte bande négative correspondant au mode de déformation des liaisons O-H de l'eau. On peut remarquer que le signal élevé de cette bande dû au fort indice de réfraction de l'eau passe par la valeur zéro. Il n'est donc pas possible de réaliser le rapport de ces deux spectres qui conduirait à des divergences pour les passages à zéro. Afin de pouvoir étudier les absorptions du PBG, nous avons alors réalisé la différence des deux spectres pour différentes valeurs de  $\gamma$  (figure 13).

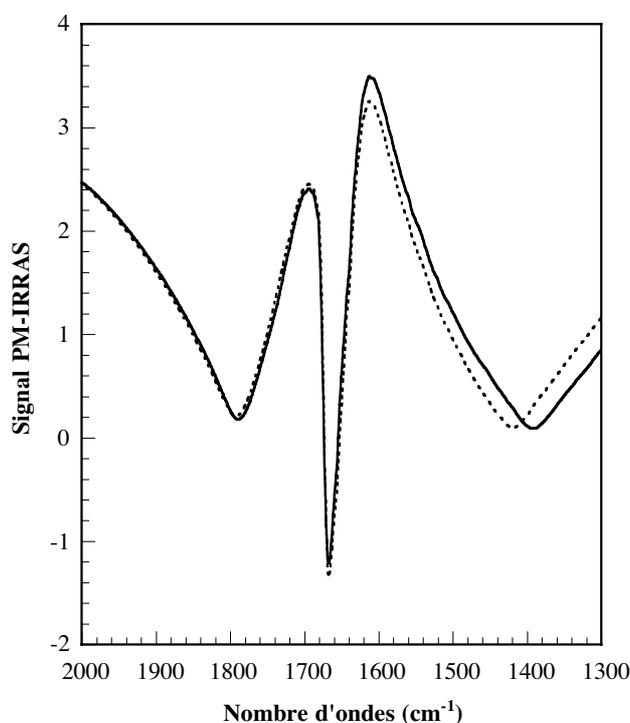


Figure 12 : Spectres PM-IRRAS d'une monocouche de PBG formée à l'interface air-eau (en trait plein) et de la surface d'eau (en trait pointillés) enregistrés pour  $\gamma = 2,2$ .

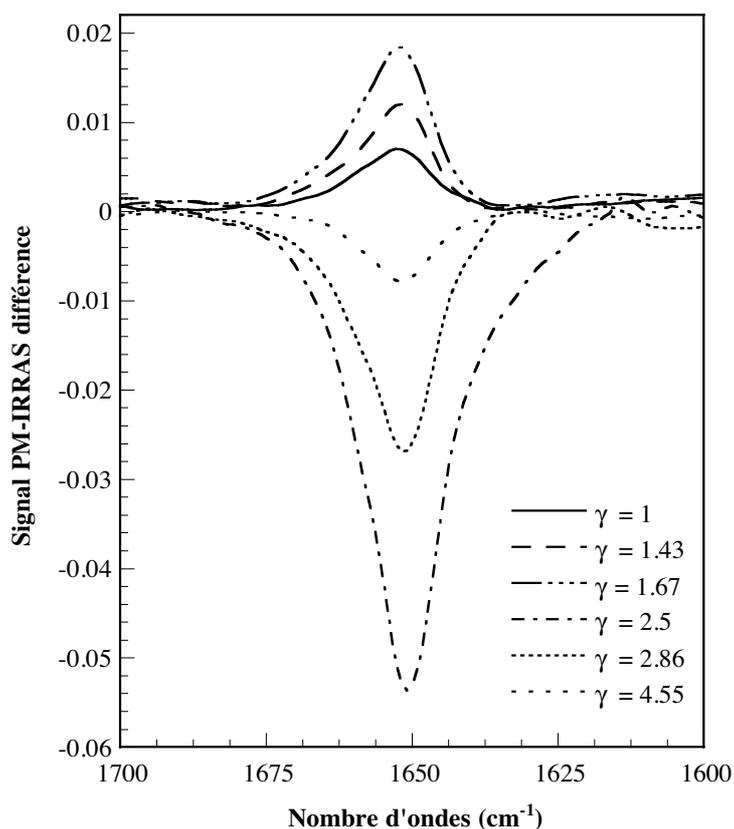


Figure 13 : Spectres PM-IRRAS différence d'une monocouche de PBG formée à l'interface air-eau pour différentes valeurs de  $\gamma$ .

La bande de vibration située vers 1650  $\text{cm}^{-1}$  correspond au mode de vibration du mode amide I (vibration de la liaison du carbonyle de la liaison peptidique) du PBG. Pour  $\gamma = 1$ , le signe positif de la bande confirme les résultats déjà obtenus [13], à savoir une orientation des hélice- $\alpha$  plutôt parallèles à l'interface. De la même façon que précédemment, pour  $\gamma < \gamma_{\text{inv}}$ , nous pouvons constater une augmentation de l'intensité pour des valeurs croissantes de  $\gamma$  et une diminution de l'intensité pour  $\gamma > \gamma_{\text{inv}}$ . L'inversion du signe de la bande amide I est observée pour une valeur de  $\gamma$  comprise entre 1,67 et 2,5.

Bien que cette première expérience sur  $\text{H}_2\text{O}$  montre qu'il est favorable de se placer à des valeurs différentes de  $\gamma = 1$ , afin de s'affranchir du problème lié à la forte absorption de l'eau dans ce domaine de fréquences, nous avons réalisé la même expérience sur  $\text{D}_2\text{O}$ .

On peut remarquer sur les spectres PM-IRRAS normalisés par un rapport (figure 14) que la deutération de la liaison peptidique provoque un décalage vers les basses fréquences de la bande amide I. Les modifications de l'intensité sont les mêmes que celles observées sur

H<sub>2</sub>O. On observe cependant un écart pour les valeurs de  $\gamma_{inv}$  à cause d'une différence entre les indices de réfraction de l'eau et de D<sub>2</sub>O dans ce domaine de fréquences.

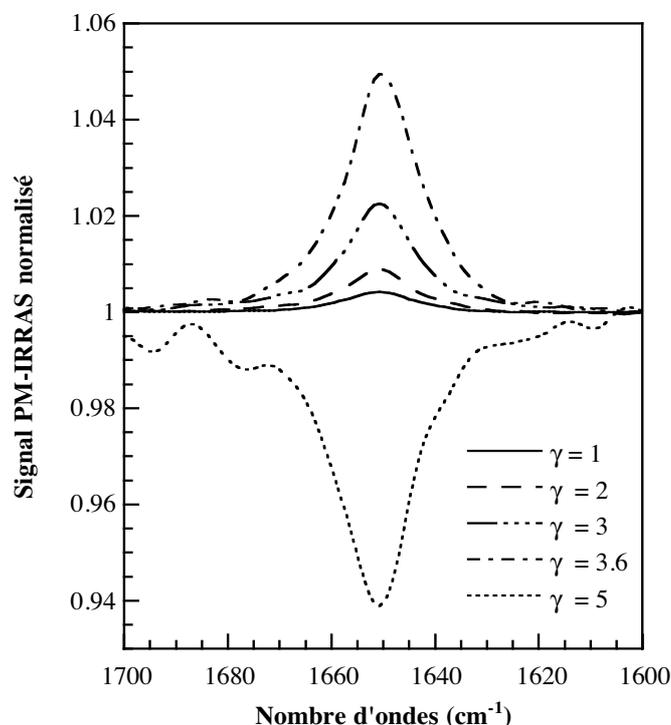


Figure 14 : Spectres PM-IRRAS normalisés d'une monocouche de PBG formée à l'interface air-D<sub>2</sub>O pour différentes valeurs de  $\gamma$ .

#### IV.4. Conclusion

L'ensemble de ces résultats montrent que le simple ajout d'un polariseur après l'échantillon sur le montage expérimental permet d'augmenter la détectivité du signal PM-IRRAS de plusieurs ordres de grandeur. Cette méthode peut donc être envisagée lorsque les bandes d'absorption que l'on veut observer sont difficilement visibles sur le spectre normalisé. C'est le cas par exemple lorsque l'on souhaite étudier, à l'interface air-eau, l'insertion de faibles concentrations de peptides ou de protéines dans des systèmes membranaires modèles.

## Bibliographie

- [1] R. G. Greenler. 1966. J. Chem. Phys., 44, 310.
- [2] R. G. Greenler. 1969. J. Chem. Phys., 50, 1963.
- [3] L. A. Nafie and D. W. Vidrine. *Double modulation Fourier transform spectroscopy in Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Vol.3, chap.3 (J. R. Ferraro, L. J. Basile, Academic Press, NY, 1982).
- [4] W. G. Golden. In *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* vol.4, chap.8 (J.R. Ferraro, L.J. Basile, Academic Press, NY, 1985).
- [5] T. Buffeteau. 1988. Thèse de l'Université Bordeaux I.
- [6] D. Blaudez. 1993. Thèse de l'Université Bordeaux I.
- [7] T. Buffeteau and al. 1991. Appl. Spectrosc., 45, 380.
- [8] D. Blaudez and al. 1996. J. Chem. Soc., Faraday Trans., 92, 525.
- [9] E. Le Calvez and al. 2001. Langmuir, 17, 670.
- [10] K. W. Hipps, G. A. Crosby. 1979. J. Phys. Chem., 83, 555.
- [11] E. Péré. 1996. Thèse de l'Université Bordeaux I.
- [12] J. Sacconi and al. Article à paraître dans *Applied Spectroscopy* (Octobre 2003).
- [13] T. Buffeteau and al. 2000. J. Phys. Chem. B, 104, 4537.



## CHAPITRE II \_ FORMATION DE MULTICOUCHES À L'INTERFACE AIR-EAU

Un enjeu majeur de la recherche biomédicale consiste notamment à mieux comprendre le fonctionnement des cellules, siège de phénomènes indispensables au bon fonctionnement de l'être humain (réplication de l'ADN, synthèse de protéines, glycolyse, dégradation des acides gras, ...). On peut comprendre l'intérêt qu'elles suscitent puisqu'elles constituent l'élément de base des systèmes biologiques complexes.

Au laboratoire, nous étudions plus particulièrement la paroi perméable qui cloisonne la cellule : la membrane plasmique (schéma 1).

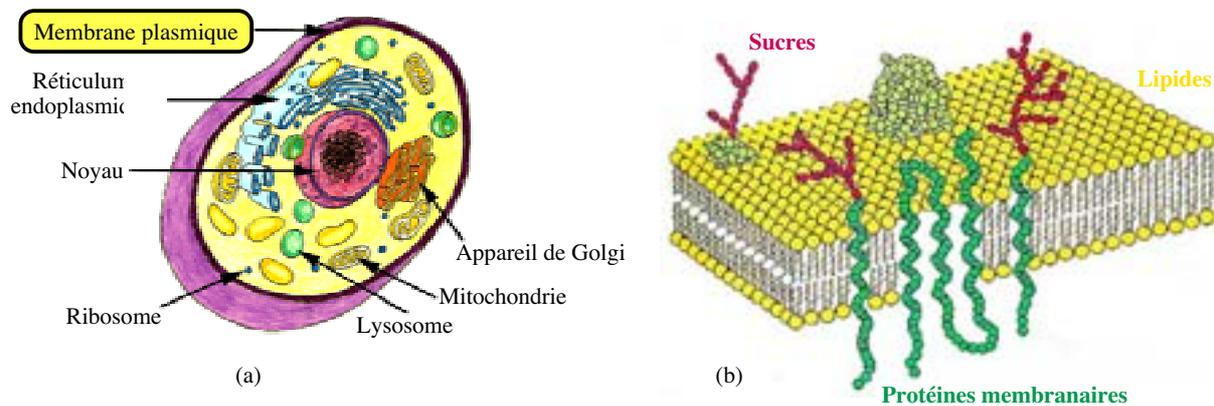


Schéma 1 : Coupe d'une cellule eucaryote (a) et représentation de sa membrane plasmique (b).

C'est par l'intermédiaire de cette membrane que la communication avec l'extérieur de la cellule peut s'établir. La membrane plasmique est constituée d'un mélange complexe de lipides (phospholipides, cholestérol, acides gras, sphingomyéline, ...), de protéines et de sucres dont les proportions varient avec le type de cellules envisagé. Parmi les constituants majoritaires des lipides, les phospholipides forment une bicouche qui sépare le cytoplasme de la cellule du milieu extracellulaire. C'est dans cette bicouche que sont localisées les protéines membranaires qui font de la membrane le siège actif de nombreux processus cellulaires (transport membranaire, motilité cellulaire, phénomène d'adhésion, phénomènes d'endocytose et d'exocytose, ...). En appréhendant les rôles structural et biologique des membranes naturelles, on espère pouvoir élucider par étapes les mécanismes d'un grand nombre de processus cellulaires et le rôle des protéines qui y sont impliquées. Cependant, face

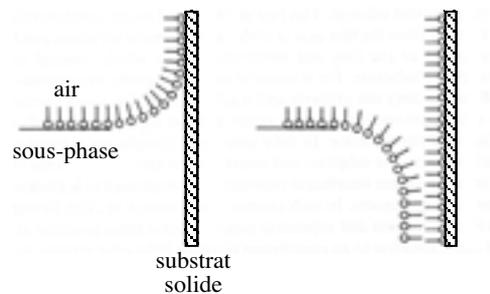
à la complexité de structure et de composition des membranes réelles, on est amené à travailler sur des systèmes moléculaires modèles plus simples (monocouches de Langmuir, bicouches supportées sur substrat solide, vésicules reconstituées, ...).

C'est à I. Langmuir (1881-1957) que l'on doit le premier modèle de membrane dans les années 1930. Ses études sur des films d'huile à la surface de l'eau [1] l'ont amené à formuler une théorie générale sur la chimie surfacique qui lui a valu le prix Nobel de Chimie en 1932. Avec sa collaboratrice K. B. Blodgett (1898-1979), ils introduisent la notion de monocouches, films de surface d'épaisseur atomique ou moléculaire possédant des propriétés bidimensionnelles [2, 3].



*Photo 1 : Irving Langmuir et Katharine Burr Blodgett.*

Ils mettent également au point la technique, dite de Langmuir-Blodgett, qui consiste à transférer sur un substrat solide plongé verticalement, à pression de surface constante, une ou plusieurs couches d'une monocouche formée à l'interface air-eau (schéma 2). On peut ainsi obtenir différentes structures de couches supportées selon la nature hydrophile ou hydrophobe du substrat (schéma 3).



*Schéma 2 : Technique de transfert de Langmuir-Blodgett (d'après [4]).*

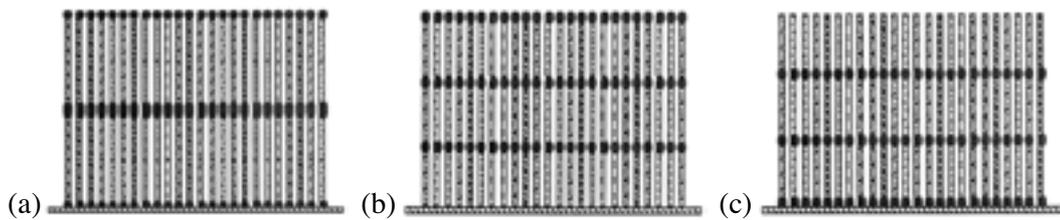


Schéma 3 : Représentation des différentes structures de films Langmuir-Blodgett. Substrats hydrophiles : association de type Y (a), association de type Z (c). Substrats hydrophobes : association de type X (b) (d'après [5]).

La méthode de Langmuir-Schaefer introduite en 1938 permet également de former des bicouches supportées par approche horizontale du substrat près de l'interface (schéma 4).

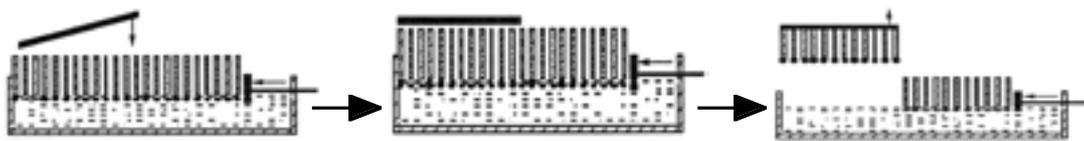


Schéma 4 : Méthode de transfert selon la technique de Langmuir-Schaefer (d'après [5]).

Un autre type de cellule modèle dont la forme sphérique se rapproche de la géométrie des cellules réelles sont les vésicules (schéma 5). Leur paroi, constituée de deux couches accolées de lipides membranaires, reproduit en effet l'armature de la structure complexe de la membrane cellulaire.

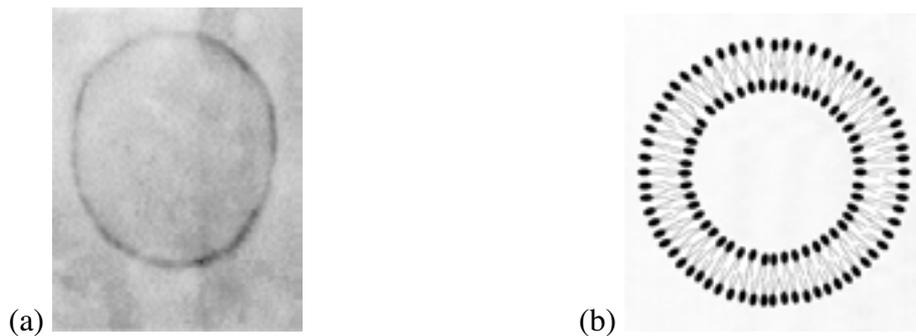


Schéma 5 : (a) Image d'une vésicule obtenue par microscopie à contraste de phase. (b) Coupe d'une vésicule dont le cœur est constitué d'une bicouche sphérique.

Les trois modèles cités ci-dessus, les monocouches de Langmuir, les multicouches supportées et les vésicules constituent encore aujourd'hui les principaux modèles d'étude des membranes biologiques. Chacun, selon sa spécificité de structure, présente en effet une alternative intéressante pour l'étude des membranes cellulaires et apporte des informations

complémentaires sur l'organisation, l'orientation des molécules de la membrane et la nature des interactions développées avec des peptides ou des protéines membranaires.

Par exemple, contrairement aux vésicules à cause de la trop forte absorption de l'eau, les monocouches de Langmuir et les multicouches supportées, sont particulièrement bien adaptées à une étude en spectroscopie PM-IRRAS. En revanche, les vésicules constituent un modèle d'étude mieux adapté pour l'analyse de l'interaction de protéines membranaires avec une membrane en raison de leur épaisseur hydrophobe qui reproduit parfaitement celle des cellules réelles. Dans le cas des multicouches supportées, la couche d'eau présente au-dessus peut être une limitation pour certaines techniques d'analyse comme la diffraction de rayons X ou la spectroscopie de fluorescence. De plus, la présence d'un substrat solide peut perturber la structure de la couche et modifier la nature des interactions entre les molécules.

C'est dans la perspective de réaliser des systèmes modèles encore plus proches de la structure des membranes naturelles, que s'inscrit ma thèse. Un des objectifs a été en effet de mettre au point des méthodes qui permettent de stabiliser, à l'interface air-eau, des multicouches (bicouches, tricouches) de phospholipides. Ainsi les systèmes formés pourront être étudiés par différentes méthodes de spectroscopie optique (Infrarouge, Raman, UV-Visible) en fonction de divers paramètres physicochimiques (pH, force ionique, peptides, ...). Nous espérons que ces nouveaux systèmes modèles présenteront un grand intérêt pour l'étude des interactions membranes-protéines. En effet, reproduisant l'épaisseur hydrophobe des membranes naturelles, nous comptons comparer la nature des interactions mises en jeu lors de l'insertion de peptides membranaires avec les études effectuées sur monocouches [6-12]. Ces multicouches formées à l'interface air-eau pourront être étudiées par les deux techniques d'analyse de surface du laboratoire : la microscopie à l'angle de Brewster et la spectroscopie PM-IRRAS afin de préciser l'organisation et l'orientation des phospholipides constituant le système. La sous-phase pourra être également modulée afin de se rapprocher des conditions physiologiques. Par ailleurs, je voudrais souligner qu'au début de ce travail, aucun système de ce type n'avait encore jamais été réalisé. Seuls des travaux de N. L. Gershfeld [13-20], basés principalement sur des mesures de pression de surface, avaient suggéré la formation de

bicouches de DMPC, à l'interface air-eau, à partir de l'éclatement de vésicules à une température critique. Cependant, aucune étude au niveau moléculaire n'a été entreprise.

Notre démarche a été progressive. La première approche décrite dans la deuxième partie de ce chapitre a consisté à reproduire l'épaisseur hydrophobe d'une membrane réelle à partir de monocouches de Langmuir d'un acide gras à longue chaîne carbonée. Après avoir présenté les résultats obtenus, nous verrons les limitations de ce type de systèmes. Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à chercher des conditions expérimentales qui permettent de réaliser et de stabiliser de façon simple des multicouches phospholipidiques à l'interface air-eau. En nous inspirant de la méthode de Langmuir à partir de cuves modifiées, nous avons cherché à contrôler le phénomène de collapse, au cours duquel les molécules sont susceptibles de basculer les unes sur les autres, pour former dans certains cas des bicouches ou tricouches stables à l'interface air-eau. Les deux méthodes, pas encore systématiques pour tous les phospholipides classiques, seront décrites dans les parties trois et quatre. Enfin, je présenterai dans une dernière partie une autre méthode de réalisation de bicouche phospholipidique formée sous une monocouche d'octadécyltriméthoxysilane (OTMS) polymérisée à la surface de l'eau. Cette méthode facile à mettre en œuvre et reproductible semble à l'heure actuelle la plus prometteuse. Avant de décrire ces différentes méthodes, je présenterai dans une première partie quelques généralités sur les monocouches de Langmuir et montrerai comment il est possible, à partir de la microscopie à l'angle de Brewster et la spectroscopie PM-IRRAS, de remonter à l'épaisseur des systèmes formés à l'interface air-eau et à l'orientation des molécules de la couche.

## I. Généralités

### I.1. Les molécules amphiphiles

L'idée de Langmuir pour former des monocouches à l'interface air-eau a été d'exploiter le caractère amphiphile (du grec "qui aime des deux côtés") des lipides. Au cours de ce paragraphe, je me focaliserai plus particulièrement sur les phospholipides avec lesquels j'ai travaillé au cours de la thèse. Ces molécules composées d'une tête polaire et d'une chaîne carbonée (schéma 6) s'organisent spontanément à l'interface air-eau, la partie hydrophile développant des interactions favorables avec la sous-phase et la partie hydrophobe dirigée vers l'air (schéma 7).

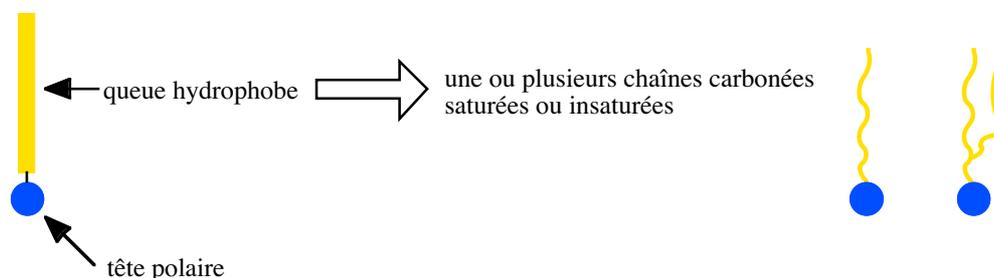


Schéma 6 : Structure des molécules amphiphiles.

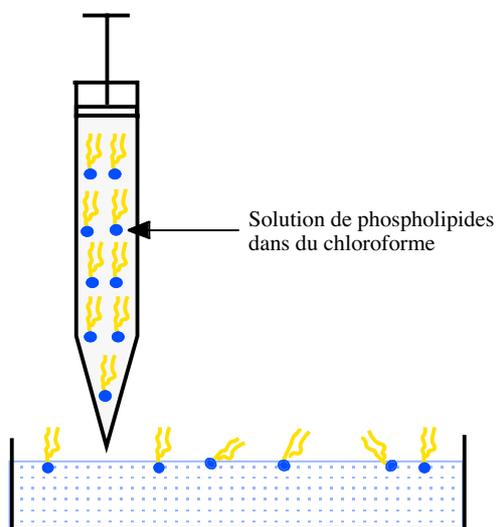


Schéma 7 : Organisation des molécules de phospholipides à l'interface air-eau.

Bien que la solubilité des lipides soit faible dans l'eau, il existe toujours un équilibre entre les molécules de lipides qui s'organisent en film monomoléculaire à l'interface air-eau et des molécules libres dans la sous-phase. C'est cet état d'équilibre qui caractérise les films de Gibbs. Cependant, dans le cas des phospholipides, cet équilibre est fortement déplacé vers

la formation du film à l'interface. On peut alors considérer que toutes les molécules épanduës restent à la surface. On forme dans ce cas, ce qu'on appelle des films de Langmuir, cas particulier des films de Gibbs (schéma 8).

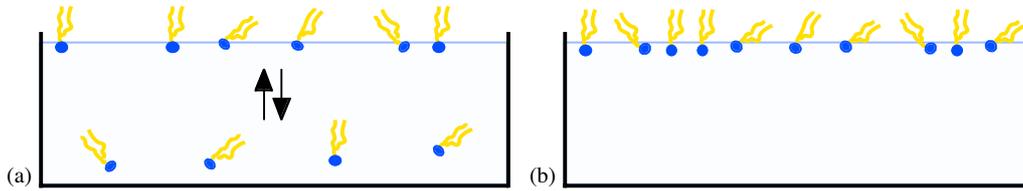


Schéma 8 : (a) Films de Gibbs. (b) Films de Langmuir.

## I.2. Isotherme de compression

Un film de Langmuir, système bidimensionnel, est caractérisé par deux paramètres : la pression de surface et l'aire moléculaire. La pression de surface  $\pi$ , l'équivalent de la pression pour un système tridimensionnel, est définie de la façon suivante :

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

où  $\gamma_0$  et  $\gamma$  sont respectivement la tension superficielle de l'eau ( $\gamma_0 = 72,8 \text{ mN/m}$  à  $20^\circ\text{C}$ ) et la tension superficielle d'une surface recouverte par un film, avec  $\gamma = \left. \frac{\partial G}{\partial S} \right)_{T,P,n}$  (n étant le nombre de molécules présentes à la surface). La pression de surface est donc un indicateur de l'état d'organisation d'un film à la surface. Une pression de surface élevée sera caractéristique d'un état ordonné. L'aire moléculaire  $A$  est définie par l'aire moyenne occupée par un ensemble de molécules sur une surface d'aire donnée. Elle est d'autant plus faible que le film est compact. Il existe donc une relation étroite entre la pression de surface et l'aire moléculaire caractérisée par la courbe donnant l'évolution de  $\pi$  en fonction de  $A$ , appelée l'isotherme de compression (figure 1). En comprimant le film à l'interface grâce à une barrière mobile adaptée sur une cuve de Langmuir, il est alors possible de contrôler sa compacité. Par analogie avec les systèmes tridimensionnels, on définit différents états d'organisation d'un film (figure 1). Pour une pression de surface croissante, on distingue successivement la phase gaz, la phase liquide expansé et la phase liquide condensé. Lorsque les molécules ne peuvent plus être comprimées, il existe une pression de surface pour laquelle

on définit le phénomène de collapse qui correspond dans certains cas au basculement des molécules sur les autres et se traduit par la formation de surépaisseurs à la surface.

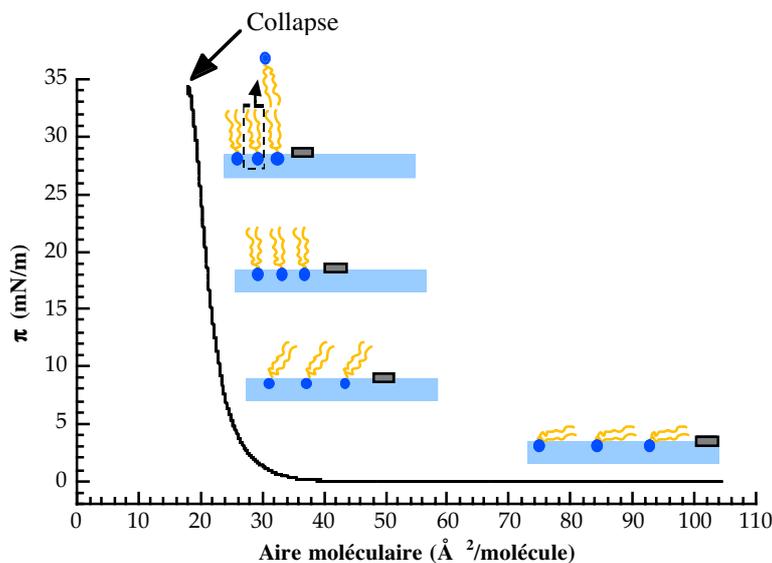


Figure 1 : Isotherme de compression avec l'évolution de l'état d'organisation du film en fonction de sa pression de surface.

Expérimentalement, la pression de surface est mesurée grâce à une balance de Wilhelmy (schéma 9). Le principe de la mesure repose sur la force qui s'applique sur un morceau de papier plongeant dans la sous-phase au niveau de l'interface et suspendu à une tige reliée à un tensiomètre qui mesure cette force.

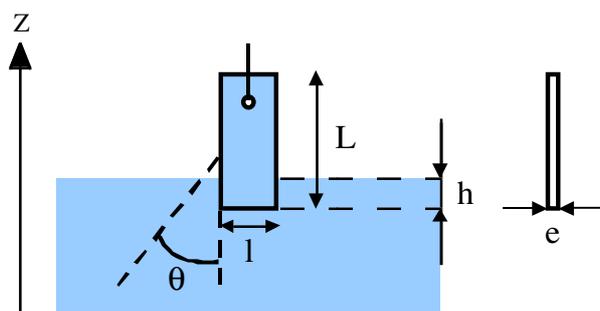


Schéma 9 : Balance de Wilhelmy.

La résultante des forces qui s'exercent sur le morceau de papier peut s'écrire [21] :

$$\mathbf{F} = \mathbf{P} + \mathbf{P}_A + \mathbf{f} \quad (1)$$

où  $\mathbf{P}$  représente le poids du morceau de papier,  $\mathbf{P}_A$  la poussée d'Archimède et  $\mathbf{f}$  la force interfaciale qui résulte du mouillage.

La projection sur l'axe  $z$  de la relation (1) donne pour une interface d'eau :

$$F_z^{\text{eau}} = -\rho_{\text{papier}} L \ell g + \rho_{\text{eau}} h \ell g - 2(e + \ell) \gamma_{\text{eau}} \cos \theta \quad (2)$$

où  $\rho_{\text{papier}}$  et  $\rho_{\text{eau}}$  sont respectivement la masse volumique du papier et de l'eau,  $L$ ,  $\ell$  et  $e$ , la longueur, la largeur et l'épaisseur du papier,  $h$  la hauteur d'immersion du papier,  $g$  la constante de gravité,  $\gamma_{\text{eau}}$  la tension superficielle de l'eau et  $\theta$  l'angle de mouillage. Le mouillage pouvant être considéré total dans le cas de l'eau ( $\theta = 0$ ), l'expression (2) peut s'écrire :

$$F_z^{\text{eau}} = -\rho_{\text{papier}} L \ell g + \rho_{\text{eau}} h \ell g - 2(e + \ell) \gamma_{\text{eau}} \quad (3)$$

Dans le cas où la surface est recouverte d'un film mince, la force selon  $z$  a pour expression :

$$F_z^{\text{film}} = -\rho_{\text{papier}} L \ell g + \rho_{\text{eau}} h \ell g - 2(e + \ell) \gamma_{\text{film}} \quad (4)$$

Ainsi :

$$\Delta F_z = F_z^{\text{film}} - F_z^{\text{eau}} = 2(e + \ell)(\gamma_{\text{eau}} - \gamma_{\text{film}}) = 2(e + \ell)\pi \quad (5)$$

La pression de surface est donc directement reliée à la différence entre la force qui s'exerce sur le morceau de papier en présence et en absence de film à l'interface.

$$\pi = \frac{\Delta F_z}{2(e + \ell)} \quad (6)$$

## II. Techniques expérimentales

Les nouveaux systèmes modèles formés à l'interface air-eau ont été caractérisés et étudiés avec les deux techniques d'analyse de surface du laboratoire : la microscopie à l'angle de Brewster et la spectroscopie PM-IRRAS. Afin de comprendre comment il est possible d'évaluer l'épaisseur des systèmes formés et leur état de compacité, je présenterai dans les deux paragraphes suivants chacune de ces deux techniques.

### II.1. Microscopie à l'angle de Brewster

#### II.1.1 Principe

La microscopie à l'angle de Brewster [22, 23] est une technique qui permet de visualiser *in situ* l'état de la surface d'un film et/ou son évolution au cours d'une compression. Elle est basée sur la réflectivité nulle d'une surface d'eau pour une lumière polarisée dans le plan d'incidence et pour un angle d'incidence appelé l'angle de Brewster (voir chapitre 1). Si la

surface est recouverte d'un film mince d'indice optique  $n$  différent de celui de l'eau, un rayon lumineux de faible intensité est réfléchi puis est collecté par une caméra CCD (schéma 10).

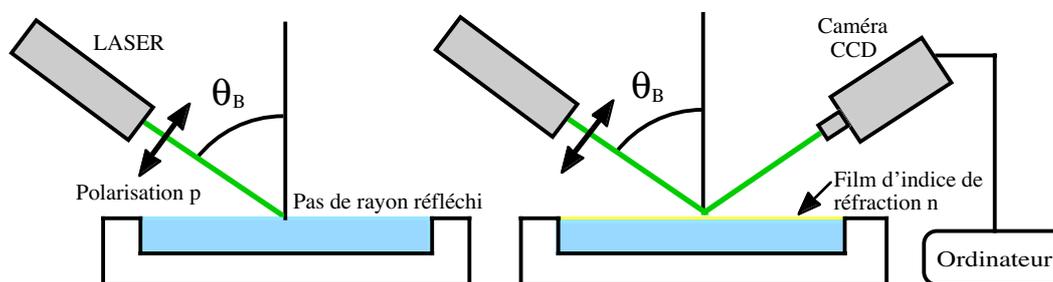


Schéma 10 : Montage expérimental de la microscopie à l'angle de Brewster.

### II.1.2 Images Brewster

La caméra CDD, équipée d'un objectif de grossissement  $\times 10$ , permet de visualiser la surface du film sur des images de dimensions  $430 \mu\text{m} \times 540 \mu\text{m}$ . Les images (voir par exemple les images 4) sont codées en niveaux de gris dont les variations dépendent des différences locales d'épaisseur et des propriétés de dispersion optique du film et du temps d'obturation choisie pour la caméra. Comme dans le cas des systèmes tridimensionnels, la forme des domaines est indicatrice de leur fluidité.

### II.1.3 Expression de la réflectance

À l'interface air-eau et à l'angle de Brewster, on montre, d'après la formule 7 [24], que, pour un indice optique du film constant, la réflectance varie comme l'épaisseur du film au carré.

$$R \propto \left(\frac{e}{\lambda}\right)^2 \frac{(n_{\text{film}}^2 + n_{\text{air}}^2)}{(n_{\text{film}}^2 - n_{\text{air}}^2)^2} \frac{(n_{\text{film}}^2 - n_{\text{eau}}^2)^2 (n_{\text{air}}^2 - n_{\text{eau}}^2)^2}{n_{\text{eau}}^4} \quad (7)$$

où  $n_{\text{air}}$ ,  $n_{\text{eau}}$ , et  $n_{\text{film}}$  représentent respectivement l'indice de l'air, de l'eau et du film. Dans ces conditions, si on suppose que l'indice ne varie pas lorsque le film évolue d'une monocouche à une bicouche ou d'une monocouche à une tricouche, la réflectance est respectivement multipliée par 4 ou 9. Expérimentalement, la réflectance est déterminée à partir des niveaux de gris mesurés sur les images Brewster grâce à une procédure de calibration.

## II.1.4 Procédure de calibration

Théoriquement, il est établi que la courbe de Fresnel, pour une polarisation  $p$ , passe par un minimum à l'angle de Brewster (figure 7, chapitre I). Au voisinage de ce minimum, la courbe peut être paramétrée par une parabole dont l'équation est intégrée au logiciel de la microscopie à l'angle de Brewster (figure 2).

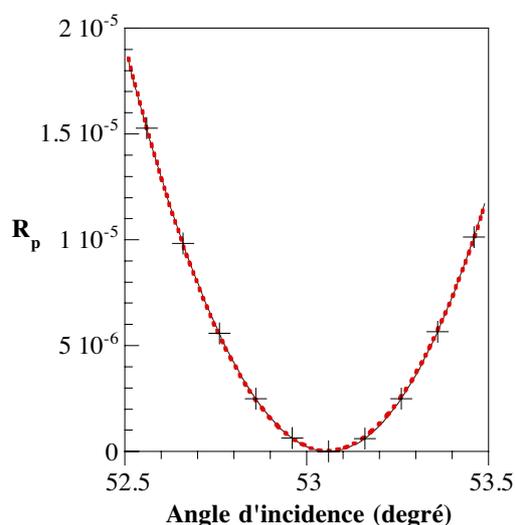


Figure 2 : Parabole correspondant à l'ajustement du minimum de la courbe de Fresnel, pour une polarisation  $p$ , autour de l'angle de Brewster.

La procédure de calibration, effectuée pour un temps d'obturation de la caméra donné, permet de calibrer les niveaux de gris en fonction de l'angle d'incidence. La courbe obtenue (figure 3) est ensuite ajustée par le logiciel à l'équation théorique de la parabole et l'ajustement trouvé permet alors de déterminer la courbe reliant la réflectance en fonction du niveau de gris (figure 4). La réflectance étant connue, il est donc possible de remonter à l'épaisseur du film d'après un modèle basé sur la formule 7.

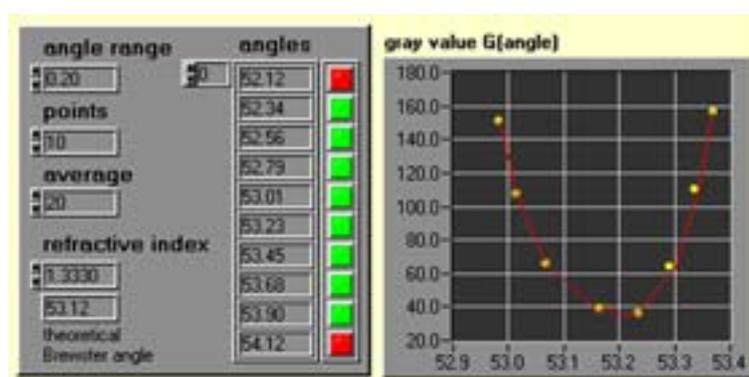


Figure 3 : Courbe de calibration du niveau de gris en fonction de l'angle d'incidence pour un temps d'oburation donné.

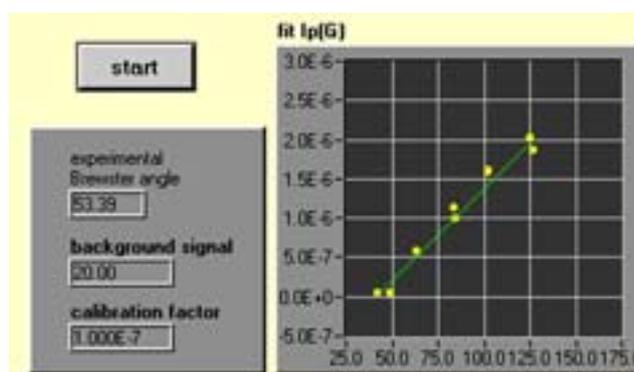


Figure 4 : Courbe de l'intensité de la réflectance en fonction du niveau de gris déterminé grâce à la procédure de calibration du logiciel de la microscopie à l'angle de Brewster.

## II.2. Spectroscopie PM-IRRAS

Les résultats obtenus en microscopie à l'angle de Brewster peuvent être ensuite complétés par une étude en spectroscopie PM-IRRAS. D'après la règle de sélection à l'interface air-eau (voir chapitre 1), il est possible, à partir de l'orientation et de l'intensité des bandes d'absorption, de préciser l'organisation et l'orientation des molécules de phospholipides constituant le film ainsi que la quantité de molécules présentes à l'interface. Par conséquent, l'intensité de la bande d'absorption d'un mode de vibration sera doublée ou triplée dans le cas d'une bicouche ou d'une tricouche si on considère que l'orientation des molécules n'est pas modifiée par rapport à la monocouche.

## III. Monocouches de Langmuir de molécules à longue chaîne carbonée

L'intérêt de former des bicouches à l'interface air-eau est notamment de reproduire l'épaisseur hydrophobe des membranes naturelles dans un environnement aqueux. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons envisagé de réaliser des monocouches de molécules à longues chaînes carbonées par la méthode de Langmuir. Cette méthode parfaitement reproductible présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre.

L'acide tricontanoïque (schéma 1) nous a paru intéressant à étudier. Cet acide gras composé de trente carbones présente en effet une longueur de chaîne carbonée, qui en configuration trans, est environ deux fois plus grande que celle des phospholipides classiques (DMPC, DPPC). D'autre part, son groupement carboxylique, sensible aux variations de pH et

de force ionique de la sous-phase, le rend plus attractif que son homologue alcoolique, l'alcool triacontanol.

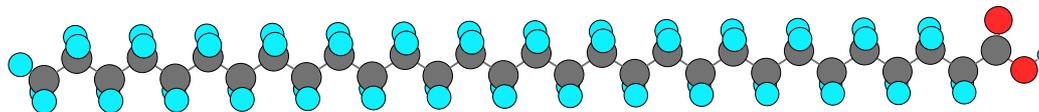


Schéma 11 : Molécule d'acide tricontanoïque.

Nous avons donc vérifié dans un premier temps que l'épaisseur hydrophobe de sa monocouche à l'interface air-eau était proche de celle des membranes naturelles. Puis, dans le but de rendre le système plus fluide et pour avoir une composition plus en adéquation avec celle des membranes biologiques, nous l'avons étudié en mélange avec du DMPC en compression à l'interface air-eau. Chacune de ces études a été réalisée en microscopie à l'angle de Brewster et en spectroscopie PM-IRRAS.

### III.1. Étude de l'acide tricontanoïque

La monocouche d'acide tricontanoïque a été obtenue à l'interface air-eau par la méthode classique de Langmuir en épandant sur une cuve de Langmuir (photo 2) la solution d'acide de concentration  $10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  à la surface de l'eau.



Photo 2 : Cuve de Langmuir

L'isotherme présenté figure 5 a été obtenu en comprimant à vitesse lente ( $0,03 \text{ \AA}^2$  par molécule). Son allure est caractéristique des acides gras saturés avec un saut abrupt de la tension de surface vers une aire moléculaire d'environ  $30 \text{ \AA}^2$  et une aire limite de  $19 \text{ \AA}^2$  [25].

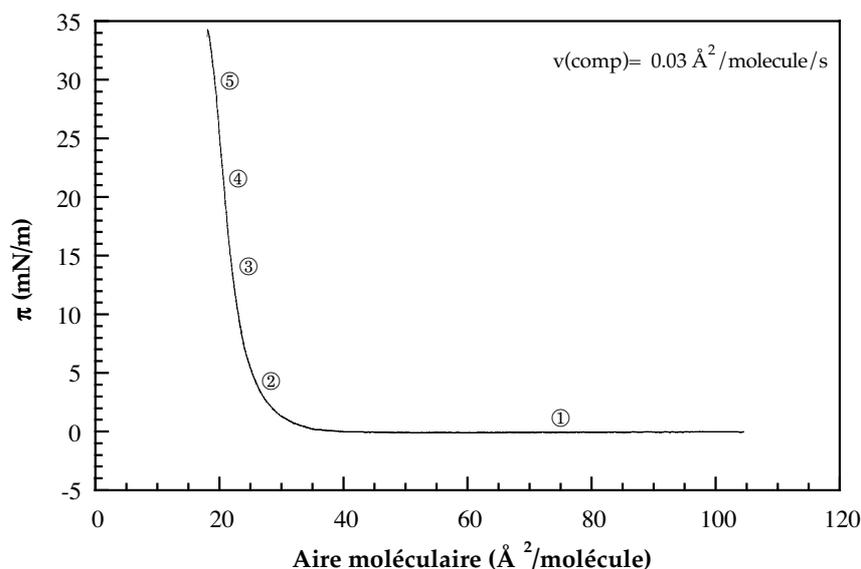
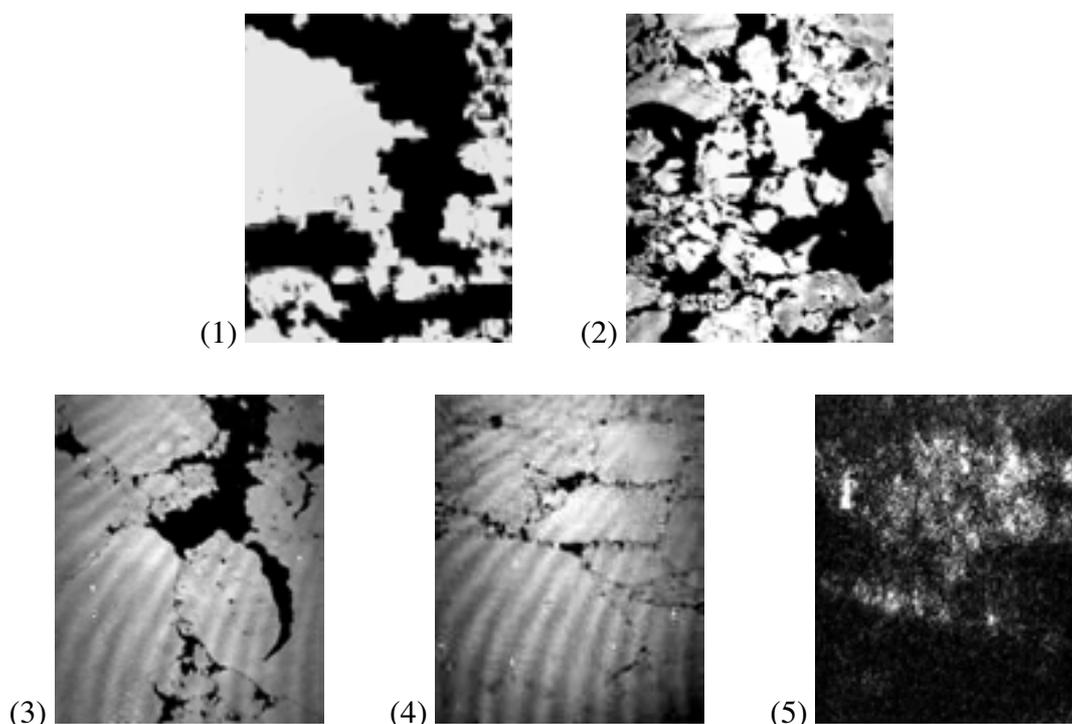


Figure 5 : Isotherme de l'acide triacontanoïque enregistré à  $T = 20^{\circ}\text{C}$ .

Les images 1 obtenues par la microscopie à l'angle de Brewster présentent l'état de la surface lors de la compression. Aux faibles pressions de surface (images 1 et 2), pour un temps d'obturation de  $1/120$  s, l'acide apparaît sous forme de domaines gris clair aux contours découpés sur fond noir (eau de la sous-phase). Lorsque la pression de surface augmente, le niveau de gris des domaines augmente et l'aire entre les domaines diminue, la couche d'acide devient de plus en plus compacte (image 3). On peut remarquer cependant que les domaines gardent leur intégrité et ne fusionnent pas (image 4). Pour des pressions superficielles élevées (image 5), la surface apparaît avec une multitude de points très lumineux synonymes du collapse des domaines d'acide qui forment des surépaisseurs.



*Images 1 : Images réalisées au cours de la compression de la monocouche d'acide tricosanoïque en microscopie à l'angle de Brewster. Les images 1 et 2 ont été enregistrées avec un temps d'obturation de 1/120 s) et les images 3 à 5 avec un temps d'obturation de 1/250 s.*

Pour une pression de surface de 22 mN/M, l'intensité lumineuse des domaines, évaluée à partir de la courbe de calibration de l'intensité lumineuse en fonction des niveaux de gris des images, correspond à une épaisseur de 39 Å avec l'indice de réfraction de la couche d'acide  $n = 1,5$  et un angle de Brewster de 53,10 degré. La monocouche compacte d'acide simule donc l'épaisseur hydrophobe des membranes naturelles. Cependant, la forme très découpée des domaines laisse supposer que la monocouche est très rigide. De plus, ces domaines sont apparus quasiment immobiles à la surface au cours de l'expérience.

Ce résultat a été confirmé par le spectre PM-IRRAS réalisé dans le domaine de vibration des liaisons C-H des groupements  $\text{CH}_2$  des chaînes carbonées (figure 6). Les vibrations symétrique et antisymétrique présentent des nombres d'onde de basse fréquence, respectivement à 2848 et 2917  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristiques de chaînes carbonées en conformation tout trans [26].

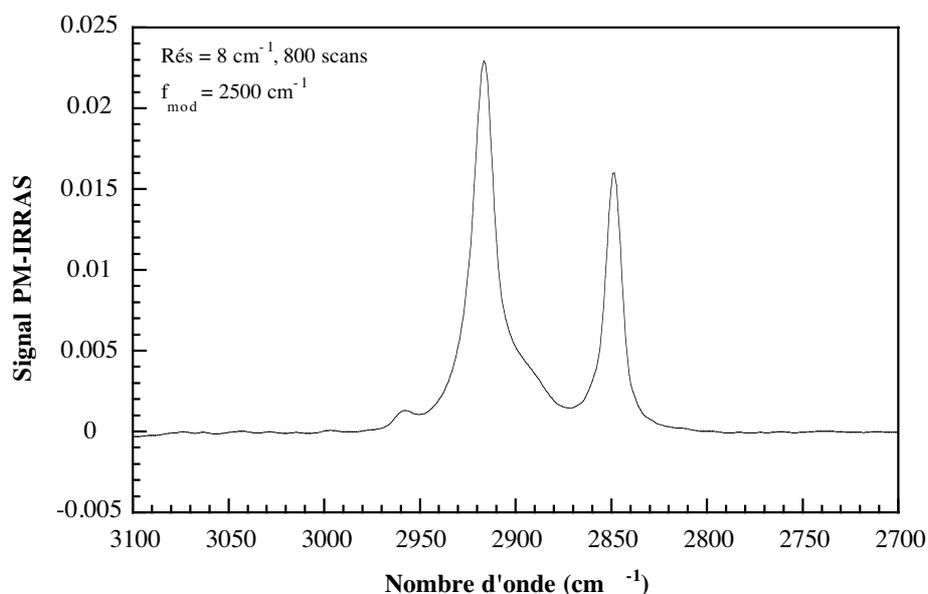
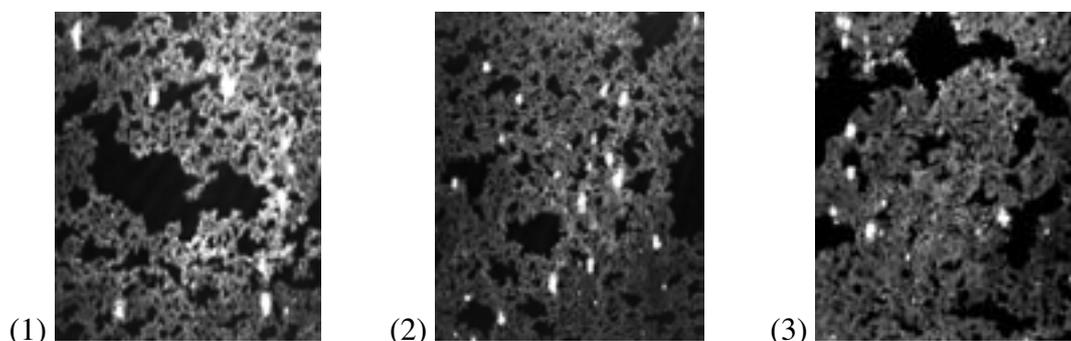


Figure 6 : Spectre PM-IRRAS dans le domaine des vibrations symétriques ( $2849\text{ cm}^{-1}$ ) et antisymétriques ( $2917\text{ cm}^{-1}$ ) de la liaison C-H des groupements  $\text{CH}_2$  de la chaîne carbonée de l'acide tricontanoïque.

Malgré l'épaisseur hydrophobe escomptée, la rigidité de la monocouche d'acide tricontanoïque n'est pas satisfaisante pour espérer modéliser une membrane naturelle. Afin d'apporter de la fluidité au système, nous avons envisagé des mélanges d'acide et de DMPC, un phospholipide dont la température de transition entre la phase gel et la phase fluide est de  $23^\circ\text{C}$ .

### III.2. Mélange d'acide tricontanoïque et de DMPC

Au cours d'expériences préliminaires en microscopie à l'angle de Brewster, c'est le mélange acide-DMPC en proportion molaire 40-60 qui s'est révélé le plus intéressant. C'est en effet celui pour lequel on a pu observer la formation d'une phase mixte entre les deux composés. Les images correspondant à l'isotherme figure 7 sont présentées ci-après :



Images 2 : Images du mélange acide tricontanoïque-DMPC 40-60 obtenues en microscopie à l'angle de Brewster pour les temps d'obturation  $1/50\text{ s}$  (image 1),  $1/120$  (image 2) et  $1/250\text{ s}$  (image 3).

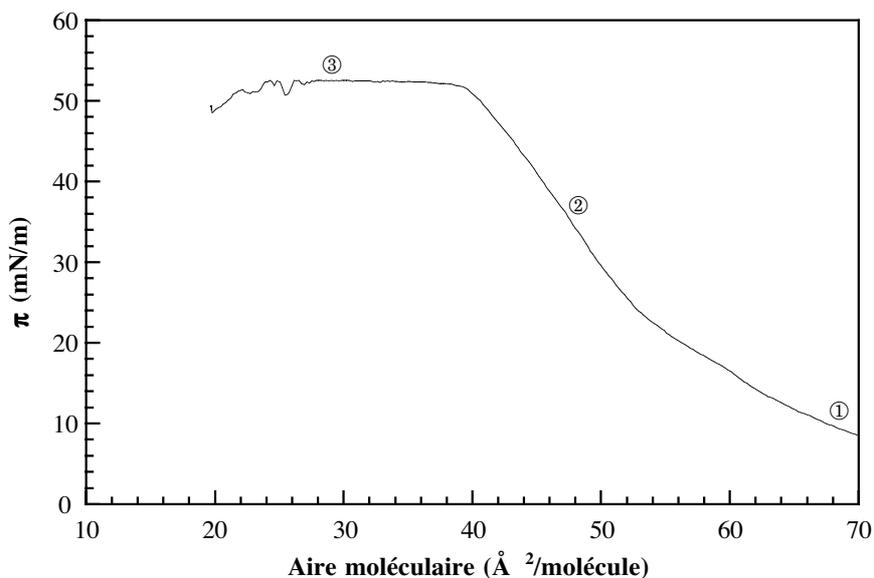


Figure 7 : Isotherme du mélange acide tricontanoïque-DMPC obtenu par compression lente à l'interface air-eau à  $T = 20^{\circ}\text{C}$ .

À faible taux de compression, on observe un système triphasique où coexistent des zones gris foncé, gris clair et blanc (image 1). Les constituants ayant été étudiés seuls au préalable, on peut en conclure que les niveaux de gris relevés correspondent respectivement au DMPC seul en phase condensée, au mélange d'acide et de DMPC en phase condensée et à des agrégats d'acide. Au cours de la compression, les agrégats blancs subsistent et les domaines gris foncé diminuent au profit des zones gris clair dont l'intensité augmente continûment (image 2). À faible aire moléculaire et forte pression de surface (image 3), le système reste triphasique avec cependant un domaine gris clair qui recouvre majoritairement la surface. Le niveau de gris de ce domaine gris clair pour ce temps d'obturation (1/250 s) correspond à une intensités de bicouche dont l'épaisseur a été évaluée à 39 Å avec un indice de réfraction du mélange  $n = 1,45$  et un angle de Brewster de 53,1 degré.

Par ailleurs, l'étude en spectroscopie PM-IRRAS du même système montre que l'intensité de la bande de vibration C=O des groupements ester du phospholipide et des groupements carboxyliques de l'acide tricontanoïque est doublée lorsque l'aire moléculaire est réduite de moitié (figure 8).

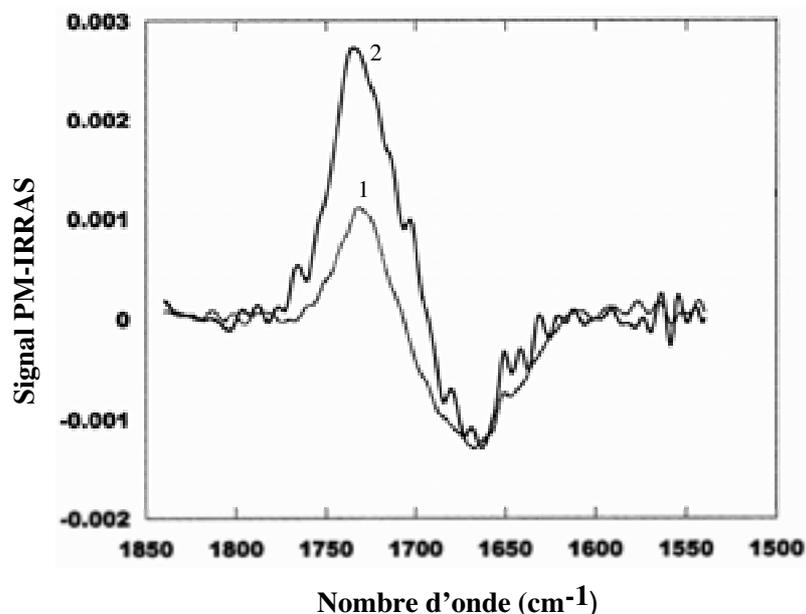


Figure 8 : Spectres PM-IRRAS du mélange acide tricosanoïque-DMPC à l'interface air-eau. Pour une aire moléculaire de 45 Å<sup>2</sup> (1) et pour une aire moléculaire de 20 Å<sup>2</sup> (2).

L'ensemble de ces résultats nous permettent de proposer un modèle (schéma 12) pour rendre compte de la structure de la couche formée à fort taux de compression. Les domaines blancs de forte intensité sont supposés correspondre à des surépaisseurs d'acide ①, les domaines gris foncé de faible épaisseur sont associés à une monocouche de DMPC ②, quant aux domaines gris clairs, ils traduisent la coexistence de domaines de bicouches de DMPC ③ et de monocouches d'acide ④. On suppose que leur formation est stabilisée par des interactions hydrophobe-hydrophobe entre les molécules de DMPC et les molécules d'acide gras. Lorsque l'on atteint des taux de compression élevés, la rigidité de l'acide semble favoriser le basculement des molécules de phospholipide en bicouche.

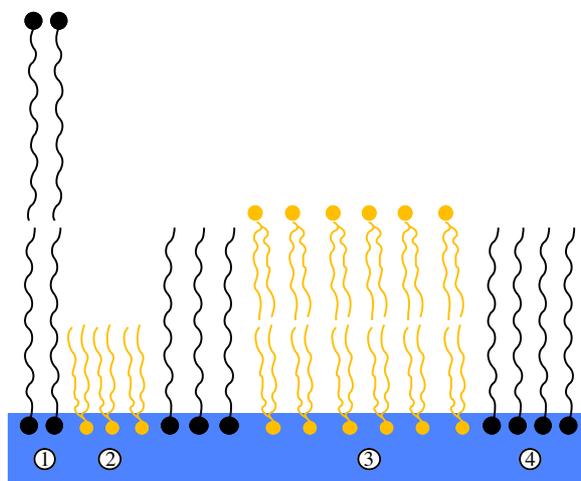


Schéma 12 : Modèle représentant la structure du mélange d'acide tricosanoïque et de DMPC à fort taux de compression.

Cependant, le contour découpé des domaines suggère que ce système de bicouches formé sous ces conditions est encore trop rigide pour pouvoir être retenu comme système modèle des membranes naturelles. Ainsi, une expérience supplémentaire, réalisée sur une sous-phase salée (concentration en NaCl ajustée à 150 mM), au cours de laquelle nous avons injecté de la mélittine (voir chapitre III) sous le système n'a montré aucun changement significatif caractéristique de l'insertion de ce peptide. Ceci montre que, malgré la présence de sel favorisant la montée de la mélittine à l'interface, le système mixte acide gras-phospholipide est trop compact pour l'envisager comme système membranaire modèle.

Bien que notre tentative pour former des multicouches organisées à l'interface air-eau par la méthode de Langmuir en utilisant des molécules à longues chaînes carbonées n'ait pas abouti aux résultats escomptés, elle nous a permis néanmoins de montrer qu'il était possible de stabiliser des domaines de bicouches de DMPC à l'interface air-eau. Dans cette perspective, nous avons envisagé deux méthodes qui permettent d'induire la formation d'une deuxième couche au-dessus de la monocouche à partir d'une quantité double ou triple de molécules de phospholipides de celle nécessaire à la réalisation d'une monocouche. Avant de présenter les résultats que j'ai obtenus avec différentes sortes de phospholipides, je présenterai les modifications qu'il a été nécessaire de faire avant d'aboutir à la formation de multicouches organisées à l'interface air-eau.

#### IV. Formation de multicouches par la méthode de Trurnit

La méthode de Trurnit [27, 28], contrairement à la méthode de Langmuir où l'on épand goutte-à-goutte, consiste à épandre en une seule injection la quantité totale de la solution de phospholipides sur un cône en verre (schéma 13). On peut supposer que la macrogoutte de solution va déferler telle une vague recouvrant ainsi rapidement toute la surface d'eau. Les molécules disposant de toute la surface, on favorise les interactions entre les têtes polaires et l'eau aux dépens des interactions hydrophobes entre les chaînes carbonées évitant ainsi la formation d'agrégats à la surface. De cette façon, les molécules sont réparties de façon uniforme et homogène en une seule injection.

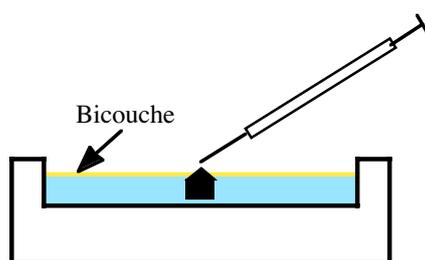


Schéma 13 : Méthode de Trurnit. Épandage en une seule injection sur un cône en verre.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une cuve en téflon de très petite surface (37 cm<sup>2</sup>) afin de favoriser le basculement des molécules de phospholipides dès que toute la surface d'eau est recouverte d'une monocouche (photo 3). Les phospholipides n'étant pas solubles dans la sous-phase aqueuse, ils n'ont pas d'autre choix que de basculer pour former une deuxième couche au-dessus de la première. La portée des interactions entre chaînes carbonées dans la deuxième couche étant réduite pour une cuve de surface restreinte, on suppose que, dès qu'une molécule bascule, c'est-à-dire qu'elle se positionne la tête polaire vers le haut développant des interactions hydrophobes favorables avec les queues hydrophobes des molécules de la couche inférieure (schéma 14), elle induit le basculement des autres molécules par un mécanisme tel que les interactions entre les chaînes carbonées se propagent de proche en proche.



Photo 3 : Minicuve de Langmuir vue de dessus.

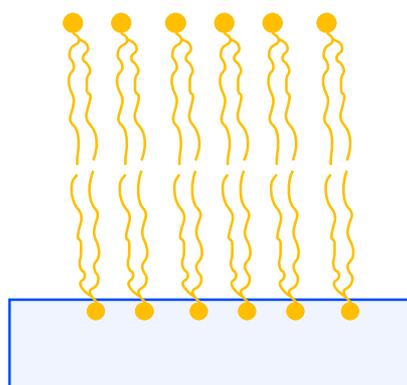


Schéma 14 : Modèle de bicouche à l'interface air-eau.

En utilisant cette méthode, j'ai pu observer à l'aide de la microscopie à l'angle de Brewster et dans le cas d'une solution de DMPC, qu'il était possible d'obtenir une surface phospholipidique homogène très lumineuse avec une intensité environ quatre fois plus grande que celle de la monocouche compacte. Ce résultat signifie qu'il est possible de former **directement** une bicouche fluide de DMPC à la surface de l'eau. Cependant, bien que l'expérience ait été reproduite plusieurs fois successivement, elle s'est avérée non reproductible sur un intervalle de temps plus grand. Je n'ai donc pas pu compléter cette étude en spectroscopie PM-IRRAS. Des essais réalisés avec une solution de DPPC (DiPalmitoylPhosphatidylCholine) ont révélé une monocouche parsemée d'agrégats. Au stade de ces recherches, nous pouvons néanmoins donner quelques éléments d'explication sur les phénomènes observés.

Le DMPC, dont les chaînes carbonées possèdent deux groupements  $\text{CH}_2$  de moins que celle du DPPC, a une température de transition entre la phase gel et la phase fluide de  $23^\circ\text{C}$  tandis que celle du DPPC est de  $41^\circ\text{C}$ . Dans nos conditions d'expérience où la température ambiante était supérieure à sa température de transition (les expériences ayant été faites en

été !), le DMPC est dans sa phase fluide alors que le DPPC reste dans sa phase gel. On peut donc penser que le DPPC a tendance à former des petits domaines d'agrégats à la surface de l'eau qui empêchent l'organisation régulière d'une deuxième couche de phospholipides et que l'état fluide semble une condition nécessaire à la formation de bicouches à l'interface air-eau.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons mené des expériences sur des cuves de Langmuir modifiées afin d'explorer le comportement de monocouches au-delà du collapse.

## V. Formation de multicouches par compression au-delà du collapse

Le collapse, notion introduite pour les monocouches [29], fait généralement référence aux phénomènes qui apparaissent sur les isothermes des monocouches pour de fortes pressions de surface. Dans certains cas, le collapse est associé à la formation locale de surépaisseurs lorsque la monocouche ne peut plus être comprimée, la surface étant totalement occupée par les molécules. Nous avons donc cherché à étudier le comportement d'un film de phospholipides lorsqu'il est comprimé jusqu'à une aire moléculaire deux fois plus petite que celle pour laquelle se produit le collapse de la monocouche. En effet, si l'on suppose que l'aire occupée par une molécule (en Å<sup>2</sup> par molécule) dans une monocouche sur une surface S (en cm<sup>2</sup>) est donnée par la relation  $A = \frac{S \times 10^{16}}{n}$  où n est le nombre de molécules présentes à

la surface, alors, pour une même surface, l'aire A' occupée par les molécules dans une bicouche (supposée formée par deux monocouches "tête-bêche" superposées) sera égale à

$$A' = \frac{S \times 10^{16}}{2n} = \frac{A}{2}$$

soit deux fois plus petite que l'aire moléculaire pour une monocouche. J'ai donc épandu une quantité de solution double de celle nécessaire à la formation d'une monocouche compacte. Lors des premiers essais avec le DMPC, j'ai été confrontée au problème de rupture de l'interface. En effet, il arrive un moment où la tension superficielle de la surface est trop faible pour permettre au ménisque formé par le liquide de se maintenir sur les bords de la cuve. Afin de contourner ce problème, nous avons construit une nouvelle barrière qui permet de comprimer un film à la surface de l'eau en maintenant avec le niveau d'eau plus bas que les bords de la cuve (schéma 15). Des photos de cette nouvelle barrière sont présentées ci-dessous :



Schéma 15 : Coupe de la cuve de Langmuir modifiée.

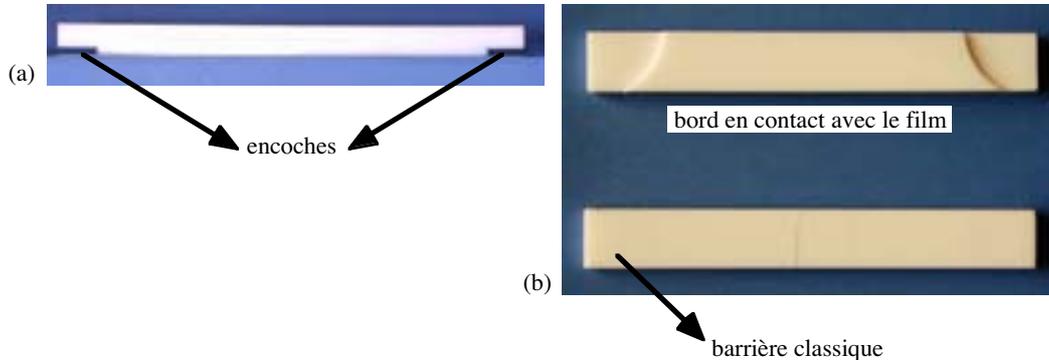


Photo 4 : Photos de la nouvelle barrière. (a) Vue de face. (b) Vue de dessus.

Les encoches reposent sur les bords de la cuve et le décrochement vient s'encaster dans la cuve. Ainsi, il est possible de comprimer jusqu'à des pressions de surface élevées ( $\sim 50 \text{ mNm}^{-1}$ ) sans risquer de rompre l'interface. Avec cette méthode, nous utilisons la vitesse de la barrière en mouvement comme force motrice pour induire la formation d'une deuxième couche au-dessus de la monocouche lorsque le collapse est atteint.

Les paragraphes qui suivent présentent les résultats que j'ai obtenus avec quatre phospholipides différents.

### V.1. Bicouches de DMPC

Afin de pouvoir comprimé jusqu'à une aire moléculaire deux fois plus petite que l'aire moléculaire de collapse (environ l'aire occupée par une molécule de DMPC), l'expérience, réalisée à une température régulée à  $26^\circ\text{C}$ , a consisté à épandre le double de la quantité d'une solution de DMPC ( $5.10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ ) dans le chloroforme nécessaire à la formation d'une monocouche compacte. Ainsi, le DMPC est dans sa phase fluide. Les paramètres de compression au-delà du collapse sont ceux utilisés lors de compressions classiques de films de Langmuir. La vitesse de compression est fixée à  $0.05 \text{ \AA}^2$  par molécule et par seconde ("vitesse lente"). En raison des dimensions de la cuve de Langmuir utilisée, le rapport de

compression<sup>1</sup> maximum que l'on peut atteindre est environ égal à 8. Dans ces conditions, la monocouche de DMPC de départ est dans une phase liquide expansé de pression de surface de 9 mNm<sup>-1</sup>. L'isotherme obtenu dans ces conditions (figure 9) présente une montée abrupte de la pression de surface jusqu'au collapse puis un palier à environ 50 mNm<sup>-1</sup>. Les images Brewster enregistrées lors de la montée (non présentées) montrent, avant le collapse, une surface homogène dont le niveau de gris augmente progressivement jusqu'à un niveau de gris d'une monocouche compacte de DMPC (mesuré au cours d'une expérience préalable). Après le collapse, on peut voir sur les images Brewster (images 3), obtenues avec un temps d'obturation au 250<sup>ième</sup> de seconde, l'apparition de domaines circulaires gris très mobiles parsemant la monocouche compacte de DMPC (en noir). Au fur et à mesure de la compression, ces domaines grossissent sans changer d'intensité.

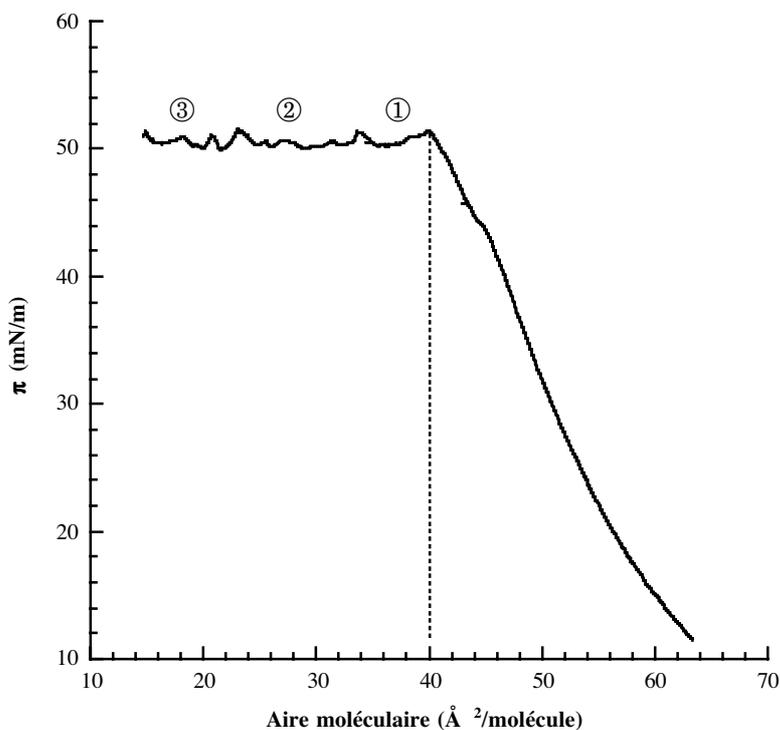
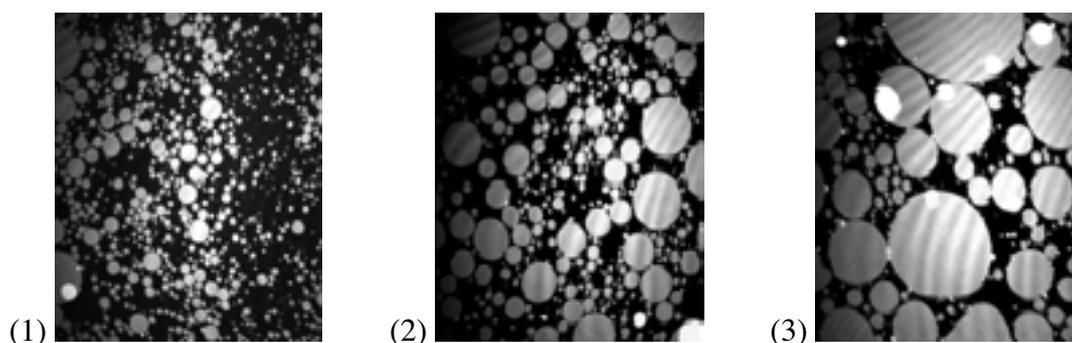
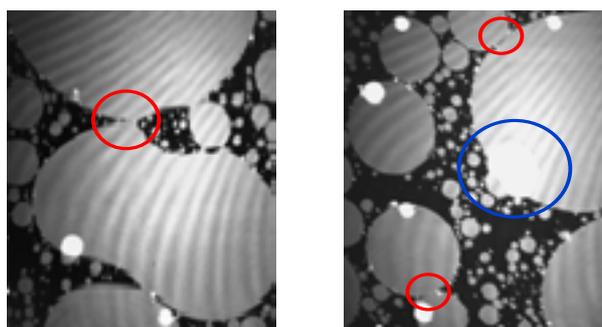


Figure 9 : Isotherme du DMPC ( $7,5 \cdot 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ ) pour une vitesse de compression de  $0,05 \text{ Å}^2/\text{molécule/s}$  à  $T = 26^\circ\text{C}$ .

<sup>1</sup> Rapport de la surface initiale de la cuve ( $288 \text{ cm}^2$ ) sur la surface finale après compression ( $35 \text{ cm}^2$ ).



Images 3 : Images Brewster lors de la compression du DMPC.



Images 4 : Images Brewster de bicouches fluides de DMPC enregistrées après la fin de la compression. Les cercles rouges montrent deux domaines qui commencent à fusionner. Le cercle bleu montre deux domaines qui ont fusionné mais où les molécules ne sont encore pas réparties uniformément sur tout le domaine d'où une forte luminosité.

Les images enregistrées après la fin de la compression (images 4) montrent que ces domaines continuent de fusionner pour former des domaines de plus en plus gros. Deux domaines commençant à fusionner sont signalés par un cercle rouge. Le cercle bleu montre l'endroit où deux domaines ont déjà fusionné. L'intensité très lumineuse signifie qu'à l'endroit de la fusion les molécules ne se sont pas encore réparties de façon uniforme et homogène formant ainsi des surépaisseurs. J'ai pu observer que, même au bout d'un temps très long, la surface n'est jamais totalement recouverte. On peut voir également des domaines beaucoup plus lumineux qui correspondent à la formation de surépaisseurs au sein des domaines circulaires gris.

À partir de la courbe de calibration et de la courbe modélisée de la réflectivité en fonction de l'épaisseur, j'ai montré que le niveau de gris des domaines pour le temps d'obturation au 250<sup>ième</sup> de seconde correspondait à une épaisseur de  $(41,7 \pm 1.6) \text{ \AA}$ , soit environ le double de l'épaisseur d'une monocouche compacte de DMPC. De plus, la forme circulaire et la mobilité des domaines sont caractéristiques d'une bicouche en phase fluide.

Ces résultats ont été complétés par une étude en spectroscopie PM-IRRAS. Les spectres, enregistrés dans le domaine des hautes fréquences, de la monocouche à 30 mNm<sup>-1</sup> et du système formé à 50 mNm<sup>-1</sup> sont présentés ci-dessous (figure 10).

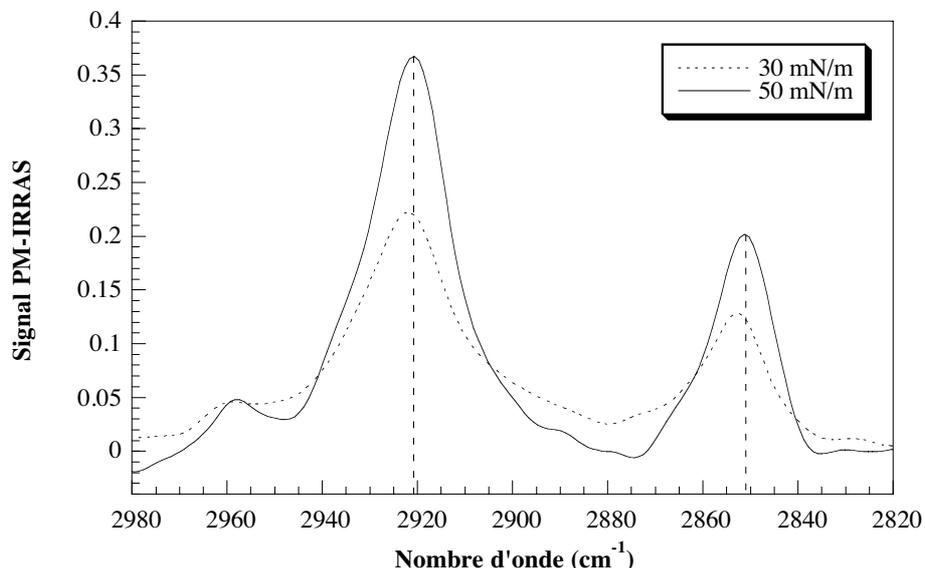


Figure 10 : Spectres PM-IRRAS de la monocouche de DMPC à 30 mNm<sup>-1</sup> et de la bicouche à 50 mNm<sup>-1</sup> comprimés à la vitesse de 0,05 Å<sup>2</sup>/molécule/s pour une fréquence de modulation de 1500 cm<sup>-1</sup> et une résolution de 8 cm<sup>-1</sup>.

On remarque est que l'intensité des bandes d'absorption des vibrations antisymétrique ( $\bar{\nu} = 2921 \text{ cm}^{-1}$ ) et symétrique ( $\bar{\nu} = 2851 \text{ cm}^{-1}$ ) des groupements CH<sub>2</sub> des chaînes carbonées de la bicouche est plus faible que le double de l'intensité de la monocouche compacte (leur rapport est égal à environ 1,6). Il existe également un décalage en fréquence d'environ 1 cm<sup>-1</sup> pour la vibration symétrique et de 2 cm<sup>-1</sup> pour la vibration antisymétrique. Or, l'intensité mesurée en spectroscopie PM-IRRAS est une intensité moyenne. D'après l'état de la surface observé en microscopie à l'angle de Brewster, l'intensité à 50 mNm<sup>-1</sup> est une moyenne entre l'intensité d'une monocouche compacte et l'intensité de domaines de bicouches. Il est donc logique de trouver une intensité plus faible que celle attendue pour une surface recouverte entièrement d'une bicouche. De plus, l'orientation des molécules de DMPC dans la bicouche n'est *a priori* pas la même que dans la monocouche, du fait des contraintes supplémentaires imposées par l'agencement d'une deuxième couche au-dessus de la première. Selon cette hypothèse, les moments de transition relatifs aux vibrations des groupements CH<sub>2</sub> des chaînes carbonées étant perpendiculaires à la direction moyenne des chaînes (schéma 16), on en déduit, d'après

la règle de sélection, que les molécules dans la bicouche doivent être plus inclinées que dans la monocouche (schéma 16).

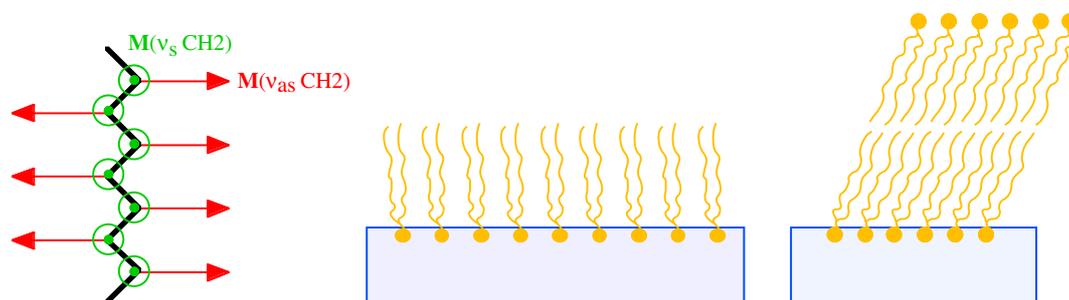
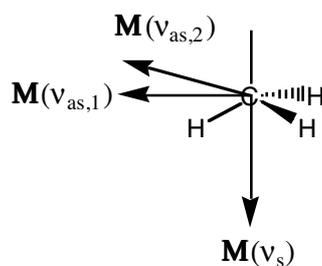


Schéma 16 : Orientation des moments de transition des CH<sub>2</sub> des chaînes carbonées du DMPC et représentation schématique de l'orientation des molécules dans la monocouche et la bicouche.

Par ailleurs, le décalage vers les basses fréquences montre que la bicouche est dans un état légèrement plus rigide que la monocouche. Cette rigidité peut être attribuée aux interactions hydrophobes qui apparaissent entre les domaines hydrophobes des deux couches et qui induisent un rapprochement des têtes polaires créant ainsi un système global plus compact.

On peut remarquer également des changements au niveau des bandes de vibration des liaisons C-H des groupements méthyles terminaux. En effet, pour le système à 50 mNm<sup>-1</sup>, on voit apparaître une bande au niveau de la vibration antisymétrique et disparaître la bande de la vibration symétrique. Cet effet traduit une différence d'orientation des méthyles entre la monocouche et la bicouche. D'après la règle de sélection et l'orientation des moments de transition relatifs aux vibrations (schéma 17), l'axe des méthyles est plus vertical dans la bicouche que la monocouche. Ce résultat est en faveur d'une bicouche composée de deux monocouches tête-bêche et peut être attribué aux interactions hydrophobes qui se développent entre les chaînes carbonées des deux couches de la bicouche qui rigidifient le système.



*Schéma 17 : Orientation des moments de transition relatifs aux vibrations symétrique et antisymétrique des liaisons C-H des méthyles terminaux des chaînes carbonées du DMPC.*

Une expérience similaire faite avec du DPPC a montré qu'au-delà du collapse, il se formait des agrégats au sein de la monocouche compacte. Ce phospholipide dans son état gel à  $T = 24^{\circ}\text{C}$  ne présente pas de condition favorable à la formation de domaines organisés de bicouches. La structure des bicouches de DMPC est discutée dans la partie VI.

Afin de poursuivre l'étude sur la formation de bicouches organisées à l'interface air-eau par compression au-delà du collapse et notamment d'étudier l'influence du caractère fluide du phospholipide utilisé, j'ai testé trois autres phospholipides le DOPS (DiOléoylPhosphatidylSerine), le DOPC (DiOléoylPhosphatidylCholine) et le DOPG (DiOléoylPhosphatidylGlycérol). Entrant dans la composition de nombreuses membranes naturelles, ces trois phospholipides présentent l'avantage d'être dans leur phase fluide quelles que soient les fluctuations de la température ambiante qui oscille entre  $18$  et  $29^{\circ}\text{C}$  dans les salles où sont effectuées les manipulations. Ces phospholipides, constitués de deux mêmes chaînes carbonées possédant 18 carbones et une insaturation cis en position 9 par chaîne, diffèrent seulement par leur tête polaire ; le DOPS est caractérisé par une tête phosphatidylserine chargée négativement, le DOPC par une tête phosphatidylcholine zwitterionique et le DOPG par une tête phosphatidylglycérol chargée négativement (voir tableau 1).

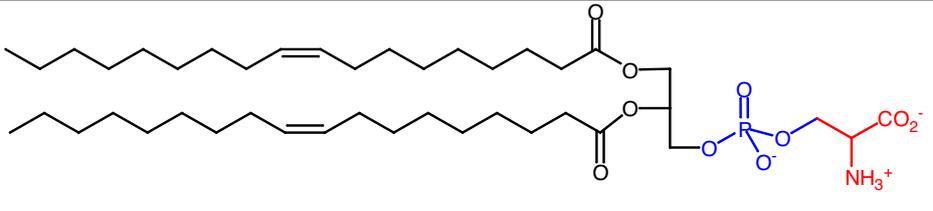
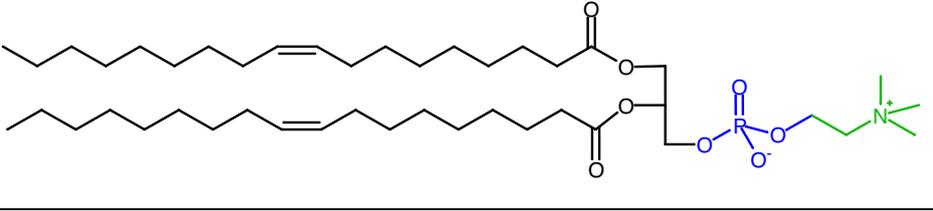
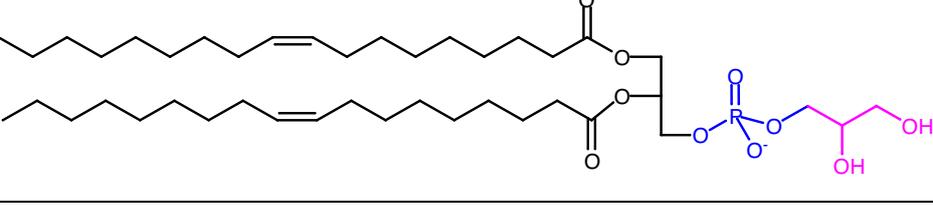
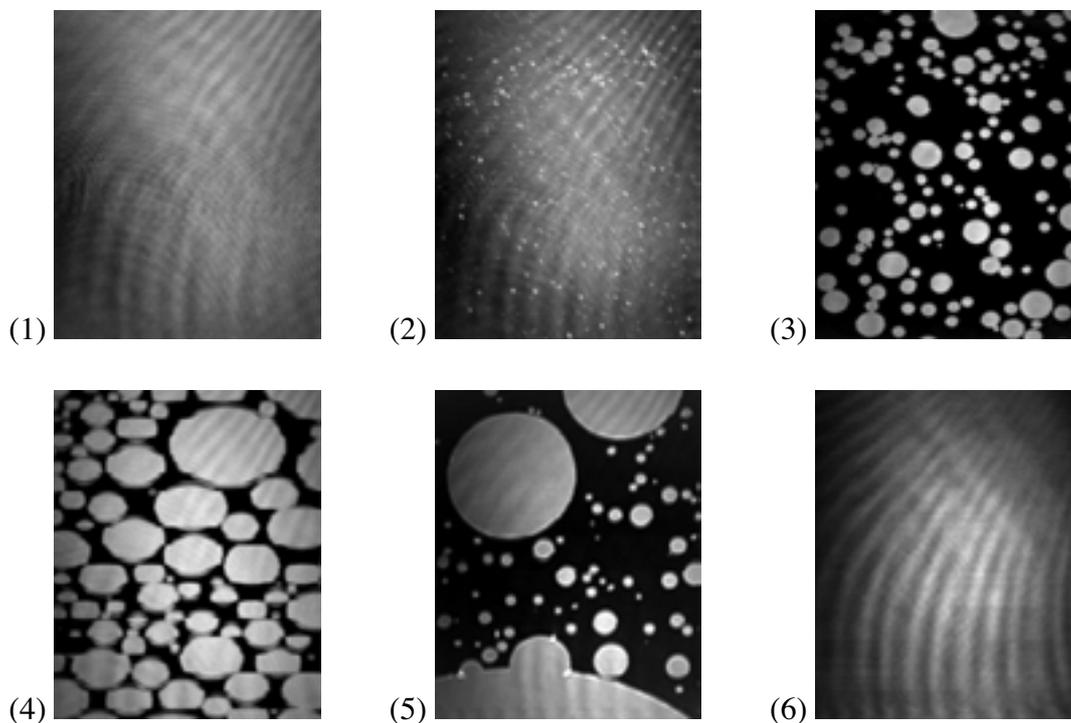
	Formule chimique semi-développée	T <sub>m</sub> (°C)
DOPS		-11
DOPC		-20
DOPG		-18

Tableau 1 : Formules chimiques des phospholipides DOPS, DOPC et DOPG.

## V.2. Tricouche de DOPS

Les images Brewster présentées sur les images 5 relatives à l'isotherme figure 11 ont été enregistrées à température ambiante lors de la compression d'une quantité triple de solution de DOPS ( $5 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ ) dans le chloroforme pour une vitesse de compression de  $0,2 \text{ \AA}^2$  par molécule et par seconde ("vitesse rapide") sur une cuve de Langmuir modifiée. L'état initial de la monocouche correspond à une phase liquide expansé de pression de surface de  $21 \text{ mNm}^{-1}$ . On observe pendant la montée progressive en pression l'apparition de points blancs puis l'apparition de petits domaines circulaires. Afin de ne pas saturer les capteurs de la caméra CCD, le temps d'obturation de la caméra est réduit du 50<sup>ième</sup> au 500<sup>ième</sup> de seconde. À partir de l'image 3, la monocouche apparaît donc en noir et les domaines circulaires en gris. Après le collapse, pour une pression quasiment constante de  $43 \text{ mNm}^{-1}$  et une diminution continue de l'aire moléculaire (domaine relatif au palier sur l'isotherme), les domaines grossissent par fusion pour finalement recouvrir totalement la surface de la cuve. Ceci se traduit par une brusque remontée en pression avec rupture de pente sur l'isotherme. Les niveaux de gris des domaines circulaires mesurés correspondent à une intensité de tricouche de DOPS ( $I = (1,47 \pm 0,05) \cdot 10^{-5}$ ), celle de la monocouche ayant été mesurée au préalable ( $I =$

$(1,31 \pm 0,05) \cdot 10^{-6}$ ). De nouveau, la forme circulaire de ces domaines et leur grande mobilité à la surface de l'eau sont synonymes d'une tricouche fluide de DOPS.



Images 5 : Images Brewster du DOPS comprimé à vitesse rapide. Les images 1 et 2 ont été enregistrées pour un temps d'obturation au 50<sup>ième</sup> de seconde et les images 3 à 6 au 500<sup>ième</sup> de seconde.

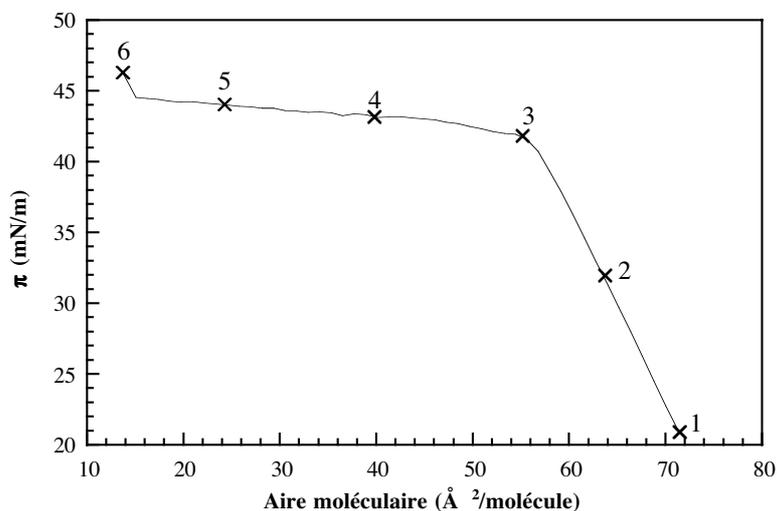


Figure 11 : Isotherme du DOPS comprimé à la vitesse de  $0,2 \text{ \AA}^2/\text{molécule/s}$ .

L'analyse du système en spectroscopie PM-IRRAS (figure 12) a montré que les bandes d'absorption des vibrations symétriques et antisymétriques des groupements  $\text{CH}_2$  des chaînes carbonées du DOPS avaient des positions en fréquence identiques ( $2923$  et  $2853 \text{ cm}^{-1}$ )

caractéristiques de systèmes fluides. De plus, la bande de vibration antisymétrique pour la tricouche ( $6,1 \cdot 10^{-3}$ ) a une intensité trois fois plus forte que celle de la monocouche compacte ( $2 \cdot 10^{-3}$ ), confirmant la formation d'une tricouche de DOPS. On peut remarquer le même effet sur la bande de vibration du carbonyle de l'ester à  $1736 \text{ cm}^{-1}$  et sur le creux de l'eau à  $1666 \text{ cm}^{-1}$  correspondant à la déformation des liaisons O-H dans la molécule d'eau (figure 13).

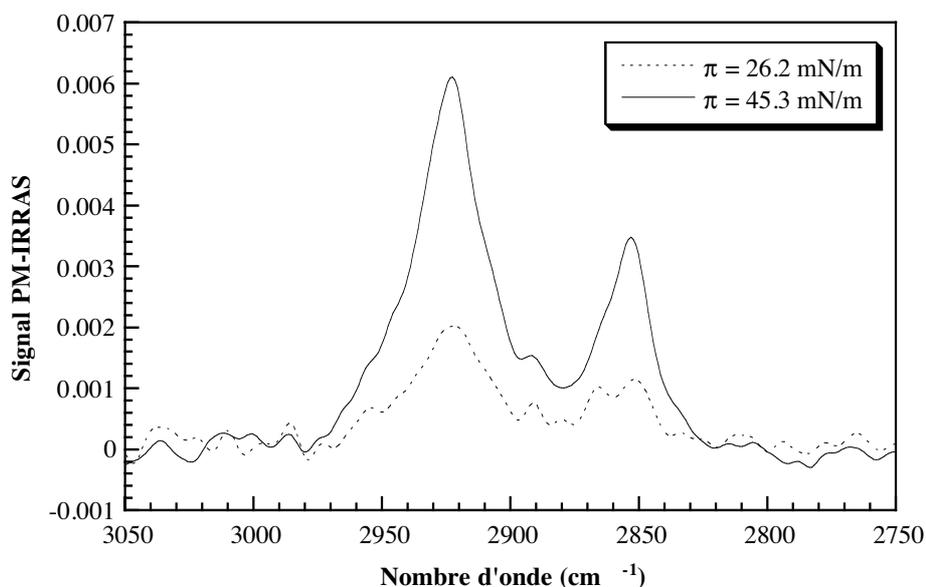


Figure 12 : Spectres PM-IRRAS dans le domaine des vibrations antisymétrique et symétrique des liaisons C-H des groupements  $\text{CH}_2$  de la monocouche et de la tricouche de DOPS comprimées à vitesse rapide pour une fréquence de modulation de  $1500 \text{ cm}^{-1}$ .

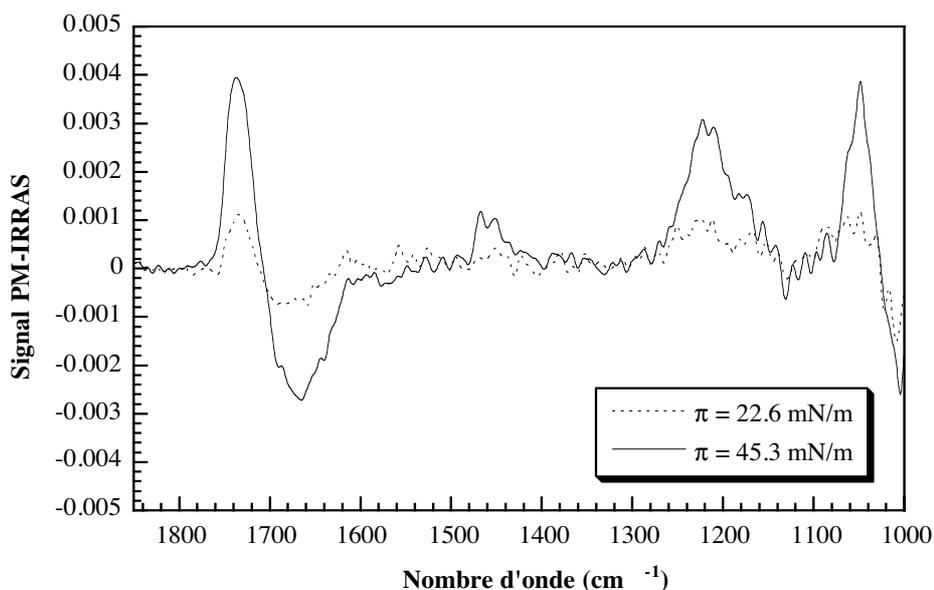


Figure 13 : Spectres PM-IRRAS dans le domaine des basses fréquences de la monocouche et de la tricouche de DOPS comprimées à vitesse rapide pour une fréquence de modulation de  $1500 \text{ cm}^{-1}$ .

Par ailleurs, afin de vérifier la réversibilité du système, j'ai réalisé la décompression de la tricouche et la recompression de la monocouche nouvellement formée. Pour la décompression, la microscopie à l'angle Brewster a montré la fragmentation de la tricouche en domaines de monocouche (images 6, a) et sa disparition progressive (images 6, b) au profit d'une monocouche de DOPS recouvrant la surface (images 6, c). Sur l'isotherme (figure 14) on peut remarquer que la pression de surface de la monocouche formée après la décompression a chuté à  $3 \text{ mNm}^{-1}$ . Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat. Soit il y a eu perte de molécules au cours de la compression (des molécules étant passées de l'autre côté de la barrière), soit il reste des agrégats à la surface. L'image 6, c de la monocouche montrant une surface homogène sans agrégat visible semble en faveur de la deuxième hypothèse. De plus, sa recompression n'a pu aboutir à la formation d'une tricouche complète (images 7). En outre, j'ai observé la formation de domaines avec une intensité encore plus forte que celle de la tricouche correspondant à l'épaisseur de cinq couches (images 7, c). Ceci laisse supposer que, bien qu'ayant attendu la relaxation de la monocouche après la décompression à savoir la réorganisation homogène et uniforme des molécules à la surface, il devait rester des petits domaines de tricouche de taille inférieure à la résolution du microscope ( $2 \mu\text{m}$ ), c'est pourquoi la surface de la monocouche (images 6, c) est apparue homogène. Ainsi, ils ont constitué des germes qui, comprimés au-delà du collapse, ont formé des domaines de cinq couches empêchant ainsi, par un défaut de molécules, la formation complète d'une tricouche.

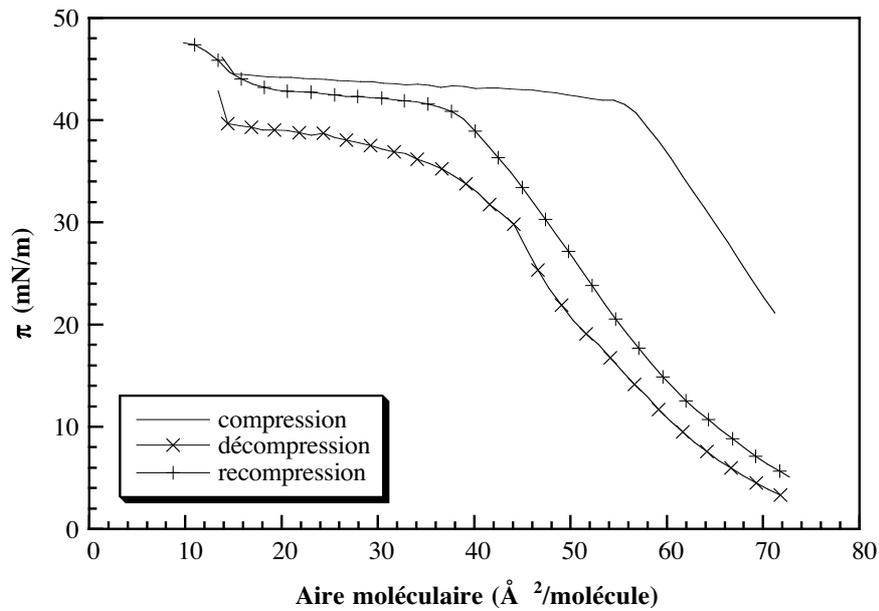
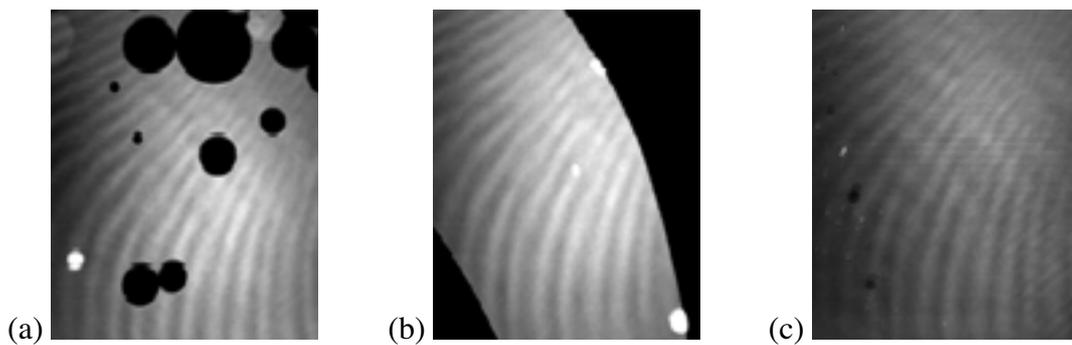
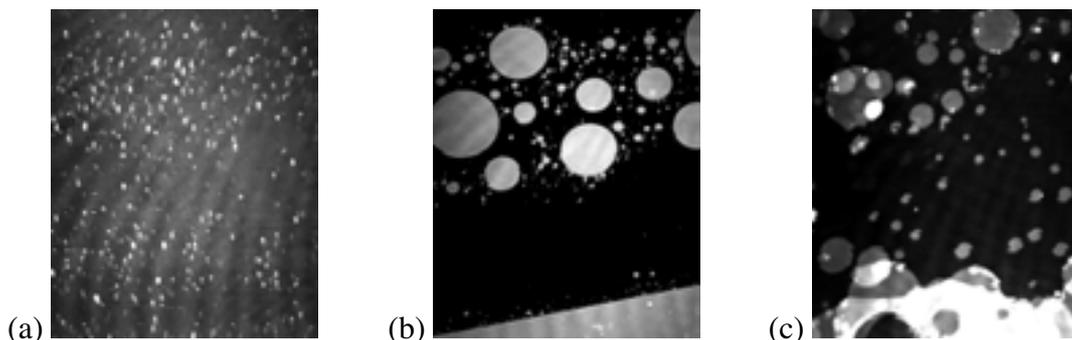


Figure 14 : Isothermes relatifs au cycle de compression, décompression et recompression du DOPS à la vitesse de  $0,2 \text{ \AA}^2/\text{molécule/s}$ .



Images 6 : Images Brewster enregistrées lors de la décompression. (a) Fragmentation de la tricouche. (b) Disparition de la tricouche au profit de la monocouche. (c) Monocouche de DOPS.



Images 7 : Images Brewster enregistrées lors de la recompression. (a) Apparition de points blancs. (b) Formation de domaines circulaires de tricouche. (c) Formation de surépaisseurs supérieures à des tricouches.

Plusieurs séries d'expériences ont également montré la reproductibilité de la formation d'une tricouche de DOPS à partir de la compression au-delà du collapse de la monocouche.

Ce résultat, obtenu pour la première fois, laisse entrevoir de nouvelles perspectives dans le cadre de la réalisation de systèmes modèles des membranes naturelles. En effet, la tricouche de DOPS à la surface de l'eau peut être décomposée en une bicouche surmontée d'une monocouche. Elle reproduit ainsi l'épaisseur hydrophobe des membranes naturelles et peut être envisagée comme un modèle pertinent pour l'étude de l'interaction avec des peptides injectés en sous-phase. Cependant, on peut penser que sa composition n'est pas idéale. En effet, les membranes naturelles sont constituées d'une grande variété de phospholipides avec différentes charges électrostatiques tandis que la tricouche est seulement composée de molécules de DOPS chargées négativement. Afin d'améliorer le système, j'ai envisagé l'étude de deux homologues du DOPS : le DOPC, un phospholipide zwitterionique et le DOPG, un phospholipide chargé négativement. Tous deux fluides à température ambiante et possédant des chaînes carbonées identiques à celles du DOPS, on pouvait s'attendre à un comportement similaire à celui du DOPS. Nous verrons dans le paragraphe suivant que les résultats obtenus n'ont pas été ceux escomptés.

### **V.3. Résultats expérimentaux obtenus avec le DOPC et le DOPG**

Bien que les isothermes de ces deux phospholipides obtenus à vitesse rapide présentent la montée en pression et le palier après le collapse, à la différence du DOPS, la brusque remontée en pression n'apparaît pas (figure 15). Sur les images Brewster (images 8 et 9), au début de la compression, je n'ai pu observer que l'apparition de petits domaines très lumineux qui n'ont pas grossi au cours de la montée en pression. Après le collapse, ils ont disparu au profit d'une surface recouverte d'une multitude de points scintillants très lumineux quelque soit le temps d'obturation choisi.

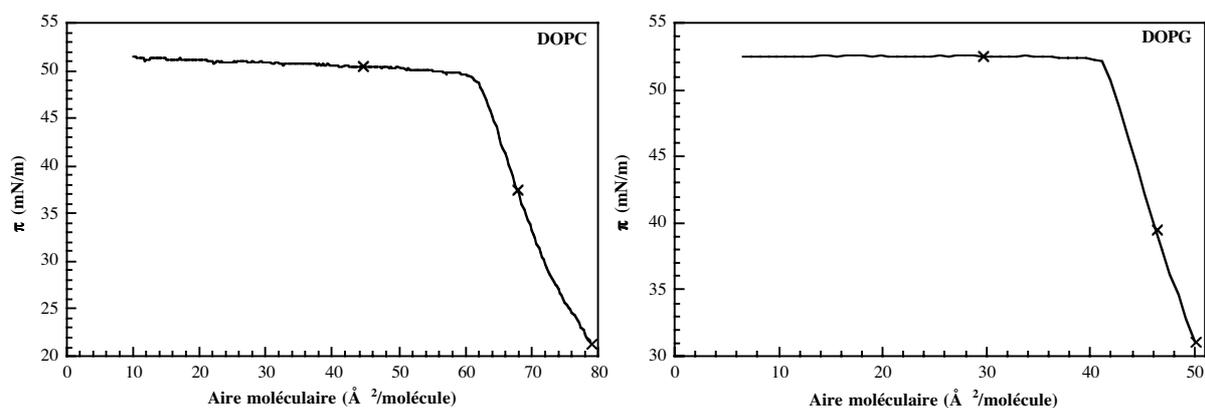
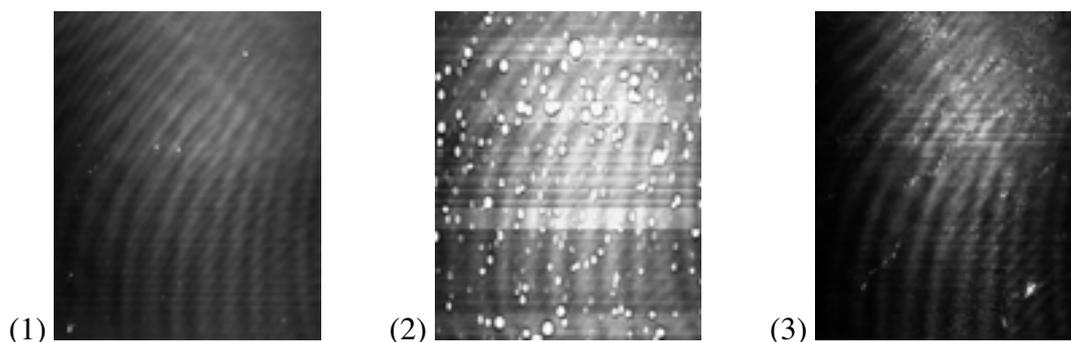
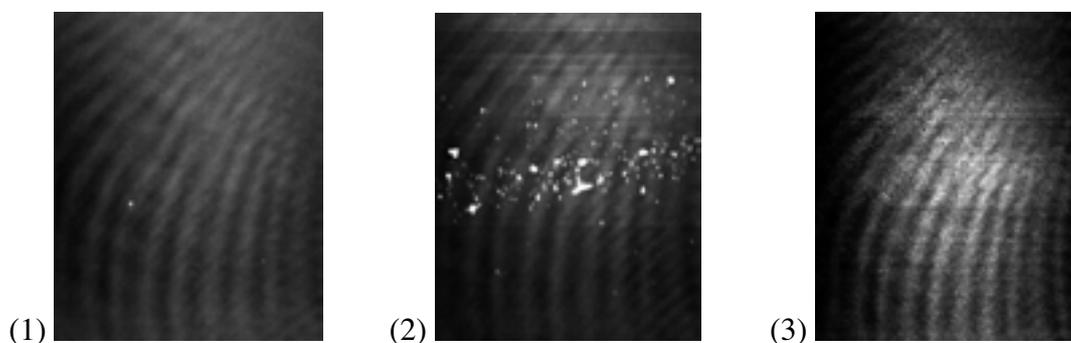


Figure 15 : Isothermes du DOPC et du DOPG comprimés au-delà du collapse à la vitesse de  $0,2 \text{ \AA}^2/\text{molécule/s}$ .



Images 8 : Images Brewster du DOPC comprimé à la vitesse de  $0,2 \text{ \AA}^2/\text{molécule/s}$ . (1) Monocouche ( $TO = 1/50 \text{ s}$ ). (2) Domaines lumineux apparus au cours de la montée en pression ( $TO = 1/50 \text{ s}$ ). (3) Scintillements très lumineux après le collapse ( $TO = 1/500 \text{ s}$ ).



Images 9 : Images Brewster du DOPG comprimé à la vitesse de  $0,2 \text{ \AA}^2/\text{molécule/s}$ . (1) Monocouche ( $TO = 1/50 \text{ s}$ ). (2) Domaines lumineux apparus au cours de la montée en pression ( $TO = 1/50 \text{ s}$ ). (3) Scintillements très lumineux après le collapse ( $TO = 1/500 \text{ s}$ ).

Les résultats obtenus avec le DOPC et le DOPG semblent montrer que le caractère fluide des phospholipides n'est pas une condition suffisante à la formation de multicouches organisées à l'interface air-eau. Alors que nous aurions pu penser que les chaînes carbonées oléoyl étaient un paramètre favorable à la formation de tricouche, les résultats précédents

montrent que les têtes polaires jouent également un rôle déterminant pour la formation de ces systèmes. Une discussion sera plus amplement menée dans la partie VI de ce chapitre.

Toujours dans le but de moduler la charge électrostatique de la tricouche, j'ai envisagé l'étude de mélanges de DMPC et de DOPS, ces deux phospholipides ayant donné des résultats probants lorsqu'ils sont considérés seuls. Suite à de nombreux essais, seul le mélange DOPS-DMPC dans les proportions molaires 95% - 5% a montré des résultats intéressants.

#### **V.4. Mélange de DOPS et de DMPC**

Bien que l'isotherme seul (figure 16) pouvait laisser supposer des résultats analogues à ceux obtenus avec le DOPC et le DOPG puisqu'il ne présentait pas de brusque remontée en pression de surface après le palier vers  $48 \text{ mNm}^{-1}$ , les images Brewster (images 10) ont néanmoins montré la formation de grands domaines circulaires avec une intensité absolue identique à celle de la tricouche de DOPS seul. Cependant, je n'ai pu observer le recouvrement total de la surface comme c'était le cas avec le DOPS seul, expliquant ainsi l'absence de la brusque remontée en pression de surface. Sur l'image 6, nous pouvons voir, sur la périphérie des domaines, des lignes blanches très lumineuses correspondant à la formation d'agrégats. Cette perte de molécules qui participent à la formation de surépaisseurs à la surface permet d'expliquer que la tricouche composée d'un mélange de DOPS et de DMPC ne peut recouvrir toute la surface suite à un défaut de molécules. D'autre part, ces lignes d'agrégats qui s'amoncellent sur les contours semblent empêcher la fusion entre domaines de tricouches comme on peut le supposer sur l'image 6 avec une fine ligne de monocouche en noir séparant deux domaines gris bien que la pression de surface très élevée favorise leur rapprochement. Ces résultats semblent suggérer qu'il y a séparation de phase entre les molécules de DOPS s'organisant en tricouche au cœur des domaines et les molécules de DMPC s'accumulant sur leurs bords.

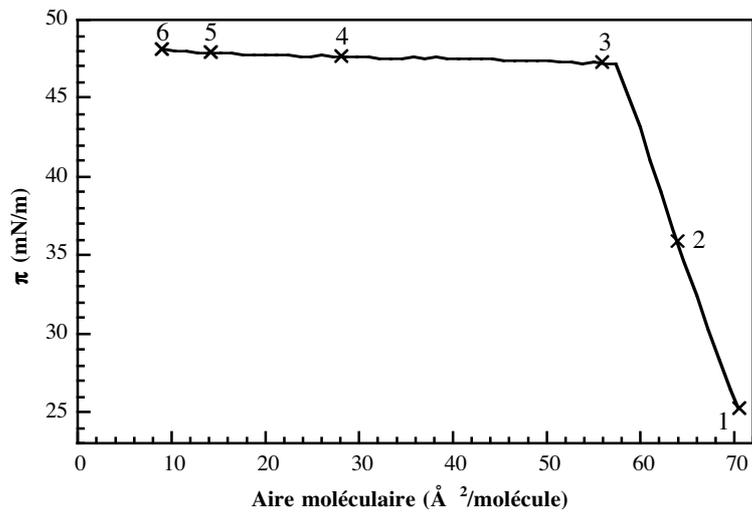
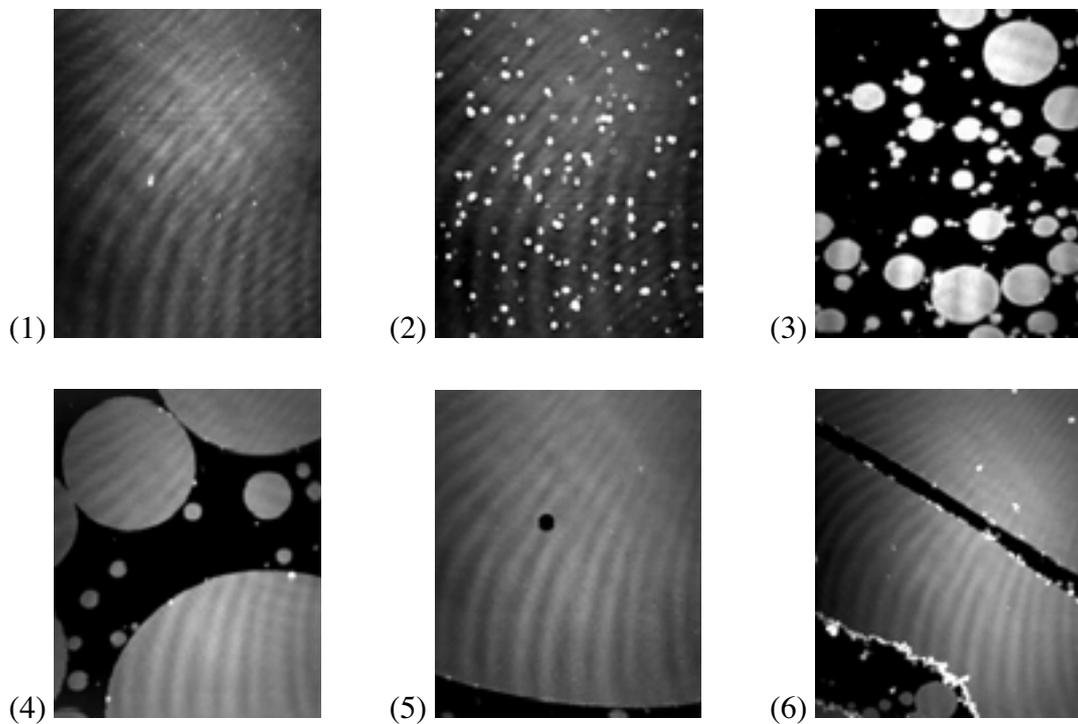


Figure 16 : Isotherme du mélange DOPS-DMPC 95%-5% comprimé à la vitesse de  $0,2 \text{ \AA}^2/\text{molécule/s}$ .



Images 10 : Images Brewster enregistrées lors de la compression au-delà du collapse du mélange DOPS-DMPC 95%-5% à la vitesse de  $0,2 \text{ \AA}^2/\text{molécule/s}$  et avec un temps d'obturation de  $1/50 \text{ s}$  (images 1 et 2) et de  $1/500 \text{ s}$  (images 3 à 6).

## VI. Discussion

Suite aux résultats obtenus par la méthode de Trurnit et par la méthode de compression au-delà du collapse, nous allons chercher à expliquer les phénomènes observés à savoir que le DMPC tend à former des bicouches à l'interface air-eau tandis que le DOPS favorise la formation de tricouche. Nous essayerons également d'expliquer les scintillements observés dans le cas du DOPC et du DOPG. Par ailleurs, nous allons chercher à expliciter les

mécanismes mis en jeu par ces méthodes et notamment pourquoi la méthode de Trurnit, dans les conditions expérimentales dans lesquelles j'ai travaillé, s'est avérée non reproductible.

### **VI.1. Bicouche ou tricouche ?**

Tandis que la microscopie à l'angle de Brewster et la spectroscopie PM-IRRAS nous ont permis de conclure à la formation de bicouches de DMPC et de tricouches de DOPS, les deux techniques ne permettent pas de conclure quant à la structure des systèmes formés. C'est pourquoi nous avons cherché à les expliciter à partir de considérations thermodynamiques.

Pour une bicouche ou une tricouche à la surface de l'eau, l'organisation de la première couche est imposée par la nature de l'interface. Elle aura donc une structure identique à celle d'une monocouche à savoir les têtes polaires plongeant dans l'eau et les chaînes carbonées dirigées vers l'air. En revanche, pour la deuxième couche d'une bicouche, deux types de structure peuvent être envisagées (schéma 18). Soit elle est orientée dans le même sens que la première couche (schéma 18a), soit elle est dans le sens opposé (schéma 18b). Dans le premier cas, il est favorable que les chaînes carbonées de la troisième couche soient dirigées vers l'air mais le contact entre les têtes polaires de la deuxième couche et les chaînes carbonées de la première couche crée des interactions répulsives. Dans le deuxième cas, il se développe des interactions favorables entre les chaînes carbonées des deux couches bien que les têtes polaires de la deuxième couche soient orientées vers l'air. Ces considérations laissent penser que la structure selon des couches opposées est la plus favorable thermodynamiquement d'autant plus qu'il est probable que dans cette configuration les têtes polaires de la deuxième couche soient hydratées afin de minimiser la répulsion avec l'air.

La structure de la tricouche est quant à elle moins discutable. Si l'on envisage une structure telle que celle représentée schéma 19, toutes les interactions entre couches sont favorisées d'un point de vue thermodynamique. De plus, la similitude entre les résultats obtenus (isothermes et images Brewster) pour le DOPS comprimé au-delà du collapse et le collapse de la monocouche du cristal liquide 8CB (4'-n-octyl-4-CyanoBiphényl) suggère un comportement identique pour ces deux composés. En effet, le collapse du 8CB est un modèle de collapse organisé qui se traduit par une transition de la monocouche vers une tricouche [30,

31]. Et l'organisation proposée pour la tricouche de 8CB est identique à celle proposée figure 19, à la différence près que la deuxième et troisième couche sont supposées interdigitées au niveau des têtes polaires [31, 32]. Dans notre cas, les mesures d'épaisseur à partir des intensités sur les spectres PM-IRRAS et les images Brewster sont plutôt en faveur de couches superposées sans interdigitation.

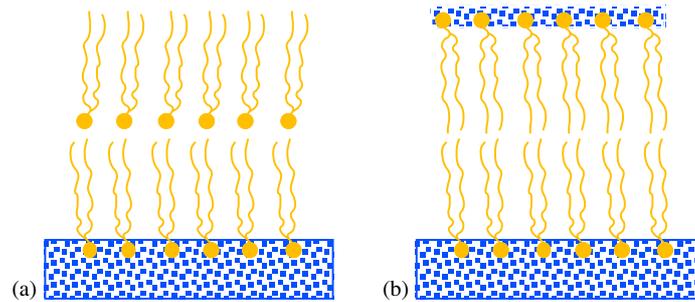


Schéma 18 : Structures possibles de bicouche à l'interface air-eau.

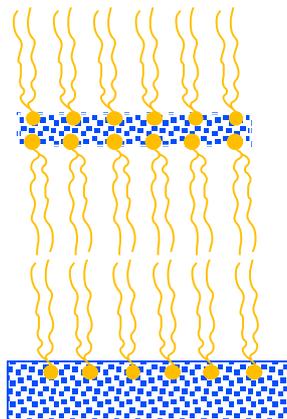


Schéma 19 : Structure possible d'une tricouche à l'interface air-eau.

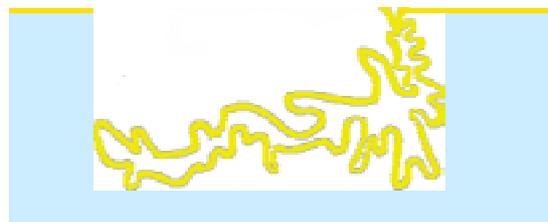
Ces structures supposées pour la bicouche et la tricouche permettraient d'expliquer que la formation de bicouche de DMPC se soit avérée plus difficile et non reproductible par la méthode de Trurnit et par la méthode de compression au-delà du collapse, la bicouche étant moins stable thermodynamiquement que la tricouche. Ainsi, les conditions qui semblent le plus favorables à la formation d'une bicouche sont un taux d'humidité de l'air ambiant élevé. En effet, en favorisant l'hydratation des têtes polaires dirigées vers l'air, on crée une couche d'eau au-dessus qui les écranent de l'air "sec". Cependant, bien que j'aie tenté d'augmenter le taux d'humidité en travaillant sous atmosphère saturée de chlorure cuivreux ( $\text{CuCl}_2$ ) dans

une boîte recouvrant la petite cuve en téflon (un taux d'humidité de 90 % a été atteint), je n'ai pas constaté d'amélioration dans les résultats. La boîte n'étant pas parfaitement étanche et la petite cuve ne possédant pas de système de régulation en température de la sous-phase, comme c'est le cas pour la cuve de Langmuir, toutes les conditions n'étaient pas réunies, le DMPC n'étant peut-être pas dans sa phase fluide au moment de l'expérience. Des expériences réalisées dans une pièce parfaitement étanche et régulée en température et en taux d'humidité permettraient de pousser plus loin nos investigations.

Pour le DOPS, la tête polaire chargée négativement exclut la formation d'une bicouche, les interactions avec l'air étant encore plus défavorisées que dans le cas du DMPC avec une tête polaire zwitterionique. Il est donc plus favorable au DOPS de former une tricouche comme l'ont montré les résultats expérimentaux. Sa structure, avec les chaînes carbonées en contact avec l'air, est en effet thermodynamiquement stable, comme c'est le cas pour une monocouche.

## **VI.2. Scintillements du DOPC et du DOPG à la surface de l'eau**

L'article de Ybert and al. [33] qui propose différents mécanismes possibles pour le phénomène collapse nous a suggéré que les scintillements observés après le collapse lors de la compression du DOPC et du DOPG étaient peut-être dues à des réflexions sur des multicouches qui se formeraient non pas en surface mais dans la sous-phase (schéma 20).



*Schéma 20 : Bicouches de DOPC et de DOPG pouvant donner lieu à des scintillements à la surface en microscopie à l'angle de Brewster (d'après [33]).*

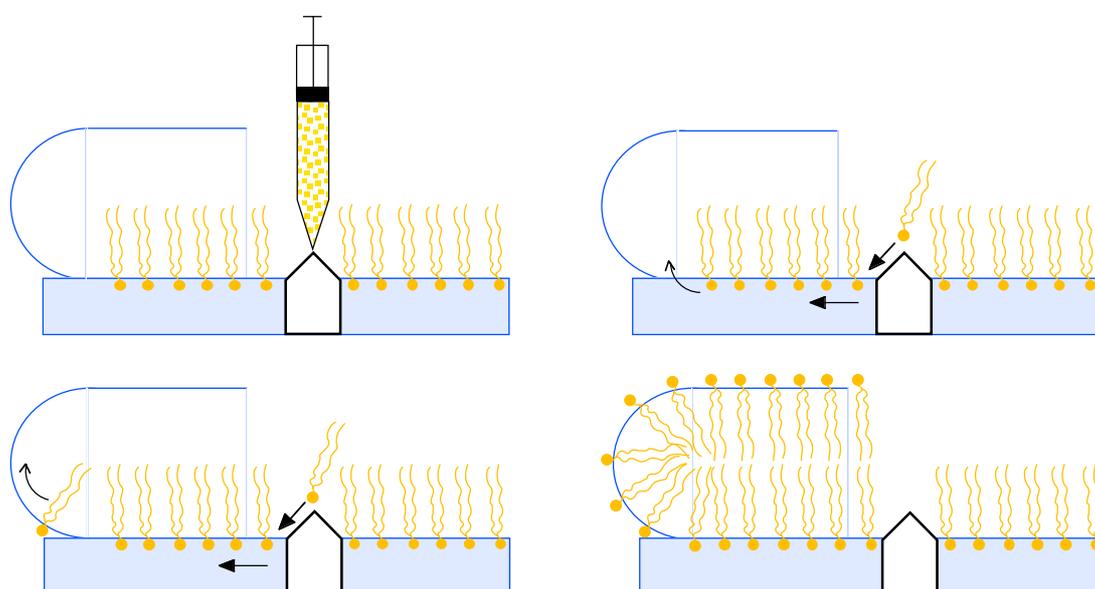
## **VI.3. Mécanismes de formation de multicouches organisées à l'interface air-eau**

D'après les résultats que j'ai obtenus, il semble plus difficile de former des multicouches stables à l'interface air-eau par la méthode de Trurnit que par la méthode de

compression au-delà du collapse. Dans les deux cas, on peut supposer que la bicouche se forme à partir de molécules appartenant à la monocouche.

Pour la méthode de Trurnit, on peut décomposer la formation de la bicouche en deux étapes qui se produisent de façon simultanée (schéma 21). La première correspond à la formation d'une monocouche, la deuxième correspond au basculement de molécules de la monocouche qui en sont exclues du fait de l'insertion des molécules qui continuent de se répartir sur la surface jusqu'à l'étalement complet de la goutte épanchée sur le cône.

Pour la méthode de compression au-delà du collapse, on peut envisager le même mécanisme de basculement à partir d'une monocouche préformée initialement.



*Schéma 21 : Mécanisme proposé pour la formation de la bicouche par la méthode de Trurnit.*

Pour la tricouche, les observations faites en microscopie à l'angle de Brewster ont montré que dès lors que les domaines circulaires sont formés, leur intensité ne varie pas au cours de leur grossissement. On peut donc supposer que la bicouche et la troisième couche se forment simultanément. La bicouche s'agence par basculement des molécules d'après le mécanisme proposé ci-dessus et la tricouche se forme par glissement de la monocouche au-dessus de la bicouche en formation, comme le suggère le schéma 22.

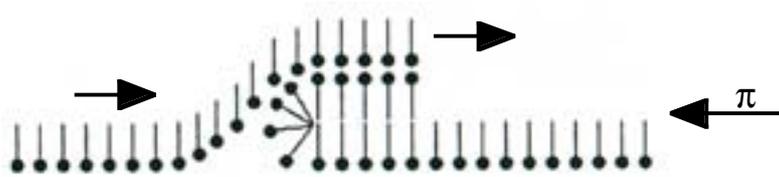


Schéma 22 : Mécanisme proposé pour la formation d'une tricouche par la méthode par compression au-delà du collapse (d'après [34]).

La différence qui intervient entre les deux méthodes et qui peut permettre d'expliquer la difficulté de la méthode de Trurnit est la vitesse de formation de la bicouche. En effet, pour cette dernière, l'étalement de la goutte se fait de façon brutale à cause de l'épandage en une seule injection de la solution ne laissant pas le temps aux molécules de se répartir et de s'organiser de façon homogène et uniforme à la surface. L'insertion chaotique des molécules peut engendrer une forte déstabilisation du système et empêcher la formation d'une structure stable. Au contraire, pour la méthode de compression au-delà du collapse, la monocouche étant déjà formée, c'est la barrière en mouvement qui en comprimant les molécules provoque leur basculement vers une deuxième couche. Dans ce cas, on peut expliquer le phénomène par une perturbation extérieure, créée par la barrière en mouvement, induisant le passage d'un état d'équilibre (métastable), la monocouche, vers un autre état d'équilibre, la bicouche ou la tricouche.

Les résultats décrits au cours des parties IV à VI ont montré qu'il était possible de stabiliser des multicouches de phospholipides organisées à l'interface air-eau. Ces travaux précurseurs ouvrent la voie à un nouveau domaine de recherche sur la réalisation, à l'interface air-eau, de systèmes modèles reproduisant la diversité de composition et l'épaisseur hydrophobe des membranes naturelles. L'étude de leur interaction avec des peptides pourra être envisagée comme nous le verrons dans le chapitre suivant. Bien que ces travaux aient dégagé un certain nombre de points essentiels pour parvenir à former des bicouches ou tricouches phospholipidiques stables, il n'en reste pas moins à chercher les conditions expérimentales optimales qui conduiront à la reproductibilité de la méthode de Trurnit. Il serait également intéressant d'identifier les paramètres physico-chimiques qui sont

déterminants chez les phospholipides pour parvenir à fixer les conditions qui aboutiront à la formation systématique de leur multicouche stable par la méthode de compression au-delà du collapse.

Toujours dans le but de réaliser des bicouches stables à l'interface air-eau et suite aux résultats précédents, nous avons réfléchi à l'élaboration d'une nouvelle méthode qui aurait l'avantage d'être à la fois simple et reproductible quelque soit le type de phospholipide utilisé. Pour cela, nous nous sommes inspirés des études sur la formation de bicouches planes supportées (SPB, en anglais) sur substrat solide à partir de l'éclatement de vésicules [35-45]. Nous nous sommes également basés sur les travaux réalisés par l'équipe de F. Rondelez de l'institut Curie avec notre équipe sur les dérivés siloxanes [48]. Je décrirai donc dans la partie suivante les différentes étapes de la méthode et présenterai les résultats obtenus en microscopie à l'angle de Brewster et en spectroscopie PM-IRRAS qui ont permis de conclure à la formation, par éclatement de vésicules, d'une bicouche de DMPC supportée sous une monocouche d'octadécyltriméthoxysilane polymérisée à l'interface air-eau.

## VII. Formation de bicouches supportées par éclatement de vésicules à l'interface air-eau

### VII.1. Principe de la méthode

La méthode consiste à former, par éclatement de vésicules de DMPC injectées dans une sous-phase aqueuse, une bicouche supportée **sous** une monocouche d'octadécyltriméthoxysilane (OTMS, schéma 23) polymérisé à l'interface air-eau. La première étape est l'hydrolyse acide suivie de la polymérisation d'un film d'OTMS épandu sur la surface d'une cuve de Langmuir. La deuxième étape est l'injection dans la sous-phase d'une solution de petites vésicules de DMPC qui éclatent au contact de la monocouche d'OTMS polymérisé. La formation de la bicouche de DMPC a été suivie par la spectroscopie PM-IRRAS et la microscopie à l'angle de Brewster.

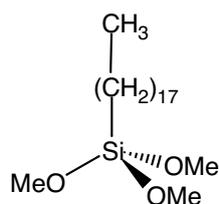


Schéma 23 : Molécule d'octadécyltriméthoxysilane.

### VII.2. Polymérisation du film d'OTMS

L'étude réalisée en spectroscopie PM-IRRAS de la polymérisation d'un film de Langmuir d'OTMS est décrite dans l'article de D. Blaudez et al. [48]. Dans notre cas, afin de réduire la quantité de phospholipide à utiliser, nous avons travaillé avec une petite cuve en téflon de 37 cm<sup>2</sup> de surface. Le principe de l'expérience consiste à épandre une solution d'OTMS diluée dans le chloroforme telle que la pression de surface initiale du film soit de 25 mNm<sup>-1</sup>. La première étape étant l'hydrolyse de l'OTMS, la solution est épandue sur une sous-phase acide de pH = 2. Le mécanisme de la polymérisation est décrit selon le schéma réactionnel 24 ci-dessous :

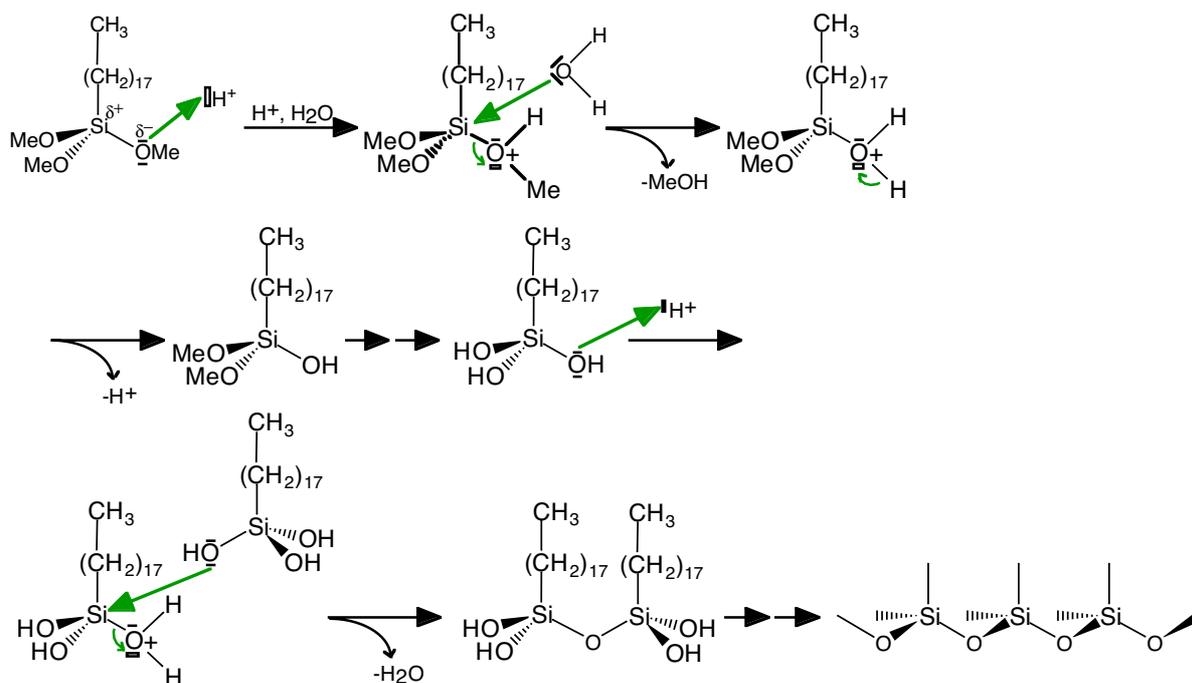
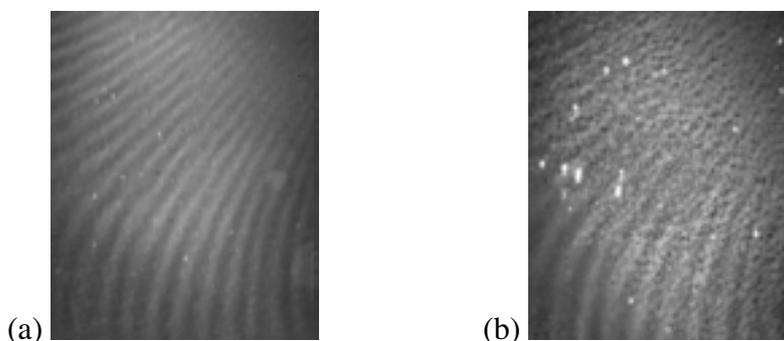


Schéma 24 : Mécanisme de la polymérisation de l'OTMS.

La première étape d'hydrolyse acide des groupements méthoxy en groupements hydroxy des molécules d'OTMS pour former l'octadécyltrihydroxysilane (OTHS) est facilitée dans le cas d'un méthoxysilane par rapport à son homologue éther. En effet, le silicium étant plus électropositif qu'un carbone, la liaison Si-O est d'autant plus polarisée ( $\chi(\text{Si}) = 1,93$  ;  $\chi(\text{C}) = 2,55$  ;  $\chi(\text{O}) = 3,44$  d'après l'échelle d'électronégativité de Pauling). L'étape suivante de polymérisation en milieu acide consiste en la protonation d'un groupement hydroxyl suivi de l'attaque nucléophile d'un oxygène d'un groupement hydroxyl appartenant à une deuxième molécule d'OTHS avec perte d'une molécule d'eau. D'après l'article de Blaudez and al. [48], deux molécules d'oxygène sur trois sont, en moyenne, engagées dans une liaison Si-O-Si (polymérisation bidimensionnelle) qui conduit à la formation d'une monocouche à l'interface air-eau. Il faut noter que la cinétique de la polymérisation est plus rapide en milieu basique, le groupe OH étant un meilleur groupe partant que  $\text{H}_2\text{O}^+$  et  $\text{OH}^-$  étant un meilleur nucléophile que OH. Au cours de l'expérience, nous avons attendu trois heures afin d'être sûr que la polymérisation soit complète. Le spectre PM-IRRAS enregistré à pH 2 (figure 15, courbe noire) est caractérisé par la bande de vibration de la liaison Si-O-Si entre  $980$  et  $1150 \text{ cm}^{-1}$ , synonyme de la polymérisation de la monocouche à l'interface.

Dans une deuxième étape, nous avons procédé à la neutralisation de la sous-phase par ajout d'une solution de soude de concentration  $1 \text{ molL}^{-1}$ , de manière à se rapprocher des conditions physiologiques des cellules biologiques. Le spectre PM-IRRAS enregistré à pH 7 (figures 14 et 15, courbes vertes) montre une modification des intensités de la bande Si-O-Si et des bandes de vibration des liaisons C-H des groupements  $\text{CH}_2$ . Cet effet signifie qu'il y a une réorientation des chaînes carbonées et des têtes silane au cours de la polymérisation.

Par ailleurs, les images Brewster (images 11) montrent que la surface évolue, au cours de la polymérisation, d'un aspect homogène (image 11, a) à un aspect granuleux (image 11, b), traduisant une certaine rugosité de la monocouche d'OTMS polymérisée.



Images 11 : Images Brewster du film d'OTMS à pH = 2 (image a) et à pH = 7 (image b).

### VII.3. Formation de la bicouche de DMPC

Cette étape consiste à injecter un volume donné de solution de SUV (Small Unilamellar Vesicles en anglais) de DMPC sous la couche d'OTMS polymérisé. Les SUV sont préparées par sonication d'une solution de DMPC dans de l'eau ultrapure à la concentration de 8 mg par mL. Lors de la sonication, les vésicules multilamellaires de DMPC, qui se sont formées spontanément dans l'eau, sont cassées en vésicules unilamellaires plus petites de diamètre d'environ 50 nm. Du fait de leur tension de courbure élevée, les SUV sont peu stables thermodynamiquement. Ainsi, en présence d'une surface hydrophile, elles ont tendance à s'adsorber puis à éclater pour former une bicouche uniforme, comme ça a été montré dans le cas de substrats solides hydrophiles [37-40, 42-47]. Nous avons donc étudié le comportement de SUV de DMPC au contact d'une monocouche d'OTMS polymérisé au caractère hydrophile du fait de la présence des oxygènes. L'expérience a été réalisée à  $27^\circ\text{C}$ , au-dessus de la température de transition entre la phase gel et la phase fluide du DMPC, afin que, s'il se

forme une bicouche, celle-ci soit dans une phase fluide comme c'est le cas pour les bicouches naturelles.

#### VII.4. Spectres PM-IRRAS

L'évolution de l'état de la surface en fonction du temps après l'injection des vésicules de DMPC a été suivie en spectroscopie PM-IRRAS (figures 17 et 18). L'identification des bandes sur les spectres PM-IRRAS va permettre de savoir si des molécules de DMPC sont présentes à la surface et donc si les vésicules ont effectivement éclaté.

Dans le domaine des hautes fréquences (figure 17), on peut constater une forte augmentation de l'intensité des bandes de vibration antisymétrique ( $2918\text{ cm}^{-1}$ ) et symétrique ( $2850\text{ cm}^{-1}$ ) des liaisons C-H des groupements  $\text{CH}_2$  après l'injection des vésicules. Cette augmentation signifie qu'en plus des groupements  $\text{CH}_2$  des chaînes carbonées octadécyl de la monocouche, il y a également une contribution des groupements  $\text{CH}_2$  des chaînes carbonées du DMPC, synonyme de leur présence à l'interface.

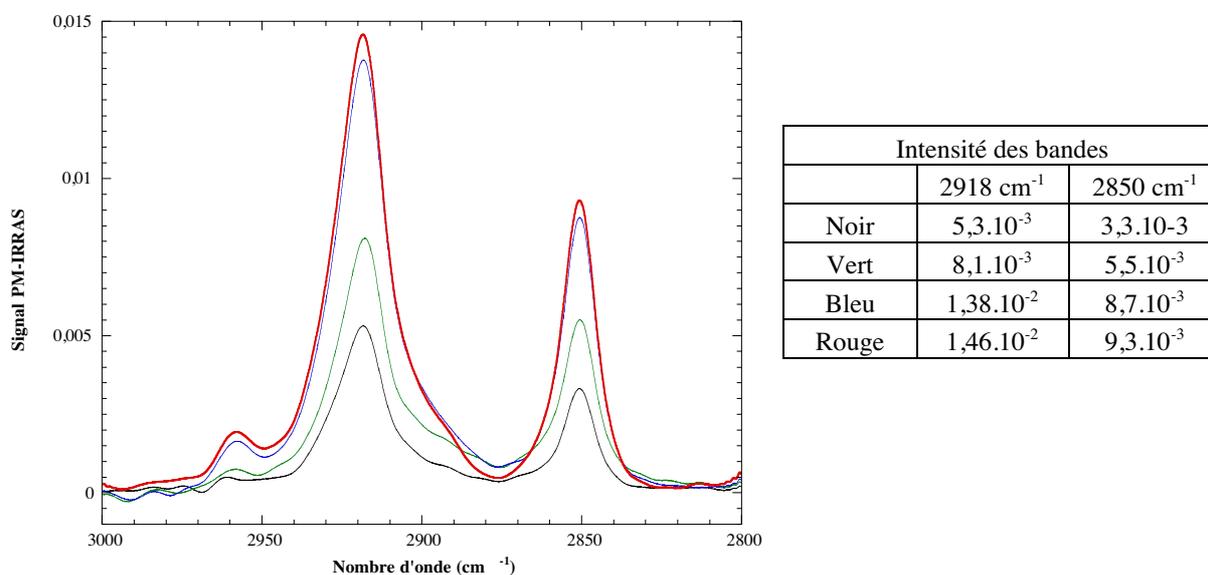
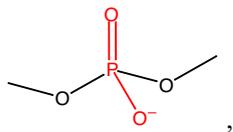


Figure 17 : Spectres PM-IRRAS dans le domaine des fréquences des vibrations antisymétrique ( $2918\text{ cm}^{-1}$ ) et symétrique ( $2850\text{ cm}^{-1}$ ) de la liaison C-H des groupements  $\text{CH}_2$ . Monocouche d'OTMS hydrolysée : à  $\text{pH} = 2$  (noir), à  $\text{pH} = 7$  (vert). Monocouche d'OTMS polymérisée en présence des vésicules de DMPC : 45 min après l'injection (bleu), 3h30 après l'injection (rouge).

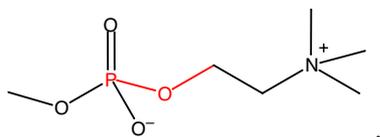
Dans le domaine des basses fréquences (figure 18), on voit l'apparition de bandes caractéristiques du phospholipide :

- à  $1738\text{ cm}^{-1}$ , la bande de vibration de la liaison C=O du carbonyle du groupement ester,

- à 1229 et à 1086  $\text{cm}^{-1}$ , les bandes des vibrations antisymétrique et symétrique de la liaison  $\text{PO}_2^-$  du groupement phosphate :

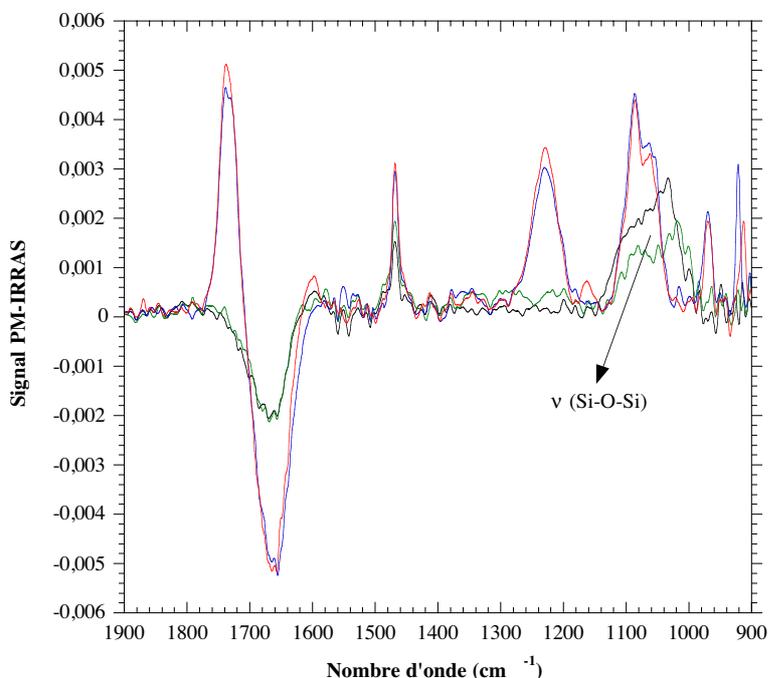


- à 1063  $\text{cm}^{-1}$ , la bande de vibration de la liaison C-O-P :



- à 970, la bande de vibration antisymétrique de la liaison C-N du groupement triméthylammonium  $\left(\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3\right)$ .

On peut voir également à 1468  $\text{cm}^{-1}$  une augmentation de l'intensité de la bande de déformation de la liaison C-H des groupements  $\text{CH}_2$  présents à la fois dans les chaîne octadécyl de la monocouche et dans les chaînes carbonées du DMPC. De plus, l'intensité du creux à 1660  $\text{cm}^{-1}$  dû à la déformation des liaisons O-H de la molécule d'eau a été multipliée par 2,5.



Intensité des bandes		
	1660 $\text{cm}^{-1}$	1468 $\text{cm}^{-1}$
Noir	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$
Vert	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$
Bleu	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-3}$
Rouge	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$

Figure 18 : Spectres PM-IRRAS dans le domaine des basses fréquences (rapports entre les spectres bruts et le spectre de la sous-phase aqueuse). Monocouche d'OTMS hydrolysée : à pH = 2 (noir), à pH = 7 (vert). Monocouche d'OTMS polymérisée en présence des vésicules de DMPC : 45 min après l'injection (bleu), 3h30 après l'injection (rouge).

Chacune de ces observations tend à montrer que les vésicules de DMPC ont éclaté à la surface de la monocouche. Cependant, afin de quantifier les résultats obtenus, j'ai réalisé la simulation numérique des spectres PM-IRRAS enregistrés dans le domaine des basses fréquences afin d'estimer l'épaisseur des différentes couches présentes à l'interface. Pour cela, j'ai d'abord simulé le spectre expérimental de la monocouche d'OTMS polymérisé sur la sous-phase de pH = 7. Les bandes d'absorption correspondant aux bandes d'absorption des vibrations antisymétrique et symétrique de la liaison C-H des groupements CH<sub>2</sub> sont modélisées par deux bandes de profil mixte très majoritairement lorentzien centrées à 2918 et 2850 cm<sup>-1</sup> de 30 cm<sup>-1</sup> de largeur à mi-hauteur. Les coefficients d'extinction k sont choisis égaux à ceux de l'arachidate de cadmium donnés dans l'article [49]. Le film d'OTMS est modélisé par une couche uniaxiale (isotrope dans le plan) sur une surface d'eau dont les indices, fonction de la longueur d'onde, sont donnés dans [50]. Son épaisseur est ajustée telle que le spectre expérimental et le spectre simulé coïncident. Les résultats sont présentés sur la figure 19 pour une fréquence de modulation de 1450 cm<sup>-1</sup>. On peut voir que c'est le spectre simulé pour une épaisseur de 22 Å qui reproduit le mieux le spectre expérimental. À partir de ce résultat, j'ai pu simuler le spectre expérimental enregistré 45 minutes après l'injection des vésicules de DMPC. Le système est modélisé par une couche de DMPC d'épaisseur variable sous une couche d'OTMS de 22 Å. Les simulations présentées sur la figure 20 montrent que le spectre simulé pour une couche de DMPC de 35 Å d'épaisseur reproduit le mieux le spectre expérimental. L'épaisseur trouvée est du même ordre de grandeur que l'épaisseur d'une bicouche supportée libre fluide de DMPC mesurée par réflectivité de neutrons [51]. Ce qui correspond, après l'injection des vésicules, à une augmentation de l'épaisseur du film à la surface de  $\frac{22 + 35}{22} = 2,6$ . Ce résultat corrobore avec l'augmentation de l'intensité du creux de l'eau de 2,5, signifiant que les vésicules de DMPC ont éclaté à la surface pour former une bicouche de DMPC sous une monocouche d'OTMS polymérisé.

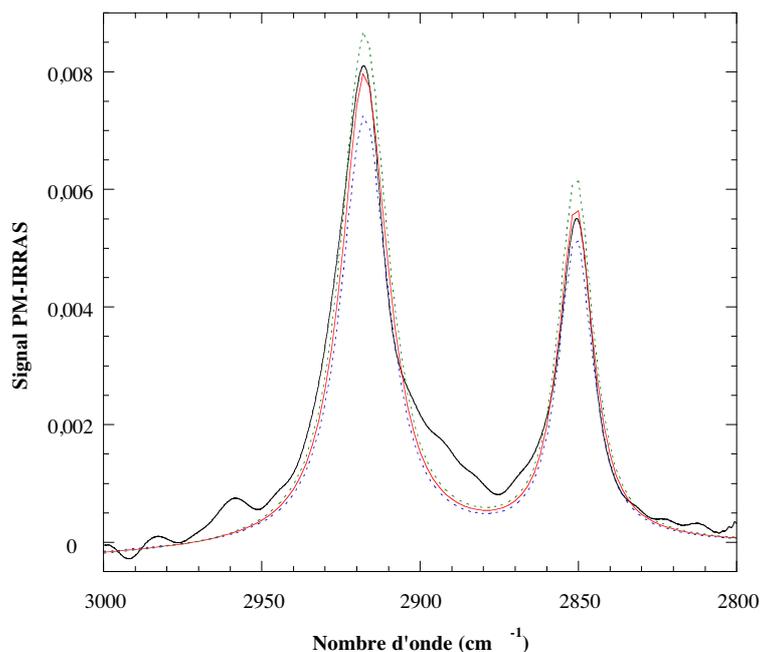


Figure 19 : Spectre PM-IRRAS expérimental (en noir) et spectres simulés de la monocouche d'OTMS polymérisée à pH = 7 pour trois épaisseurs différentes : 20 Å (en bleu), 22 Å (en rouge) et 24 Å (en vert).

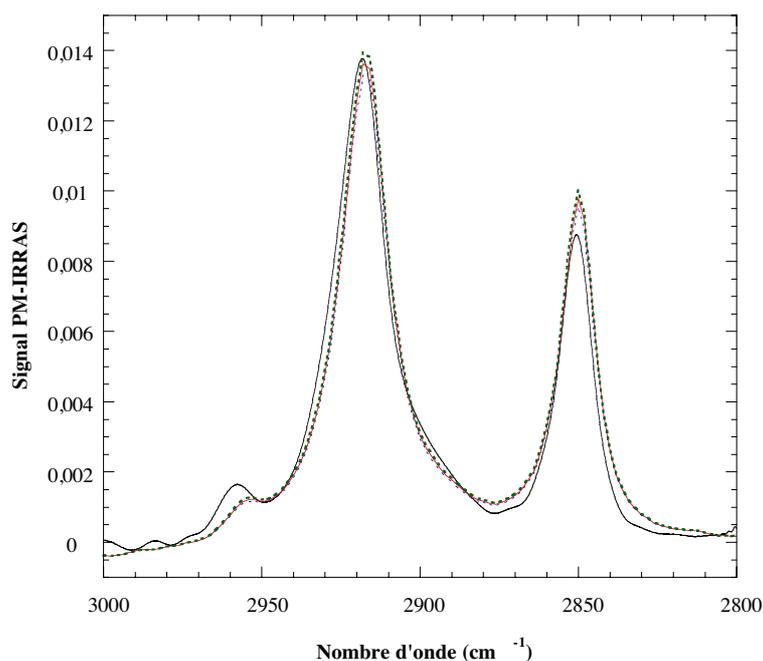
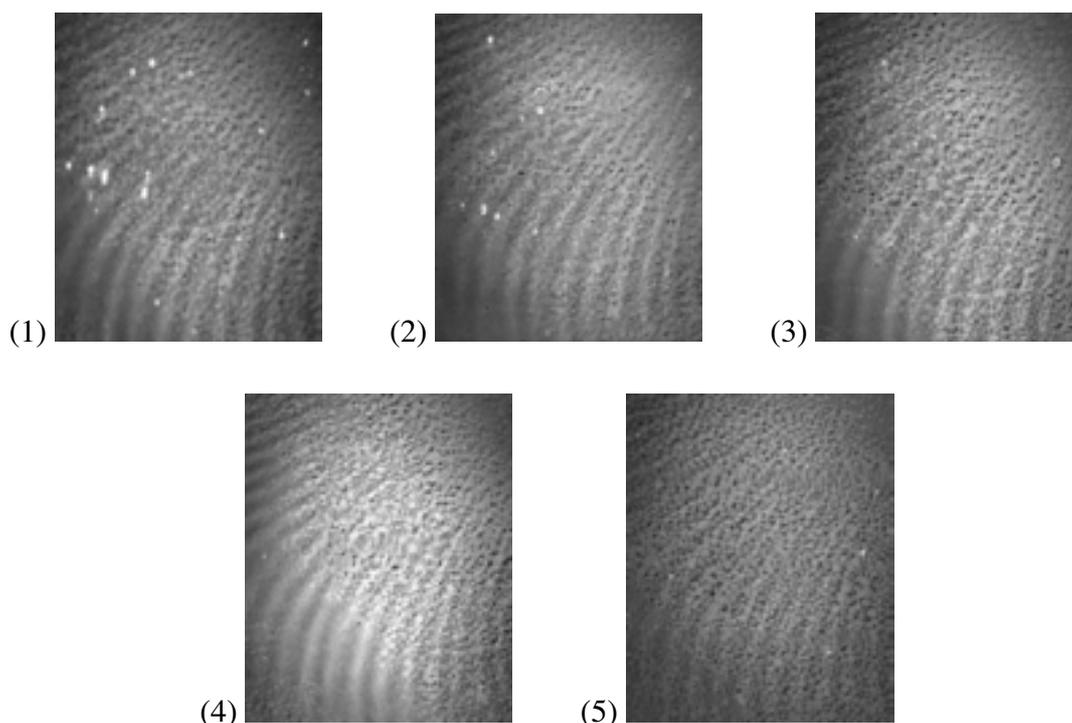


Figure 20 : Spectre PM-IRRAS expérimental enregistré 45 minutes après l'injection de vésicules (en noir) et spectres simulés d'une monocouche d'OTMS polymérisée à pH = 7 sur une couche de DMPC pour trois épaisseurs différentes : 33 Å (en bleu), 35 Å (en rouge) et 37 Å (en vert).

## VII.5. Étude en microscopie à l'angle de Brewster

Afin de compléter les résultats obtenus en spectroscopie PM-IRRAS, j'ai étudié l'évolution en fonction du temps de l'intensité des images Brewster après l'injection de la solution de vésicules sous la monocouche d'OTMS polymérisé.

Après l'injection de la solution de vésicules de DMPC, la surface homogène d'aspect "granuleux" après la neutralisation du pH de la sous-phase (images 12, 1), n'a pas changé d'aspect mais son intensité a fortement augmenté (images 12, 2-5). En effet, dans les minutes qui ont suivi l'injection, j'ai pu observer une augmentation très rapide du niveau de gris des images impliquant une diminution du temps d'obturation du 50<sup>ième</sup> au 250<sup>ième</sup> de seconde. Le niveau de gris a continué à augmenter rapidement pendant environ un quart d'heure puis a augmenté plus progressivement jusqu'à atteindre une valeur correspondant à une intensité lumineuse environ huit fois plus importante que l'intensité de la monocouche d'OTMS de départ, soit une épaisseur environ 2,8 fois plus grande que celle de la monocouche d'OTMS polymérisé (figure 21). Ce qui est concordant avec l'augmentation de l'intensité du creux de l'eau observée en spectroscopie PM-IRRAS.



*Images 12 : Images Brewster enregistrées après l'injection des vésicules de DMPC. (1) Monocouche d'OTMS polymérisée après neutralisation du pH de la sous-phase ( $TO = 1/50$  s),  $t = 0$ . Monocouche après injection des vésicules : (2)  $t + 1$  min ( $TO = 1/120$  s), (3)  $t + 4$  min ( $TO = 1/250$  s), (3)  $t + 14$  min ( $TO = 1/250$  s), (4)  $t + 54$  min ( $TO = 1/500$  s).*

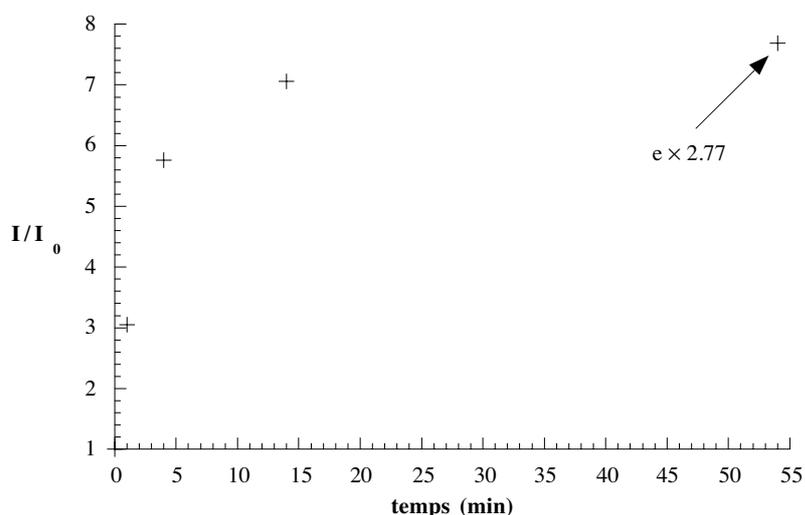


Figure 21 : Évolution en fonction du temps du rapport de l'intensité des images Brewster après l'injection des vésicules de DMPC sur l'intensité de la monocouche d'OTMS de départ.

Alors que les intensités relevées sur les spectres PM-IRRAS laissaient penser qu'une bicouche de DMPC s'était formée sous la monocouche d'OTMS polymérisé, la microscopie à l'angle de Brewster a apporté une information supplémentaire sur son homogénéité. La spectroscopie PM-IRRAS ne peut en effet pas conclure sur la nature d'un film à la surface, les intensités mesurées étant des intensités moyennes. Ainsi les intensités relevées auraient pu correspondre à un système composé de domaines de différentes épaisseurs.

Par ailleurs, nous pouvons voir, sur le spectre PM-IRRAS (figure 17, courbes bleue et rouge), une légère augmentation de l'intensité des bandes de vibration des liaisons C-H des groupements CH<sub>2</sub>, une heure après l'injection des vésicules de DMPC. Ce résultat suggère que des vésicules éclatent encore à la surface et que des molécules de DMPC continuent de s'insérer dans la bicouche après sa formation. Cet effet se traduit également par une augmentation de la pression de surface en fonction du temps (figure 22) qui se poursuit tant que la saturation de la bicouche n'est pas atteinte.

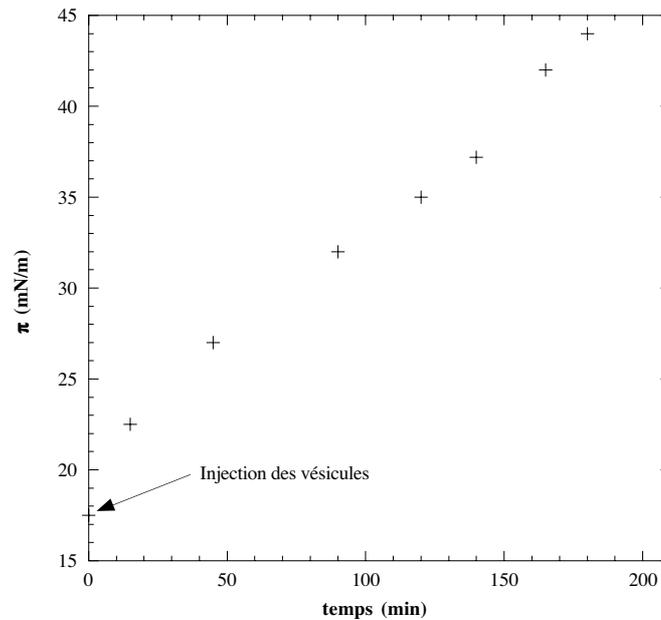


Figure 22 : Évolution de la pression de surface après l'injection des vésicules de DMPC sous la monocouche d'OTMS polymérisé.

Ces résultats ont été confirmés par l'étude de l'intensité des images Brewster en fonction du temps (tableau 2).

Images	1	2	3	4	5
t (min)	0	1	4	14	54
I	$3,03 \cdot 10^{-6}$	$9,25 \cdot 10^{-6}$	$1,75 \cdot 10^{-5}$	$2,14 \cdot 10^{-5}$	$2,33 \cdot 10^{-5}$

Tableau 2 : Évolution de l'intensité de la surface en fonction du temps après l'injection des vésicules de DMPC.

Pour cela, j'ai effectué l'ajustement de la courbe afin de préciser le mécanisme de formation des bicouches de DMPC sous la monocouche d'OTMS polymérisé.

En considérant l'allure de la courbe moyenne passant par les points du tableau 2 représentés sur la figure 23, j'ai simulé la courbe de l'intensité lumineuse en fonction du temps par une fonction exponentielle de la forme  $y = I_0 + (I_\infty - I_0) [1 - \exp(-t/\tau)]$  où  $I_0$  et  $I_\infty$  représentent respectivement l'intensité à l'instant initial (soit l'intensité de la monocouche d'OTMS polymérisé) et l'intensité à l'instant infini et  $\tau$  la constante de temps caractéristique de la montée de l'exponentielle. Le calcul (courbe rouge, figure 23) montre que la fonction y choisie assure la corrélation entre tous les points et que la constante de temps  $\tau$  est égale à

environ 3 minutes. Ce résultat permet donc d'établir que la bicouche se forme très rapidement après l'injection des vésicules.

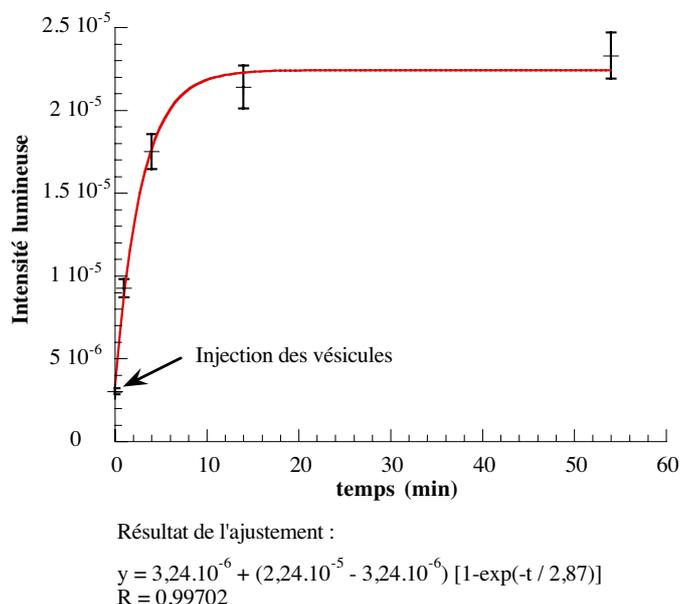
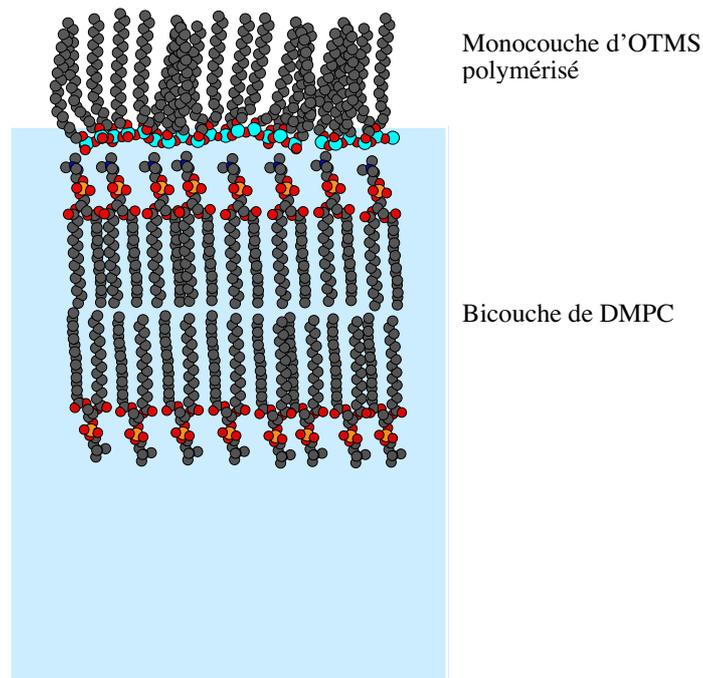


Figure 23 : Évolution de l'intensité lumineuse des images Brewster (images 12) en fonction du temps. La courbe en rouge représente l'ajustement de tous les points du tableau 2 par la fonction y.

## VII.6. Conclusion

Les résultats obtenus par les différentes méthodes d'analyse montrent que les vésicules de DMPC injectées dans la sous-phase éclatent au contact de la monocouche d'OTMS polymérisé pour former rapidement une bicouche de DMPC "à trous" partiellement compacte. La cinétique de cette réaction, évaluée à environ 3 minutes, est rapide conformément aux résultats trouvés pour la formation de bicouches sur substrats solides hydrophiles [40, 42]. Une fois la bicouche formée, les vésicules intactes dans la sous-phase continuent d'éclater, les molécules de DMPC libérées venant combler les espaces vacants dans la bicouche. Cette réaction se traduit par une croissance continue et progressive de la pression de surface et de l'intensité lumineuse des images Brewster jusqu'à saturation de la bicouche [52].

D'autre part, parallèlement à ce qui a été suggéré dans la partie VI sur la structure d'une bicouche et d'une tricouche formée à l'interface air-eau, la structure thermodynamiquement la plus stable de la bicouche de DMPC formée ici est telle que les têtes polaires de la couche supérieure soient en contact avec la monocouche hydrophile d'OTMS polymérisé et celles de la couche inférieure avec l'eau de la sous-phase (schéma 25).



*Schéma 25 : Représentation schématique de la bicouche de DMPC supportée sous la monocouche d'OTMS polymérisé.*

Dans la perspective de reproduire un système modèle proche des propriétés des membranes naturelles, nous envisageons de construire une nouvelle cuve qui permettra de vidanger la sous-phase. Ainsi, il sera possible de contrôler sa compacité en stoppant sa formation lorsque la pression de surface correspondra à celle d'une bicouche fluide ( $\approx 30$  mN/m). Dans ces conditions, nous pourrions envisager l'étude de son interaction avec des peptides, qui ne sera pas faussée par l'interaction des peptides avec les vésicules dans la sous-phase, celles-ci ayant été éliminées lors de la vidange. Nous pourrions également moduler les propriétés physico-chimiques de la sous-phase (présence de sels et d'ions) afin de se rapprocher des conditions physiologiques des cellules biologiques.

## Bibliographie

- [1] I. Langmuir. 1917. JACS, 39, 1848.
- [2] K. B. Blodgett. 1935. JACS, 57, 1007.
- [3] K. B. Blodgett, I. Langmuir. 1937. Phys. Rev., 51, 967.
- [4] R. H. Tredgold. *Order in thin organic films*. Cambridge University Press, 1994.
- [5] A. Ulman. *An introduction to ultrathin organic films : from Langmuir-Blodgett to self-assembly*. Academic Press, Inc., 1991.
- [6] B. Patrana-Rios. 1995. Biophys. J., 69, 2531.
- [7] I. Cornut and al. 1996. Biophys. J., 70, 305.
- [8] C. R. Flach and al. 1996. Biophys. J., 70, 539.
- [9] A. Gericke and al. 1997. Biophys. J., 73, 492.
- [10] F. Wu and al. 1998. Biophys. J., 74, 3273.
- [11] D. Dieudonné and al. 1998. JACS, 120, 792.
- [12] S. Castano and al. 1999. BBA, 1416, 176.
- [13] N. L. Gershfeld and K. Tajima. 1979. Nature, 279, 708.
- [14] K. Tajima and N. L. Gershfeld. 1985. Biophys. J., 47, 203.
- [15] L. Ginsberg and N. L. Gershfeld. 1985. Biophys. J., 47, 211.
- [16] N. L. Gershfeld. 1986. Biophys. J., 50, 457.
- [17] N. L. Gershfeld & al. 1986. Faraday Discuss. Chem. Soc., 81, 19.
- [18] N. L. Gershfeld & al. 1993. Biophys. J., 65, 1174.
- [19] K. Fukada and N. L. Gershfeld. 1997. J. Phys. Chem. B., 101, 8225.
- [20] A. J. Jin & al. 1999. Biochemistry, 38, 13275.
- [21] Nima. Operating manual. *Tensiometers and Langmuir-Blodgett troughs*. Nima technology Ltd., 4<sup>th</sup> Ed, 1998.
- [22] S. Hénon and J. Meunier. 1991. Rev. Sci. Instrum., 62, 936.
- [23] D. Hönig and D. Möbius. 1991. J. Phys. Chem., 95, 4590.
- [24] M. N. G. de Mul and J. A. Mann, Jr. 1998. Langmuir, 14, 2455.
- [25] A. F. Mingotaud, C. Mingotaud and L. K. Patterson. *Handbook of monolayers*. Ed., Academic, San Diego, 1993.

- [26] L. Ricard and al. 1985. *J. Phys. Chem.*, 89, 4793.
- [27] H. J. Trurnit. 1960. *J. Coll. Sci.*, 15, 1.
- [28] C. Salesse and al. 1990. *Biochemistry*, 29, 4567.
- [29] G. L. Gaines. *Insoluble monolayers at the liquid-gas interfaces*. Wiley Interscience New York, 1966.
- [30] M. C. Friedenbergh and al. 1994. *Langmuir*, 10, 1251.
- [31] M. N. de Mul and J. A. Mann, Jr. 1994. *Langmuir*, 10, 2311.
- [32] J. Xue and al. 1992. *Phys. Rev. Lett.*, 69, 474.
- [33] C. Ybert and al. 2002. *J. Phys. Chem. B*, 106, 2004.
- [34] C. Gourier and al. 2002. *Langmuir*, 18, 9434.
- [35] T. H. Watts and al. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7564.
- [36] T. H. Watts and al. 1986. *Nature*, 320, 179.
- [37] E. Kalb and al. 1992. *BBA*, 1103, 307.
- [38] P. Nollert and al. 1995. *Biophys. J.*, 69, 1447.
- [39] H. Egawa and K. Furusawa. 1999. *Langmuir*, 15, 1660.
- [40] C. A. Keller and al. 2000. *Phys. Rev. Lett.*, 84, 5443.
- [41] J. Jass and al. 2000. *Biophys. J.*, 79, 3153.
- [42] I. Reviakine and A. Brisson. 2000. *Langmuir*, 16, 1806.
- [43] V. P. Zhdanov and B. Kasemo. 2001. *Langmuir*, 17, 3518.
- [44] A. Granéli and al. 2003. *Langmuir*, 19, 842.
- [45] E. Reimhult and al. 2003. *Langmuir*, 19, 1681.
- [46] R. Lipowsky and U. Seifert. 1991. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 202, 17.
- [47] U. Seifert. 1997. *Adv. Phys.*, 46, 13.
- [48] D. Blaudez and al. 2002. *Langmuir*, 18, 9158.
- [49] T. Buffeteau and al. 1999. *J. Phys. Chem. B*, 103, 5020.
- [50] J. E. Bertie and Z. Lan. 1996. *Appl. Spectrosc.*, 50, 1047.
- [51] A. V. Hughes and al. 2002. *Langmuir*, 18, 8161.
- [52] J. Sacconi and al. Article à paraître dans *Biophys. J.* (Décembre 2003).



## CHAPITRE III \_ DYNAMIQUE MOLÉCULAIRE

### I. Généralités sur les simulations numériques

La démarche des méthodes de simulation numérique pourrait être décrite par un propos formulé par Isaac Newton dès 1686 : "*Toute la tâche de la philosophie semble consister en ceci : à partir de l'observation des mouvements, comprendre les forces en jeu dans la nature, et ensuite à partir de ces forces, décrire les autres phénomènes*". En effet, le potentiel intermoléculaire étant connu, la dynamique d'un système classique est entièrement définie. Partant d'une configuration initiale, le modèle, il suffit de mettre en action les forces définies par les équations de Newton pour suivre pas à pas l'évolution du système. Toute méthode de simulation débute par la constitution d'un modèle qui représente une configuration possible d'un système de  $N$  particules. On se donne ensuite une loi d'évolution de cette configuration de départ qui va permettre d'échantillonner un grand nombre de configurations du système, le tout formant un ensemble statistique. Pour chaque configuration, l'énergie du système est déterminée à partir du calcul des interactions entre particules. Les propriétés du système sont alors définies comme des moyennes sur l'ensemble des configurations. Ainsi, les méthodes de simulation numérique permettent de déterminer les propriétés d'ensemble d'un système à partir du comportement des molécules individuelles. L'étape finale consiste à comparer ces propriétés à celles des systèmes réels. À l'heure actuelle, grâce notamment au développement de la puissance des ordinateurs de calcul, les simulations numériques sont devenues une troisième voie dans la méthodologie scientifique, complémentaire de la théorie et de l'expérience. Il est en effet nécessaire d'avoir recours simultanément à la théorie, pour définir les expressions des forces intermoléculaires intervenant dans les calculs et à l'expérience, pour construire les configurations initiales des systèmes modèles.

Par ailleurs, il est essentiel que le principe du calcul à partir des systèmes modèles définisse des conditions d'application (par exemple, sur le nombre de particules constituant le système et les paramètres définissant l'échantillonnage des configurations) tels que les calculs soient possibles et aient un sens physique. Le nombre de particules  $N$  est notamment important parce qu'il détermine la taille du système et la durée du calcul, approximativement

proportionnel à  $N^2$  pour un système classique. Par exemple, dans le cadre d'un calcul de dynamique moléculaire, pour une durée de calcul donnée, le choix d'un grand nombre de particules limite le nombre de configurations explorées et par conséquent la durée d'évolution du système. Inversement, le choix d'un petit nombre de particules permet l'observation du système sur une longue période d'évolution mais la taille du système risque d'être trop petite pour représenter de façon pertinente la réalité.

Finalement, dans la mesure où les résultats d'un calcul de simulation numérique corroborent les résultats théoriques et expérimentaux, la simulation numérique peut permettre une meilleure compréhension d'un système au niveau microscopique. En effet, la connaissance de la dynamique d'un système modèle peut aider à interpréter les phénomènes observés au niveau atomique ou moléculaire. De plus, la modélisation apporte une aide visuelle qui permet de conceptualiser des mécanismes, démarche qui n'est pas toujours facile à effectuer pour notre cerveau à partir de méthodes d'analyse qui ne rendent compte que de résultats à l'échelle macroscopique.

C'est dans cette perspective que nous avons entrepris, en collaboration avec Michel Laguerre de l'Institut Européen de Chimie et Biologie, un calcul de dynamique moléculaire d'une monocouche et d'une bicouche de DMPC afin de tenter de comprendre les résultats expérimentaux du chapitre II sur la différence de stabilité de la bicouche de DMPC et la tricouche de DOPS. Avant d'analyser les résultats obtenus par la simulation numérique, je ferai tout d'abord une description des méthodes de dynamique moléculaire puis je présenterai la construction des systèmes modélisant la monocouche et la bicouche de DMPC dont nous avons étudié les dynamiques.

## **II. La simulation par dynamique moléculaire**

Le schéma 2 donne un aperçu général de la méthodologie de la méthode de simulation par dynamique moléculaire.

Les méthodes de simulation explorent l'espace des configurations du système modèle à partir d'une configuration de départ dont l'évolution est suivie par échantillonnage. Dans les méthodes de dynamique moléculaire, les particules se déplacent spontanément dans un champ

de forces (fonction d'énergie potentielle) et on suit leur trajectoire pas à pas au cours du temps. Il est essentiel que les états explorés soient bien représentatifs du système c'est-à-dire que les états de plus basse énergie soient représentés avec leur probabilité de présence réelle. Cette condition est remplie en dynamique moléculaire si la configuration de départ est une configuration d'équilibre. C'est pourquoi avant de lancer le calcul de simulation, on réalise une minimisation du système que l'on a construit au préalable. Au cours de cette partie, je présenterai tout d'abord le principe d'une simulation par dynamique moléculaire et les différents paramètres nécessaires à sa mise en œuvre dans le logiciel de simulation NAMD que nous avons utilisé. Je décrirai ensuite les méthodes de construction de la monocouche et de la bicouche de DMPC.

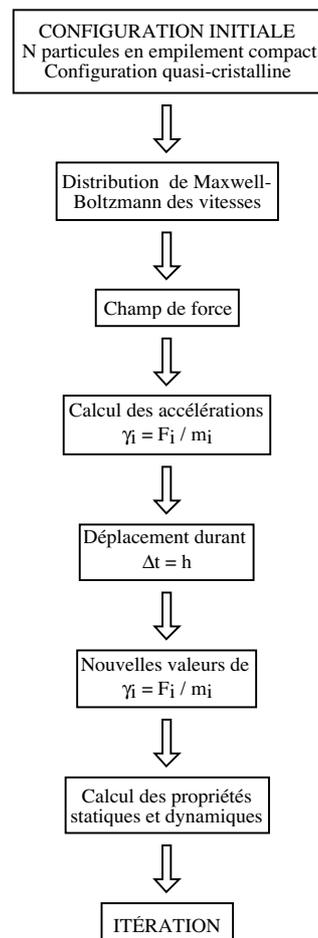


Schéma 1 : Méthodologie d'une simulation par dynamique moléculaire (d'après [1]).

## II.1. Équations du mouvement

Le calcul consiste à engendrer une trajectoire dans l'espace des phases<sup>1</sup> en fonction du temps par l'intégration numérique des équations de Newton du mouvement (équation 1) pour toutes les particules.

$$\mathbf{F}_i = m_i \boldsymbol{\gamma}_i = m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} \quad (1)$$

où  $\mathbf{F}_i$  représente les forces agissant sur les particules  $i$  de masse  $m_i$ ,  $r_i$  les coordonnées de d'espace et  $\boldsymbol{\gamma}_i$  leurs vecteurs-accélération.  $\mathbf{F}_i$  est défini à partir de la relation :

$$\mathbf{F}_i = \sum_{i \neq j} \nabla u(r_{ij}) \quad (2)$$

$\nabla$  étant l'opérateur gradient et  $u(r_{ij})$  le potentiel d'interaction de paires. Le calcul du gradient de  $u(r_{ij})$  impose que son expression soit une fonction différentielles des coordonnées  $r_i$ .

Les conditions initiales du système étant fixées, les calculs consistent à itérer deux opérations de base ;

- 1) le calcul de la force totale agissant sur chaque particule à un instant donné  $t$
- 2) l'avancement des coordonnées de toutes particules sous l'action des forces appliquées jusqu'à leurs valeurs prédites à l'instant ultérieur  $t + h$ ,  $h$  étant le pas du calcul.

Typiquement, le pas de calcul doit être plus rapide que la plus rapide des vibrations du système. Or, la présence d'atomes d'hydrogène dans les molécules (atome le plus léger) génèrent des vibrations de l'ordre de  $10^{-14}$  s. Le pas de calcul est donc choisi de l'ordre de la femtoseconde ( $10^{-15}$  s).

## II.2. Conditions initiales

Les conditions initiales définissent une configuration de départ pour les coordonnées et les vitesses des particules confinées dans une boîte.

---

<sup>1</sup> On appelle phases les différents états possibles du système repérés par  $6N$  coordonnées d'espaces et moments cinétiques.

Les coordonnées sont choisies de manière à correspondre à une structure de basse énergie potentielle. Généralement, le nombre de particules  $N$  et leur disposition dans la boîte sont choisis pour reproduire l'agencement réel des atomes.

Les vitesses des particules sont réparties selon une distribution de Maxwell-Boltzmann qui centre la distribution des vitesses autour d'une vitesse moyenne choisie en fonction de l'énergie cinétique que l'on veut attribuer au système. C'est une manière indirecte de fixer la température du système d'après le théorème d'équipartition à partir de l'énergie cinétique donné ci-dessous :

$$\langle E_c \rangle = \frac{3}{2} NkT \quad (3)$$

où  $k$  est le facteur de Boltzmann.

### II.3. Périodicité

Les molécules mises en mouvement se déplacent dans la boîte. Cependant, les molécules proches des bords sont susceptibles d'en sortir. Afin d'empêcher cette "évaporation", on réalise, par l'application de conditions périodiques, un artifice de calcul permettant d'éliminer les discontinuités aux frontières de la boîte en simulant un système infini. De cette manière, on tient compte des effets de solvants et d'environnement pour chaque particule appartenant à une maille du cristal.

Par exemple, si l'on considère  $N$  particules dans une boîte de simulation cubique de dimension  $L$ , on va répliquer le cube dans les trois directions de l'espace pour former un réseau tridimensionnel de cubes identiques. Ainsi, chaque particule de la boîte origine a une image translaturée de  $\pm L$  dans les trois directions de l'espace. De cette façon, lorsqu'une particule se déplace dans la boîte centrale au cours de la simulation, ses images dans les cubes adjacents se déplacent exactement de la même manière, de sorte que si une molécule quitte la boîte, une particule image entre simultanément par la face opposée. Ceci est illustré sur le schéma 1 pour un réseau bidimensionnel.

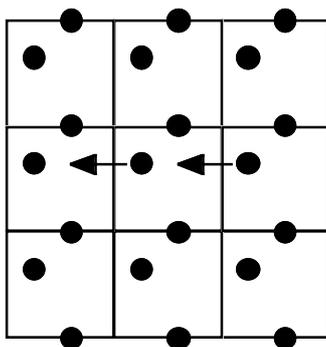


Schéma 2 : Réseau périodique à deux dimensions (d'après [1]).

Les conditions périodiques étant les mêmes pour les boîtes image que pour la boîte centrale, on génère de proche en proche un réseau infini de boîtes.

#### II.4. Distance de troncature

Chaque particule de la boîte centrale interagit en principe avec toutes les autres particules du réseau périodique. Or, le nombre d'interactions de paires augmente avec la taille du système. C'est pourquoi, afin de limiter les calculs, on introduit une distance dite de troncature (ou cut-off en anglais) telle que les interactions de paire d'atomes séparés par une distance supérieure à la distance de troncature soient négligées. Dans notre cas, elle est déterminée selon la convention de troncature sphérique qui consiste à centrer une sphère d'interaction de rayon  $r_t$  (rayon de troncature) autour de chacune des particules et à ne prendre en considération que les particules ou images situées à l'intérieur de la sphère.

On définit deux sortes de distances de troncature : la distance de troncature d'atomes ou de groupes. Dans le premier cas, seules les interactions d'un atome avec les autres atomes contenus dans la sphère de troncature sont prises en compte. Pour la distance de troncature de groupe, on décrit les molécules en groupes d'atomes de charge nette nulle généralement définis à partir des groupements fonctionnels chimiques comme les groupes carbonyle, carboxylique, méthyle. Si un atome du groupe appartient à la sphère de troncature alors tout le groupe appartient à la sphère et inversement. Dans ce cas, contrairement au choix d'une distance de troncature d'atomes, les dipôles ne sont pas coupés et aucune interaction supplémentaire monopole-monopole artificielle n'est introduite.

Expérimentalement, la distance de troncature est déterminée en considérant l'expression des potentiels d'interactions de paires qui comprennent les interactions de Van Der Waals décrites par le potentiel de Lennard-Jones  $V_{L-J} = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$  et les interactions électrostatiques dont le potentiel est donné par l'expression  $V_{el} = \sum_{i \neq j} \frac{z_i z_j e^2}{\epsilon r_{ij}}$ . Généralement, on considère que les interactions de Van Der Waals de faible portée (décroissance en  $1/r^6$ ) sont négligeables au-delà d'une distance de quelques dizaines d'angströms. Pour les interactions électrostatiques, la portée est fonction du type de distance de troncature considérée. Pour la distance de troncature d'atomes, le terme prédominant dans le potentiel d'interaction électrostatique est les interactions entre ions, leur décroissance est donc en  $1/r$ . Pour la distance de troncature de groupes, ce sont les interactions dipolaires qui dominent, la décroissance est donc en  $1/r^3$ . Ainsi, la distance de troncature d'atomes est choisie généralement supérieure à la distance de troncature de groupes. Par ailleurs, la distance de troncature de groupes doit être supérieure à la taille des groupes sinon les interactions entre atomes d'un même groupe sont occultées. La taille des groupes variant typiquement de 1 à 3 Å, cette condition est respectée pour des distances de troncature supérieures à 10 Å.

La mise en œuvre d'une simulation par dynamique moléculaire étant désormais connue, je vais maintenant décrire le champ de forces que nous avons utilisé pour effectuer la simulation de la monocouche et de la bicouche de DMPC.

## II.5. Champ de force

La pertinence des résultats d'un calcul de minimisation et de simulation va dépendre en particulier du champ de force utilisé. Celui que nous avons utilisé est le champ de force CHARMM. Au départ, ce champ de force a été paramétrisé pour reproduire les propriétés des peptides et des protéines. Son application a ensuite été étendue à d'autres molécules comportant des groupes fonctionnels identiques. Dans le cas des phospholipides, des études antérieures ont montré qu'une expression simplifiée du champ de force CHARMM où ne subsistent que les termes diagonaux et les termes relatifs aux interactions non liées

(interactions de Van Der Waals et interactions électrostatiques) donnaient des résultats en accord avec les systèmes réels. C'est cette expression (équation 4) que nous avons utilisée pour effectuer les calculs de minimisation et de dynamique pour la monocouche et la bicouche de DMPC.

$$\begin{aligned}
 E_{CVFF} = & \sum_{\text{paires liées}} K_l (l - l_0)^2 + \sum_{\text{angles de liaisons}} H_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{angles dièdres}} K_\phi [1 - \cos(n\phi - \phi_0)] \\
 & + \sum_{\text{angles de torsion hors du plan}} K_\chi (\chi - \chi_0)^2 + \sum_{\text{paires non liées}} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{4}$$

On reconnaît dans l'expression (4) les origines de 8 huit contributions ; quatre termes (termes diagonaux) entre atomes liés par covalence correspondant aux élongations de liaison, angles de liaison, angles de torsion et angles de torsion hors du plan et deux termes entre atomes non liés par covalence correspondant aux interactions répulsives ( $1/r^{12}$ ), de dispersion ( $1/r^6$ ) et électrostatiques. Les termes du champ de force sont illustrés sur le schéma 3.

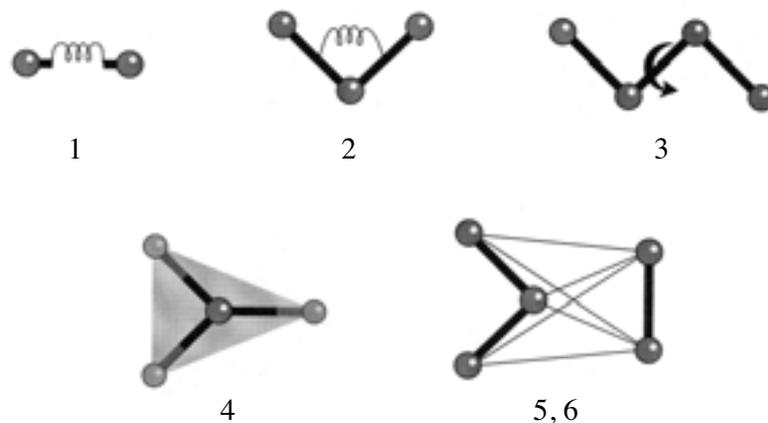


Schéma 3 : Illustration du champ de force. Les termes 1 à 4 représentent les interactions liées correspondant aux élongations de liaison (1), aux angles de liaison (2), aux angles de torsion (3) et aux angles de torsion impropre (4). Les termes (5) et (6) représentent les interactions non liées regroupant les interactions de Van Der Waals et les interactions électrostatiques (d'après [2]).

Dans les deux premiers termes, on considère que, les positions moyennes des atomes étant fixées et les mouvements restant de faible amplitude, les longueurs et les angles de liaisons restent proches de leur valeurs d'équilibre. Les liaisons sont ici modélisées par un potentiel harmonique où  $K_l$  est la constante de force d'élongation de la liaison,  $l$  la longueur

de la liaison et  $l_0$  la longueur de la liaison à l'équilibre. Le terme de contrainte qui maintient les angles de liaison proches de leur valeur d'équilibre est également un terme harmonique, où  $K_\theta$  est la constante de force de l'angle de liaison,  $\theta$  l'angle et  $\theta_0$  la valeur de l'angle à l'équilibre.

La rotation restreinte des groupes autour des liaisons est représentée dans le troisième terme à l'aide d'un potentiel de torsion comprenant un terme en cosinus où  $K_\phi$  est la constante de force,  $\phi$  l'angle dièdre,  $n$  sa multiplicité (c'est-à-dire le nombre de positions angulaires d'équilibre) et  $\phi_0$  l'angle dièdre de référence.

Le quatrième terme correspond à un potentiel d'interactions hors du plan (out-of plane potential en anglais) qui s'applique généralement à un groupe d'atomes coplanaires contenant un carbone hybridé  $sp^2$  lié à trois autres atomes. C'est le cas par exemple du carbone d'un groupement amide. Ce potentiel représente la distorsion du carbone central dans le plan formé par les trois autres atomes (voir schéma 3) et est calculé à partir d'un potentiel harmonique dit de Wilson. Le paramètre  $K_\chi$  représente la constance de force,  $\chi$  l'angle de torsion hors du plan et  $\chi_0$  l'angle de torsion hors du plan de référence (toujours égal à  $180^\circ$ ).

Le cinquième terme regroupe les interactions répulsives et les interactions de dispersion sous la forme d'un potentiel de Lennard-Jones. Les paramètres  $\epsilon$  et  $\sigma$  déterminent complètement la forme de ce potentiel en spécifiant respectivement la profondeur du minimum et le diamètre de collision.

Le dernier terme inclut les interactions électrostatiques dues aux charges partielles et aux moments dipolaires et multipolaires, auxquelles on incorpore les contributions dues aux liaisons hydrogène pour éviter de leur consacrer un terme spécifique dans le potentiel total.

Les deux derniers termes prennent en compte toutes les interactions entre paires d'atomes pour des molécules distinctes, tandis qu'entre atomes de la même molécule, seules les interactions entre atomes distants de plus de trois liaisons interatomiques sont comptées, les interactions entre atomes directement liés étant incluses dans les quatre premiers termes du champ de force.

### III. Construction des systèmes

La première étape d'une simulation numérique consiste à construire le système que l'on veut minimiser et dont on veut étudier la dynamique. Pour cela, on utilise le logiciel CHARMM qui gère la programmation de la construction du modèle et le logiciel INSIGHT II qui permet de le visualiser. Pour la monocouche et la bicouche de DMPC, nous avons utilisé le modèle DMPC et le modèle TIP3P déjà existants. Le modèle DMPC a été construit à partir des fichiers de topologie et de paramètres de CHARMM (version 27b) [3]. Le modèle TIP3P utilisé pour l'eau solvant est un modèle rigide à trois points et trois liaisons [4, 5] dont la minimisation et la dynamique ont été réalisées dans une boîte comprenant 216 molécules d'eau avec une méthode de simulation de type Monte Carlo<sup>2</sup> [5]. Ce modèle a l'avantage de reproduire de façon satisfaisante la solvatation de nombreux systèmes, de taille différente, chargés ou non. Au cours de la dynamique, on considère un modèle rigide de l'eau en fixant la longueur des liaisons O-H.

Le modèle (monocouche ou bicouche) construit dans CHARMM est ensuite placé dans une boîte de simulation et repris dans le logiciel NAMD [6] pour effectuer la minimisation et la dynamique. Dans un premier temps, il est minimisé avec le minimiseur par défaut ( $\frac{\partial}{\partial x}$ ) pendant 5000 pas. Il est ensuite soumis à une dynamique à nombre de particules et pression de surface constants. Les simulations, effectuées à tension de surface constante avec déformation libre de la surface et pression de surface fixée sur la hauteur de la boîte de simulation, sont réalisées avec la méthode de Nosé-Hoover (piston de Langevin appliqué à une boîte flexible). Les paramètres utilisés sont les suivants :

- Pression selon l'axe vertical : 1 bar
- Période d'oscillation du piston : 200 fs
- Amortissement du piston : 100 fs.

---

<sup>2</sup> La méthode de Monte Carlo recherche les états de plus basse énergie parmi tous les états possibles en partant du principe que les états explorés sont statistiquement les plus probables. L'échantillonnage repose sur une loi de probabilité basée sur l'énergie potentielle des différents états du système calculée à partir d'un potentiel intermoléculaire additif de paires.

Les dynamiques pour la monocouche et la bicouche ont été calculées respectivement sur 2,991 ns et 3,183 ns.

Les dimensions en Angströms de la boîte de simulation pour la monocouche et la bicouche étaient de  $37,4562 \times 43,2506 \times 130$  et de  $37,4562 \times 43,2506 \times 190$ , contenant respectivement 13 986 et 23424 atomes.

La pression de surface a été choisie égale à  $48 \text{ mNm}^{-1}$  conformément aux résultats trouvés expérimentalement pour la bicouche. Nous avons affecté la même valeur à la monocouche afin de pouvoir effectuer une comparaison entre les deux systèmes.

La distance de troncature d'atomes a été fixée à  $14 \text{ \AA}$ . Nous avons utilisé un double pas de temps d'intégration : 1 fs pour les interactions à courte distance (interactions de Van Der Waals) et 4 fs pour les interactions à longue distance (interactions électrostatiques), avec la liste des interactions intermoléculaires réactualisée tous les 20 pas.

La température a été fixée à 300 K et réajustée tous les 50 pas.

Au cours de la dynamique, une image est stockée tous les 1000 pas (toutes les une picoseconde) et un fichier "restart" (fichier de sauvegarde des données de la dynamique) est réécrit tous les 10000 pas.

### III.1. Construction de la monocouche de DMPC

Le principe consiste, dans un premier temps, à paver le plan (xy) selon un réseau hexagonal centré de 6 molécules de DMPC suivant x et de 6 molécules de DMPC suivant y (voir schéma 4). Les phosphores de la tête polaire choline sont placés aux nœuds du réseau.

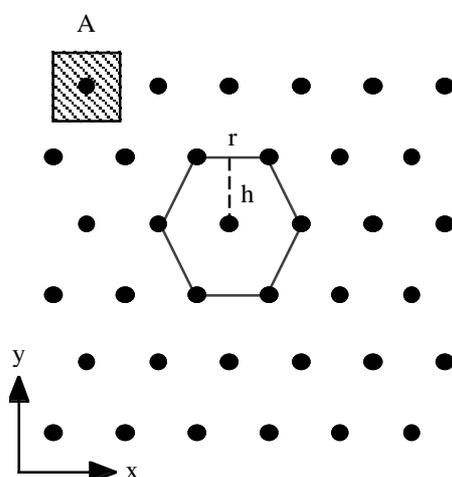
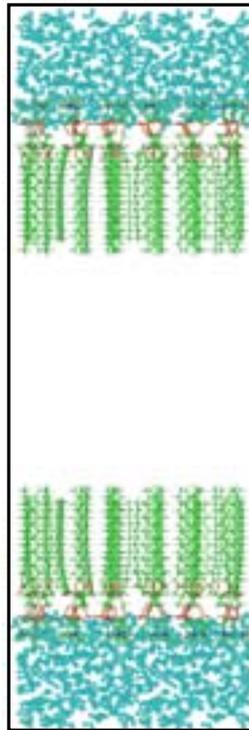


Schéma 4 : Pavage du plan selon un réseau hexagonal centré de molécules de DMPC.

Si on appelle  $r$  le côté de l'hexagone, les molécules sont espacées de  $r$  selon l'axe  $x$  et de  $h = r \frac{\sqrt{3}}{2}$  selon l'axe  $y$ . Le côté  $r$  de l'hexagone est fixé à partir de l'aire moléculaire  $A$  d'une molécule de DMPC considérée carrée et prise égale à  $45 \text{ \AA}$  dans la phase gel. Les chaînes carbonées des lipides sont orientées selon l'axe  $z$ . Afin d'augmenter la précision des résultats de la dynamique, on duplique la monocouche ainsi construite de telle façon à avoir deux monocouches identiques dans la boîte de simulation. Elles sont positionnées comme sur le schéma 5 avec les chaînes carbonées en regard séparées par une couche d'air de hauteur suffisamment grande pour qu'il n'y ait aucune interaction entre les monocouches pour ne pas perturber la dynamique de chacune.



*Schéma 5 : Schéma de la boîte de simulation pour la monocouche modèle.*

Par ailleurs, afin de simuler une monocouche à l'interface air-eau, les têtes polaires du DMPC sont hydratées par une couche de  $20 \text{ \AA}$  d'eau, qui correspond à une hydratation de 25 molécules d'eau par lipide. La méthode pour hydrater uniquement les têtes polaires a consisté à remplir totalement la boîte d'eau et à éliminer ensuite les molécules d'eau entre les phosphores des deux monocouches. Les dimensions de la base de la boîte sont fixées par l'arrangement des molécules de DMPC dans le plan  $(xy)$  et par l'épaisseur des couches d'eau et la distance entre les têtes polaires.

### III.2. Construction de la bicouche de DMPC

Le principe de construction de la bicouche de DMPC est inspiré de celui de la monocouche, à la différence près que les deux bicouches sont séparées par une couche d'eau afin de simuler la sous-phase aqueuse de l'expérience (schéma 6). La hauteur d'eau entre les deux bicouches correspond à un degré d'hydratation de 25 molécules d'eau par tête polaire et est telle que les deux bicouches soient indépendantes. On a supposé également que les têtes polaires pointant dans l'air étaient hydratées par une couche d'eau correspondant à un degré d'hydratation de 4 molécules d'eau par tête polaire afin de minimiser les répulsions hydrophiles / hydrophobes comme nous l'avons supposé pour la bicouche de DMPC obtenue expérimentalement par la méthode de compression au-delà du collapse.

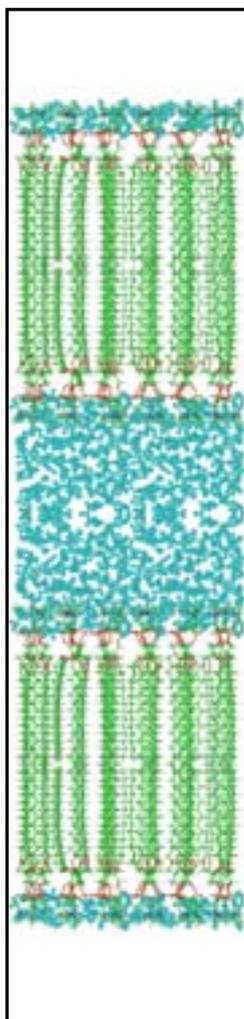


Schéma 6 : : Schéma de la boîte de simulation pour la bicouche modèle.

#### IV. Analyse des paramètres structuraux des systèmes simulés

Pour la monocouche et la bicouche de DMPC, la dynamique a été effectuée à nombre de particules et pression de surface constants. À partir des calculs de dynamique moléculaire, nous avons extrait les paramètres qui nous ont semblé pertinents pour une étude comparée avec les expériences réalisées en microscopie à l'angle de Brewster et en spectroscopie PM-IRRAS (chapitre II). Nous sommes intéressés plus particulièrement à la structure et à la compacité des couches (disposition des atomes dans les couches et aires moléculaires), à l'organisation des chaînes carbonées (inclinaison et conformations gauche) et à l'orientation des têtes polaires (orientation du carbonyle du groupement ester par rapport à l'interface).

##### IV.1. Aire moléculaire

Afin de pouvoir établir une comparaison entre les deux systèmes, les aires moléculaires initiales de la monocouche et de la bicouche modèles de DMPC ont été choisies identiques et égales à  $45 \text{ \AA}^2$ . Cette valeur est supérieure à l'aire moléculaire de collapse de  $40 \text{ \AA}^2$  observée expérimentalement (voir chapitre II, figure 6). En effet, par la méthode au-delà du collapse, nous n'avons pas observé la formation d'une bicouche recouvrant totalement la surface. Ce résultat suggère que la pression subie par la deuxième couche n'est pas aussi forte que celle subie par la monocouche inférieure. C'est pourquoi nous avons choisi une aire moléculaire intermédiaire correspondant à un système globalement moins compact que la monocouche de DMPC.

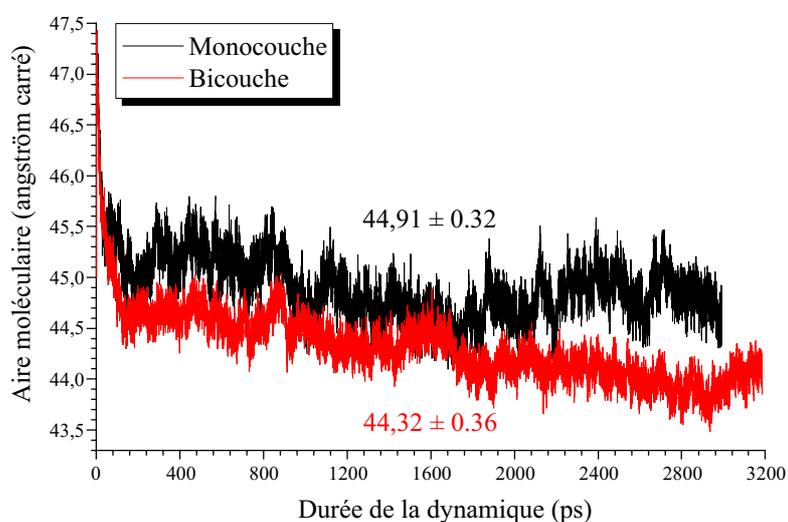


Figure 1 : Évolution des aires moléculaires de la monocouche (en noir) et de la bicouche (en rouge) au cours de la dynamique.

Sur la figure 1, on peut voir qu'au cours de la dynamique, les aires moléculaires moyennes pour la monocouche et la bicouche sont sensiblement les mêmes. Ce résultat est en accord avec les observations expérimentales. La valeur légèrement inférieure pour la bicouche peut être attribuée aux interactions hydrophobes entre les chaînes carbonées des deux couches qui tendent à rigidifier le cœur hydrophobe et donc à compacter les têtes polaires. Cette différence est cependant trop faible pour être perceptible expérimentalement.

## IV.2. Répartition des atomes dans les couches

Pour la monocouche et la bicouche, la répartition des atomes a été effectuée sur les 9 dernières images de la dernière dynamique, la plus représentative du système après environ 3 ns de simulation.

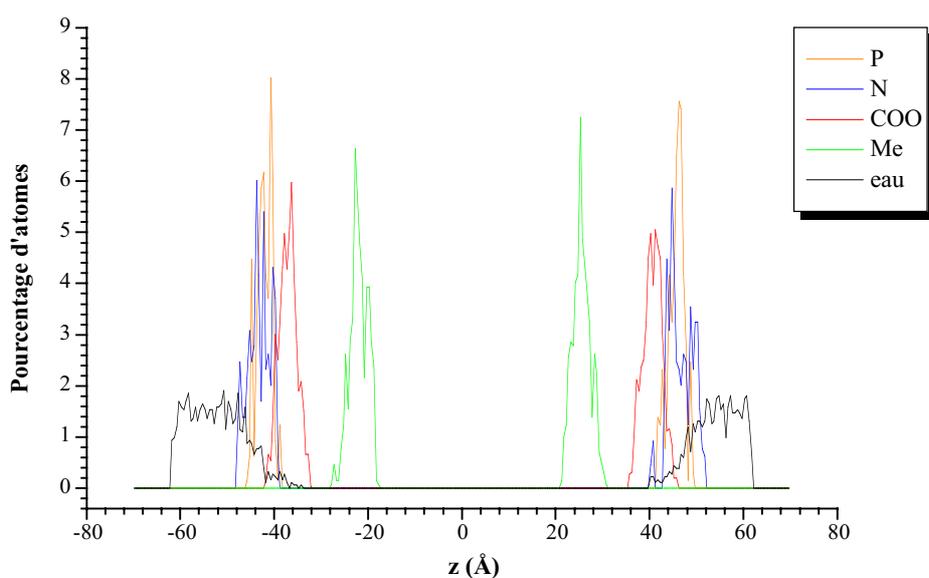


Figure 2 : Répartition des atomes dans la monocouche de DMPC.

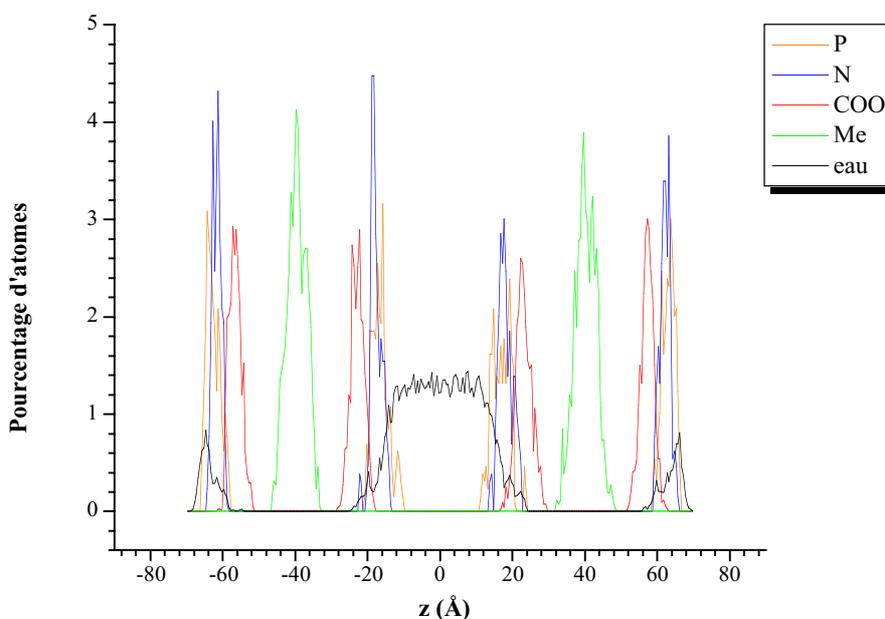


Figure 3 : Répartition des atomes dans la bicouche de DMPC.

Sur les figures 2 et 3, nous pouvons remarquer que la répartition des atomes est sensiblement identique entre les deux monocouches et les deux bicouches des boîtes de simulation. Ceci suggère que chacune d'entre elles s'est comportée de la même façon au cours de la dynamique. Nous pouvons également observer que les atomes de phosphores et les atomes d'azote se répartissent sur une même tranche d'espace. Ce phénomène peut être attribué aux interactions électrostatiques favorables qui se développent entre la densité de charge négative des oxygènes portés par le groupement phosphate et la charge positive portée par l'atome d'azote. Par ailleurs, nous pouvons voir qu'au maximum de la densité des oxygènes du groupement ester, la densité de l'eau est proche de zéro. Ceci signifie que l'hydratation du groupement ester est faible pour la monocouche et pour la bicouche. Ce résultat est en accord avec les résultats observés sur les spectres PM-IRRAS (figure 12). La bande de vibration du carbonyle du groupement ester située vers  $1734 \text{ cm}^{-1}$  est en effet proche de la fréquence de vibration du carbonyle du DMPC à l'état cristallin ( $1738 \text{ cm}^{-1}$ ). Des expériences antérieures ont montré que la fréquence de vibration du carbonyle était directement reliée à l'organisation du DMPC à la surface de l'eau. Ainsi, pour une pression de surface variant de  $0,1$  à  $34 \text{ mNm}^{-1}$ , la fréquence augmente de  $1728$  à  $1737 \text{ cm}^{-1}$  (figure 4). Ce phénomène traduit la déshydratation du carbonyle au cours de la compression. En effet, à faible pression de surface, les molécules de DMPC sont totalement désordonnées à la surface

permettant aux carbonyles d'interagir avec les molécules d'eau de la sous-phase en établissant des liaisons hydrogène. Le taux d'hydratation des carbonyles est dans ce cas élevé d'où une bande large et une fréquence de vibration peu élevée. Au cours de la compression, les molécules de DMPC se redressent et s'ordonnent à la surface de l'eau se traduisant par l'apparition de la bande d'élongation des liaisons C-H des groupements  $\text{CH}_2$  vers  $1470 \text{ cm}^{-1}$ . Le redressement des chaînes carbonées provoque l'expulsion des carbonyles hors de la sous-phase et leur déshydratation. Cet effet se traduit par une diminution de la largeur de la bande et par le déplacement de sa position vers une fréquence proche de celle du DMPC à l'état cristallin. Sa structure déterminée par rayons X a montré que les molécules d'eau étaient confinées au niveau des groupements phosphates de la tête choline du DMPC et que les carbonyles étaient déshydratés. Dans notre cas, l'écart en fréquence observé expérimentalement est en accord avec la faible hydratation établie d'après les résultats de dynamique moléculaire.

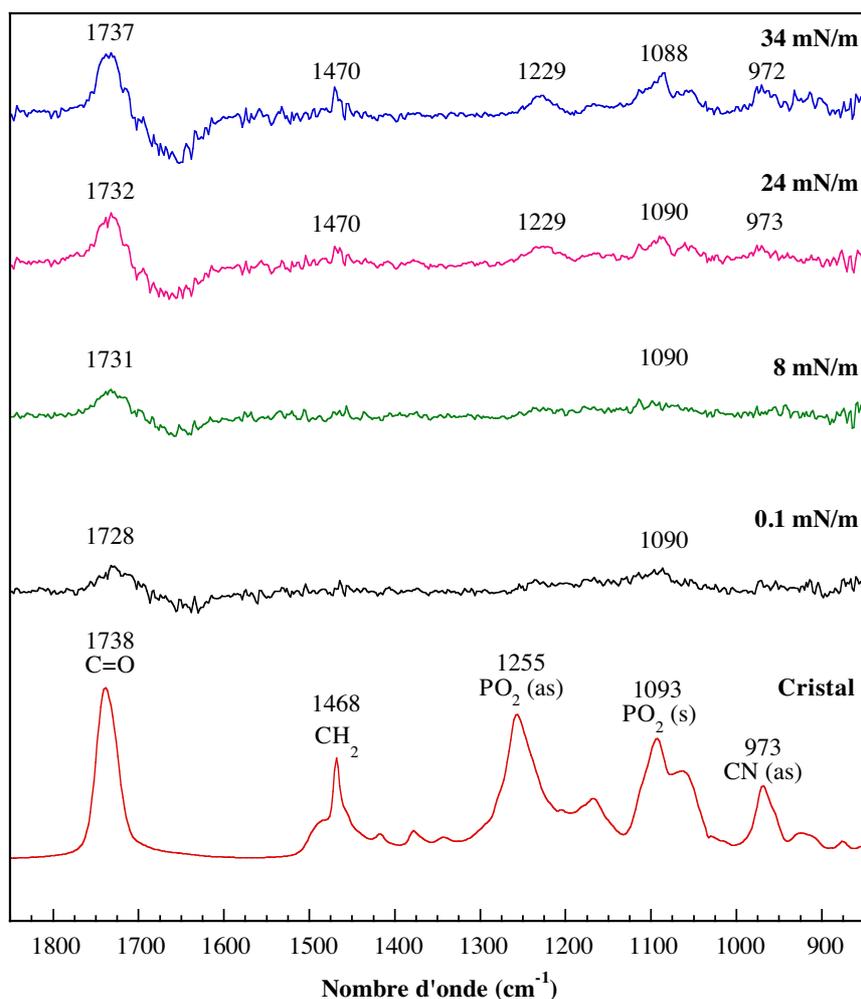
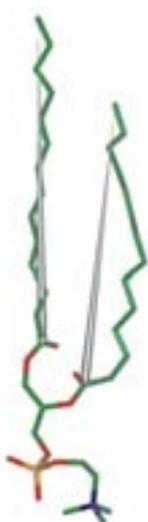


Figure 4 : Évolution de la position en fréquence de la bande de vibration du carbonyle au cours de la compression d'une monocouche de DMPC.

### IV.3. Inclinaison des chaînes carbonées

Sur la figure 5, figure la répartition des angles d'inclinaison pour les chaînes carbonées 1 et 2 pour chacune des deux monocouches de la boîte de simulation. Les chaînes carbonées 1 et 2 correspondent aux chaînes portées respectivement par l'alcool secondaire et l'alcool primaire du squelette glycérol (schéma 7). Après avoir examiné la dernière image de la dynamique pour la monocouche et la bicouche, nous avons constaté que les chaînes carbonées étaient restées relativement rectilignes. Nous avons donc déterminé l'angle d'inclinaison à partir du vecteur formé par le carbone du groupement ester et le carbone du groupement méthyle terminal (schéma 7).



*Schéma 7 : Molécule de DMPC. La chaîne carbonée à droite est portée par l'alcool secondaire (chaîne 1) et la chaîne carbonée à gauche est portée par l'alcool primaire (chaîne 2). L'angle d'inclinaison des chaînes est déterminée à partir des vecteurs représentés en gris.*

Les angles d'inclinaison évalués (figure 5) montrent que la chaîne carbonée 1 est en moyenne moins inclinée que la chaîne carbonée 2. Ce résultat peut s'expliquer par la direction des chaînes au niveau de la tête polaire. En effet, la chaîne 1 s'oriente d'abord selon une direction horizontale et se redresse ensuite, alors que la chaîne 2 s'oriente verticalement. Le redressement de la chaîne 1 est imposé par les degrés de liberté du carbonyle. Ceci laisse supposer que la chaîne 1 a moins de liberté de mouvement que la chaîne 2 par rapport à l'interface, d'où des angles d'inclinaison plus faibles.

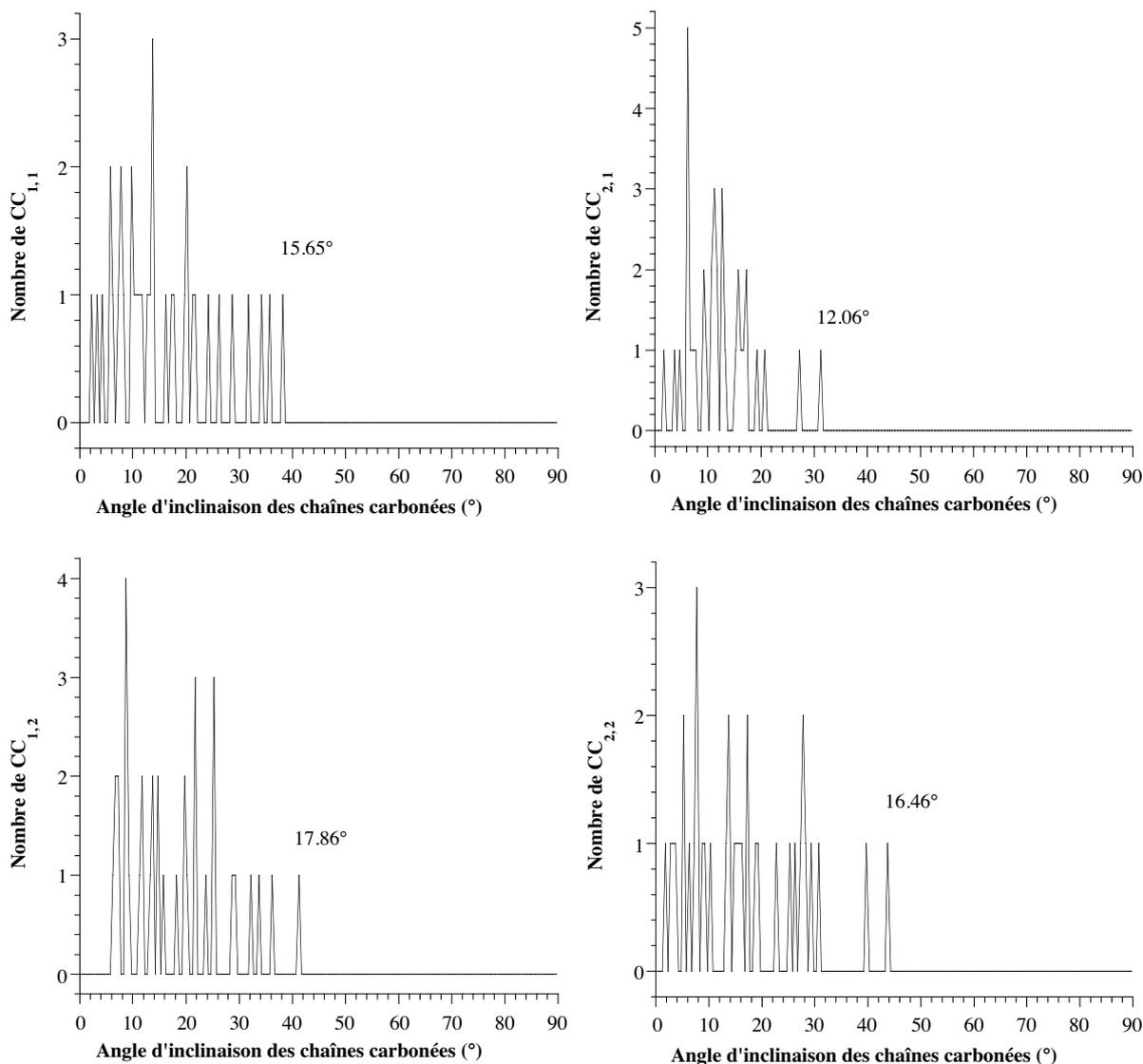


Figure 5 : Orientation par rapport à la normale à la surface des chaînes carbonées de la monocouche de DMPC. Le symbole  $CC_{i,j}$  signifie chaîne carbonée  $j$  de la monocouche  $i$ .

Pour chaque bicouche, nous avons différencié les chaînes carbonées des couches exposées à l'air nommées 1 et 4 des chaînes carbonées des couches en contact avec la sous-phase nommées 2 et 3. Nous avons ensuite établi la moyenne sur les deux bicouches. L'analyse de l'orientation des chaînes carbonées (figures 6 et 7) montre que l'inclinaison des chaînes carbonées de la couche exposée à l'air est plus faible ( $\sim 14^\circ$ ) que celle des chaînes carbonées de la couche en contact avec la sous-phase aqueuse ( $\sim 16^\circ$ ). Ce phénomène est lié au faible taux d'hydratation des têtes polaires pointant dans l'air qui rigidifie la couche supérieure de la bicouche. En effet, l'eau de la sous-phase, en écrantant les charges électrostatiques de la tête choline, favorise le caractère fluide des chaînes carbonées. Par

ailleurs, l'inclinaison des chaînes carbonées dans la bicouche est légèrement plus faible ( $\sim 15^\circ$ ) que l'inclinaison des chaînes carbonées dans la monocouche ( $\sim 16^\circ$ ). Ceci est également en faveur de chaînes carbonées plus rigides dans la bicouche que dans la monocouche. En effet, on peut supposer que dans la monocouche, les chaînes carbonées pointant dans l'air ne sont pas contraintes contrairement à celles de la couche inférieure de la bicouche qui interagissent avec les chaînes carbonées de la couche supérieure.

Cependant, ces écarts sont trop faibles pour espérer les détecter en spectroscopie infrarouge. En revanche, les résultats du calcul de dynamique moléculaire permettent de préciser les résultats obtenus en spectroscopie PM-IRRAS. Le rapport inférieur à 2 entre les intensités de la bande de vibration symétrique des liaisons C-H des groupements  $\text{CH}_2$  dans la bicouche et la monocouche peut être attribué au fait que la surface est un système mixte où coïncident des domaines de monocouche et de bicouche mais n'est pas dû à une différence significative dans l'orientation des chaînes carbonées.

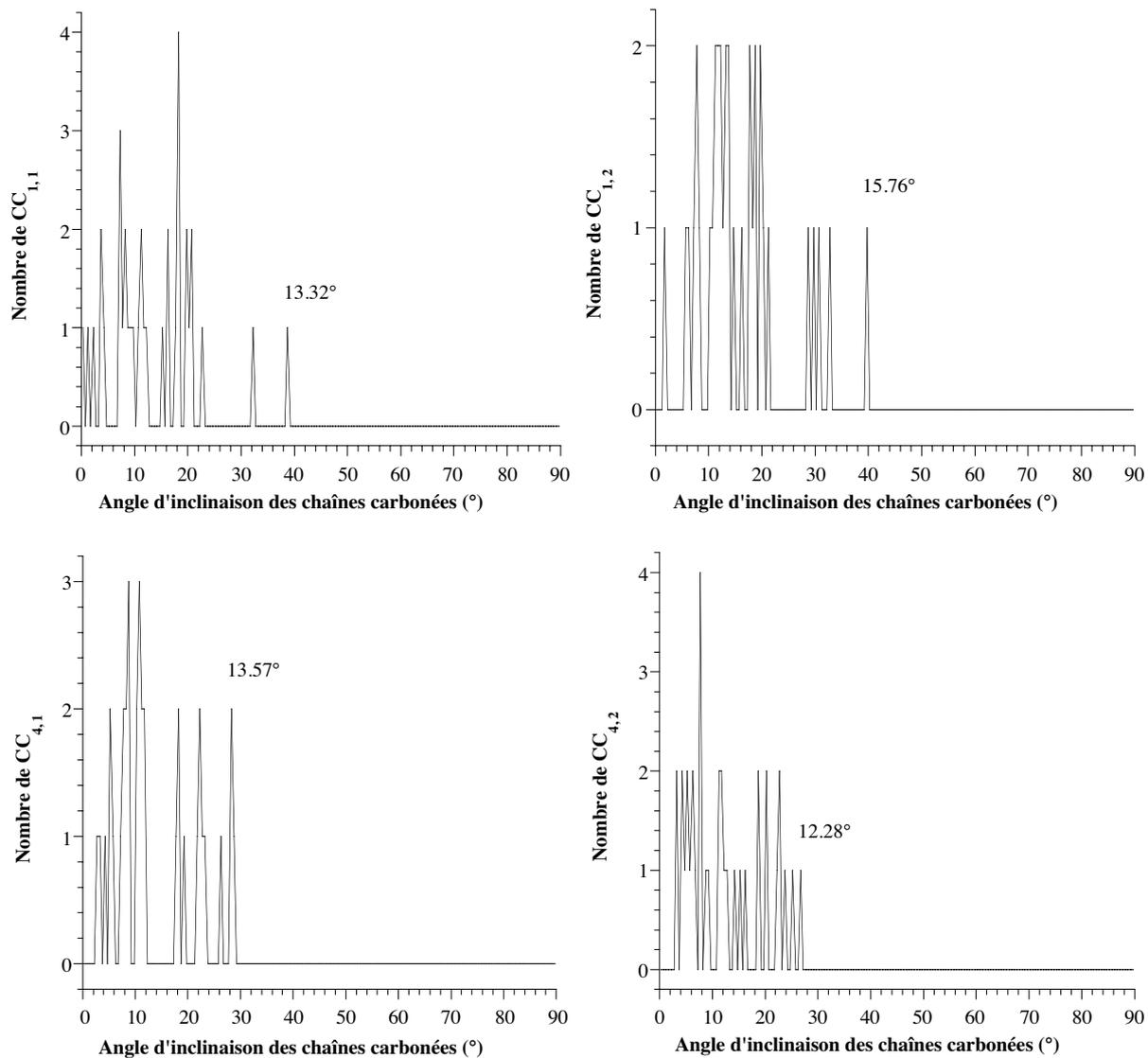


Figure 6 : Orientation par rapport à la normale à la surface des chaînes carbonées des couches 1 et 4 exposées à l'air de la bicouche de DMPC.

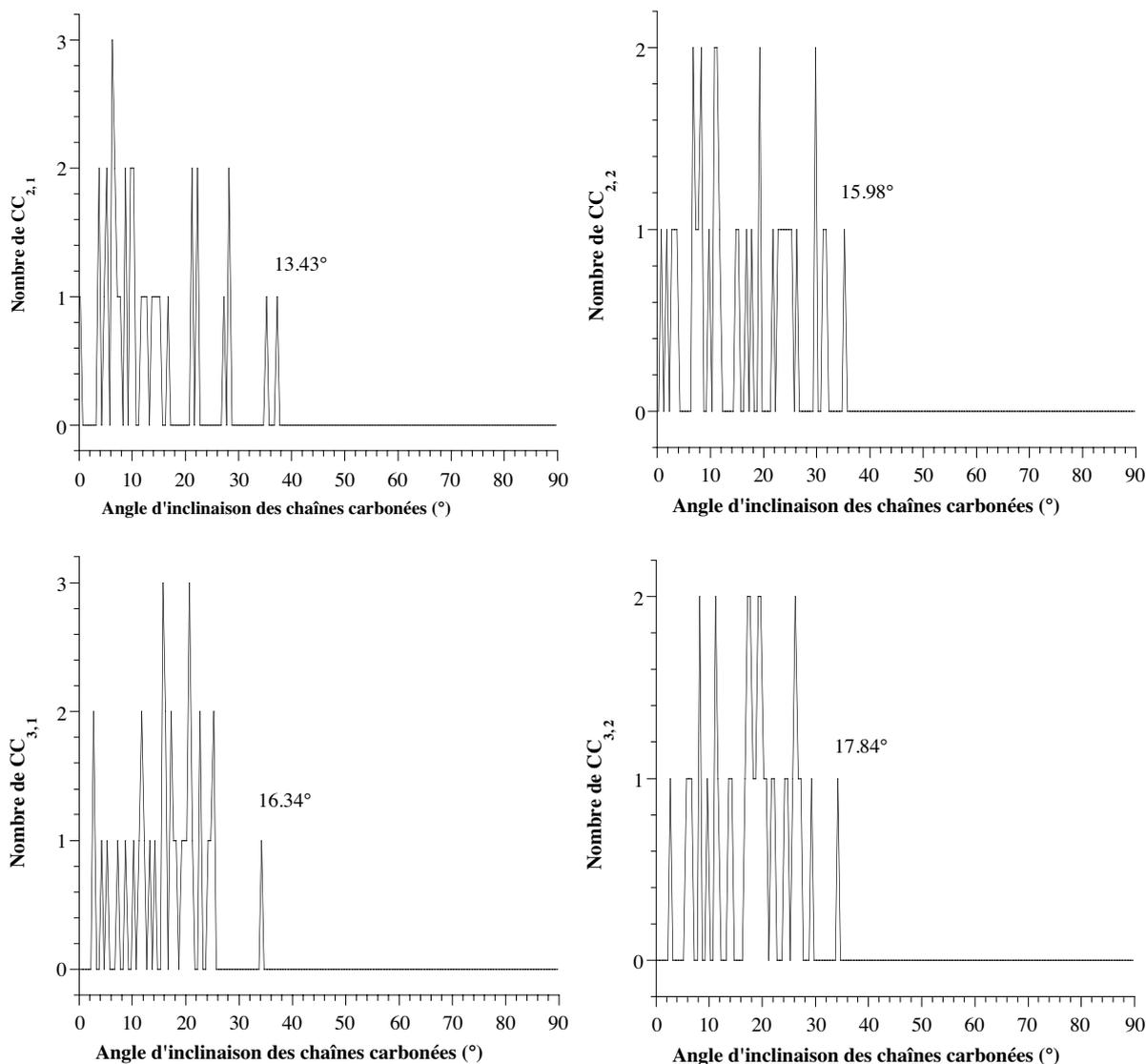


Figure 7 : Orientation par rapport à la normale à la surface des chaînes carbonées des couches 2 et 3 en contact avec la sous-phase aqueuse de la bicouche de DMPC.

#### IV.4. Conformations gauche

Les conformations gauche ont été déterminées à partir du calcul des angles dièdres des chaînes carbonées. Le premier angle dièdre est défini à partir du carbone du groupement ester (voir schéma 8).

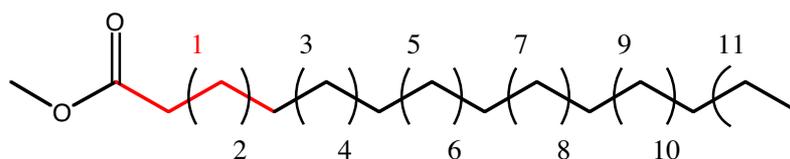


Schéma 8 : Définition des angles dièdres dans la molécule de DMPC.

Sur les graphiques représentant le pourcentage de conformations gauche en fonction du numéro de l'angle dièdre pour la monocouche (figure 8) et pour la bicouche (figure 9), nous

pouvons voir que l'angle dièdre numéro 1 se démarque des autres par la valeur plus élevée du pourcentage de conformations gauche. Ceci peut être directement lié à sa structure qui comprend le carbone du groupement ester. Nous l'avons donc exclu dans le calcul du nombre de conformations gauche par molécule de DMPC afin de pouvoir estimer le nombre de conformations gauche par chaîne carbonée correspondant à des angles dièdres d'atomes de carbone équivalents. Dans ces conditions, nous trouvons qu'il existe en moyenne une conformation gauche par molécule de DMPC dans la monocouche et la bicouche modèle. Ce résultat signifie que la monocouche et la bicouche sont des systèmes rigides et bien organisés. Expérimentalement, il devrait correspondre à des fréquences identiques pour la vibration antisymétrique des liaisons C-H des groupements CH<sub>2</sub>. Or, avec la méthode par compression au-delà du collapse, nous avons observé un léger décalage vers les basses fréquences pour la bicouche de DMPC (figure 10, chapitre II), attribué à un état plus fluide. Cependant, il faut noter que les calculs de dynamique moléculaire ont été effectués avec la même pression de surface pour la monocouche et la bicouche tandis qu'expérimentalement, les spectres PM-IRRAS ont été obtenus à 30mNm<sup>-1</sup> pour la monocouche et 50 mNm<sup>-1</sup> pour la bicouche. Il est donc raisonnable de penser, comme le montrent les résultats de dynamique moléculaire, que la monocouche sera plus rigide à pression de surface plus élevée.

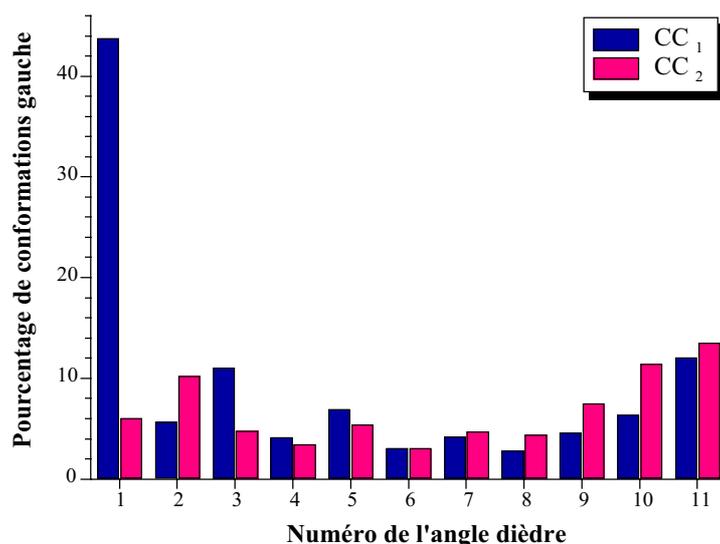


Figure 8 : Répartition et pourcentage des conformations gauche dans les chaînes carbonées myristoyl pour la monocouche de DMPC.

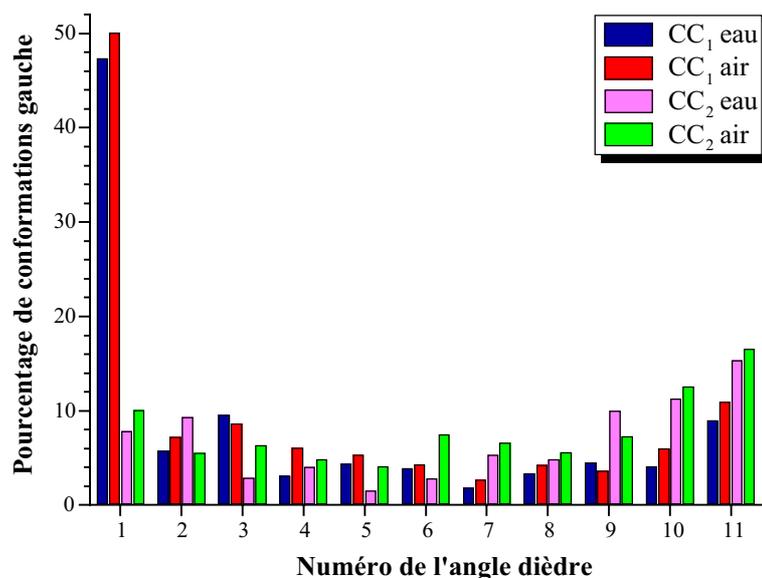


Figure 9 : Comparaison du nombre de conformations gauche dans les chaînes carbonées entre les deux couches de la bicouche de DMPC.

#### IV.5. Orientation du carbonyle du groupement ester

Sur les figures 10, 11 et 12, sont présentées les orientations du vecteur CO du carbonyle de l'ester par rapport à l'interface respectivement pour la monocouche et pour les couches 1 et 4 exposées à l'air et 2 et 3 en contact avec la sous-phase aqueuse de la bicouche. Dans le cas de la bicouche, il existe une différence d'orientation du carbonyle entre la couche exposée à l'air ( $\sim 21^\circ$ ) et la couche en contact avec la sous-phase aqueuse ( $\sim 18^\circ$ ). Cependant, cet écart relativement faible ne conduira pas à des modifications significatives sur les spectres PM-IRRAS. La moyenne globale pour la bicouche ( $\sim 19^\circ$ ) et la moyenne pour la monocouche sont sensiblement identiques. On peut donc considérer que l'orientation des têtes polaires entre les deux systèmes ne change pas. Ce résultat de dynamique moléculaire est proche des résultats expérimentaux. En effet, sur les spectres PM-IRRAS (figure 13), l'intensité de la bande de vibration du carbonyle pour la bicouche ( $2,8 \cdot 10^{-3}$ ) est environ deux fois plus grande que pour la monocouche ( $1,3 \cdot 10^{-3}$ ).

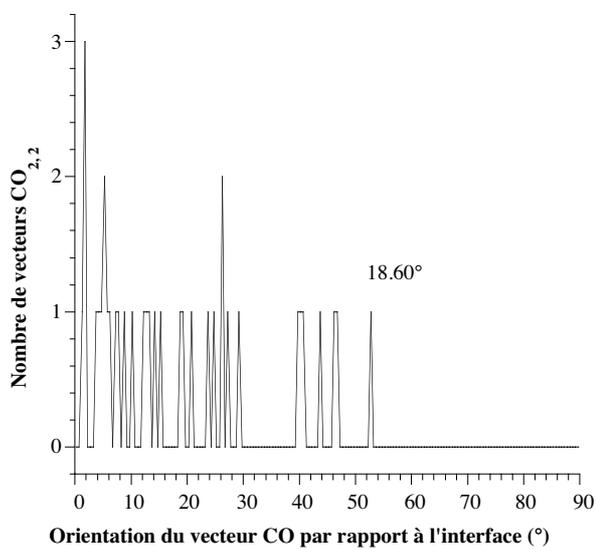
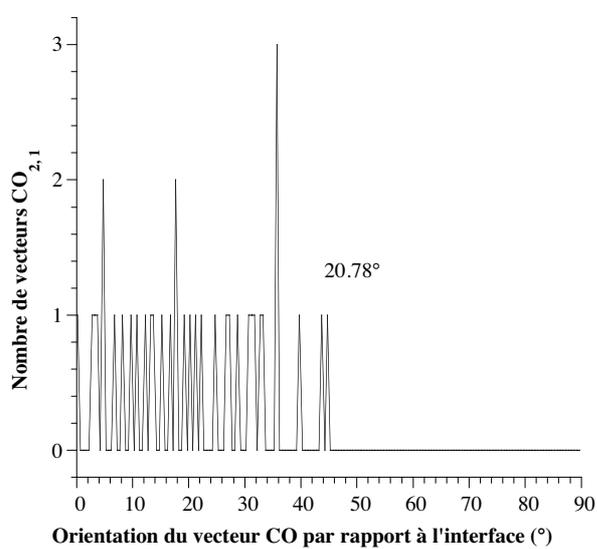
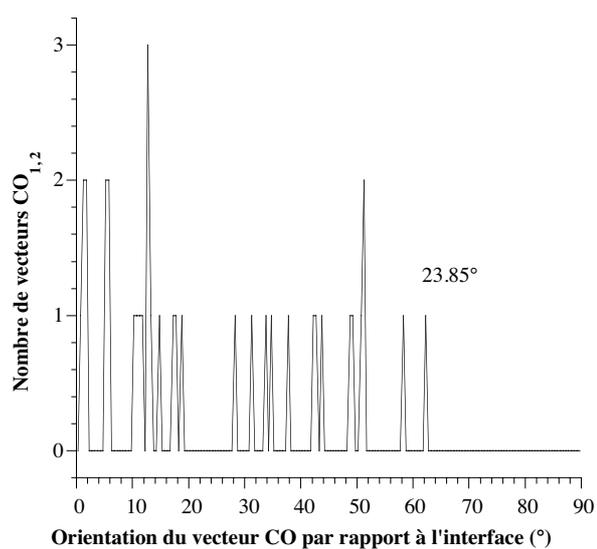
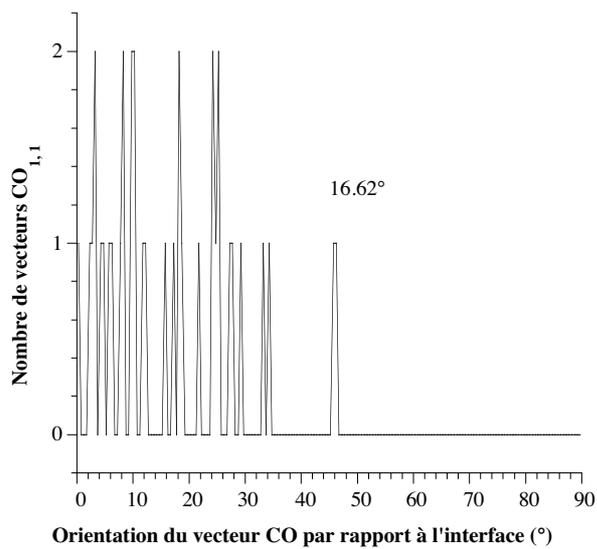


Figure 10 : Orientation par rapport au plan de l'interface du carbonyle pour la monocouche de DMPC.

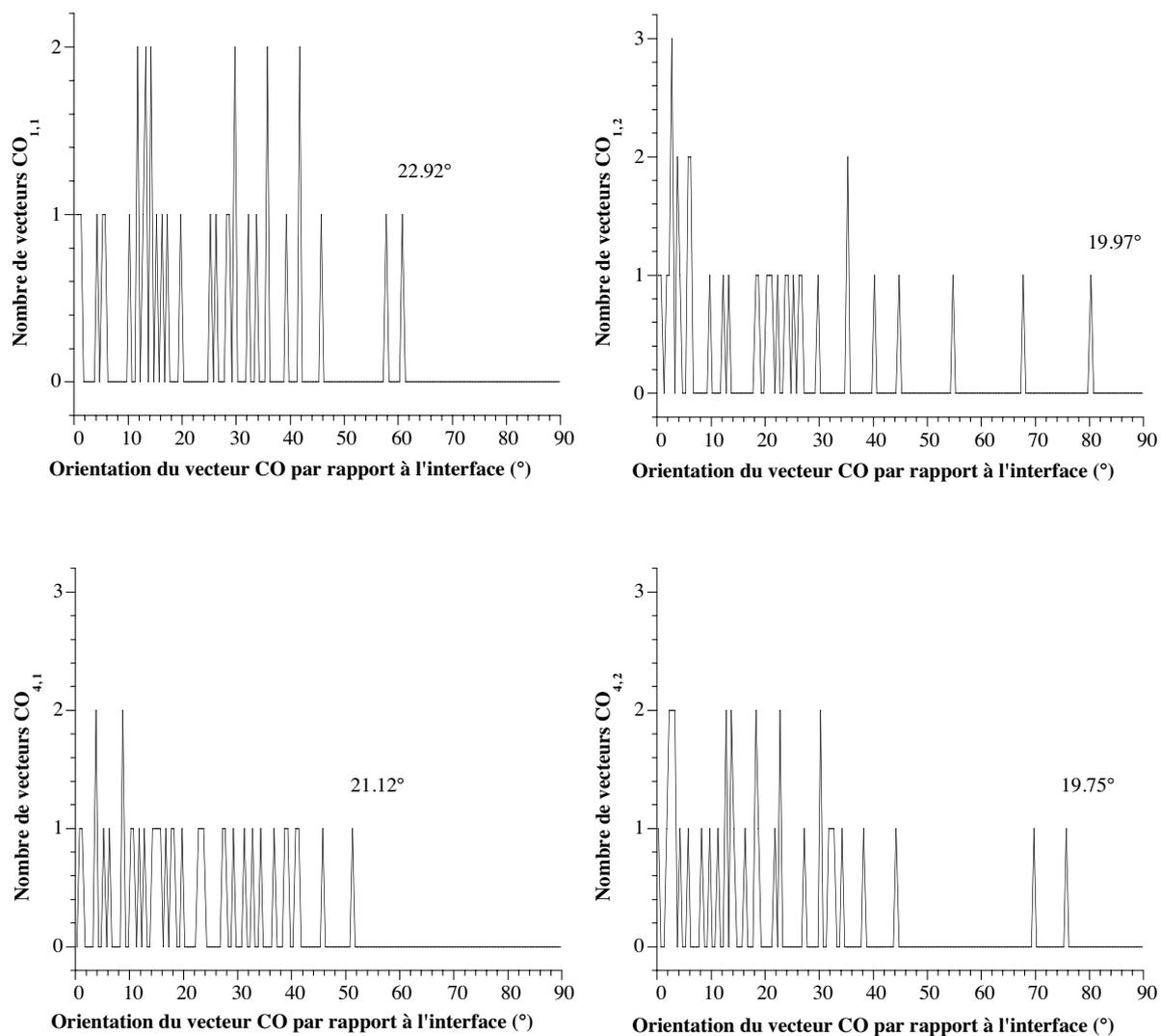


Figure 11 : Orientation par rapport au plan de l'interface du carbonyle pour les couches exposées à l'air de la bicouche de DMPC.

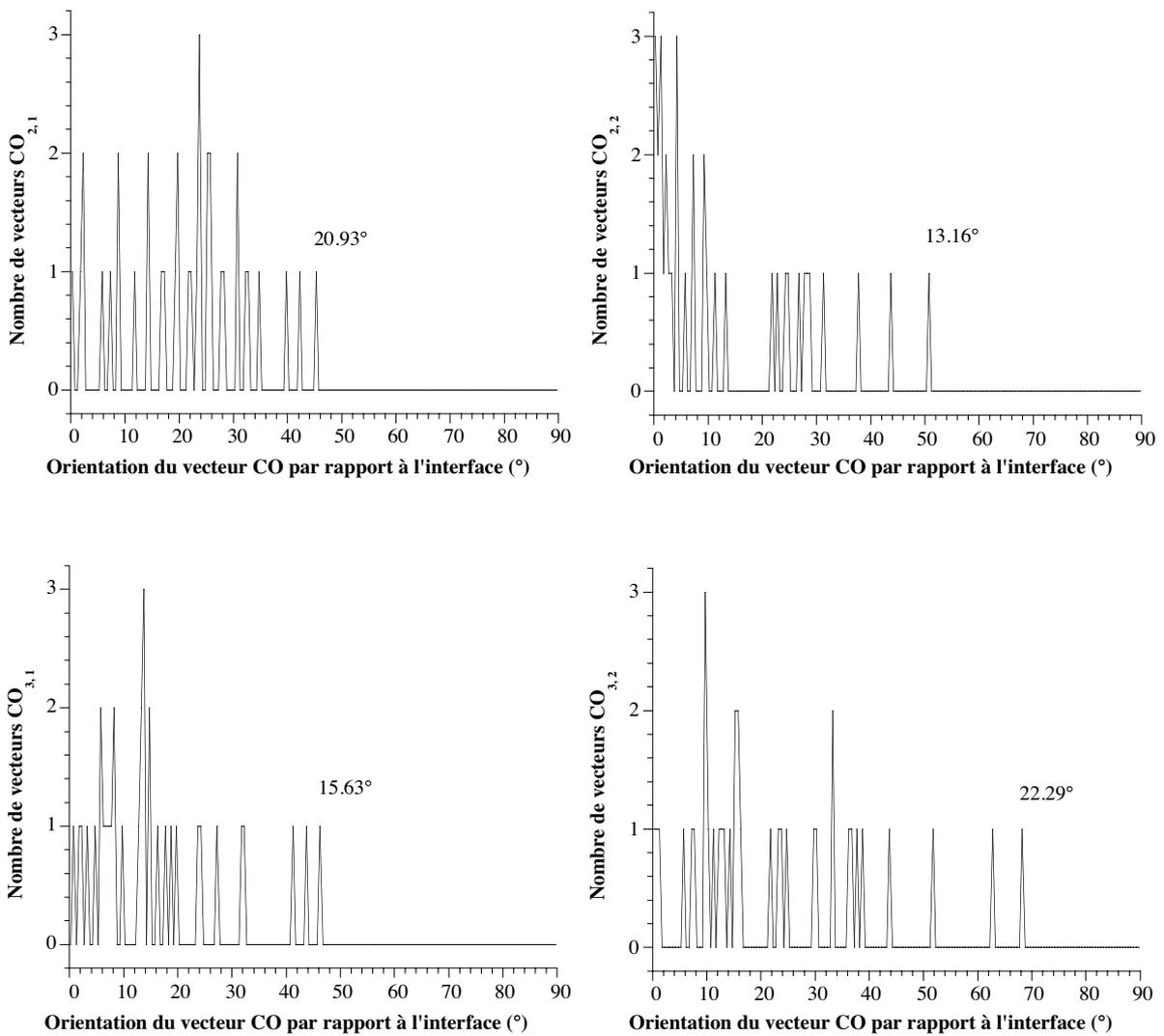


Figure 12 : Orientation par rapport au plan de l'interface du carbonyle pour les couches en contact avec la sous-phase aqueuse de la bicouche de DMPC.

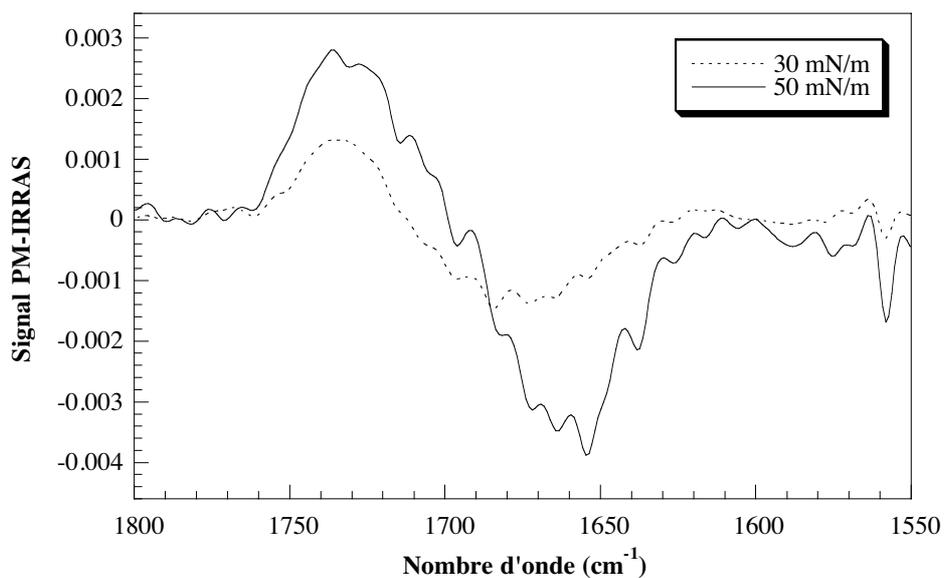


Figure 13 : Spectres PM-IRRAS de la monocouche et de la bicouche de DMPC obtenus à basse fréquence.

## V. Conclusion

Les différents résultats issus des calculs de dynamique moléculaire ont montré que les caractéristiques de la monocouche et de la bicouche de DMPC, construite en considérant un taux d'hydratation de 4 molécules d'eau par tête polaire dans la couche supérieure, sont sensiblement identiques. Les deux systèmes présentent peu de conformations gauche, synonyme de structures rigides et organisées. La bicouche est toutefois légèrement plus rigide à cause des interactions hydrophobes qui se développent entre les chaînes carbonées des deux couches. L'organisation au niveau des têtes polaires diffère également très peu, ce qui signifie que le basculement d'une deuxième couche sur la monocouche de DMPC ne modifie pas fondamentalement les caractéristiques de la monocouche. Cependant, nous avons pu remarquer des différences entre la couche supérieure et la couche inférieure dans la bicouche, traduisant le taux d'hydratation plus faible pour la couche exposée à l'air.

L'ensemble de ces résultats est en accord avec les observations expérimentales et sont notamment en faveur de l'existence d'une couche d'hydratation au niveau des têtes polaires de la couche supérieure de la bicouche comme nous l'avions suggéré dans le chapitre II. Cette couche d'hydratation permet en effet de réduire les interactions défavorables entre l'air environnant et les têtes choline et explique la formation d'une bicouche de DMPC à l'interface air-eau. Cependant, la difficulté de formation de la bicouche de DMPC par injection directe (méthode non reproductible) ou par la méthode de compression au-delà du collapse (bicouche non totale) suggère que la deuxième couche n'est stable que si elle est soumise à une forte pression de surface. Ce résultat traduit la rigidité de la bicouche formée dont la structure se rapproche d'un état quasi cristallin. Dans ces conditions, la moindre perturbation entraîne l'écroulement de l'édifice. C'est pourquoi la bicouche s'est avérée difficile à former expérimentalement. La quasi-cristallinité de la couche supérieure est également en accord avec les observations faites en microscopie à l'angle de Brewster où les domaines de bicouches semblaient flotter à la surface.

## VI. Perspectives

Les résultats expérimentaux ont montré qu'il était possible de réaliser une bicouche de DMPC à l'interface air-eau. Par ailleurs, les résultats de dynamique moléculaire sur la bicouche composée de deux monocouches tête-bêche ont montré que ces deux couches avaient des organisations identiques. De plus, le taux d'hydratation de la couche supérieure joue un rôle déterminant dans la stabilité de la bicouche. À la vue de ces résultats, nous pensons qu'une expérience réalisée sous atmosphère saturée en humidité et au-delà de la température de transition entre la phase gel et fluide du DMPC, facilitera la formation d'une bicouche stable. Nous envisageons également de poursuivre les calculs de dynamique moléculaire en considérant un taux d'hydratation des têtes polaires de la couche exposée à l'air plus élevé. D'autre part, bien que les résultats établis soient en faveur d'une bicouche constituée de deux monocouches tête-bêche, il serait intéressant d'étudier la dynamique de deux monocouches superposées en montrant par exemple que ce système diverge d'un point de vue énergétique. Nous confirmerions ainsi la structure de la bicouche proposée chapitre II.

Concernant la tricouche de DOPS, les calculs de dynamique moléculaire s'avèrent plus délicats car ils nécessitent, pour la tête polaire serine, l'utilisation de paramètres non disponibles à l'heure actuelle pour le champ de force de CHARMM. Aucun calcul n'a donc été mené, pour le moment, dans le cadre d'une étude de ce système à l'interface air-eau.

## Bibliographie

- [1] A. Gerschel. *Liaisons intermoléculaires. Les forces en jeu dans la matière condensée.* InterEditions et CNRS Edition, 1995.
- [2] Discover®. Forcefield simulations. User Guide, Part 1. Versions 2.9.7 & 95.0 / 3.0.0. Biosym / Molecular Simulations, 1995.
- [3] S. E. Feller and al. 1997. *Biophys. J.*, 73, 2269.
- [4] W. Jorgensen and al. 1983. *J. Chem. Phys.*, 79, 926.
- [5] W. Jorgensen and al. 1998. *J. Comput. Chem.*, 19, 1179.
- [6] L. Kalé and al. 1999. *J. Comput. Phys.*, 151, 283.

# CHAPITRE IV \_ INTERACTION D'UN PEPTIDE MEMBRANAIRE, LA MÉLITTINE, AVEC LES MULTICOUCHES FORMÉES À L'INTERFACE AIR-EAU



## I. Introduction

Un des buts de la réalisation de bicouches à l'interface air-eau était d'entreprendre in fine l'étude de leur interaction avec des peptides membranaires. Pour cela, je me suis plus particulièrement intéressée à la mélittine, un peptide cytotoxique composant majoritaire du venin d'abeille. Plusieurs raisons ont motivé mon choix. D'une part, la mélittine est considérée comme un peptide modèle pour son interaction spécifique avec les membranes naturelles. Elle est connue notamment pour provoquer la lyse des érythrocytes. D'autre part, elle présente un grand intérêt vis-à-vis de nos systèmes à l'interface air-eau puisque, soluble dans l'eau, elle peut être injectée directement dans la sous-phase aqueuse. Ce n'est pas le cas de tous les peptides dont certains exigent un solvant organique susceptible d'interagir avec les lipides. Les systèmes que nous avons réalisés à l'interface air-eau reproduisent l'épaisseur hydrophobe des membranes naturelles. Afin de savoir si ce facteur est déterminant pour la nature des interactions membranes-protéines ou peptides, nous comparerons les résultats que nous avons obtenus avec ceux déjà obtenus sur les monocouches de Langmuir. De cette façon, nous comptons apporter de nouveaux éléments de réponse quant à sa structure et son orientation dans les bicouches lipidiques. En effet, il n'existe pas actuellement de consensus au sein de la communauté scientifique sur le mode d'action de la mélittine sur les membranes. Nous espérons ainsi faire un lien entre la structure qu'adopte la mélittine dans les bicouches et son rôle dans les membranes.

Avant de présenter les résultats que j'ai obtenus avec la tricouche de DOPS et avec la bicouche supportée de DMPC sous la monocouche d'OTMS polymérisé (partie IV), je présenterai dans la partie II quelques généralités sur la structure des protéines. La spectroscopie PM-IRRAS étant la méthode de choix pour étudier l'orientation des molécules

à l'interface air-eau, je décrirai également dans cette partie les caractéristiques de la liaison peptidique en spectroscopie infrarouge. Je ferai ensuite le bilan sur l'état des connaissances concernant la méliittine dans la partie III. Je présenterai notamment les nombreux résultats obtenus sur les différentes structures qu'elle peut adopter et ses diverses orientations en fonction des systèmes étudiés.

## II. Les protéines

Les protéines sont des macromolécules naturelles formées d'un enchaînement ordonné d'acides  $\alpha$ -aminés dont le nombre de résidus est parfaitement défini à la différence des polymères.

### II.1. Les acides aminés

Les acides aminés sont des molécules organiques comportant un groupe fonctionnel acide carboxylique et un groupe amine primaire en position  $\alpha$  (schéma 1). Seul le résidu proline comporte un groupement amine secondaire.

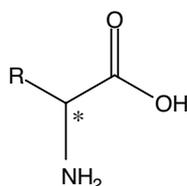


Schéma 1 : Formule chimique d'un acide aminé.

C'est la chaîne latérale R qui distingue les différents acides aminés. À l'heure actuelle, environ 500 sont connus. Mais seuls 20 participent à la synthèse des protéines naturelles. Parmi eux, le corps humain en synthétise 12, les 8 autres, appelés acides aminés essentiels, sont apportés par l'alimentation. Les 20 acides aminés constituant des protéines sont classés dans le tableau 1 en fonction des propriétés physico-chimiques de la chaîne latérale et dans le tableau 2, en fonction de son hydrophobicité dans le cas de l'échelle d'Eisenberg. À l'exception de la glycine achirale, les acides  $\alpha$ -aminés constituant des protéines comportent

un carbone asymétrique, de configuration S (L en projection de Fischer) dans les acides aminés naturels.

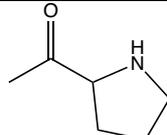
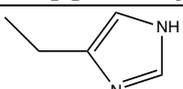
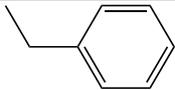
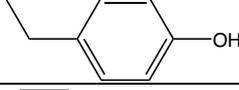
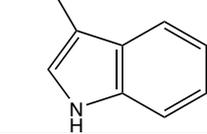
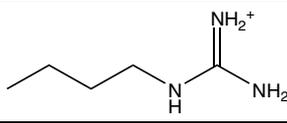
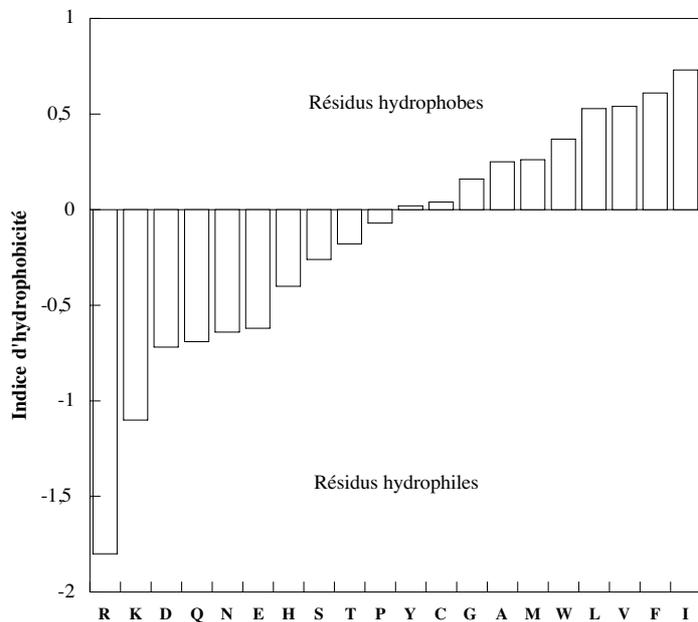
Caractère de la chaîne	Acides aminés	Symboles		Chaîne latérale R
Aliphatique	Glycine	Gly	G	H
	Alanine*	Ala	A	CH <sub>3</sub>
	Valine*	Val	V	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	Leucine*	Leu	L	CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	Isoleucine*	Ile	I	CH(CH <sub>3</sub> )-CH-CH <sub>3</sub>
	Proline	Pro	P	
	Cystéine	Cys	C	CH <sub>2</sub> -SH
	Méthionine*	Met	M	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -S-CH <sub>3</sub>
Aromatique	Histidine	His	H	
	Phénylalanine*	Phe	F	
	Tyrosine	Tyr	Y	
	Tryptophane*	Trp	W	
Polaire	Asparagine	Asn	N	CH <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>
	Glutamine	Gln	Q	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO-NH <sub>2</sub>
	Sérine	Ser	S	CH <sub>2</sub> -OH
	Thréonine*	Thr	T	CH(CH <sub>3</sub> )-OH
Chargée	Lysine*	Lys	K	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>
	Arginine	Arg	R	
	Aspartate	Asp	D	CH <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>
	Glutamate	Glu	E	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COO <sup>-</sup>

Tableau 1 : Les 20 acides aminés constituant les protéines. Les acides aminés marqués d'un astérisque sont les acides aminés essentiels (d'après [1]).



Résidus	Code à 1 lettre	Indice d'hydrophobicité
Arginine	R	-1.8
Lysine	K	-1.1
Acide aspartique	D	-0.72
Glutamine	Q	-0.69
Asparagine	N	-0.64
Acide glutamique	E	-0.62
Histidine	H	-0.4
Sérine	S	-0.26
Thréonine	T	-0.18
Proline	P	-0.07
Tyrosine	Y	0.02
Cystéine	C	0.04
Glycine	G	0.16
Alanine	A	0.25
Méthionine	M	0.26
Thryptophane	W	0.37
Leucine	L	0.53
Valine	V	0.54
Phénylalanine	F	0.61
Isoleucine	I	0.73

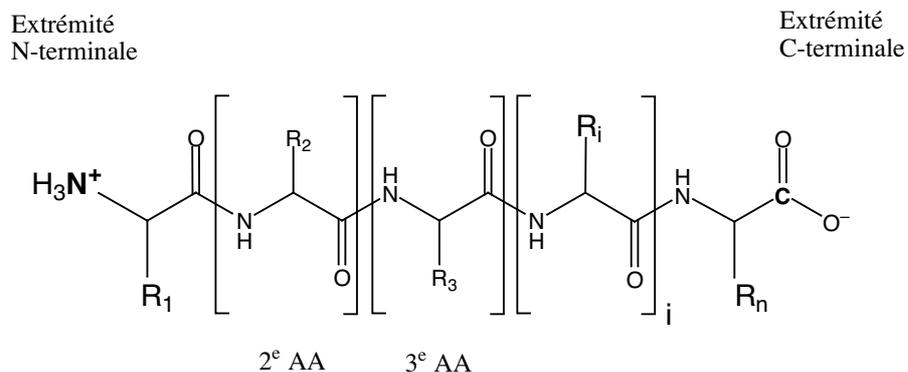
Tableau 2 : Classement des acides  $\alpha$ -aminés selon l'échelle consensus d'hydrophobicité d'Eisenberg [2].

## II.2. Structure des protéines

On distingue quatre niveaux d'organisation pour une protéine ; la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire.

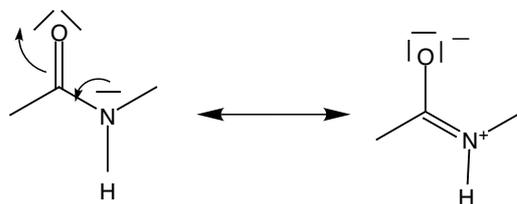
### II.2.1 Structure primaire et aspect conformationnel de la liaison peptidique

L'enchaînement ordonné des acides aminés d'une protéine est appelé structure primaire. Par convention, la séquence est donnée de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale (schéma 2). La chaîne carbonée principale des protéines est caractérisée par une succession de liaisons peptidiques qui résulte de la réaction entre la fonction amine d'un acide aminé avec la fonction acide carboxylique d'un autre acide aminé.



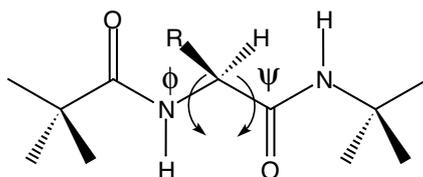
*Schéma 2 : Chaîne polypeptidique.*

La liaison peptidique présente des caractéristiques qui lui sont propres et qui vont induire un nombre limité de conformations stables des protéines. Des calculs de mécanique quantique et des études aux rayons X de cristaux de dipeptides ou de polypeptides ont montré que la longueur de la liaison C-N dans la liaison peptidique est de 1,32 Å c'est-à-dire inférieure à une simple liaison C-N ( $d = 1,47 \text{ \AA}$ ) et supérieure à une double liaison C=N ( $d = 1,25 \text{ \AA}$ ) [1, 3]. La liaison peptidique a donc un caractère double liaison comme le montre la forme mésomère limite sur le schéma 3, qui implique la quasi-coplanéité des atomes C, O, N et H.



*Schéma 3 : Formes mésomères de la liaison peptidique.*

D'autre part, la position en trans des atomes O et H de la liaison peptidique étant plus stable de 16,7 kJmol<sup>-1</sup> que la position cis, la chaîne polypeptidique s'agence préférentiellement de la façon suivante :



*Schéma 4 : Degrés de liberté de la liaison peptidique.*

Les seuls degrés de liberté possibles sont les rotations autour des liaisons  $C^\alpha-N$  et  $C^\alpha-C$  notées respectivement  $\phi$  et  $\psi$ . La rotation autour de la liaison C-N est impossible à température ambiante à cause du caractère double liaison de la liaison peptidique. Ces considérations géométriques limitent le nombre de conformations stables que peuvent adopter les protéines.

## II.2.2 Structures secondaires

La structure secondaire est définie comme l'agencement régulier et répétitif dans l'espace de la chaîne carbonée principale de la chaîne polypeptidique. Elle résulte essentiellement de la formation de liaisons hydrogène entre l'oxygène du carbonyle d'une liaison peptidique d'un motif et l'hydrogène de l'azote d'une liaison peptidique d'un autre motif. L'hélice- $\alpha$  et le feuillet- $\beta$  sont les deux grands types de structure secondaire rencontrés dans les protéines.

L'hélice- $\alpha$  est stabilisée par la formation des liaisons hydrogène, dirigées selon l'axe de l'hélice et qui s'établissent entre le groupe carbonyle du motif  $i$  et le groupe NH du motif  $i+4$ . (schéma 5). Ce sont ces liaisons hydrogène qui constituent le motif de base de la structure. Dans les chaînes polypeptidiques, c'est en majorité l'hélice- $\alpha$  droite ( $\phi = -57^\circ$  et  $\psi = -47^\circ$ ) qui est observée. Le pas d'une hélice- $\alpha$  idéale est de 3,6 unités d'acides aminés par tour ce qui correspond à une hauteur de 1,5 Å entre deux monomères. Il faut donc cinq tours pour retrouver deux motifs superposables.

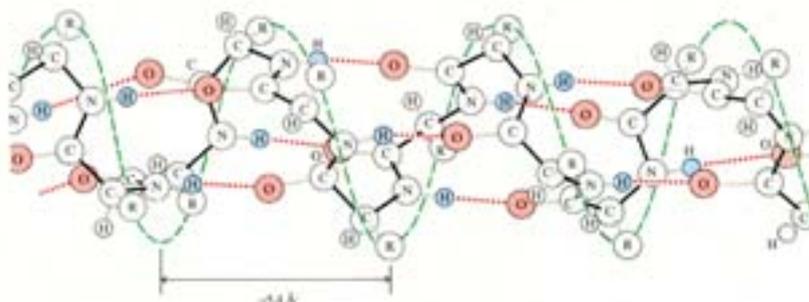


Schéma 5 : Structure d'une hélice- $\alpha$  (d'après [4]).

Il existe également un autre type de structure en hélice rencontrée dans les protéines : l'hélice  $3_{10}$  qui possède trois résidus par tour. Elle se situe le plus souvent à l'extrémité C-terminale d'une hélice- $\alpha$ . Les liaisons hydrogène qui la stabilisent ne sont plus parallèles à l'axe et relient les atomes O et H des motifs  $i$  et  $i+3$ . L'indice 10 désigne le nombre d'atomes impliqués dans le cycle qui réunit les groupes carbonyle et amino qui participent aux liaisons hydrogène (schéma 6).

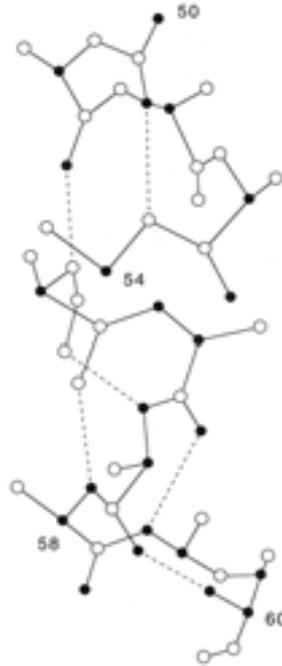


Schéma 6 : Vue stéréoscopique d'une hélice  $3_{10}$  (résidus 54 à 60) se plaçant à la suite d'une hélice- $\alpha$  dans la ribonucléase. Les liaisons hydrogène (indiquées en pointillés) sont moins bien alignées que dans une hélice- $\alpha$  (d'après [1]).

L'autre grand type de structure rencontrée dans les protéines est le feuillet- $\beta$  constitué de deux chaînes polypeptides (ou brins  $\beta$ ) positionnées en vis à vis. Dans ce cas, les liaisons hydrogène s'établissent entre chaque brin ce qui engendre la formation d'une structure plissée en forme d'accordéon, les chaînes latérales R étant alternativement d'un côté et de l'autre du feuillet (schéma 7). Les brins  $\beta$  peuvent interagir de deux façons différentes pour former un feuillet ; soit les deux brins sont orientés dans la même direction, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, on parle alors de *feuillet- $\beta$  parallèle* (schéma 8, a), soit les deux brins sont orientés de façon opposée, on parle dans ce cas de *feuillet- $\beta$  anti-parallèle* (schéma 8, b). Cette dernière forme, la plus stable thermodynamiquement, est la plus représentée dans

les protéines. Dans chacune des deux formes, les liaisons hydrogène adoptent une orientation particulière (schéma 8). Dans un feuillet- $\beta$  parallèle, les liaisons hydrogène sont régulièrement espacées mais forment un angle avec les atomes des groupements peptidiques interagissant. Dans un feuillet- $\beta$  anti-parallèle, il y a alternance de paires de liaisons hydrogène rapprochées et de paires éloignées.

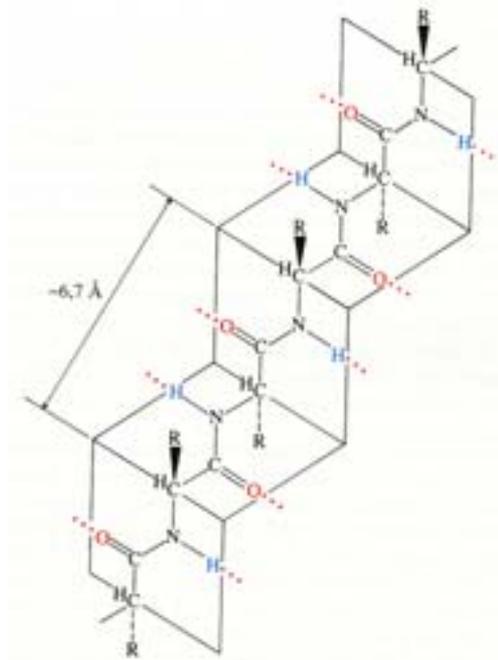


Schéma 7 : Structure en forme d'accordéon d'un feuillet- $\beta$  (d'après [4]).

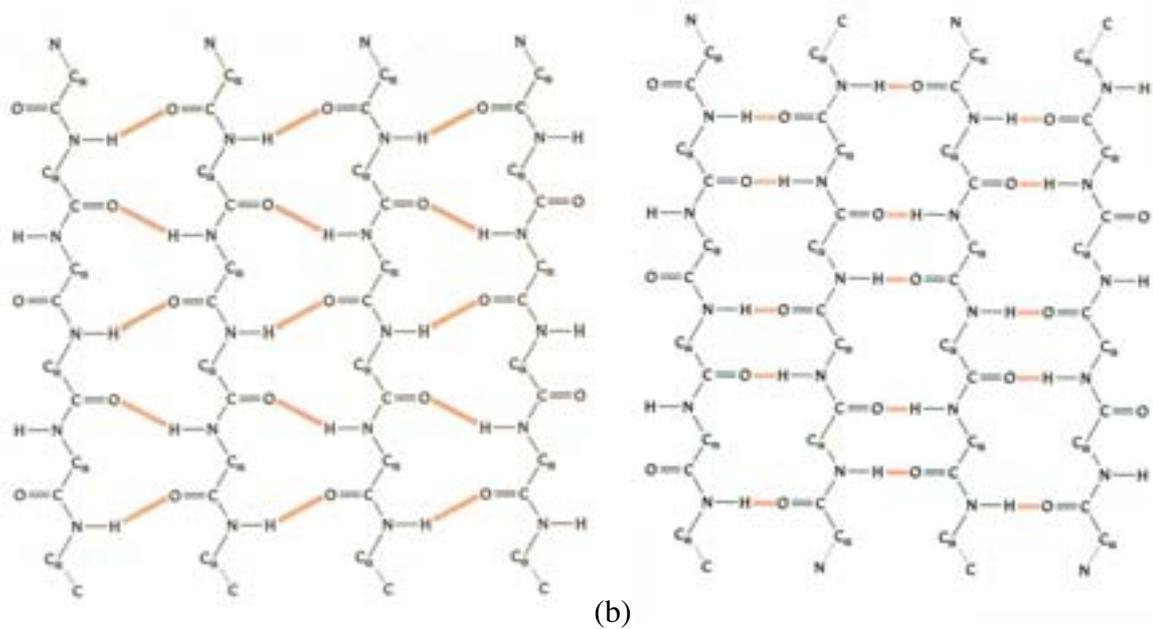


Schéma 8 : Représentation schématique de la distribution des liaisons hydrogène dans un feuillet) parallèle (a) et anti-parallèle (b) (d'après [5]).

Il faut noter qu'en réalité, les feuillets- $\beta$  sont vrillés (twistés) par rapport à l'axe des chaînes peptidiques.

Il existe également une autre structure secondaire souvent rencontrée chez les protéines : le coude  $\beta$  (ou  $\beta$ -turn) qui permet le repliement de la chaîne polypeptidique. Il existe sous deux formes présentes soit entre deux hélices- $\alpha$  soit entre deux brins d'un feuillet- $\beta$ . Il est formé par quatre acides aminés successifs avec une liaison hydrogène entre le groupe carbonyle du premier et le groupe amino du dernier (schéma 9). Les groupes carbonyle et amino situés dans la boucle constituent des sites privilégiés d'interaction, soit en formant des liaisons hydrogène avec d'autres groupes polaires (chaînes latérales, autres parties de la protéine, molécules d'eau...), soit en formant des liaisons covalentes avec par exemple des chaînes glycaniques dans les glycoprotéines.

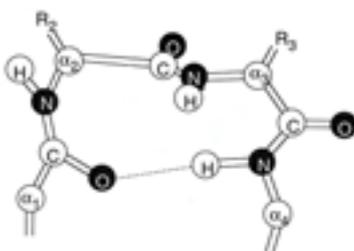


Schéma 9 : Structure d'un coude- $\beta$  (d'après [1]).

### II.2.3 Structure tertiaire

Cette structure résulte de la façon dont les structures secondaires s'organisent dans l'espace. Ce sont des forces mises en jeu par les chaînes latérales, comme les liaisons hydrogène, les ponts disulfure, les forces de London, les forces de nature électrostatique (comme par exemple les paires d'ions), qui sont à l'origine de ce troisième stade d'organisation des protéines. Elle correspond notamment à l'organisation des hélices- $\alpha$  de la bactériorhodopsine (schéma 10) ou à la structure en tonneau des feuillets- $\beta$  des porines (schéma 11).

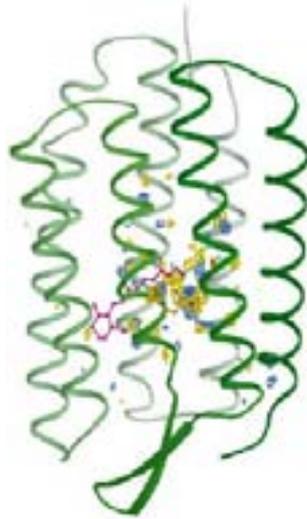


Schéma 10 : Structure tertiaire de la bactériorhodopsine.

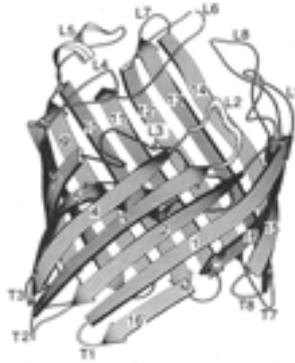


Schéma 11 : Structure en tonneau de la porine de *Rhodobacter capsulatus*. Les feuillets- $\beta$ , représentés par les flèches numérotées de 1 à 16, sont reliés par des boucles extramembranaires désignées par les lettres L et T (d'après [6]).

#### II.2.4 Structure quaternaire

Dans le cas des complexes protéiques (qui résulte de l'association de deux ou plusieurs structures tertiaires), la structure quaternaire désigne l'arrangement et le regroupement dans l'espace des différentes chaînes polypeptidiques. C'est le cas par exemple de l'hémoglobine constituée de quatre chaînes protéiques, de même structure tertiaire, possédant chacune son propre hème (schéma 12).

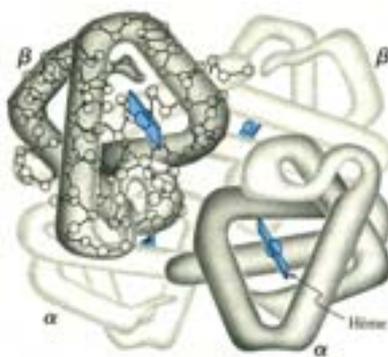


Schéma 12 : Structure quaternaire de l'hémoglobine. Le complexe est formé de 4 chaînes protéiques de structure tertiaire identique possédant chacune un hème représenté en bleu (d'après [4]).

Nous allons voir que les caractéristiques conformationnelles des protéines peuvent être déterminées par une étude en spectroscopie infrarouge.

### II.3. Spectroscopie infrarouge des protéines

Les protéines sont de grosses molécules composées au moins d'une centaine de résidus soit environ 200 atomes, ce qui implique plus de  $(3N-6) = 594$  vibrations en spectroscopie d'absorption infrarouge. Heureusement, on peut se limiter aux vibrations des groupements peptidiques des protéines qui absorbent dans le même domaine de longueur d'onde. Ils donnent en effet de fortes bandes d'absorption caractéristiques qu'on nomme communément bandes amide A et B pour les bandes d'absorption dans les hautes fréquences (supérieures à  $3000\text{ cm}^{-1}$ ) et bandes amide I à VII pour les bandes d'absorption dans les basses fréquences (inférieures à  $1700\text{ cm}^{-1}$ ). Nous allons décrire plus en détail l'ensemble de ces vibrations.

#### II.3.1 Modes de vibration de la liaison peptidique

On distingue les vibrations dans le plan de la liaison amide (bandes amide A et B et bandes amide I à IV) des vibrations hors du plan (bandes amide V à VII).

Les bandes amide A et B sont caractéristiques de la vibration de la liaison N-H. Elles résultent d'une résonance de Fermi entre le premier état excité de la vibration N-H et le deuxième état excité de la vibration amide II [7]. Elles se situent respectivement vers  $3300\text{ cm}^{-1}$  et  $3100\text{ cm}^{-1}$ . Ces deux bandes sont peu sensibles aux conformations des chaînes protéiques, bien que la première renseigne sur la force et la distribution des liaisons

hydrogène dans une protéine. Les bandes de vibration amide I à III, localisées entre 1000 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ , sont pertinentes pour l'étude des conformations des protéines car elles sont intenses et sensibles à leurs structures secondaires. Les bandes amide IV à VII, situées à des fréquences inférieures à 700  $\text{cm}^{-1}$ , ne sont pas observables dans le domaine de fréquences des montages de modulation de polarisation. Lors de l'analyse des spectres, nous nous attacherons donc plus particulièrement aux bandes amide I et II qui donnent les bandes de vibration les plus intenses. À partir de leurs fréquences et de leurs intensités respectives, il sera alors possible de trancher dans la plupart des cas sur la structure secondaire d'une protéine. La bande amide I est principalement localisée sur la vibration de la liaison C=O (~ 78 % en termes de répartition énergétique). La bande amide II est majoritairement localisé sur la déformation de la liaison N-H (~ 63 %) et peu sur l'élongation de la liaison C-N (~ 34 %). La bande amide III est localisée sur l'élongation de la liaison C-N (~ 35 %) et la déformation de la liaison N-H (~ 29 %). Les fréquences de ces bandes et leur description sont répertoriées dans le tableau 2.

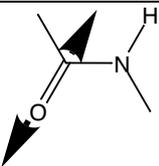
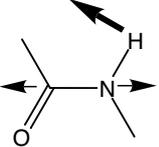
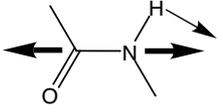
Bandes de vibration	Description	Fréquences (en $\text{cm}^{-1}$ )
Amide I		1700-1610
Amide II		1560-1510
Amide III		1310-1240

Tableau 3 : Représentation des modes de vibration amide I et II de la liaison peptidique (d'après [7]).

### II.3.2 Modes de vibration en fonction de la conformation des protéines

Les chaînes polypeptidiques sont constituées d'une succession d'unités répétitives chacune comportant une liaison peptidique. De ce fait, en spectroscopie infrarouge, dans le

cas de protéines possédant une structure régulière (hélice- $\alpha$ , feuillet- $\beta$ , coude- $\beta$ ), il se produit un couplage entre les modes de vibrations amide I et II de chaque unité répétitive notamment à cause des liaisons hydrogène qui interviennent entre motifs (hélice- $\alpha$ ) ou entre chaînes (feuillet- $\beta$ ). De ce couplage, résulte l'éclatement des modes amide I et II qui dépend de la conformation de la protéine. Leurs fréquences de vibration vont alors dépendre dans le cas de l'hélice- $\alpha$  uniquement de la différence de phase  $\delta$  entre vibrations d'une sous-unité d'une même chaîne (phase intrachaîne) et dans le cas d'un feuillet- $\beta$ , les vibrations seront aussi fonction de la différence de phase  $\delta'$  entre vibrations d'une sous-unité appartenant à des chaînes différentes (différence de phase interchaîne). Pour l'hélice quasi-infinie, on trouve, pour chaque mode de vibration, un moment de transition parallèle et perpendiculaire à l'axe z de l'hélice (schéma 13), pour le feuillet- $\beta$  parallèle, on trouve un moment de transition parallèle et perpendiculaire à l'axe z du feuillet (schéma 14, a) tandis que pour le feuillet- $\beta$  antiparallèle, on distingue deux moments de transition dans le plan xy perpendiculaire à l'axe du feuillet et un moment de transition parallèle à l'axe du feuillet (schéma 14, b). Les fréquences expérimentales observées dans H<sub>2</sub>O des modes de vibration caractéristiques d'une conformation sont répertoriées dans le tableau 3. Ainsi, à partir d'un spectre d'absorption infrarouge, il sera possible de différencier les formes hélices- $\alpha$ , feuillets- $\beta$  parallèles et antiparallèles, les coudes- $\beta$  et les formes désordonnées.

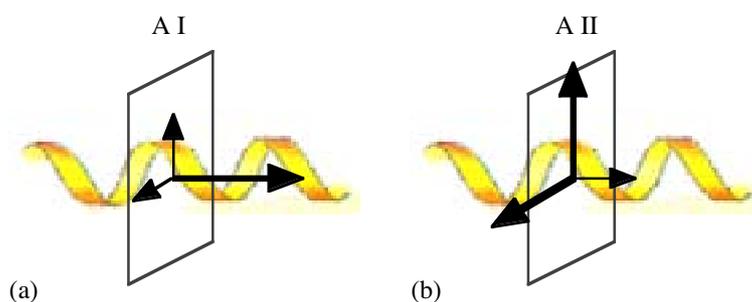


Schéma 13 : Représentation schématique des modes Amide I et II pour l'hélice- $\alpha$ .

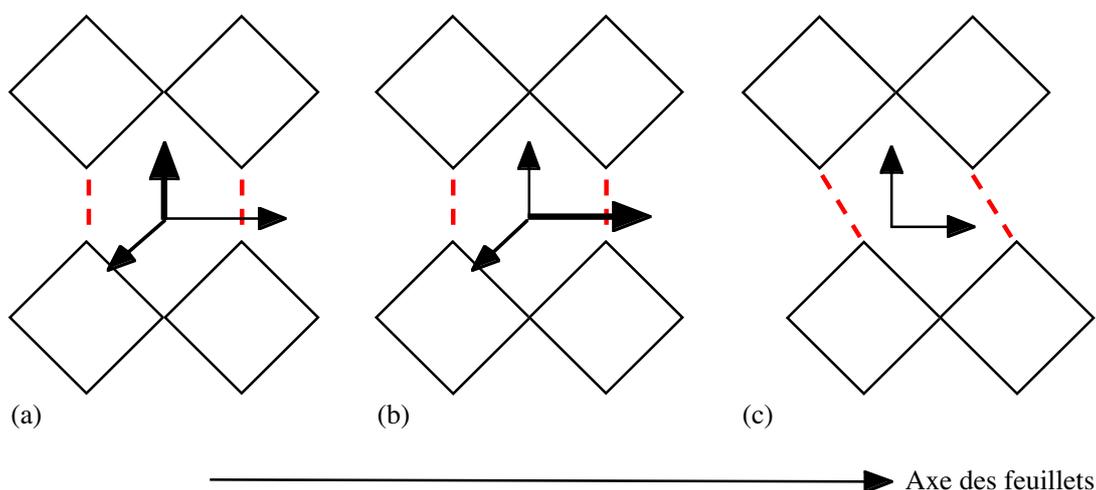


Schéma 14 : Représentation schématique des vibrations Amide I (a) et II (b) d'un feuillet- $\beta$  antiparallèle et des vibrations caractéristiques d'un feuillet- $\beta$  parallèle (c).

Structures secondaires		Mode amide I (en $\text{cm}^{-1}$ )
Hélice- $\alpha$		1652-1662 (F)
Feuillets- $\beta$	Parallèle	1632-1618 (F)
	Anti-parallèle	1685-1695 (f) 1632-1618 (F)
Coude- $\beta$		1665-1685
Structure désordonnée		1652-1648 (L)

Tableau 4 : Fréquences caractéristiques des modes amide I et II pour différentes conformations de protéines. Les lettres (F), (f) et (L) désignent respectivement des bandes de Forte et faible intensité et une bande Large (d'après [8]).

Dans  $\text{D}_2\text{O}$ , la deutération partielle provoque un léger décalage du mode amide I vers les basses fréquences. Les nouvelles fréquences sont alors notées avec une apostrophe (amide I'). Ce décalage en fréquence, plus marqué pour la structure désordonnée, permettra de mieux différencier cette structure d'une hélice- $\alpha$ . Cette différenciation est beaucoup plus difficile lors de l'étude dans l'eau à cause de leurs fréquences rapprochées.

### III. La mélittine

La mélittine est un peptide cytotoxique<sup>1</sup> composant majoritaire du venin *d'abeille Apis Mellifera* [9, 10]. Composée de 26 acides aminés, c'est un peptide à caractère cationique avec une charge électrostatique nette de + 6 provenant, à l'extrémité C-terminale, des quatre acides aminés Lys-Arg-Lys-Arg et, à l'extrémité N-terminale, de la forme acide du groupement amino et de la lysine en position 7 [11].

$\text{H}_3\text{N}^+$ -Gly-Ile-Gly-Ala-Val-Leu-Lys-Val-Leu-Thr-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala-Leu-Ile-Ser-Trp-Ile-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln-Gln-CONH<sub>2</sub>

*Schéma 15 : Séquence des 26 acides aminés de la mélittine. En bleu, sont indiqués les groupements chargés positivement.*

Connue pour son activité hémolytique élevée (elle provoque la lyse des érythrocytes) [12], la mélittine fait l'objet de nombreuses études pour tenter d'éclaircir la nature de son interaction avec les membranes et notamment pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'hémolyse. Elle est également considérée comme un peptide modèle dont l'étude permettra d'élucider la relation entre la structure des protéines membranaires et leur interaction avec les lipides qui constituent les membranes. Cependant, malgré les nombreux résultats obtenus sur différents systèmes modèles (vésicules [13-15], multicouches supportées [16], monocouches de Langmuir [17, 18]), leur diversité ne permet pas d'établir un consensus sur la nature de l'interaction de la mélittine avec les lipides membranaires. Les résultats obtenus sont en fait fonction de la méthode de préparation des systèmes étudiés et de leurs caractéristiques physico-chimiques. Ils dépendent notamment de la composition et de la nature des lipides, du rapport molaire entre la mélittine et les lipides, de la force ionique et du pH de la phase aqueuse, de la présence ou non d'un potentiel membranaire et du degré d'hydratation de la bicouche [19]. Sous certaines conditions, la mélittine peut aussi provoquer la micellisation des bicouches lipidiques [20, 22]. Avant de

---

<sup>1</sup> Du grec "cyto" qui signifie cellule.

rendre compte des différents effets induits par la mélittine, je présenterai dans un premier temps les différentes structures rencontrées.

### III.1. Structures de la mélittine

Malgré la grande proportion d'acides aminés hydrophobes (résidus 1 à 6, 8 à 20, 25 et 26), la mélittine est très soluble dans l'eau (solubilité supérieure à 250 mg par mL). En solution aqueuse, elle peut adopter plusieurs conformations et états d'agrégation selon sa concentration, le pH et la force ionique [19]. Elle peut être sous forme monomérique ou tétramérique. Le monomère est sous forme de pelote statistique tandis que le tétramère est constitué de deux dimères croisés d'hélices- $\alpha$  antiparallèles positionnées comme sur la schéma 16. L'organisation tridimensionnelle du tétramère est telle que les parties hydrophobes des hélices s'orientent vers l'intérieur et les parties hydrophiles vers l'extérieur (exposées au solvant). Chacune des hélices adopte une conformation telle que les acides aminés polaires se trouvent à l'intérieur de l'hélice et les acides aminés hydrophobes sont situés sur la face externe de l'hélice (schéma 17). Elles apparaissent légèrement courbée à cause de la proline en position 14.

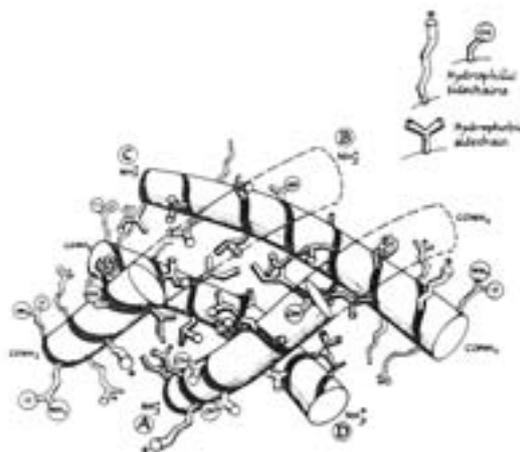
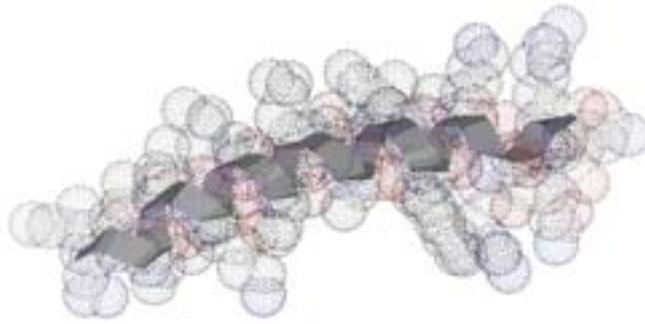


Schéma 16 : Structure de la forme tétramérique de la mélittine (d'après [19]).



*Schéma 17 : Structure de la mélittine lorsqu'elle est sous la forme d'une hélice- $\alpha$ . Les sphères représentent les résidus constituant la structure primaire de la mélittine. La face externe de l'hélice est constituée majoritairement de résidus hydrophobes (sphères noires) tandis que la face interne, de nature hydrophile, est constituée majoritairement de résidus polaires (sphères rouges) et de résidus chargés positivement (sphères bleues).*

C'est le caractère amphipathique de l'hélice- $\alpha$  que peut former la mélittine sous certaines conditions qui en fait un peptide modèle. En effet, la plupart des protéines membranaires adoptent la structure amphipathique de l'hélice- $\alpha$  lorsqu'elles interagissent avec les membranes. L'état conformationnel et d'agrégation de la mélittine dans l'eau résulte d'un compromis entre l'effet hydrophobe et l'effet électrostatique dû aux charges portées par la mélittine. L'effet hydrophobe tend à rassembler les acides aminés hydrophobes à l'extérieur de l'hélice ou à l'intérieur du tétramère tandis que les charges positives sur la mélittine, du fait de la répulsion électrostatique, tendent à éloigner les molécules de mélittine et donc à favoriser l'état de non-association. C'est pourquoi à des concentrations élevées en NaCl (le sel écrante les charges positives de la mélittine), à des pH élevés (pour des pH supérieurs aux pKa 6,5 et 8,6 des lysines en positions 21 et 23 induisant une diminution de la densité de charges positives sur la mélittine) et à des concentrations élevées en mélittine (qui favorisent le rapprochement des molécules entre elles), l'état auto-associé est prédominant.

### **III.2. Action de la mélittine sur les membranes**

L'effet le plus caractéristique de la mélittine sur les membranes des cellules est son activité hémolytique. Pour des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{molL}^{-1}$  et plus, la mélittine se lie aux érythrocytes et provoque la libération de l'hémoglobine contenue à l'intérieur. À l'heure actuelle, trois mécanismes sont proposés pour expliquer l'activité lytique de la mélittine. Ils sont décrits selon trois modèles : le modèle "douve de tonneau" [23, 24], le modèle torique

[24] et le modèle "moquette" [23] ("barrel-stave" model, toroidal model et "carpet" model en anglais).

Le mécanisme selon les "douves de tonneau" est tel que les molécules de mélittine se lient de façon parallèle à la membrane puis s'associent pour former un faisceau d'hélices perpendiculaires à la membrane tel qu'il se forme un pore hydrophobe traversant la membrane (schéma 18).

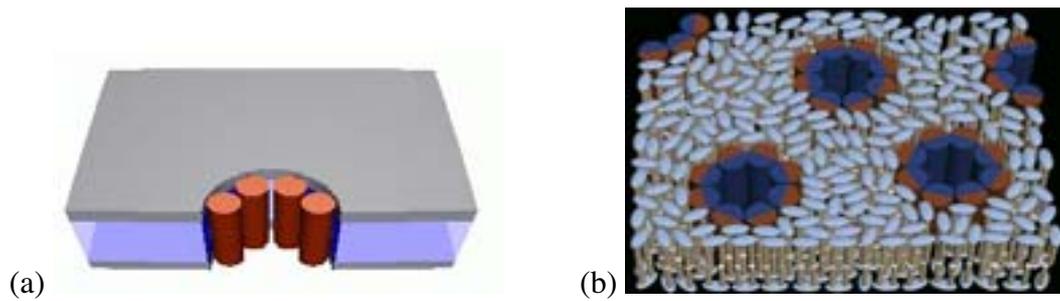


Schéma 18 : Modèle de pore en forme de douves de tonneau. (a) Coupe de la membrane (d'après [24]). (b) Vue de dessus.

Le modèle torique a été proposé suite à une étude par diffraction de neutrons des effets comparés sur les membranes de l'alaméthicine (un peptide essentiellement neutre), la magainine (un peptide portant 5 charges positives au pH physiologique) et la mélittine [24]. Les auteurs montrent que les deux peptides chargés positivement forment des pores avec les mêmes caractéristiques selon un modèle où la bicouche se structure tel un tore autour des hélices qui constituent le pore (schéma 19), d'où le nom de modèle torique. En revanche, l'alaméthicine forme des pores selon le modèle "douves de tonneau". Ils suggèrent donc que, dans le modèle torique, les têtes polaires des lipides jouent le rôle d'écran de charges qui expliquerait la différence de structure entre les pores formés avec des peptides chargés et les pores formés avec des peptides composés majoritairement d'acides aminés neutres.

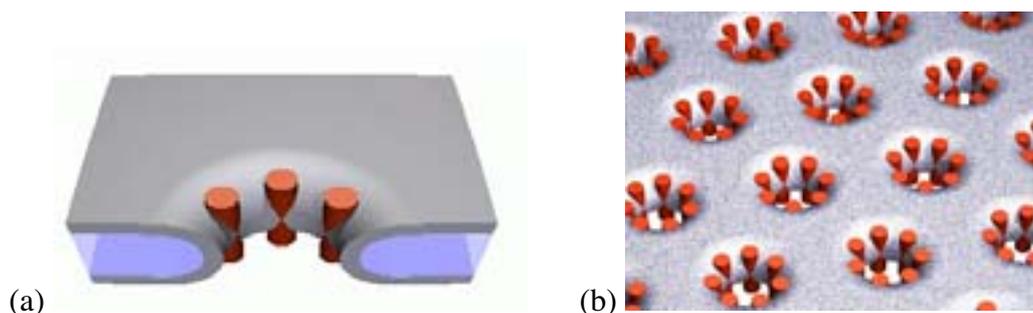


Schéma 19 : Modèle torique de pore entourée de la membrane dont la courbure forme un tore autour des pores. (a) Coupe de la membrane (d'après [24]). (b) Vue de dessus.

Le mécanisme selon le modèle "moquette" implique que la mélittine s'adsorbe à la surface de la membrane de façon parallèle et provoque sa vésicularisation en enfonçant la face hydrophobe de l'hélice dans le cœur hydrophobe de la membrane comme c'est illustré sur le schéma 20.

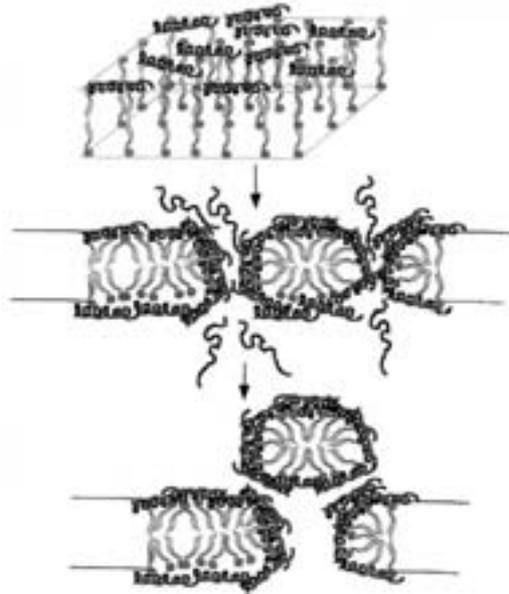


Schéma 20 : Mécanisme selon le modèle "moquette" (d'après [23]).

Il a été montré également que la mélittine induit une exaltation de la perméabilité des membranes lorsqu'elles sont soumises à un potentiel électrique, effet qui pourrait intervenir dans le mécanisme d'hémolyse [25].

La mélittine provoque aussi, à la manière d'un détergent doué de propriétés solubilisantes, la micellisation sous forme de disques de bicouches composées de phosphatidylcholines saturés dans leur phase gel [20-22].

### III.3. Orientations de la mélittine dans les membranes

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la mélittine sur les membranes, de nombreuses études ont été faites sur l'orientation de la mélittine sur les vésicules et les multicouches supportées. En revanche, peu d'études ont été faites sur les monocouches de Langmuir. Bien qu'il ait été montré que la mélittine s'organise selon une hélice- $\alpha$  lorsqu'elle interagit avec les membranes, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure quant à une orientation bien définie. En fait, elle varie en fonction de la composition en lipides des

membranes, de leur état physique (phase gel ou phase fluide) et de leur degré d'hydratation [19]. Ce qui semble émerger des résultats répertoriés est, qu'en phase gel et pour de faibles degrés d'hydratation, la mélittine s'oriente préférentiellement de façon perpendiculaire au plan de la membrane alors qu'en phase fluide et à des degrés d'hydratation élevés, la mélittine semble préférer une orientation parallèle à la membrane. Malheureusement, cette tendance ne peut faire office de conclusion puisque sous certaines conditions, des résultats contraires sont obtenus.

Étant donné que nous voulons plus précisément comparer les résultats obtenus sur monocouches de Langmuir avec ceux que j'ai obtenus avec les bicouches formées à l'interface air-eau, je vais décrire plus en détail les orientations de la mélittine observées sur monocouches [26].

Les études référencées avant 1996 et basées pour la plupart sur l'étude de l'évolution de la pression de surface des monocouches suite à l'insertion de la mélittine [27-29] ne permettent pas d'extraire d'informations au niveau moléculaire comme par exemple l'effet de la mélittine sur l'organisation des chaînes carbonées des lipides ou sa structure secondaire lorsqu'elle est en interaction avec les bicouches lipidiques. Il faut pour cela attendre les études par spectroscopie IRRAS de C. R. Flach and al. [18] et par spectroscopie PM-IRRAS de I. Cornut and al. [17]. Chacune de ces études montre certes des résultats qui se recourent mais aussi des contradictions. La tendance est que la mélittine (chargée positivement) montre une plus grande affinité pour les monocouches chargées négativement (DPPG [27, 28], DPPA [27], DPPS [18]). Cependant, ce résultat n'est pas vérifié pour des vésicules de DMPC ( $T_m = 23^\circ\text{C}$ ) et de DMPG ( $T_m = 23^\circ\text{C}$ ) [28] et pour monocouches de phospholipides naturels (egg-PC et bovine-PS) insaturés [29]. À la lumière de ces résultats, la nature de la tête polaire ne semble pas être le seul facteur qui influe sur la nature de l'interaction de la mélittine avec les membranes, l'état physique de la monocouche semble également intervenir dans le processus d'interaction des lipides avec la mélittine. Cependant, les méthodes d'investigation basées sur la mesure d'une différence de pression de surface ne permettent pas de savoir sous quelle forme se trouve la mélittine insérée : monomère ou tétramère ?, ce qui rend difficile les interprétations. L'étude réalisée par Cornut and al. en spectroscopie PM-IRRAS semble en

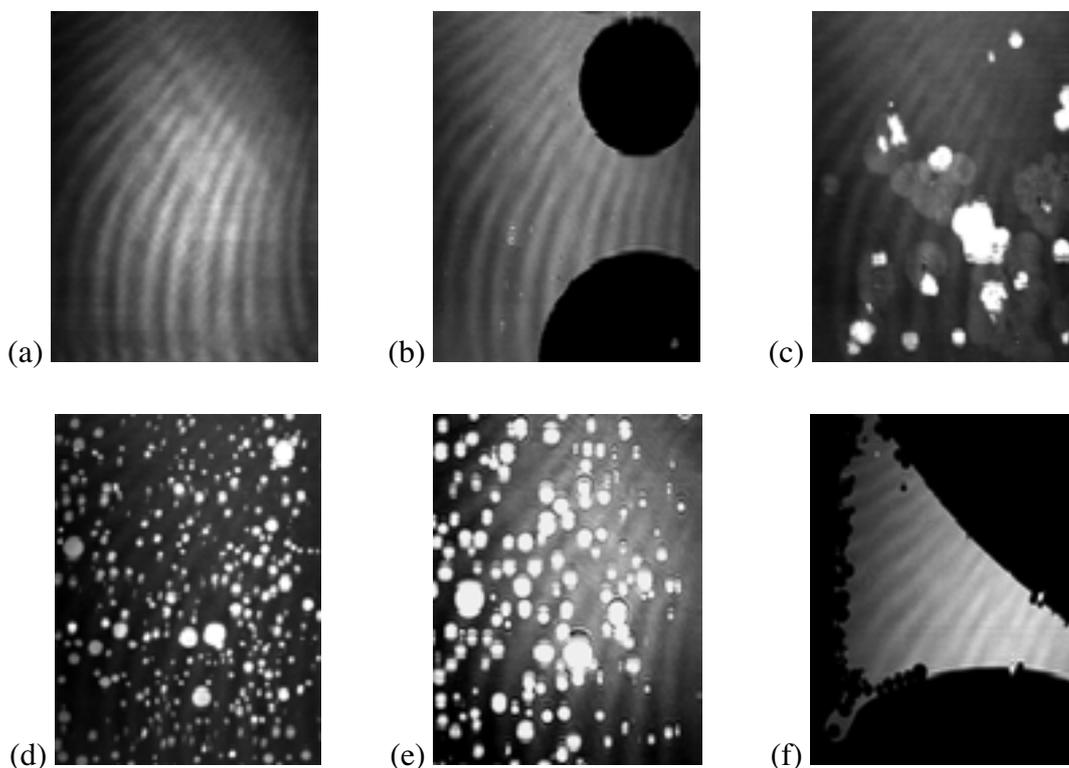
faveur de la forme tétramérique avec une orientation de la mélittine plutôt parallèle au plan de la monocouche de DMPC. Dans l'article de Flach and al., ils mettent en évidence, grâce à la spectroscopie IRRAS, que la mélittine induit de l'ordre dans les chaînes acyl du DPPC tandis qu'elle provoque le désordre dans celles du DPPS. Cependant, ils ne déterminent pas l'orientation de la mélittine par rapport à la bicouche. Ils suggèrent seulement que la mélittine pénètre plus dans le cœur hydrophobe du DPPS que dans celui du DPPC.

Suite à l'ensemble de ces résultats, notre objectif était d'étudier l'interaction de la mélittine avec les multicouches formées à l'interface air-eau dans le cas de la tricouche de DOPS et dans le cas de la bicouche de DMPC supportée. Bien que les monocouches constituent un modèle d'étude satisfaisant notamment parce qu'il permet de faire varier facilement des paramètres comme la nature et la compacité des phospholipides, la composition de la sous-phase (pH, force ionique) et la température, avec les bicouches décrites dans le chapitre suivant, nous affinons un paramètre supplémentaire, à savoir, l'épaisseur du cœur hydrophobe. Nous pensons en effet qu'elle peut être déterminante pour la nature des interactions protéines-membranes. Pour cela, nous nous sommes proposés d'étudier l'insertion de la mélittine, qui peut être injectée sans risque de dénaturation dans la sous-phase aqueuse, et de comparer nos résultats avec ceux obtenus sur les monocouches en espérant apporter de nouveaux éléments de réponse sur son orientation dans les membranes. Les études ont été effectuées en spectroscopie PM-IRRAS afin de remonter, grâce à l'analyse des bandes d'absorption, à sa structure secondaire et à son effet sur les phospholipides et en microscopie à l'angle de Brewster afin de visualiser *in situ* les effets de la mélittine sur les bicouches (micellisation, destruction de la membrane, agrégation, ...). Je décrirai, dans un premier temps, les résultats obtenus sur la tricouche de DOPS et sur le mélange DOPS-DMPC puis sur la bicouche de DMPC formée sous la monocouche d'OTMS polymérisée.

## IV. Interaction de la mélittine avec les systèmes modèles formés à l'interface air-eau

### IV.1. Tricouche de DOPS

Afin de visualiser les effets de la mélittine sur la tricouche de DOPS préalablement formée à l'interface air-eau par la méthode de compression au-delà du collapse, nous avons tout d'abord observé la surface en microscopie à l'angle de Brewster (images 1). L'expérience a consisté à injecter des quantités croissantes d'une solution aqueuse de mélittine sous la tricouche. Les images Brewster enregistrées au cours de l'expérience sont présentées sur les images 1 en fonction du rapport molaire mélittine-DOPS croissant.

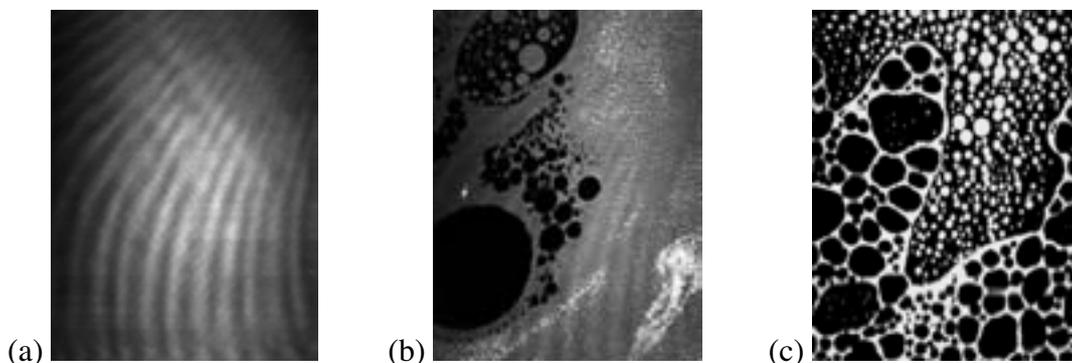


Images 1 : Images Brewster du système DOPS-mélittine pour un temps d'obturation de la caméra au 500<sup>ième</sup> de seconde. L'image (a) représente la surface de la tricouche de DOPS seule. Les images (b), (c), (d), (e), (f) correspondent respectivement à des rapports molaires mélittine-DOPS égaux à 1/300, 1/150, 1/100, 1/75, 1/60.

Pour un temps d'obturation au 500<sup>ième</sup> de seconde, on distingue sur les images Brewster deux niveaux de gris : le gris clair correspondant à des domaines de tricouches comme le montre l'image de la tricouche initiale de DOPS (image 1a) et le gris foncé correspondant à des domaines de monocouche de DOPS. Les domaines blancs très lumineux même pour des temps d'obturation plus courts sont caractéristiques d'agrégats de DOPS. L'image de la tricouche seule (image 1a) est donnée comme référence pour l'expérience d'injection de la

méllittine. Dès la première injection de méllittine (image 1b), correspondant à une concentration de  $22 \text{ nmolL}^{-1}$  dans la sous-phase, on voit apparaître des domaines circulaires de monocouches qui se forment au sein de domaines de tricouches. Pour une quantité double de méllittine injectée (image 1c), on observe l'apparition de domaines gris et blancs, plus lumineux que la tricouche, correspondant respectivement à des épaisseurs supérieures à 3 couches et à des agrégats de DOPS. L'ajout de quantités encore plus importantes de méllittine se traduit par une surface où n'apparaît plus qu'une monocouche de DOPS parsemée d'agrégats (image 1e) et où ne subsistent par endroit que de petits domaines de tricouches qui semblent "grignoter" sur les contours (image 1f). La dernière image a été enregistrée environ 1h30 après la première injection.

Afin d'exalter les effets de la méllittine sur la tricouche de DOPS, j'ai, dans une deuxième expérience, injectée une quantité importante de méllittine tel que le rapport peptide sur phospholipide soit de  $1/27$ . Ce rapport correspond à une concentration de  $0,2 \mu\text{molL}^{-1}$  de méllittine dans la sous-phase aqueuse. Deux images Brewster représentatives de l'état de la surface sont données ci-dessous :



*Images 2 : Images Brewster enregistrées pour une quantité de méllittine injectée correspondant à un rapport molaire peptide-phospholipide de  $1/27$ . L'image (a) représente la surface de la tricouche de DOPS seule.*

On observe des effets de même nature que précédemment mais ces effets sont d'autant plus spectaculaires que les images 2b et 2c ont été enregistrées dans la minute qui a suivi l'injection. On observe en effet la destruction rapide de la tricouche qui induit la formation de nombreux domaines de monocouches au sein de la tricouche de DOPS et d'agrégats (image 2b). Sur l'image 2c, la tricouche a disparu au profit de domaines de monocouches de plus en plus nombreux et d'agrégats blancs qui tapissent la monocouche.

À l'issue de ces observations, nous pouvons établir plusieurs résultats concernant l'effet de la mélittine sur la tricouche de DOPS. Plus le rapport mélittine sur phospholipide augmente, plus les effets sur la tricouche sont importants et rapides. À faible concentration, la mélittine semble provoquer la désagrégation de la tricouche en formant des domaines de monocouche. À plus forte concentration, l'apparition d'un grand nombre d'agrégats à la surface et la destruction massive de la tricouche suggèrent l'insertion de la mélittine dans la tricouche entraînant l'expulsion de molécules de phospholipides qui se regroupent pour former des agrégats. D'autre part, la deuxième expérience semble indiquer que la cinétique du mécanisme d'action de la mélittine sur la tricouche de DOPS est d'autant plus rapide que sa concentration est élevée. On peut remarquer également qu'un effet notable de la mélittine sur la tricouche de DOPS est observé à des concentrations beaucoup plus faibles (de l'ordre du  $\text{nmolL}^{-1}$ ) que celles qui provoquent la lyse des érythrocytes (de l'ordre du  $\mu\text{molL}^{-1}$ ). Ce résultat peut s'expliquer par une différence de stabilité entre les deux systèmes. D'un point de vue thermodynamique (pour des raisons de minimisation d'énergie de surface), un système plan est moins stable qu'un système sphérique. Pour ces raisons, la tricouche à l'interface air-eau est plus facile à déstabiliser que les érythrocytes. Par ailleurs, le système étudié offre des conditions propices à sa perturbation par la mélittine. En effet, le DOPS chargé négativement favorise, par des interactions électrostatiques, la montée à l'interface de la mélittine chargée positivement. De plus, la partie hydrophobe de la bicouche inférieure constituant la tricouche développe des interactions hydrophobes favorables avec la mélittine, ceci suppose que la mélittine s'insère sous forme d'hélices. Cependant, rien ne nous permet de trancher entre la forme monomère ou tétramère. De même, rien ne nous permet de dire quels sont les effets, hydrophobes ou électrostatiques, qui gouvernent le mécanisme d'interaction de la mélittine avec la tricouche. Néanmoins, l'effet spectaculaire de destruction de la tricouche semble se rapprocher de l'effet de la mélittine sur les érythrocytes.

Afin d'aller plus loin dans nos investigations et notamment afin de préciser l'orientation de la mélittine dans la tricouche de DOPS, nous avons analysé les spectres PM-IRRAS obtenus pour trois quantités croissantes de mélittine. Les spectres obtenus sont présentés ci-dessous.

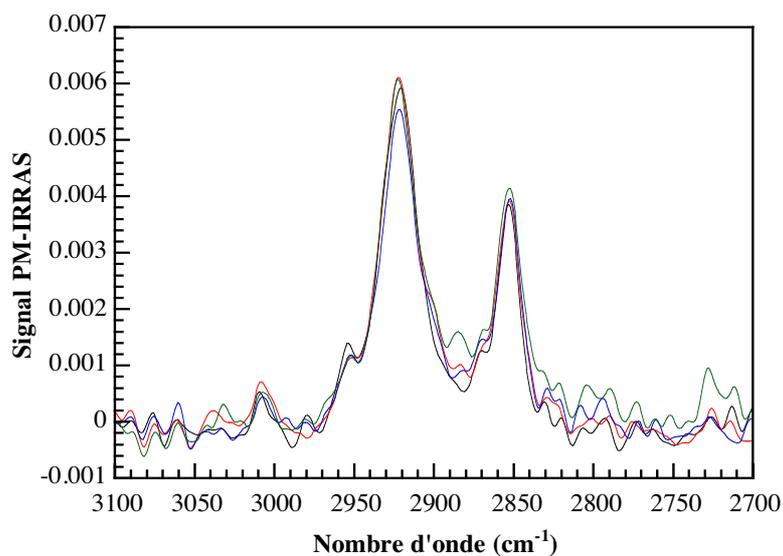


Figure 1 : Spectres PM-IRRAS dans le domaine des vibrations antisymétrique et symétrique de la liaison C-H des groupements  $\text{CH}_2$  de la tricouche de DOPS après injection de mélittine. Les spectres en rouge, bleu et vert correspondent respectivement à des rapports molaires mélittine-DOPS égaux à 1/210, 1/105, 1/70. Le spectre en noir est celui de la tricouche de DOPS seule.

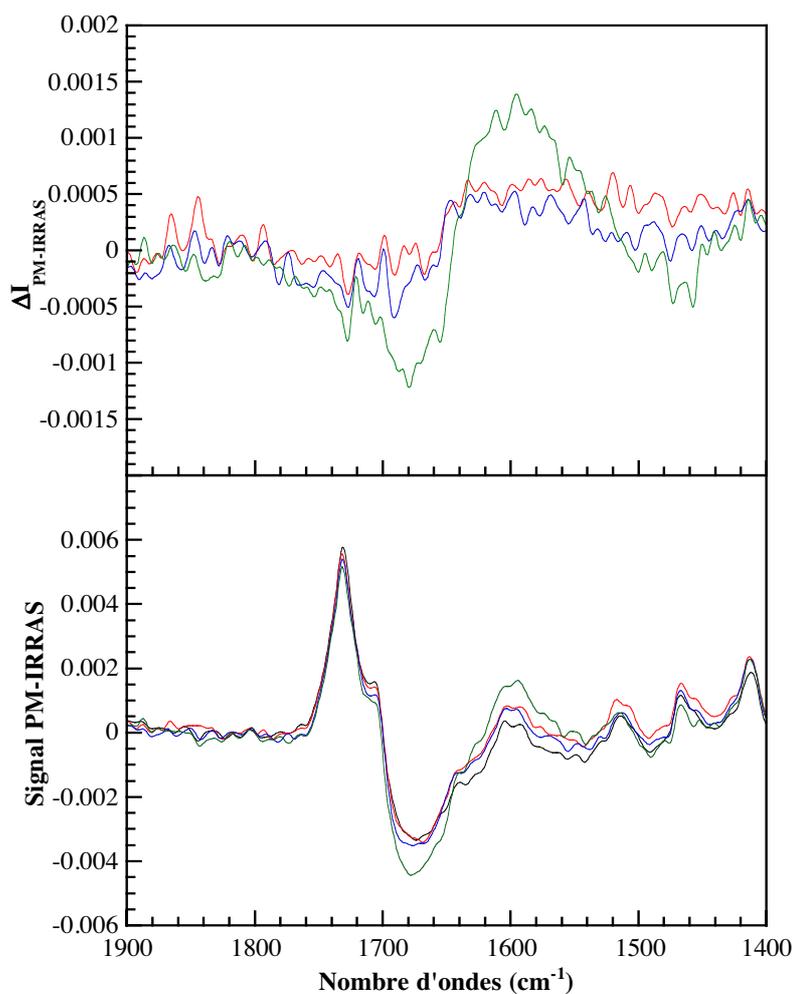
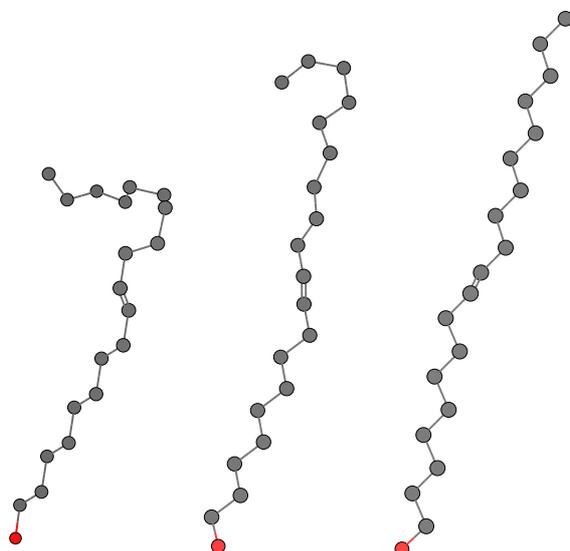


Figure 2 : Spectres PM-IRRAS et spectres différence (avec le spectre de la tricouche de DOPS seule en noir) dans le domaine des basses fréquences après injection de mélittine. Les spectres en rouge, bleu et vert correspondent respectivement à des rapports molaires mélittine-DOPS égaux à 1/210, 1/105, 1/70.

Dans le domaine des hautes fréquences (figure 1), l'ajout de quantités croissantes de mélittine se traduit par une légère augmentation de l'intensité et une modification des fréquences des deux élongations des liaisons C-H des groupements CH<sub>2</sub>. Seul l'effet sur la bande d'élongation symétrique située vers 2850 cm<sup>-1</sup> est facilement interprétable car ce mode n'est pas perturbé par d'autres modes de vibration. Le décalage observé vers les basses fréquences est généralement associé à la rigidification des chaînes carbonées. De plus, on peut supposer que la légère augmentation de l'intensité de la bande provient de cette rigidification ; en moyenne, la direction des moments de transition des groupements CH<sub>2</sub> est plus horizontale à cause d'une diminution du nombre de conformations gauche (voir schéma 21). Ce résultat est en accord avec l'observation faite sur le DPPC par l'équipe de R. Mendelsohn [18].



*Schéma 21 : Redressement des chaînes carbonées oléoyl du DOPS dû à la diminution du nombre de conformations gauche.*

Par ailleurs, on peut remarquer que le rapport des intensités des vibrations antisymétrique et symétrique reste constant quelque soit la quantité de mélittine insérée. Ce qui signifie que la quantité de molécules présentes à la surface ne varie pas ; il n'y a donc pas de perte de matière dans la sous-phase. Cette observation suggère également que les agrégats observés en Brewster ont une organisation régulière. En effet, la présence d'agrégats de structure désordonnée se traduirait par une diminution de l'intensité, leur contribution donnant une intensité PM-IRRAS nulle en moyenne (toutes les orientations étant distribuées).

Dans le domaine des basses fréquences (figure 2), on observe une intensification de la bande du creux de l'eau pour le rapport molaire mélittine-phospholipide le plus élevé (1/70).

Cet effet se traduit sur le spectre différence (spectre en présence de méliittine moins le spectre de la tricouche de DOPS seule) par l'apparition d'une bande négative de faible intensité (environ  $10^{-3}$ ) au niveau du mode amide I vers  $1677\text{ cm}^{-1}$ . Aucun changement significatif n'est observé pour les rapports plus faibles. Nous avons montré au cours d'études antérieures sur monocouches que la sensibilité du montage PM-IRRAS n'était pas suffisante pour pouvoir détecter efficacement les bandes amide des peptides pour des rapports molaires peptide-phospholipide inférieurs à 1/50. C'est pourquoi, pour les quantités de méliittine injectées, les effets sont faibles ou ne sont pas détectés. De plus, aucune perturbation n'apparaît au niveau du mode amide II vers  $1514\text{ cm}^{-1}$ . Son intensité étant encore plus faible que le mode amide I, les effets dus à la méliittine sont probablement dissimulés dans le bruit du spectre. Cependant, par comparaison avec les spectres simulés en fonction de l'orientation de la méliittine (figure 3), l'effet d'intensification du creux observé au niveau du mode amide I laisse supposer que la méliittine n'est pas à plat, contrairement à ce qui a été observé sur monocouches, mais est plutôt redressée. Ce résultat suggère que la forme très découpée des contours des domaines de tricouche restant après action de la méliittine observée sur l'image Brewster 1, f peut être attribuée à des molécules de méliittine entourant des molécules de phospholipide.

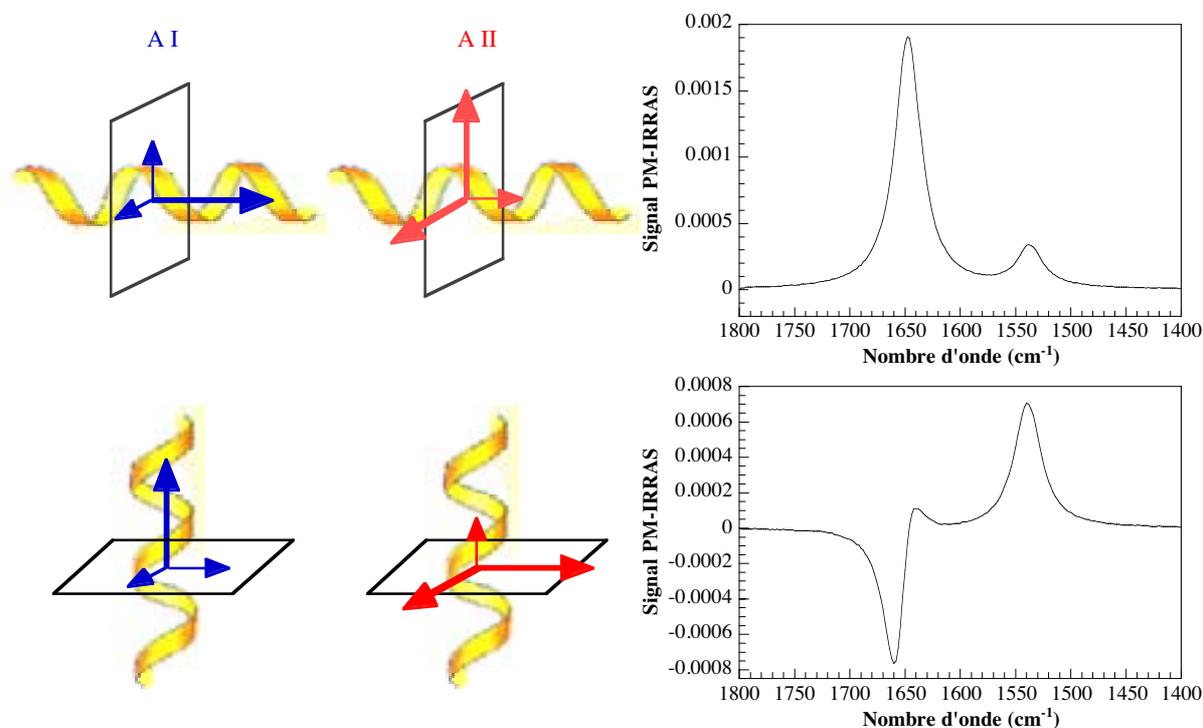


Figure 3 : Spectres PM-IRRAS simulés pour les modes de vibration amide I et II dans le cas d'une hélice parallèle et perpendiculaire au plan.

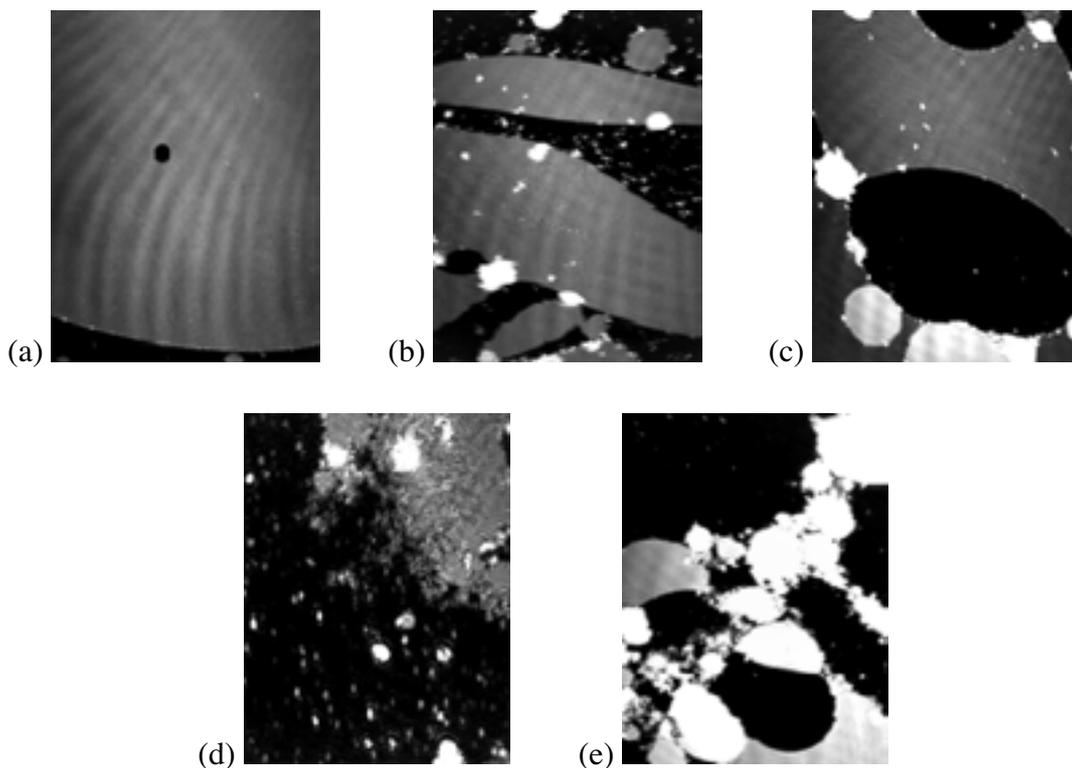
D'autre part, sur le spectre PM-IRRAS (figure 2), on observe des variations d'intensité au niveau de la vibration du carbonyle à  $1731\text{ cm}^{-1}$ , de la vibration antisymétrique de la liaison  $\text{PO}_2^-$  à  $1238\text{ cm}^{-1}$  et de la vibration de la liaison C-O-P à  $1062\text{ cm}^{-1}$ . La quantité de matière à l'interface étant constante, ces effets traduisent un changement d'orientation de la tête polaire choline du DMPC provoqué par l'ajout de mélittine dans la sous-phase. De plus, l'élargissement de la bande de vibration antisymétrique de la liaison  $\text{PO}_2^-$  (sensible aux liaisons hydrogène) signifie que les charges négatives des groupements  $\text{PO}_2^-$  interagissent avec les charges positives de la mélittine.

D'après l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que les effets de la mélittine sur la tricouche de DOPS se manifestent principalement par une modification des bandes de vibration du phospholipide. Les effets sur les bandes de la mélittine n'ont pu être observés qu'au niveau du mode amide I et pour le rapport molaire peptide-phospholipide de 1/70. Afin de confirmer et de préciser les résultats de cette étude préliminaire, il serait nécessaire de réaliser une étude sur  $\text{D}_2\text{O}$  qui permettrait d'observer la bande amide I en s'affranchissant du creux dû à l'indice de réfraction de l'eau. L'ajout d'un polariseur en sortie permettrait d'augmenter la détectivité du montage expérimental en créant une intensification des bandes sur le spectre PM-IRRAS. La mélittine possédant un résidu tryptophane, on peut également envisager une étude en microscopie de fluorescence, qui permettrait de connaître la localisation de la mélittine dans la tricouche de DOPS. De plus, la fluorescence étant un processus rapide, on pourrait avoir accès à la cinétique du mécanisme d'insertion de la mélittine dans la tricouche de DOPS.

## **IV.2. Système mixte DOPS-DMPC**

Le mélange DOPS-DMPC dans les proportions molaires 95%-5% ayant également formé des tricouches, j'ai étudié l'effet de la mélittine sur ce système pas uniquement composé de charges négatives. Les images Brewster (images 3), enregistrées pour deux rapports molaires peptide-phospholipide égaux respectivement à 1/143 (images 3b et 3c) et à 1/71,5 (images 3d et 3e), ont montré des effets identiques à ceux observés pour la tricouche de DOPS seule. L'état de la surface initiale est présenté image 3a. Après injection de la mélittine

dans la sous-phase, on voit que les domaines de monocouches (en noir) croissent au profit des domaines de tricouches (en gris), majoritaires au départ. On voit également apparaître des agrégats très lumineux, quelque soit le temps d'obturation de la caméra, qui semblent se former plutôt au niveau des contours de domaines de monocouches. Plus la quantité de mélittine injectée est importante, plus il se forme d'agrégats. Sur l'image 3d, on voit les domaines de tricouche en train de se désagréger et les molécules de phospholipides qui la constituaient se disperser à la surface.



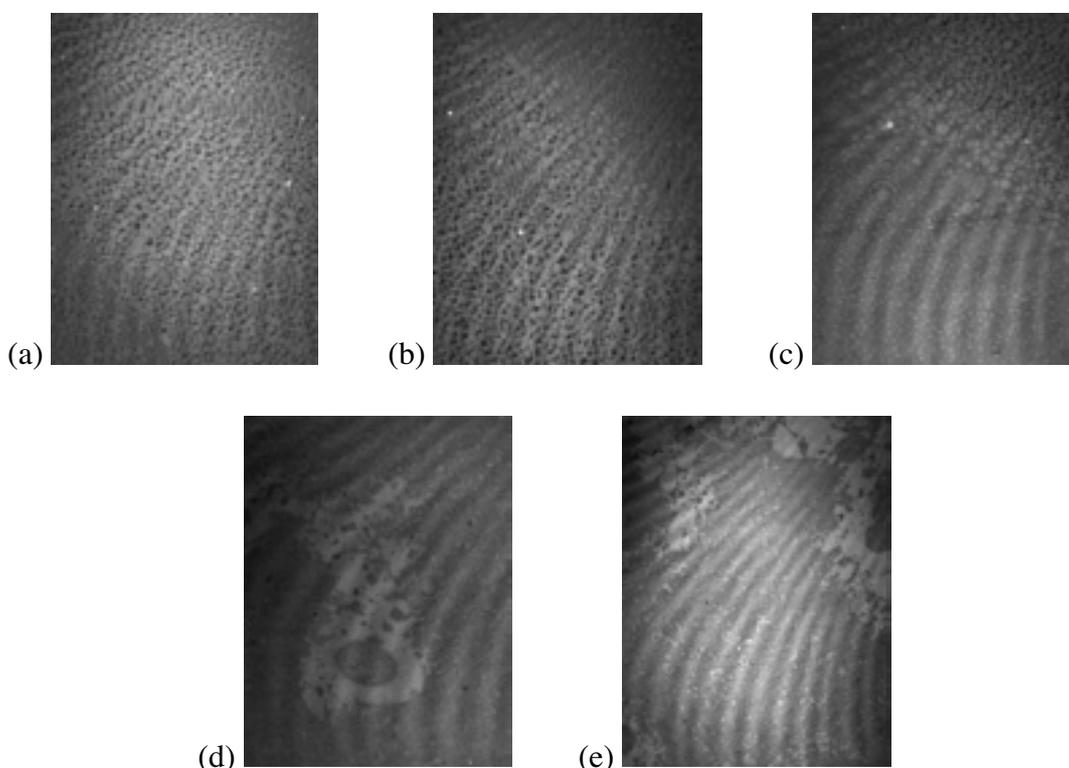
*Images 3 : Images Brewster enregistrées avec un temps d'obturation au 500<sup>ième</sup> de seconde pour le système DOPS-mélittine. L'image (a) représente la tricouche du système mixte seul, les images (b) et (c) correspondent à un rapport molaire mélittine-phospholipide de 1/143 et les images (d) et (e) à un rapport de 1/71,5.*

D'après ces observations, nous pouvons déduire que ce comportement est identique à celui observé pour la tricouche de DOPS seule. L'injection de la mélittine dans la sous-phase provoque rapidement des effets catastrophiques sur la tricouche qui se manifestent par sa destruction progressive. Il est à nouveau raisonnable de penser que la mélittine s'est insérée dans la tricouche du système mixte DOPS-DMPC en provoquant, du fait de son insertion, l'exclusion de molécules de phospholipides qui, soit, se réorganisent à la surface pour former une monocouche, soit, participent à la formation de domaines de plus en plus épais (agrégats).

Pour des raisons de non reproductibilité, cette expérience n'a pu être complétée par une étude en spectroscopie PM-IRRAS.

### IV.3. Bicouche supportée de DMPC sous une monocouche d'OTMS polymérisé

Cette partie constitue une étude exploratoire des effets de la mélittine sur la bicouche de DMPC supportée sous une monocouche d'OTMS polymérisé. Nous ne disposons pas, au moment de l'expérience, d'une cuve permettant la vidange de la sous-phase, c'est pourquoi il restait des SUV de DMPC lorsque la mélittine a été injectée. Dans ces conditions, les effets que j'ai observés n'ont pas été aussi importants que pour la tricouche de DOPS.



Images 4 : Images Brewster enregistrées lors de l'injection de mélittine sous la bicouche de DMPC supportée sous la monocouche d'OTMS polymérisé. L'image (a) représente la surface de bicouche seule. Les images (b), (c), (d), (e) correspondent respectivement à une concentration de mélittine dans la sous-phase de  $40,5 \text{ nmolL}^{-1}$ ,  $0,3 \mu\text{molL}^{-1}$ ,  $0,48 \mu\text{molL}^{-1}$  et  $0,57 \mu\text{molL}^{-1}$ .

Sur les images 4, je présente les images Brewster de la bicouche de DMPC en interaction avec des quantités croissantes de mélittine. Ce n'est qu'à partir de l'image 4c, qui correspond à une concentration en mélittine dans la sous-phase de  $0,48 \text{ mmolL}^{-1}$ , que des domaines plus lumineux apparaissent à la surface. Ils grossissent ensuite pour des quantités de mélittine encore plus importantes (images 4d et 4e). Cependant, la différence de niveau de

gris de ces domaines par rapport à celui de la surface initiale (image 4a) n'est pas suffisante pour être associée à la formation de surépaisseurs. Elle doit être plutôt attribuée à une légère variation d'indice et d'épaisseur, due à une rigidification de la bicouche de DMPC provoquée par l'insertion de la mélittine. Par ailleurs, nous pouvons constater que les premiers effets notoires causés par la mélittine se sont produits à une concentration bien supérieure aux quelques  $\text{nmolL}^{-1}$  injectés sous la tricouche de DOPS. Ce résultat laisse supposer que la mélittine a d'abord interagi avec les vésicules de DMPC dans la sous-phase avant d'interagir avec les molécules de phospholipides présentes à la surface. De plus, contrairement au DOPS chargé négativement, le DMPC est un phospholipide zwitterionique. Il aurait donc été préférable de travailler avec une sous-phase salée afin de favoriser la montée de la mélittine à l'interface.

Ces premiers résultats obtenus dans le cadre d'une étude préliminaire ouvrent la voie à des études plus approfondies. Des conditions plus favorables permettraient de poursuivre cette étude en utilisant notamment des mélanges de phospholipides afin de diversifier les charges électrostatiques de la bicouche et de moduler sa fluidité. Il serait également intéressant d'utiliser des vésicules dans lesquelles seraient incorporées des protéines. Ainsi, nous pourrions étendre le champ d'investigation de cette méthode aux protéines membranaires, qui seraient dénaturées par injection directe dans la sous-phase aqueuse. Par ailleurs, la spectroscopie PM-IRRAS permettrait de préciser l'orientation de la mélittine dans les bicouches de phospholipides. D'autre part, nous pourrions envisager une étude en microscopie de fluorescence afin de connaître la localisation de la mélittine dans la bicouche.

## **V. Conclusion**

Les études décrites dans cette partie montre qu'il est pertinent de travailler avec des multicouches dont l'épaisseur hydrophobe reproduit celle des membranes naturelles. En effet, contrairement aux résultats obtenus sur monocouches, la mélittine dans la tricouche de DOPS semble adopter une orientation transmembranaire plutôt que parallèle au plan de la couche. Ce résultat obtenu pour la première fois suggère que l'épaisseur hydrophobe des membranes joue un rôle essentiel dans le mécanisme d'insertion des peptides. De plus, la rapidité de la

cinétique d'action de la mélittine chargée positivement sur la tricouche de DOPS chargée négativement est plutôt en faveur d'une première étape de montée de la mélittine à l'interface gouvernée par les forces électrostatiques. Les modifications des bandes de vibration de liaisons de la tête choline suite à l'injection de mélittine montrent également que la mélittine a interagi avec les têtes polaires des molécules du DOPS. D'autre part, la forme découpée des contours des domaines de tricouche observée en microscopie à l'angle de Brewster et l'apparition d'une bande négative au niveau du mode amide I en spectroscopie PM-IRRAS suggère que les molécules de mélittine en hélices- $\alpha$  forment une barrière qui entoure des molécules de DOPS. Ce résultat montre que les interactions hydrophobes interviennent également dans le processus d'insertion de la mélittine dans les membranes. Son effet destructeur sur la tricouche de DOPS est à rapprocher de son activité lytique sur les érythrocytes.

La méthode de formation d'une bicouche par éclatement de vésicules, améliorée avec l'utilisation d'une cuve qui permettra la vidange de la sous-phase, semble également très prometteuse pour l'étude des interactions des membranes avec les peptides et les protéines membranaires. La modification des caractéristiques physico-chimiques de la sous-phase permettra notamment d'étudier l'influence de facteurs comme la force ionique ou le pH sur la nature de ces interactions.

## Bibliographie

- [1] M. Daune. *Biophysique Moléculaire, Structures en mouvement*. Interéditions, Paris, 1993.
- [2] D. Eisenberg and al. 1982. *Nature*, 299, 371.
- [3] D. Bertrand and E. Dufour. *La Spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Ed. Tec & Doc, 2000.
- [4] K. P. C. Vollhardt and N. E. Schore. *Traité de Chimie Organique*. Ed. De Boeck Université, Bruxelles, 1995.
- [5] C. Branden, J. Tooze. *Introduction à la structure des protéines*. Ed. De Boeck Université, Paris, Bruxelles, 1996.
- [6] E. Shechter. *Biochimie et Biophysique des membranes, Aspects structuraux et fonctionnels*. Masson, Paris, 1997.
- [7] G. D. Fasman. *Poly- $\alpha$ -amino acids. Protein models for conformational studies. Chap. 2. Infrared spectra and helical conformations*. T. Miyazama. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [8] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux and J. M. Ruyschaert. *Subcellular biochemistry*. Vol. 23. Ed. H. J. Hilderson and G. B. Ralston. Plenum press, New York. 1994.
- [9] E. Habermann and K. G. Reiz. 1964. *Naturwiss.*, 51, 61.
- [10] E. Habermann. 1972. *Science*, 177, 314.
- [11] E. Haberman and J. Jentsch. 1967. *Hope-Seylers Z. Physiol. Chem.*, 348, 37.
- [12] G. Sessa and al. 1969. *J. Biol. Chem.*, 244, 3575.
- [13] A. S. Ladokhin and al. 1997. *Biophys. J.*, 72, 1762.
- [14] S. Rex and G. Schwarz. 1998. *Biochemistry*, 37, 2336.
- [15] A. S. Ladokhin and S. H. White. 2001. *BBA*, 1514, 253.
- [16] S. Frey and L. K. Tamm. 1991. *Biophys. J.*, 60, 922.
- [17] I. Cornut and al. 1996. *Biophys. J.*, 70, 305.
- [18] C. R. Flach and al. 1996. *Biophys. J.*, 70, 539.
- [19] C. E. Dempsey. 1990. *BBA*, 1031, 143.
- [20] E. J. Dufourc and al. 1986. *Biochemistry*, 25, 6448.
- [21] E. J. Dufourc and al. 1986. *FEBS Lett.*, 201, 205.

- [22] J. Dufourcq and al. 1986. BBA, 859, 33.
- [23] Y. Shai. 1999. BBA, 1462, 55.
- [24] L. Yang and al. 2001. Biophys. J., 81, 1475.
- [25] M. T. Tosteson and al. 1985. J. Membr. Biol., 87, 35.
- [26] R. Maget-Dana. 1999. BBA, 1462, 109.
- [27] M. Bhakoo and al. 1982. Biochemistry, 21, 6879.
- [28] H. S. Hendrickson and al. 1983. Arch. Biochem. Biophys. 227, 242.
- [29] S. Ohki and al. 1994. BBA, 1194, 223.

## CHAPITRE V \_ SPECTROSCOPIE VCD

En 1811, Arago découvre qu'un cristal de quartz a la propriété de faire tourner le plan de polarisation de la lumière. Quatre ans plus tard, Biot montrent que certains liquides et solutions possèdent également cette propriété. Ces deux observations ont ouvert la voie à de nombreuses investigations et interrogations sur l'activité optique. Par ailleurs, en 1848, Pasteur montre que l'acide tartrique ( $\text{HO}_2\text{C-CHOH-CHOH-CO}_2\text{H}$ ) peut exister sous deux formes spéculaires qui se différencient par un arrangement différent des atomes de la molécule dans l'espace (schéma 1). Émerge alors la notion de chiralité<sup>1</sup>, propriété d'une molécule à être non superposable à son image dans un miroir, notion introduite en 1884 par Lord Kelvin lors d'une conférence à Baltimore. On comprend alors qu'activité optique et chiralité sont étroitement imbriquées ; seules les molécules chirales possèdent une activité optique [1].

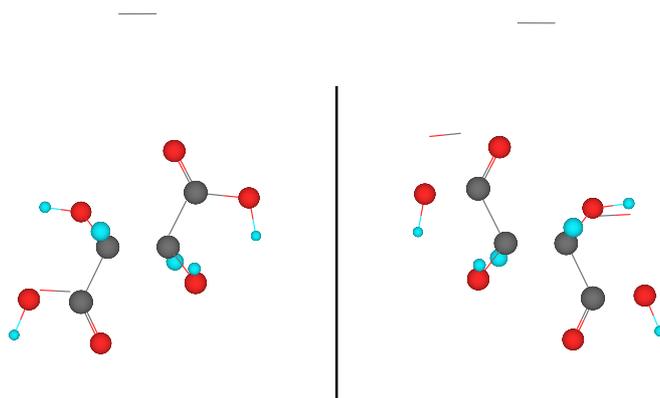


Schéma 1 : Énantiomères de l'acide tartrique non superposables.

L'activité optique peut en fait s'expliquer en terme de biréfringence ou de dichroïsme circulaire [2]. Dans le cas d'une substance non absorbante, la rotation du plan de polarisation d'une lumière polarisée rectilignement est due à une différence de propagation entre une lumière polarisée circulairement droite (d) et une lumière polarisée circulairement gauche (g). On montre en effet qu'une onde plane polarisée rectilignement est la superposition d'une onde plane polarisée circulairement droite et d'une onde plane polarisée circulairement gauche [3]. Ainsi les deux états circulaires de l'onde ne seront pas transmis à la même vitesse

---

<sup>1</sup> Du grec "kheir" la main

par une solution de molécules chirales dans une configuration donnée. Dans ce cas, l'activité optique provient d'une biréfringence dite circulaire c'est-à-dire que l'indice de réfraction  $n$  de la substance est fonction de l'état de polarisation circulaire de la lumière. L'angle de rotation du plan de polarisation s'exprime par la relation  $\theta = \frac{\pi l}{\lambda}(n_g - n_d)$  où  $l$  est le chemin optique parcouru par la lumière dans la substance chirale et  $\lambda$  la longueur d'onde du rayonnement incident. Dans le cas d'une substance absorbante, l'activité optique ne se manifeste pas seulement par une rotation du plan de polarisation mais également par un changement d'état de polarisation de la lumière incidente qui devient elliptique. L'ellipticité de l'onde  $e$  est définie par la relation  $e = \frac{\pi l}{\lambda}(k_g - k_d)$  où  $k$  est le coefficient d'extinction de la substance chirale. L'activité optique résulte alors d'une différence d'absorption entre les deux composantes polarisées circulairement droite ou gauche de l'onde incidente polarisée rectilignement. L'interaction des molécules chirales dans une configuration donnée avec un état de polarisation circulaire sera favorisée par rapport à l'autre.

Dès lors que les notions de chiralité et activité optique ont été établies, la détermination de la structure des molécules est devenue un enjeu majeur pour les chercheurs. C'est notamment dans la perspective d'obtenir de nouvelles informations sur la structure des molécules chirales que l'utilisation d'un rayonnement polarisé circulairement s'est imposé. Cette voie a ouvert un nouveau champ d'investigation pour la spectroscopie. En effet, la polarisation circulaire d'une onde ajoute une dimension supplémentaire à la spectroscopie moléculaire puisqu'un échantillon composé de molécules chirales aura une réponse différente selon que la lumière est polarisée circulairement gauche ou droite. C'est cette propriété des substances chirales qui est mise à profit pour déterminer leur structure.

Dans un premier temps, elle s'est développée dans le domaine de l'UV-visible, les transitions entre niveaux électroniques étant particulièrement intenses. Cependant, bien que le dichroïsme circulaire électronique soit sensible, il ne peut s'appliquer qu'à des molécules chirales possédant un chromophore, qui excité par un rayonnement dans le domaine de l'UV-visible, va induire des transitions entre niveaux électroniques.

Plus récemment, grâce au développement des techniques instrumentales (spectromètres à transformée de Fourier, modulateur photoélastique, détecteurs), s'est développé le dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD en anglais). Plus sélectif que son homologue électronique du fait des nombreux niveaux vibrationnels qui existent dans une molécule dans son état fondamental, son formalisme et sa mise en œuvre sont également plus simples que ceux de l'activité optique Raman (ROA).

Aujourd'hui, le VCD offre des perspectives nouvelles pour la détermination des structures des molécules chirales. Une des applications la plus immédiate est la mesure directe de l'excès énantiomérique d'un mélange à partir de son spectre VCD. L'avantage du VCD dans ce cas est qu'il ne nécessite pas la séparation préalable des deux énantiomères comme c'est souvent le cas pour les techniques usuelles (chromatographie, RMN).

Une deuxième application du VCD, qui est apparue avec le développement des calculs numériques *ab initio* et l'amélioration des performances des ordinateurs, est la détermination de la configuration absolue d'une molécule. Cette méthode exige la simulation numérique du spectre VCD de la molécule dans une configuration donnée et la comparaison avec le spectre VCD expérimental ; si le signe et l'intensité des bandes du spectre expérimental coïncident avec ceux du spectre calculé alors la configuration de l'échantillon correspond à celle de la molécule simulée sinon c'est la configuration miroir. Cette méthode peut être étendue à la détermination de la conformation dans le cas de molécules constituées de plus de quatre atomes. Néanmoins, la puissance des calculateurs actuels n'étant pas suffisante pour effectuer des calculs numériques au-delà de vingt atomes, cette application reste limitée aux petites molécules.

Une troisième application du VCD consiste à déterminer la conformation des molécules biologiques et plus particulièrement la structure secondaire des peptides et protéines. L'enregistrement des spectres VCD de protéines de structures secondaires connues dans le domaine des modes de vibration de la liaison peptidique montre que la forme de la bande VCD Amide I est caractéristique de la structure secondaire [4]. Par exemple, sur le spectre VCD de l'hémoglobine (fig. 1, a), la forme spectrale est caractéristique d'une structure en hélice- $\alpha$  tandis que pour la concanavaleine A (fig. 1, c), elle est caractéristique d'une structure

en feuillets- $\beta$  anti-parallèles. Les protéines composées d'un mélange de plusieurs structures présenteront un spectre également caractéristique qui sera un mélange des spectres de chacune des structures comme c'est le cas du lysozyme (fig. 1, b). Par comparaison, on peut voir sur les spectres d'absorption de ces trois protéines que les formes et les intensités relatives des bandes amide I et II sont quasiment identiques, rendant difficile la détermination de leur structure secondaire à partir de ces spectres.

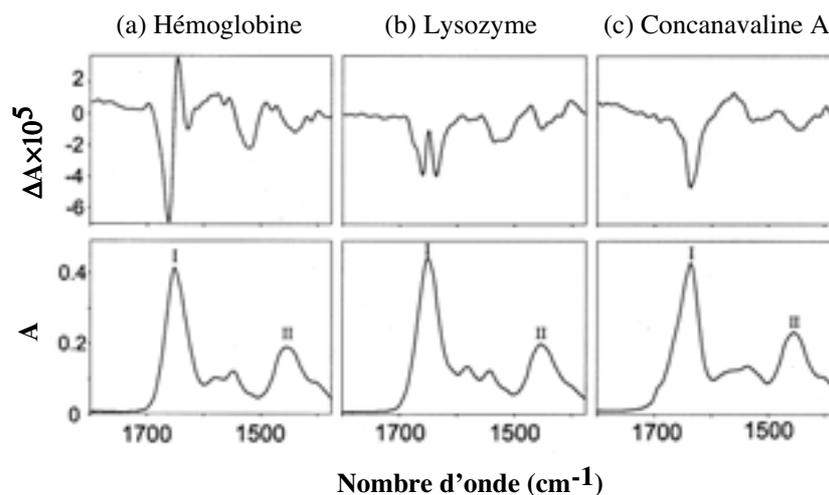


Figure 1 : Spectres d'absorbance (bas) et spectres VCD (haut) de l'hémoglobine (hélice- $\alpha$ ), de la concanaviline A (feuillets- $\beta$  antiparallèle), et du lysozyme (mélange des deux structures)

L'intérêt du VCD pour cette application est d'autant plus marqué que, dans le cas de la détermination de la conformation de petites molécules, l'interconversion des conformères à température ambiante est plus rapide que l'échelle de temps de la RMN. De plus, pour déterminer la structure secondaire des protéines, le VCD ne nécessite pas de mise en œuvre particulière comme c'est le cas pour d'autres techniques (diffraction de rayons X, diffraction de neutrons, ...).

Nous verrons par la suite que le VCD peut être aussi utilisé comme un outil pour étudier les changements de conformations de phospholipides dans différents environnements (en solution, en émulsion, en couches supportées). Cela peut donc être un moyen de mettre en évidence les changements induits par l'insertion de protéines membranaires dans des vésicules.

En résumé, le VCD semble être une technique pertinente pour l'étude de la configuration de molécules chirales ou la détermination de conformations de grosses molécules à structure macroscopique chirale. Le développement des méthodes de calculs numériques laisse entrevoir une dimension de plus en plus quantitative du VCD avec confrontation des spectres expérimentaux et des spectres simulés. À l'heure actuelle, le VCD offre pour la plupart des cas qu'une analyse qualitative déjà probante.

Au cours de ce chapitre, je présenterai tout d'abord la théorie du dichroïsme circulaire vibrationnel. Je décrirai ensuite le montage optique expérimental développé au laboratoire au cours de ma thèse et la procédure de calibration que nous avons utilisée pour obtenir le signal VCD à partir des spectres expérimentaux. Je montrerais enfin dans une troisième partie les résultats expérimentaux que j'ai obtenus.

## I. Théorie du dichroïsme circulaire vibrationnel

Le principe du VCD est de combiner la sensibilité stéréochimique de l'activité optique avec la sensibilité structurale de la spectroscopie infrarouge.

### I.1. Définition et expression

Le signal VCD est défini comme la différence d'absorbance d'un échantillon composé de molécules chirales entre une onde polarisée circulairement gauche et une onde polarisée circulairement droite.

$$S_{\text{VCD}} = \Delta A = A_g - A_d \quad (1)$$

Pour des solutions diluées, l'absorbance suit la loi de Beer-Lambert  $A = \epsilon \ell c$  où  $\ell$  est le chemin optique parcouru dans l'échantillon et  $c$  la concentration de la solution. Dans ces conditions, le VCD peut s'exprimer comme une différence des coefficients d'extinction molaire :

$$S_{\text{VCD}} = \Delta \epsilon = \epsilon_g - \epsilon_d. \quad (2)$$

Le principe physique du VCD (processus à un photon) repose sur l'absorption d'une onde infrarouge polarisée circulairement droite ou gauche qui induit une transition entre deux niveaux vibrationnels  $v$  et  $v'$  pour un mode de vibration (fonction de la longueur d'onde incidente) d'une molécule dans son niveau électronique fondamental (schéma 2).

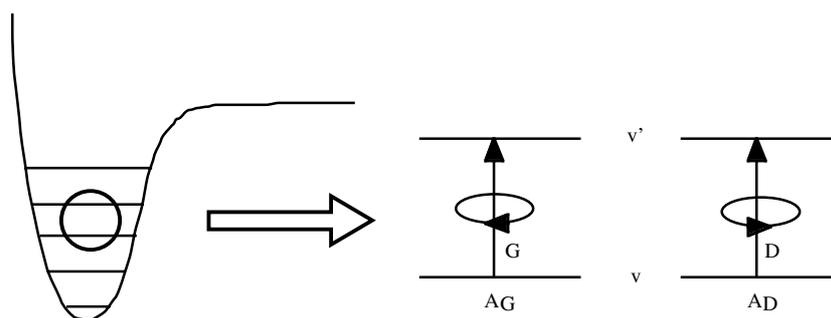


Schéma 2 : Principe physique du dichroïsme circulaire vibrationnel.

Afin de rendre compte du terme physique responsable du VCD, nous allons tout d'abord traiter le cas de l'absorption d'une substance non chirale.

Dans ce cas, l'absorption résulte de l'interaction de la partie électrique du champ électromagnétique  $\mathbf{E}$  avec le moment dipolaire électrique  $\boldsymbol{\mu}$  lors de la vibration des molécules. On montre alors, dans le cadre de la mécanique quantique, que l'absorbance d'un rayonnement infrarouge associé au mode de vibration  $i$  est proportionnelle à la force dipolaire définie par la relation [6, 7, 8] :

$$D_{\text{vvc}}^i = |\boldsymbol{\mu}_i|^2 = \left| \langle \Psi_{\text{v}i} | \boldsymbol{\mu} | \Psi_{\text{v}} \rangle \right|_i^2 = \frac{\hbar}{2\omega_i} \left| \left( \frac{\partial \boldsymbol{\mu}}{\partial Q_i} \right)_v \right|^2 \quad (3)$$

où  $\boldsymbol{\mu}$  est l'opérateur moment dipolaire électrique et  $Q_i$  la coordonnée normale pour le mode de vibration  $i$ . Cette équation rend compte de la variation du moment dipolaire électrique  $\boldsymbol{\mu}$  lors de la transition pour le mode normal de vibration  $Q_i$  à la fréquence  $\nu_i$ .

Il est également intéressant de relier la force dipolaire aux grandeurs définissant la bande d'absorption associée au mode de vibration  $i$ , celle-ci étant directement proportionnelle à l'intensité intégrée de la bande d'absorption [6, 7, 8] :

$$D_{\text{vvc}} = 9,184 \cdot 10^{-39} \int_{\text{bande}} \frac{\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu. \quad (4)$$

Dans le cas d'une substance chirale, on doit ajouter dans le potentiel d'interaction de l'onde avec la matière le terme d'interaction entre la partie magnétique du champ électromagnétique  $\mathbf{B}$  et le moment magnétique  $\mathbf{m}$  qui est non nul dans le cas de molécules chirales. On montre alors que dans le signal VCD ne subsiste qu'un terme proportionnel à la force rotationnelle [6, 7, 8] :

$$R_{\text{vvc}}^i = \text{Im} \left( \langle \Psi_{\text{v}i} | \boldsymbol{\mu} | \Psi_{\text{v}} \rangle \langle \Psi_{\text{v}} | \mathbf{m} | \Psi_{\text{v}i} \rangle \right) = \frac{\hbar}{2} \left( \frac{\partial \boldsymbol{\mu}}{\partial Q_i} \right)_v \left( \frac{\partial \mathbf{m}}{\partial P_i} \right)_v \quad (5)$$

où  $\mathbf{m}$  est l'opérateur moment magnétique et  $P_i$  le moment normal pour le mode de vibration  $i$  relié à la coordonnée normale  $Q_i$  par la relation  $P_i = \frac{\partial Q_i}{\partial t}$ . L'expression (5) montre qu'au cours de la transition il y a simultanément variation du moment dipolaire électrique et du moment dipolaire magnétique. De même que pour la force dipolaire, la force rotationnelle peut être exprimée en fonction des paramètres qui définissent la bande VCD relative au mode de vibration  $i$  [6, 7, 8] :

$$R_{\text{VCD}} = 2.296 \cdot 10^{-39} \int_{\text{bande}} \frac{\Delta\epsilon(\nu)}{\nu} d\nu. \quad (6)$$

Le signal VCD provient donc d'une interaction entre le moment dipolaire et le moment magnétique. D'après l'équation 5, le VCD existe si et seulement si les vecteurs  $\Delta\mu$  et  $\Delta m$  ne sont pas orthogonaux. Nous nous proposons d'illustrer de façon qualitative le principe du VCD sur le schéma 3.

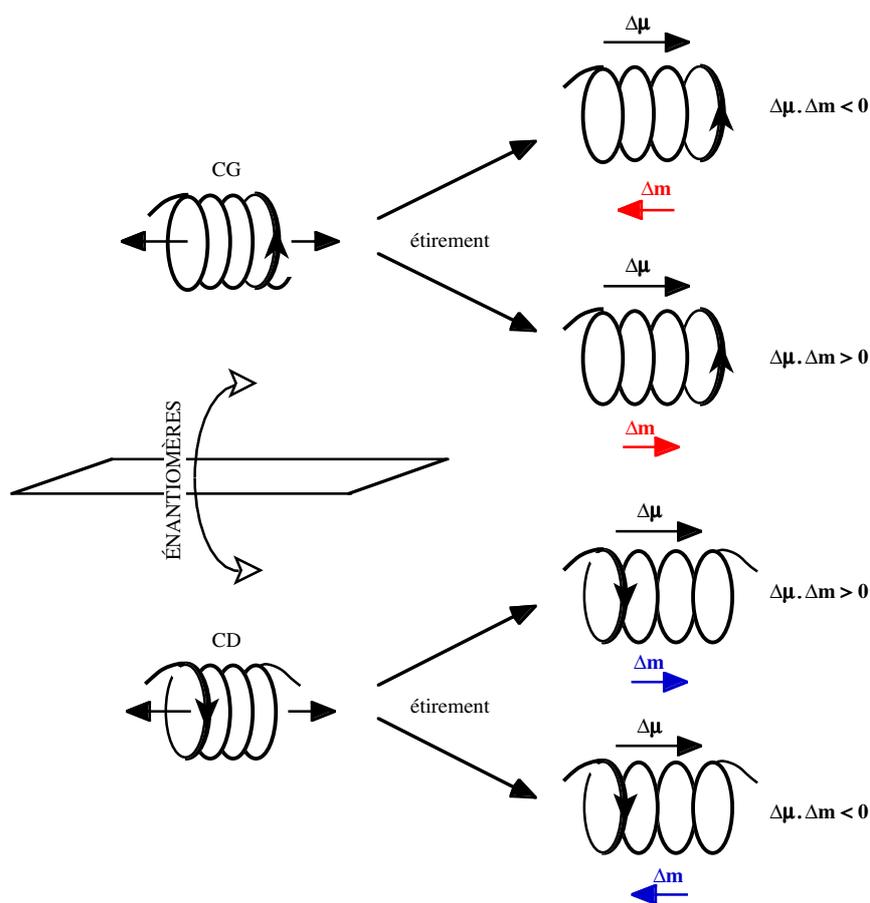


Schéma 3 : Description qualitative du principe du VCD.

Une substance chirale ayant la propriété de faire tourner le plan de polarisation d'une lumière polarisée rectilignement, on choisit de représenter arbitrairement une molécule chirale sous la forme d'une hélice avec un pas tournant à droite (hélice droite). On suppose que, pour un mode de vibration donné, l'absorption d'un rayonnement infrarouge induit une variation du moment dipolaire dirigée selon l'axe de l'hélice schématisé par un étirement de l'hélice. Cette élongation entraîne une modification de la circulation d'électrons selon les spires de l'hélice qui se traduit par la variation du moment magnétique selon l'axe de l'hélice (d'après

la règle du tire-bouchon<sup>2</sup>). La direction du vecteur  $\Delta\mathbf{m}$  peut être soit la même soit opposée à celle du vecteur  $\Delta\boldsymbol{\mu}$ . Ainsi l'intensité VCD sera respectivement positive ou négative. Ceci se manifeste sur les spectres VCD par des bandes orientées positivement ou négativement (fig. 2).

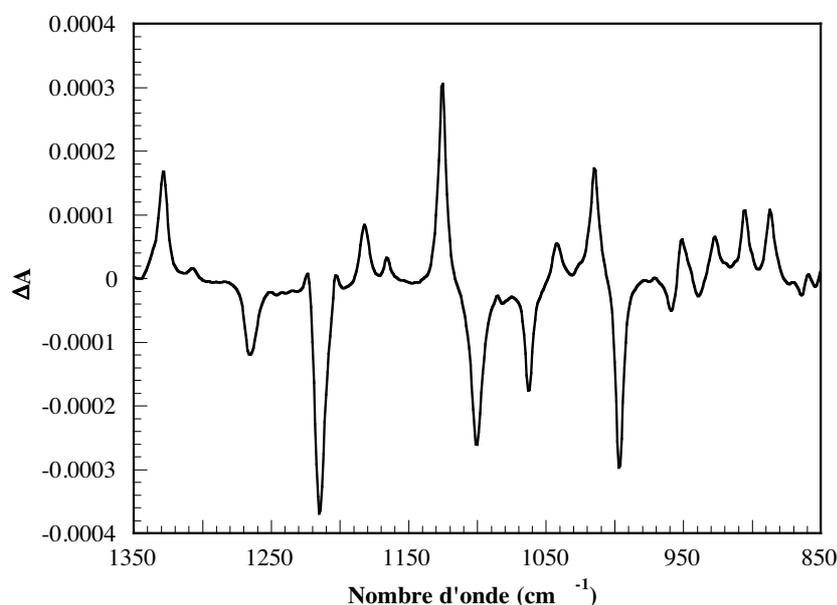


Figure 2 : Spectre VCD du (R)-(+)- $\alpha$ -pinène.

On peut transposer l'explication précédente pour un couple d'énantiomères. Si une molécule chirale est une hélice droite alors son énantiomère sera une hélice gauche. Ainsi pour un mode de vibration donné, le produit scalaire  $\Delta\boldsymbol{\mu}\cdot\Delta\mathbf{m}$  sera positif ou négatif selon l'énantiomère considéré. Leurs spectres VCD seront donc exactement opposés.

En conclusion, le VCD résulte d'un effet combiné entre une oscillation linéaire des charges (due à l'existence d'un dipôle électrique) et une oscillation circulaire des charges (due à l'existence d'un dipôle magnétique). Alors que l'absorption est due uniquement à une oscillation linéaire des charges.

---

<sup>2</sup> Le moment magnétique  $\mathbf{m}$  est défini à partir d'une boucle de courant :

$\mathbf{m} = i\mathbf{S}$  avec  $\mathbf{S}$  vecteur unité de surface de la spire et  $i$  l'intensité circulant sur la spire.

La règle dite du "tire-bouchon" permet de connaître le sens du moment magnétique en fonction du sens de circulation de l'intensité (inverse au sens de circulation des électrons) sur la spire. Si l'intensité parcourt la spire à droite (à gauche), le vecteur moment magnétique est orienté vers la droite (vers la gauche).

## I.2. Rapport d'anisotropie

Afin de pouvoir comparer les spectres VCD de plusieurs échantillons, on définit pour un mode de vibration donné le rapport d'anisotropie  $g$  tel que  $g$  soit le rapport entre l'intensité de la bande VCD et l'intensité de la bande d'absorption [7, 9] :

$$g = \frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon} = \frac{4R_{\text{vv}^\ominus}}{D_{\text{vv}^\ominus}}. \quad (7)$$

Cela revient à normaliser le spectre VCD expérimental par le nombre de molécules présentes dans l'échantillon. D'après les définitions de  $\Delta\varepsilon$  et  $\varepsilon$ ,  $g$  est proportionnel au rapport de la force rotationnelle  $R_{\text{vv},i}$  sur la force dipolaire  $D_{\text{vv},i}$ . Les rapports d'anisotropie varient typiquement entre  $10^{-3}$  et  $10^{-6}$ .

## II. Approche expérimentale du dichroïsme circulaire vibrationnel

Les premiers spectres de dichroïsme circulaire vibrationnel ont été obtenus en 1974 avec des spectromètres dispersifs [5, 6]. Dans ces conditions, en raison de la très faible intensité du signal VCD, les rapports signal sur bruit des spectres obtenus n'étaient pas suffisants pour espérer faire du VCD une technique de choix pour l'étude des systèmes chiraux. C'est grâce au développement des techniques à transformée de Fourier et à l'amélioration de la sensibilité des détecteurs que les investigations de quelques équipes de chercheurs sur la spectroscopie VCD ont pu aboutir. Ainsi en 1979 l'équipe du professeur L. A. Nafie a mesuré pour la première fois un signal VCD à partir de montages optiques utilisant un spectromètre à transformée de Fourier et la technique de modulation de polarisation [10, 11].

Les similitudes des montages optiques des spectroscopies VCD et PM-IRRAS et les performances de notre montage optique en spectroscopie PM-IRRAS nous ont encouragés à développer le VCD au sein du laboratoire, conscients que cette technique pouvait apporter des éléments de réponse nouveaux et pertinents sur les systèmes biologiques possédant des propriétés chirales.

## II.1. Montage optique

Le montage optique utilisé pour le VCD (fig. 3) est inspiré du montage optique de la spectroscopie PM-IRRAS. Je ne présenterai ici que les modifications apportées.

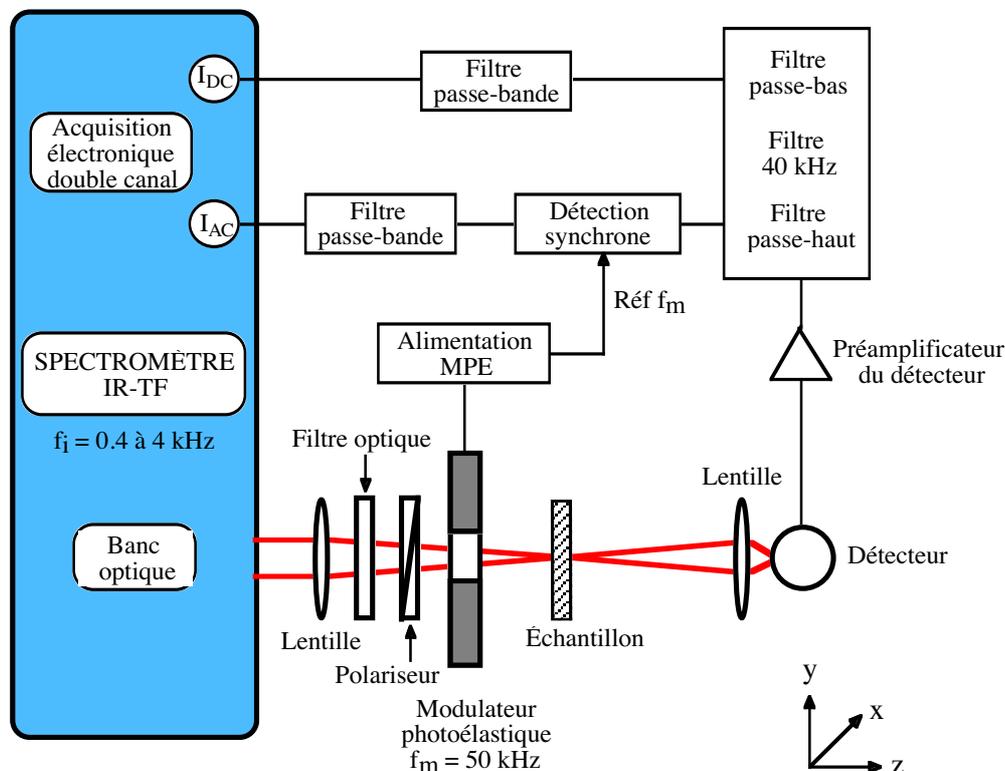


Figure 3 : Montage optique de la spectroscopie VCD

À la sortie du spectromètre infrarouge à transformée de Fourier, nous avons ajouté un filtre après la lentille afin de récupérer un maximum d'énergie dans le domaine spectral étudié. La tension sinusoïdale de fréquence  $f_m$  appliquée aux quartz piézo-électriques du modulateur photoélastique est telle que le cristal en sélénure de zinc se comporte comme une lame quart d'onde. La polarisation du faisceau infrarouge incident est ainsi modulée entre les états de polarisation circulaire droite et gauche. Comme le montre l'expression (11), la modulation s'effectue à la fréquence  $f_m$  et non plus  $2f_m$  comme c'était le cas pour la spectroscopie PM-IRRAS. Le faisceau infrarouge traverse ensuite l'échantillon puis est refocalisé grâce à une lentille sur le détecteur. Un diaphragme placé avant la lentille permet de moduler l'amplitude de l'intensité qui arrive sur le détecteur.

Par analogie avec la spectroscopie PM-IRRAS, l'intensité reçue par le détecteur peut s'écrire [12, 13] :

$$I_d(\bar{\mathbf{v}}_i, t) = \frac{1}{2} I_0(\bar{\mathbf{v}}_i) \left[ (T_d + T_g) + (T_d - T_g) \cos\left(\phi_m(t) - \frac{\pi}{2}\right) \right] \quad (8)$$

Le signe **+** en caractère gras provient de la direction de polarisation du polariseur d'entrée selon l'axe x (signe  $-$  dans le cas du PM-IRRAS où la polarisation s correspond à une orientation selon l'axe y). En VCD, le modulateur photoélastique se comporte comme une lame quart-onde, le déphasage entre les deux composantes circulaire droite et circulaire gauche du champ électrique oscille entre  $-\pi/2$  et  $+\pi/2$ . Tandis qu'en spectroscopie PM-IRRAS le déphasage entre les deux composantes parallèle et perpendiculaire du champ électrique oscille entre  $-\pi$  et  $+\pi$ . Le déphasage introduit par une lame quart-onde est donc décalé de  $\pi/2$  par au déphasage introduit par une lame demi-onde. L'expression (8) peut donc être réécrite de la façon suivante :

$$I_d(\bar{\mathbf{v}}_i, t) = \frac{1}{2} I_0(\bar{\mathbf{v}}_i) \left[ (T_d + T_g) + (T_d - T_g) \sin(\phi_m(t)) \right] \quad (9)$$

avec  $\phi_m(\bar{\mathbf{v}}_i, t) = \phi_0(\bar{\mathbf{v}}_i) \sin(\omega_m t)$ . Ainsi en développant le sinus sur la base des fonctions de Bessel :

$$\sin(\phi_0(\bar{\mathbf{v}}_i) \sin(\omega_m t)) = 2 \sum_{k=0}^{\infty} J_{2k+1}(\phi_0) \sin[(2k+1)\omega_m t] \quad (10)$$

et en limitant grâce à un filtre électronique les fréquences comprises entre 0 et  $f_m$ , on trouve :

$$I_d(\bar{\mathbf{v}}_i, t) = \frac{1}{2} I_0(\bar{\mathbf{v}}_i) \left[ (T_d + T_g) + 2(T_d - T_g) J_1(\phi_0) \sin(\omega_m t) \right] \quad (11)$$

où  $J_1$  est la fonction de Bessel d'ordre 1.

La relation (11) est composée de deux termes :

- $I_{BF}(\bar{\mathbf{v}}_i) = \frac{1}{2} I_0(\bar{\mathbf{v}}_i) (T_d + T_g)$ , terme modulé aux fréquences  $f_i$  de l'interféromètre et
- $I_{HF}(\bar{\mathbf{v}}_i, t) = I_0(\bar{\mathbf{v}}_i) (T_d - T_g) J_1(\phi_0) \sin(\omega_m t)$ , terme doublement modulé, aux fréquences  $f_i$  de l'interféromètre et à la haute fréquence  $f_m$  du modulateur photoélastique.

## II.2. Signal VCD

Les deux signaux de l'intensité  $I_{BF}$  et  $I_{HF}$  modulés à des fréquences différentes sont séparés par des filtres électroniques et le signal  $I_{HF}$  est démodulé grâce à un appareil de détection synchrone. De même qu'en spectroscopie PM-IRRAS, le dernier étage de la détection synchrone introduit un terme proportionnel à  $ge^{-2v\bar{v}_i\tau}$  (où  $\tau$  est la constante de temps de la détection synchrone et  $g$  un terme de gain introduit par la détection synchrone et par les filtres électroniques) lié à une atténuation plus grande des signaux haute fréquence que des signaux basse fréquence. On obtient alors après la détection synchrone, le signal  $I_{DS}$  suivant :

$$I_{DS}(t) = I_0(\bar{v}_i)ge^{-2v\bar{v}_i\tau}(T_d - T_g)J_1(\phi_0) \quad (12)$$

Dans le cadre du traitement informatique, on utilise dans ce cas la correction de phase de de Haseth [14] qui tient compte du signe algébrique de l'intensité. Ainsi le rapport de la transformée de Fourier des signaux  $I_{BF}$  et  $I_{DS}$  donne directement le signal suivant sans valeur absolue :

$$S = \frac{TF(I_{DS})}{TF(I_{BF})} = 2ge^{-2v\bar{v}_i\tau} \frac{(T_d - T_g)J_1(\phi_0)}{(T_d + T_g)} \quad (13)$$

Cette expression peut être exprimée en fonction de la différence d'absorbance entre une onde polarisée circulairement gauche et une onde polarisée circulairement droite. En effet,

$A = -\log T$ , d'où :

$$\frac{(T_d - T_g)}{(T_d + T_g)} = \frac{10^{-A_d} - 10^{-A_g}}{10^{-A_d} + 10^{-A_g}} = \frac{10^{-\left(\frac{A_d - A_g}{2}\right)} - 10^{\left(\frac{A_d - A_g}{2}\right)}}{10^{-\left(\frac{A_d - A_g}{2}\right)} + 10^{\left(\frac{A_d - A_g}{2}\right)}}. \quad (14)$$

Or  $10^x = e^{x \ln 10}$ , l'expression (10) peut donc s'exprimer en fonction d'un logarithme népérien :

$$\frac{e^{-\left(\frac{A_d - A_g}{2}\right) \ln 10} - e^{\left(\frac{A_d - A_g}{2}\right) \ln 10}}{e^{-\left(\frac{A_d - A_g}{2}\right) \ln 10} + e^{\left(\frac{A_d - A_g}{2}\right) \ln 10}} = \frac{-2 \sinh \left[ \left( \frac{A_d - A_g}{2} \right) \ln 10 \right]}{2 \cosh \left[ \left( \frac{A_d - A_g}{2} \right) \ln 10 \right]} = \tanh \left[ \left( \frac{A_g - A_d}{2} \right) \ln 10 \right]. \quad (15)$$

De plus, l'absorbance entre une onde polarisée circulairement gauche et une onde polarisée circulairement droite étant faible, on peut écrire que  $\tanh x \approx x$ , d'où

$$S = \frac{TF(I_{DS})}{TF(I_{BF})} = \Delta A g e^{-2v\bar{v}_i\tau} J_1(\phi_0) \ln 10. \quad (16)$$

Le signal VCD peut donc être extrait à partir de cette expression :

$$S_{\text{VCD}} = \Delta A = \frac{1}{ge^{-2v\bar{v}_i\tau} J_1(\phi_0) \text{Ln}10} \frac{\text{TF}(I_{\text{DS}})}{\text{TF}(I_{\text{BF}})} \quad (17)$$

### II.3. Calibration

L'équation (17) montre que pour obtenir le signal VCD il est nécessaire de déterminer la fonction de Bessel  $ge^{-2v\bar{v}_i\tau} J_1(\phi_0)$ . Pour cela, on procède à la procédure de calibration mise au point par L. A. Nafie [13]. Elle consiste à remplacer l'échantillon par une lame biréfringente suivie d'un polariseur. Deux orientations pour chacun des éléments optiques sont alors possibles ;

- l'axe de biréfringence de la lame est orienté soit parallèlement (||) soit perpendiculairement ( $\perp$ ) par rapport à l'axe de contrainte du modulateur photoélastique,

- la direction de polarisation du polariseur de sortie est soit parallèle (x) soit perpendiculaire (y) à celle du polariseur d'entrée orientée selon l'axe x.

Quatre configurations sont alors possibles :

$$C(x, //, x_y) = \frac{2ge^{-2v\bar{v}_i\tau} J_1(\phi_0) \sin(\alpha_B)}{1 \pm J_0(\phi_0) \cos(\alpha_B)} \quad (18)$$

$$C(x, \perp, x_y) = \frac{-2ge^{-2v\bar{v}_i\tau} J_1(\phi_0) \sin(\alpha_B)}{1 \pm J_0(\phi_0) \cos(\alpha_B)} \quad (19)$$

$\alpha_B$  étant le retard de phase introduit par la lame biréfringente fonction du nombre d'onde du rayonnement incident.

On obtient ainsi deux paires de courbes (fig. 4), chacune correspond à deux courbes qui se croisent dans le même demi-plan.

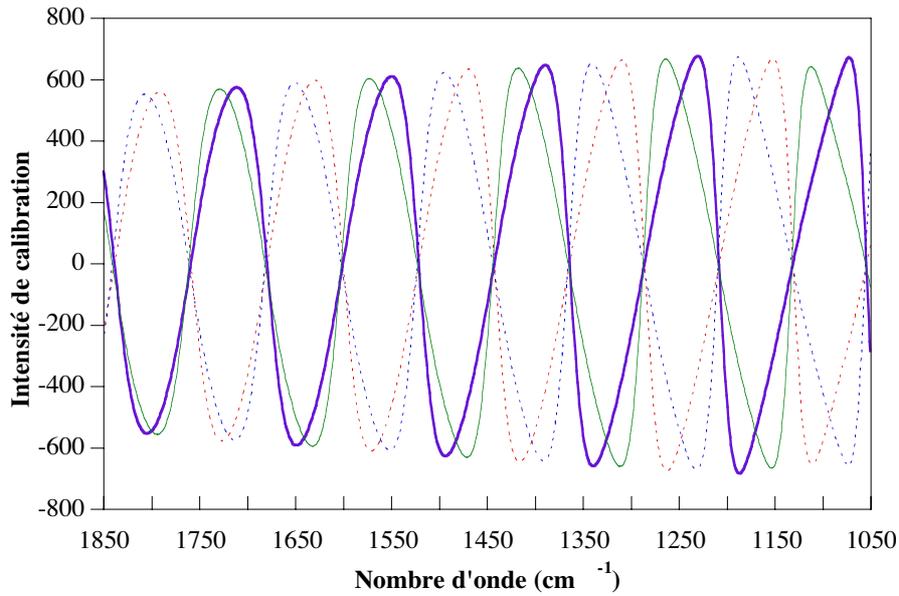


Figure 4: Intensités VCD obtenues lors de la procédure de calibration.

On peut remarquer sur chacune des courbes la décroissance de l'amplitude de l'intensité lorsque le nombre d'onde augmente, conséquence du facteur préexponentiel  $e^{-2\bar{\nu}\tau}$ .

Les courbes deux à deux correspondent respectivement aux configurations  $C(x, //, x)$  et  $C(x, \perp, y)$  ou  $C(x, //, y)$  et  $C(x, \perp, x)$ . L'équation d'une paire de courbes est donnée par l'équation (18) ou (19). Aux points de croisement, le terme  $J_0(\phi_0)\cos(\alpha_B)$  est nul donc  $\cos(\alpha_B) = 0$ ,  $\sin(\alpha_B) = \pm 1$  et les équations (10) et (11) se simplifient selon l'expression suivante :

$$C = \pm 2ge^{(-2\bar{\nu}\tau)}J_1(\phi_0) \quad (20)$$

La courbe de calibration (fig. 5) est donc entièrement décrite en interpolant les points d'intersection d'un même demi-plan (signe  $\pm$ ).

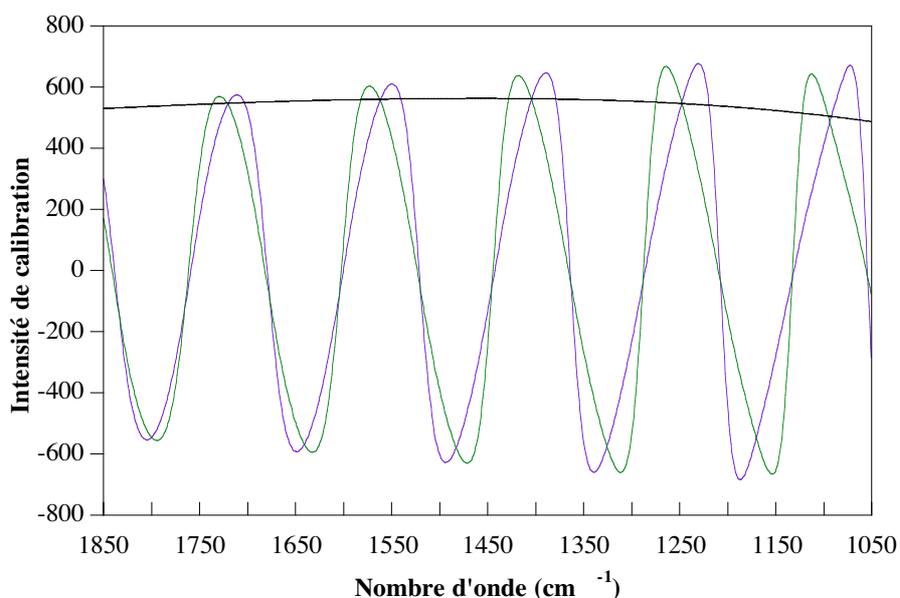


Figure 5 : Courbes de calibration (trait noir)

Le rapport de l'équation 16 avec la courbe de calibration (équation 20) permet ainsi d'obtenir le signal VCD fonction uniquement des signaux expérimentaux de l'échantillon.

### III. Résultats expérimentaux

Les principes du VCD étant désormais établis, je vais maintenant présenter les premiers résultats obtenus avec notre montage expérimental. Les signaux VCD étant très faibles, il est primordial, avant d'entreprendre l'enregistrement d'un spectre VCD, de se placer dans des conditions de détection favorables. D'après des considérations théoriques, il a été démontré, en spectroscopie infrarouge, que le rapport signal sur bruit des spectres est maximal pour une absorbance d'environ 0,4. Nous nous sommes donc appliqués à respecter cette condition afin d'obtenir des spectres VCD de qualité.

Les expériences réalisées s'inscrivent dans notre démarche plus générale sur l'étude des interactions membranes-protéines. Les progrès techniques du VCD survenus ces dernières années en font aujourd'hui un outil de choix pour l'étude de la structure des protéines dans différents solvants ou en interaction avec des lipides dans des vésicules ou des micelles. En effet, connaître les structures des protéines, à partir de techniques expérimentales rapides et fiables, constitue un atout majeur pour élucider la relation qui existe entre la structure et leur

fonction. Afin de préciser dans quel contexte se situent nos recherches, je présenterai tout d'abord les résultats obtenus ces dernières années par la spectroscopie VCD.

### III.1. État des connaissances

Avant l'apparition des techniques de dichroïsme circulaire (ECD puis VCD), la spectroscopie infrarouge, donnant lieu à des transitions bien résolues, a constitué la première méthode pour déterminer la structure secondaire des protéines à partir de l'analyse en fréquence des bandes d'absorption des modes amide. Cependant, la forme des bandes d'absorption n'est pas suffisamment sélective pour permettre une analyse statistique fine s'il y a coexistence de plusieurs structures secondaires comme c'est le cas pour les protéines.

L'émergence du dichroïsme circulaire électronique (ECD), grâce aux transitions électroniques  $n-\pi^*$  et  $\pi-\pi^*$  du groupement amide, a ensuite permis de déterminer la structure secondaire des protéines en solution, à partir de l'analyse en fréquence et de la forme spectrale des bandes d'absorption. Cependant, plusieurs limitations sont inhérentes à cette technique. Les transitions électroniques limitées en nombre sont souvent larges et de ce fait donnent lieu à un recouvrement des bandes qui induit une indétermination sur le pourcentage des structures secondaires présentes dans la protéine.

Le dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD), quant à lui, peut être vu comme la combinaison de ces deux techniques, alliant la diversité de forme des bandes d'absorption du dichroïsme circulaire électronique avec la résolution en fréquence de l'infrarouge. En outre, le VCD est plus sensible que le dichroïsme circulaire électronique aux différents aspects conformationnels des protéines. En effet, les signes et la fréquence des bandes VCD sont plus représentatifs des différents types de structures secondaires qui peuvent exister dans une protéine (hélice- $\alpha$ , feuillet- $\beta$ , structure désordonnée) que pour le dichroïsme circulaire électronique. Ceci vient du fait que les différentes types de structures secondaires contribuent de façon équivalente au spectre VCD tandis qu'en ECD, c'est la structure en hélice- $\alpha$  qui contribue majoritairement au spectre masquant les contributions des autres structures. En pratique, la fréquence des modes de vibration est déterminée à partir du spectre infrarouge, les fréquences des bandes VCD étant perturbées par les effets de solvant et d'environnement, et

les structures secondaires sont déterminées à partir de la forme des bandes VCD. En somme, le VCD apporte de la précision à la spectroscopie infrarouge et va permettre notamment de lever les ambiguïtés sur les proportions de structures secondaires qui absorbent dans le même domaine de longueur d'onde, comme par exemple les hélices- $\alpha$  et les structures désordonnées.

Les premières études en VCD sur la corrélation entre la forme des bandes amide et la structure secondaire ont été effectuées sur des polypeptides dont la structure secondaire est unique et parfaitement connue [7, 15-19]. Ces études se sont principalement focalisé sur le mode amide I (localisé sur la vibration du carbonyle de la liaison peptidique), car sa bande d'absorption est la plus intense et la plus sensible aux structures secondaires des polypeptides et protéines. Le mode amide II (résultant du mélange du mode de déformation de la liaison N-H et du mode d'élongation de la liaison C-N) moins intense est moins pertinent pour la détermination des structures secondaires. Les études sur la bande du mode homologue amide III sont moins nombreuses du fait de son caractère moins bien défini en intensité et en fréquence à cause du recouvrement avec d'autres transitions [19-22].

Les études sur le mode amide I ont été menées pour la plupart dans  $D_2O$  en raison de la forte bande d'absorption de  $H_2O$  vers  $1650\text{ cm}^{-1}$  qui masque la région de la bande amide I. De plus, les études dans  $H_2O$  exigent des trajets optiques très faibles ( $< 20\ \mu\text{m}$ ) et des concentrations élevées afin d'obtenir des valeurs d'absorbance raisonnables (entre 0,2 et 0,6) pour espérer récupérer un signal VCD. Contrairement aux protéines globulaires, dans le cas des polypeptides, on est confronté aux problèmes de solubilité et d'agrégation pour de telles concentrations rendant difficile les études dans  $H_2O$ . Par ailleurs, l'utilisation de  $D_2O$  induit l'échange des protons portés par l'azote du groupement amide avec le deutérium du solvant. Ces derniers étant impliqués dans les liaisons hydrogène à l'origine de la stabilité des structures secondaires des protéines, la deutération partielle va entraîner une dynamique d'échange entre les protons du groupement amide et ceux du solvant différente de celle qui se produit dans  $H_2O$ . Cet effet va alors se traduire par de légères modifications sur la bande du mode amide I qui sera noté dans ce cas amide I'. Les études effectuées dans  $D_2O$  ont montré que la fréquence et la forme de la bande amide I' étaient peu modifiées par rapport à la bande

amide I (voir figure 6). Les caractéristiques de ces bandes sont récapitulées dans le tableau 1 pour les hélices- $\alpha$  droites, les feuillets- $\beta$  et les structures désordonnées (d'après [18] et [23]).

		Forme des bandes du mode Amide I
Hélices- $\alpha$ droites	H <sub>2</sub> O	- (F) / + (f) $\nu^- > \nu_{\max} > \nu^+$
	D <sub>2</sub> O	- (F) / + / -
Feuillets- $\beta$	H <sub>2</sub> O	- (f) / + (F) $\nu^+ > \nu_{\max} > \nu^-$
	D <sub>2</sub> O	idem
Structures désordonnées	H <sub>2</sub> O	+ (f) / - (F) $\nu^+ > \nu_{\max} > \nu^-$
	D <sub>2</sub> O	plus intense

Tableau 1 : Formes des bandes amide I et II observées dans H<sub>2</sub>O et changements observés dans D<sub>2</sub>O. Les signes + et - font référence au signe de la bande par rapport à la ligne de base, (f) et (F) indiquent respectivement une intensité faible ou forte et  $\nu^+$  et  $\nu^-$  sont les fréquences des bandes VCD positives et négatives positionnées par rapport à la fréquence maximum de la bande d'absorption  $\nu_{\max}$  sur le spectre infrarouge.

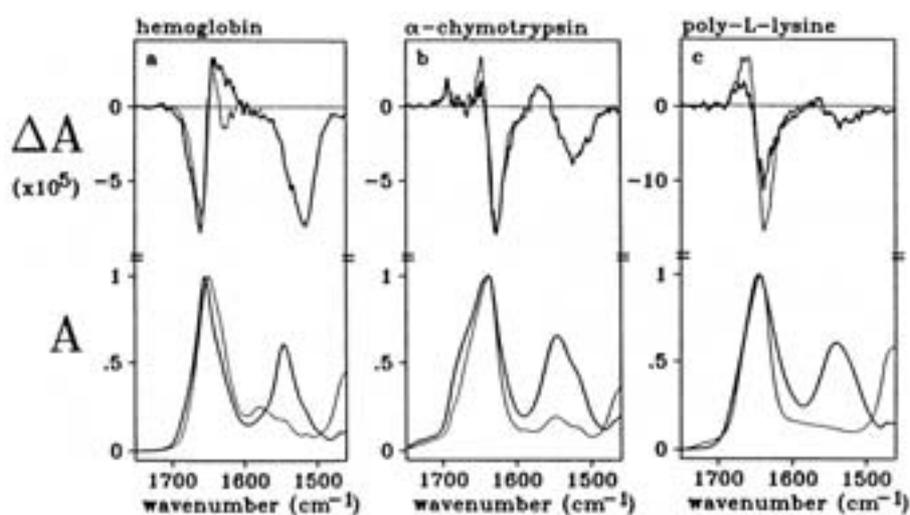


Figure 6 : Spectres IR et VCD de l'hémoglobine (hélice- $\alpha$ ), de la chymotrypsine- $\alpha$  (feuille- $\beta$ ) et de la poly-L-lysine (structure désordonnée) enregistrés dans H<sub>2</sub>O (trait épais) et dans D<sub>2</sub>O (trait fin) (d'après [18]).

Les études sur les protéines [17, 18, 24, 25] ont montré que l'allure des spectres VCD est conservée dans le cas des protéines possédant un type de structure secondaire majoritaire (hélice- $\alpha$ , feuillet- $\beta$ , structure désordonnée) par rapport aux spectres des polypeptides de structure secondaire correspondante. Dans le cas de protéines composées d'un mélange de structures secondaires, par exemple un mélange d'hélice- $\alpha$  et de feuillet- $\beta$ , le spectre VCD résulte de la combinaison du spectre VCD pour une structure secondaire majoritairement en hélice- $\alpha$  et du spectre VCD pour une structure secondaire majoritairement en feuillet- $\beta$  [18].

À l'heure actuelle, seules les protéines globulaires solubles dans l'eau et certains solvants organiques ont fait l'objet d'une étude sur la corrélation entre la forme des bandes VCD et leur structure secondaire. En effet, la plupart des protéines membranaires, mises hors de l'environnement natif, se dénaturent et de ce fait nécessitent un échantillonnage plus complexe. Seule une étude récente sur la conformation de la gramicidine<sup>3</sup> D dans des vésicules de DMPC et dans des micelles de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) ou de DODAC (DiOctadécylDiméthyl Ammonium Chloride) a été répertoriée [26]. Les auteurs ont conclu, d'après les spectres VCD obtenus avec un bon rapport signal sur bruit, que la conformation de la gramicidine D était différente de celle adoptée par la gramicidine dans des solvants organiques. Ce résultat montre que la spectroscopie VCD est également un outil d'analyse pertinent pour l'étude des protéines membranaires et encourage les recherches dans cette voie. C'est dans cette perspective que j'ai orienté mes recherches.

### III.2. Spectre VCD de référence

Dans un premier temps, avant d'entreprendre des études nouvelles, nous avons cherché à optimiser le montage expérimental en réalisant le spectre VCD du Poly( $\gamma$ -Benzyl-L-

---

<sup>3</sup> La gramicidine est un polypeptide produit par *Bacillus brevis* constitué de 15 amino-acides avec une alternance de configurations L et D dans la séquence HCO-Val(L)-Gly-Ala(L)-Leu(D)-Ala(L)-Val(D)-Val(L)-Val(D)-Trp(L)-Leu(D)-X(L)-Leu(D)-Trp(L)-Leu(D)-Trp(L)-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH. On distingue trois types de gramicidine ; la gramicidine A où X = Trp, la gramicidine B où X = Phe et la gramicidine C où X = Tyr. La gramicidine D constituée d'un mélange de gramicidines A (80%), B (5%) et C (15%) est un canal ionique qui assure le transfert de cations monovalents à travers la membrane.

Glutamate) (PBLG) (schéma 4), un polypeptide en hélice- $\alpha$  déjà étudié dans la littérature [27].

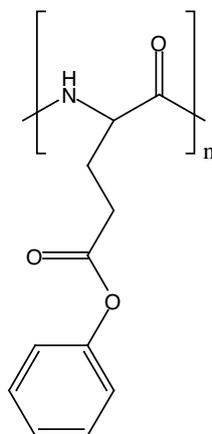


Schéma 4 : Formule chimique du PBG.

Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur le domaine des basses fréquences (entre  $1350$  et  $1850\text{ cm}^{-1}$ ) où sont localisées les bandes amide I et II caractéristiques des structures secondaires des peptides. Le spectre VCD du PBLG enregistré avec notre montage optique est présenté sur la figure 8. Conformément aux spectres enregistrés par les équipes de Nafie et Keiderling [27, 28], on observe pour le mode amide I une bande VCD avec une contribution négative à  $1661,7\text{ cm}^{-1}$  et une contribution positive à  $1654,4\text{ cm}^{-1}$  associée à la bande d'absorption Amide I située à  $1652,5\text{ cm}^{-1}$  sur le spectre infrarouge. Pour le mode Amide II dont la bande d'absorption infrarouge est située à  $1549,2\text{ cm}^{-1}$ , on observe deux bandes négatives à  $1516,2$  et  $1543\text{ cm}^{-1}$ . Aucun signal VCD n'est observé pour la vibration du carbonyle du résidu située à  $1733,5\text{ cm}^{-1}$  sur le spectre infrarouge.

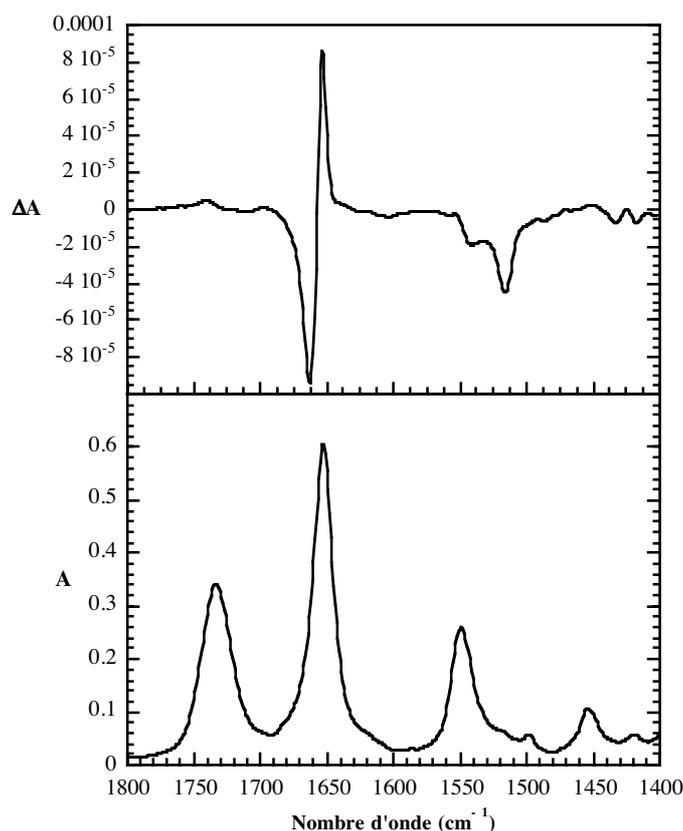


Figure 7 : Spectres IR et VCD (résolution  $8 \text{ cm}^{-1}$ , temps d'acquisition 4 H) du PBLG en solution dans le chloroforme ( $3,3 \text{ mg/mL}$ ) pour un trajet optique de  $500 \mu\text{m}$ .

Nous pouvons remarquer la qualité du spectre obtenu (bon rapport signal sur bruit) pour une acquisition de 4 heures à résolution  $8 \text{ cm}^{-1}$ . Nous pouvons constater que la bande amide I est environ deux fois plus intense que la bande amide II, synonyme de sa plus grande sensibilité à la structure secondaire du PBG. De plus, la forme de sa bande composée d'une contribution positive à haute fréquence et d'une contribution négative à basse fréquence est caractéristique de deux modes d'absorption couplés dans le cas des hélices. Le rapport d'anisotropie  $g$  de  $1,54 \cdot 10^{-4}$  pour la bande à  $1653 \text{ cm}^{-1}$  est également une valeur de référence pour les hélices quasi-infinies.

### III.3. Spectres VCD de phospholipides

Dans le but d'étudier la conformation de protéines membranaires insérées dans des membranes modèles comme les vésicules phospholipidiques, il nous a paru intéressant de regarder si les phospholipides composant les membranes naturelles ou modèles donnait un signal VCD. Nous avons essayé de comprendre pourquoi aucune étude de ce type n'était

répertoriée dans la littérature. Pour cela, nous avons étudiés plusieurs systèmes lipidiques en solution, en vésicules, en émulsion et en multicouches supportées. Nous avons utilisé des systèmes composés uniquement de phospholipides chiraux à savoir une solution de L-DPPC dans le chloroforme et une solution de SUV de L-DMPC dans D<sub>2</sub>O. Les molécules de DPPC et de DMPC possédant un carbone asymétrique au niveau du carbone intermédiaire du squelette glycérol. Il était aussi raisonnable de penser que le signal VCD pouvait apparaître au niveau de la bande d'absorption correspondant à la vibration du carbonyle du groupement ester, ce groupement étant relativement proche du carbone asymétrique. C'est pourquoi il nous a semblé pertinent d'optimiser la concentration des systèmes telle que l'absorbance de la bande d'absorption due à la vibration du carbonyle est une valeur raisonnable pour espérer voir un signal VCD.

### III.3.1 Cas des solutions

Le spectre VCD (figure 8) d'une solution de L-DPPC dans le chloroforme (de concentration 3,57 mg par mL) montre une bande négative au niveau du mode de vibration du carbonyle situé à 1733,3 cm<sup>-1</sup> sur le spectre infrarouge. Cependant, malgré une absorbance de 0,165 et un enregistrement de 6 heures à une résolution de 4 cm<sup>-1</sup>, l'intensité du signal VCD est très faible (7,6.10<sup>-6</sup>). Ce résultat suggère qu'il existe en solution un effet conformationnel qui conduit à un signal VCD très faible. En effet, on peut penser que dans ces conditions, les chaînes carbonées des molécules de phospholipide adoptent différentes conformations dont les contributions positives et négatives au spectre VCD ont tendance à se compenser, produisant un signal faible en moyenne.

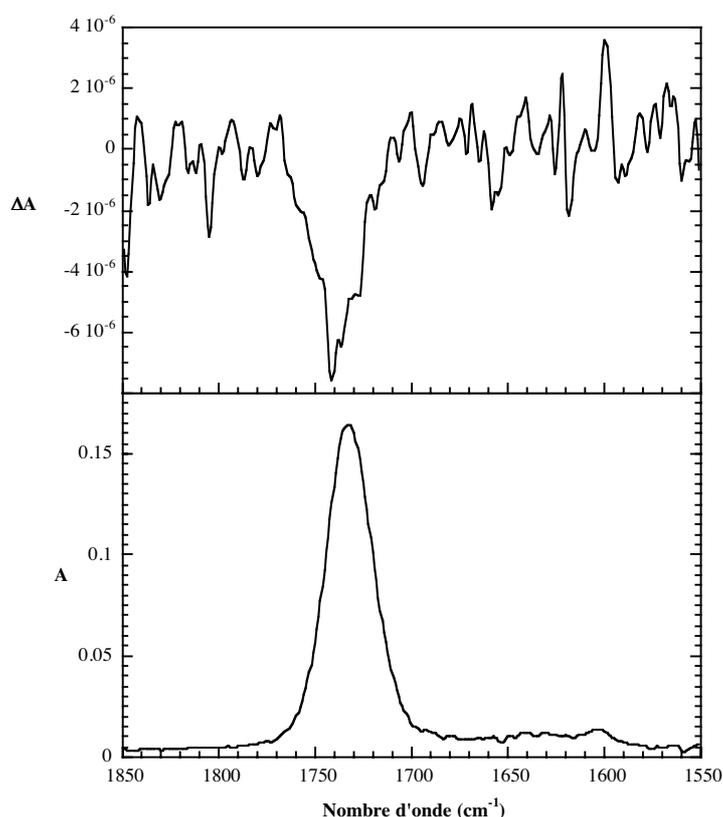


Figure 8 : Spectres IR et VCD (résolution  $4\text{ cm}^{-1}$ ) d'une solution de DPPC dans le chloroforme ( $3.57\text{ mg/mL}$ ). Le spectre VCD correspond à un temps d'acquisition de 6 H et un trajet optique de  $500\text{ }\mu\text{m}$ .

### III.3.2 Cas des vésicules

Afin de réduire l'effet conformationnel dû aux chaînes carbonées autour du carbone asymétrique, nous avons étudié une solution de SUV de L-DMPC dans  $\text{D}_2\text{O}$  (de concentration  $34\text{ mg par mL}$ ) où les chaînes carbonées sont maintenues dans un environnement sphérique défini par la vésicule. Sur le spectre VCD présenté figure 9, aucun signal dichroïque n'est détecté au niveau du mode de vibration du carbonyle situé à  $1734,7\text{ cm}^{-1}$  sur le spectre infrarouge. Cependant, le bruit du spectre, du même ordre de grandeur que l'intensité des bandes VCD ( $\sim 10^{-5}$ ) est trop important pour espérer extraire un signal. Bien que le spectre présenté ne permette pas de conclure sur ce type d'échantillon, nous pensons néanmoins obtenir, avec le montage actuel plus performant et un enregistrement avec un temps d'acquisition beaucoup plus long, le signal VCD caractéristique des lipides en vésicules.

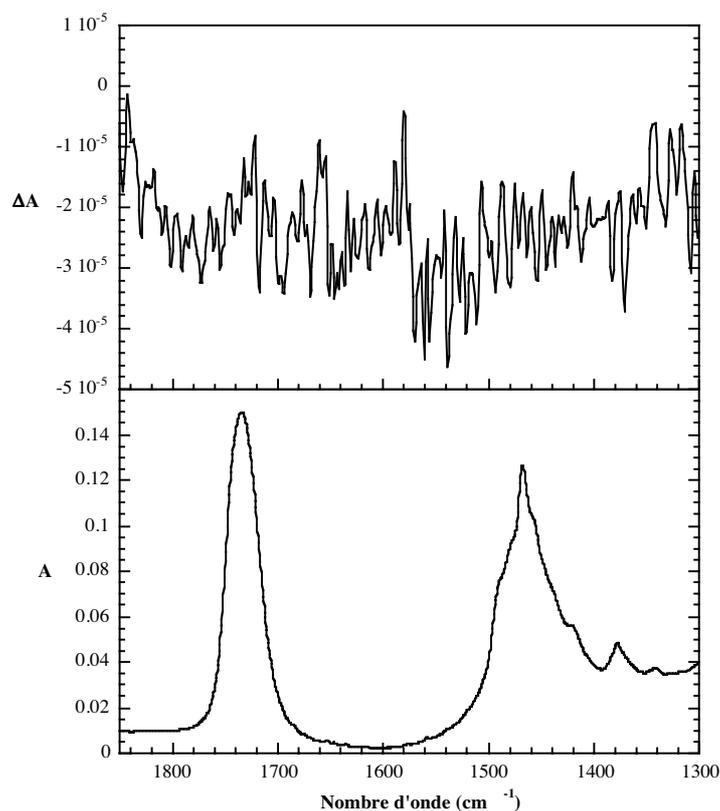


Figure 9 : Spectres IR et VCD d'une solution de SUV de DMPC dans  $D_2O$  (34 mg/mL). Le spectre VCD correspond à un temps d'acquisition de 2 H à la résolution de  $4\text{ cm}^{-1}$  pour un trajet optique de  $50\text{ }\mu\text{m}$ .

### III.3.3 Cas des émulsions

Afin de surmonter le problème conformationnel lié à la solubilité des phospholipides dans le chloroforme, nous avons, dans un deuxième temps, orienté nos recherches sur des systèmes phospholipidiques cristallisés en dispersion<sup>4</sup> dans le nujol. L.A. Nafie a en effet montré que le spectre VCD du (-)-(1S,4S)-camphre en émulsion dans le nujol était identique à celui d'une solution de camphre dans le chloroforme [12]. Nous nous sommes inspirés de ce résultat pour tenter d'élucider le comportement des phospholipides à partir de leurs spectres VCD. Nous avons donc étudié une série de phospholipides (DMPC, DMPA, DPPC et DOPC) dont les propriétés physico-chimiques et les structures sont différentes. Les spectres VCD obtenus sont présentés ci-dessous.

<sup>4</sup> Suspension de petits cristaux de phospholipides dans le nujol, une huile de paraffine (hydrocarbure saturé) dans lequel le phospholipide est insoluble.

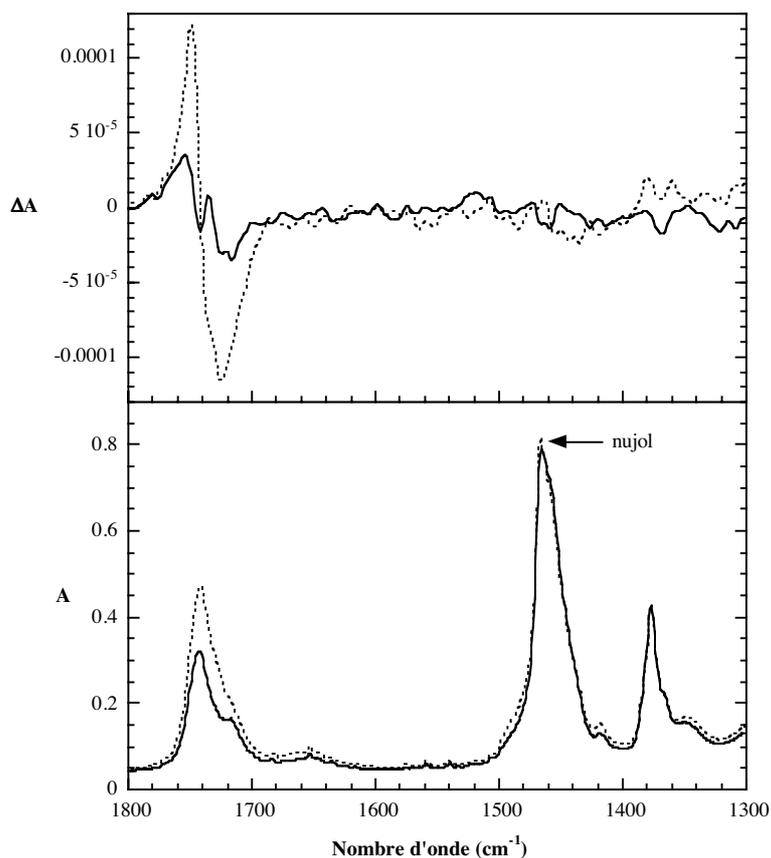


Figure 10 : Spectres IR et VCD (résolution  $8 \text{ cm}^{-1}$ , temps d'acquisition 37 min) du DMPC en émulsion dans le nujol pour deux échantillons différents.

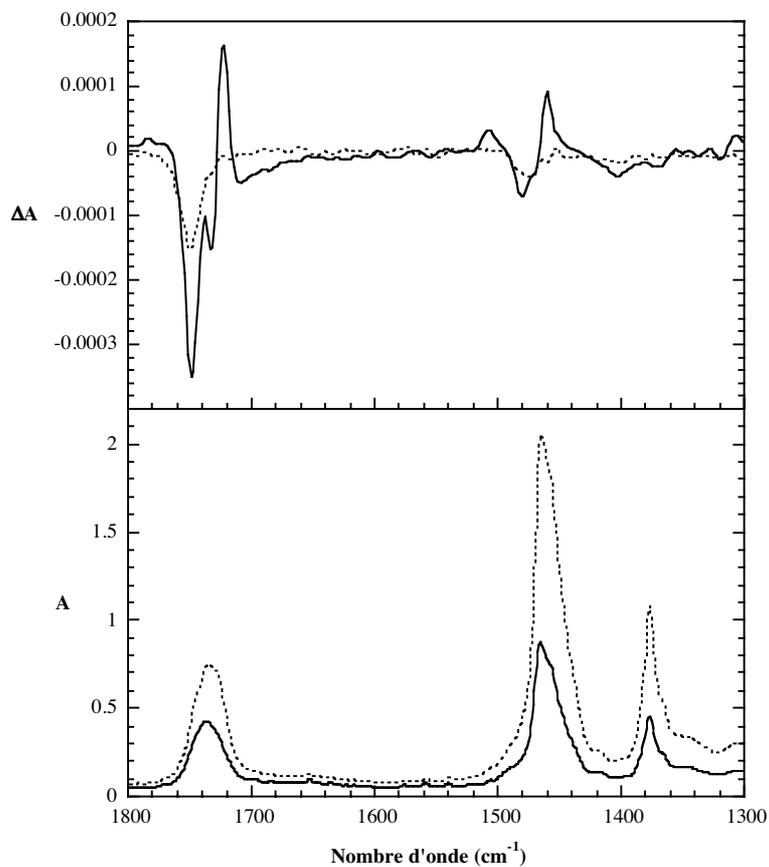


Figure 11 : Spectres IR et VCD (résolution  $8 \text{ cm}^{-1}$ , temps d'acquisition 37 min) du DPPC en émulsion dans le nujol pour deux échantillons différents.

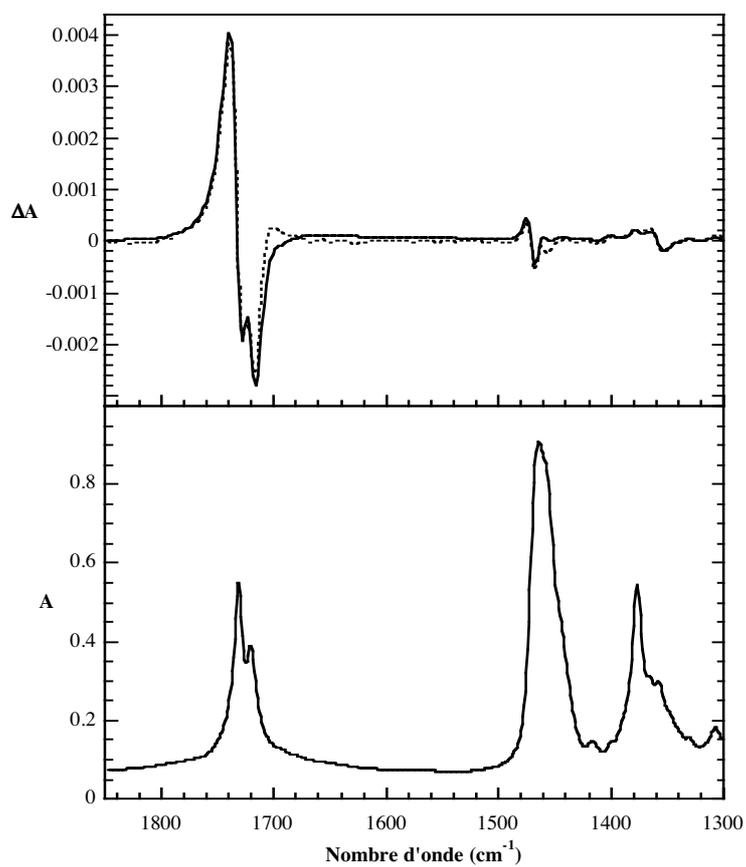


Figure 12 : Spectres IR et VCD du DMPA en émulsion dans le nujol. Les spectres VCD correspondent à un temps d'acquisition de 15 s (pointillés) et de 37 min (trait plein) à la résolution  $8\text{ cm}^{-1}$ .

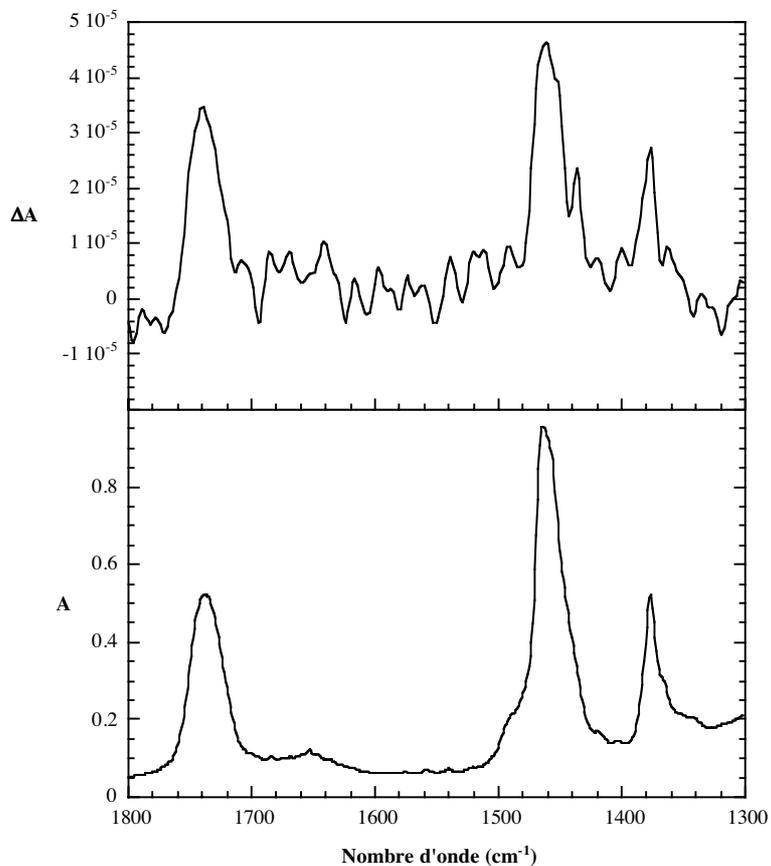


Figure 13 : Spectres IR et VCD (résolution  $8\text{ cm}^{-1}$ , temps d'acquisition 37 min) du DOPC en émulsion dans le nujol.

Face à la difficulté d'interprétation des spectres VCD, nous nous sommes focalisés sur le signal VCD engendré par la vibration de la liaison carbonyle du groupement ester des phospholipides (groupement le plus près du carbone asymétrique). Dans le cas du DMPC et du DPPC (figure 10 et 11), nous pouvons remarquer la non-reproductibilité des spectres IR et VCD pour deux échantillons différents. Ce résultat est dû à l'existence de deux formes cristallines à température ambiante dont les proportions varient avec le degré d'hydratation des molécules de phospholipides. Ce n'est pas le cas du DMPA qui existe sous une seule forme cristalline. Par ailleurs, la différence fondamentale qui existe entre le DMPA, le DMPC et le DPPC est l'intensité de la bande VCD correspondant à la vibration du carbonyle. Cette bande est beaucoup plus intense dans le cas du DMPA. On peut voir également dans le cas du DMPA un éclatement au niveau de la contribution négative de la bande VCD qui résulte du couplage entre les vibrations de chaque maille du cristal. Dans le cas du DOPC (figure 13), on observe une diminution significative de l'intensité qui peut être attribuée à son état fluide à température ambiante. En effet, la fluidité se traduit par un désordre conformationnel plus grand autour du carbone asymétrique par rapport à des phospholipides en phase gel où les conformations sont plus rigides. Le calcul des rapports d'anisotropie (tableau 2) pour la bande VCD du DMPA et du DOPC illustre ce résultat. Ce rapport est d'autant plus fort que la température de transition entre la phase gel et la phase fluide est élevée.

	T <sub>m</sub> (°C)	Fréquence des bandes VCD (cm <sup>-1</sup> )	Rapport d'anisotropie g
DMPA	50	1739,6	7.10 <sup>-3</sup>
DOPC	-20	1740,1	7,5.10 <sup>-5</sup>

Tableau 2 : Rapports d'anisotropie g pour les bandes VCD de plus haute fréquence sur les spectres VCD. L'absorbance prise pour le calcul est celle de la bande d'absorption infrarouge correspondante.

On constate également, pour un temps d'acquisition de 37 minutes, que le rapport signal sur bruit du spectre VCD du DMPA est meilleur que celui des trois autres phospholipides, le moins bon étant celui du spectre du DOPC. De plus, dans le cas du DMPA, un temps d'acquisition de 15 secondes seulement est suffisant pour obtenir un signal VCD significatif. Ces deux observations confirment que, dans le cas du DMPA, une conformation est stabilisée

dans la phase gel. Par ailleurs, la comparaison entre les deux spectres VCD du DMPA montre qu'un temps trop court peut conduire à des artefacts sur le spectre VCD. En effet, sur le spectre correspondant à un temps d'acquisition de 15 secondes, on voit apparaître une bande vers  $1700\text{ cm}^{-1}$  qui n'apparaît plus sur le spectre enregistré pendant 37 minutes. Ceci indique que des bandes de faible intensité sur un spectre VCD peuvent être confondues avec du bruit. Il est donc important de vérifier si ces bandes persistent pour des enregistrements plus longs afin de ne pas aboutir à des conclusions erronées.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est difficile d'obtenir des spectres VCD de phospholipides en solution ou en vésicules à cause d'un effet conformationnel important dans ces conditions. Les études réalisées sur des émulsions ont confirmé ce résultat et ont montré que le VCD est très sensible à l'état physique (gel ou fluide) des phospholipides qui se manifeste sur l'intensité des bandes. Nous avons donc orienté nos recherches sur l'étude de multicouches supportées dans lesquelles les conformations des molécules de phospholipides sont figées.

### III.3.4 Cas des multicouches supportées

Afin de poursuivre l'étude du dichroïsme circulaire vibrationnel des phospholipides, nous nous sommes inspirés d'une méthode d'échantillonnage utilisée en infrarouge qui consiste à réaliser des multicouches supportées de phospholipides sur substrat solide. Le principe consiste à évaporer, sur un substrat de  $\text{CaF}_2$ , une macrogoutte de solution de phospholipides dans le chloroforme sous atmosphère saturée de solvant afin de permettre une évaporation lente de la goutte. De cette façon, les phospholipides s'organisent, à la manière des cristaux liquides, en multibicouches parallèles au plan du substrat avec une épaisseur de l'ordre du micromètre. Il est possible également de réaliser une hydratation partielle de ces échantillons en les plaçant sous atmosphère saturée de vapeur d'eau (réalisée par évaporation d'un bécher d'eau placé dans une étuve). Pour ces échantillons, les spectres VCD ont révélé des effets dichroïques forts (de l'ordre de  $10^{-4}$ ) comme l'illustrent les spectres du L-DPPC et du L-DMPC hydraté sur les figures 14 et 15. Nous avons cependant constaté que les spectres de plusieurs échantillons préparés dans ces conditions variaient avec l'orientation  $\theta$  de

l'échantillon (figure 14, b). Ce résultat laisse supposer qu'il existe, en plus du dichroïsme vibrationnel, du dichroïsme linéaire (LD en anglais). L'enregistrement de leurs spectres LD a confirmé cette hypothèse. Pour ce type d'échantillon où les molécules de phospholipides sont orientées dans le plan de l'interface, l'onde incidente arrivant sous incidence normale va interagir avec les moments de transitions orientés parallèlement à l'interface. Ainsi, d'après la formule (5), le spectre VCD va dépendre à la fois de la variation du moment magnétique (correspondant au terme  $\frac{\partial \boldsymbol{\mu}}{\partial Q}$ ) mais également de la direction des moments de transition (correspondant au terme  $\frac{\partial \mathbf{m}}{\partial P}$ ).

Dans le cas du L-DPPC en phase gel à température ambiante, le spectre LD (figure 14, c) montre que le dichroïsme linéaire d'environ  $4 \cdot 10^{-2}$  est important pour la bande de vibration du carbonyle située à  $1737 \text{ cm}^{-1}$  sur le spectre infrarouge. Il contribue donc de façon significative au signal VCD (figure 14, b) qui ne peut être interprété dans ces conditions. Nous avons donc cherché l'orientation de l'échantillon pour lequel le dichroïsme linéaire disparaît. L'expérience ayant donné  $\theta = 46^\circ$ , nous avons réalisé le spectre VCD à cet angle (figure 14, b, trait plein). Seule une faible diminution de l'intensité est observée par rapport au spectre enregistré à  $\theta = 0^\circ$ . Ainsi, nous pouvons conclure que pour ce type d'échantillon, il est difficile d'interpréter quantitativement le spectre VCD dans la mesure où le dichroïsme linéaire est important. En revanche, pour le L-DMPC hydraté et fluide à la température de l'expérience, le dichroïsme linéaire mesuré étant d'environ  $5 \cdot 10^{-4}$  pour la bande de vibration du carbonyle, sa contribution au spectre VCD peut être considérée comme négligeable. Le spectre VCD est donc dû majoritairement à du dichroïsme circulaire. Ces deux exemples montrent que la phase physique du phospholipide et son degré d'hydratation sont des facteurs déterminants pour l'orientation des multicouches supportées. De plus, nous avons constaté que les spectres VCD pour deux échantillons réalisés à partir d'une même solution étaient différents. Ces résultats montrent que cette méthode d'échantillonnage encore non reproductible doit être améliorée pour éviter les effets d'orientation des molécules dans le plan du substrat. Nous avons testé d'autres méthodes d'échantillonnage (spin-coating, hydratation des multibicouches), mais aucune de ces méthodes n'a permis jusqu'à présent

d'éliminer ce problème. Cependant, il est essentiel de persévérer dans cette voie pour réussir à former des échantillons homogènes afin d'obtenir des informations sur les effets conformationnels des phospholipides dans les bicouches. Un taux d'hydratation élevé semble notamment contribuer à l'homogénéité des systèmes supportés. De plus, nous envisageons *in fine* de réaliser ces multibicouches en présence de peptides afin de connaître leurs effets sur les membranes en analysant leurs bandes amide ou les modifications qu'ils produiraient sur les bandes des phospholipides.

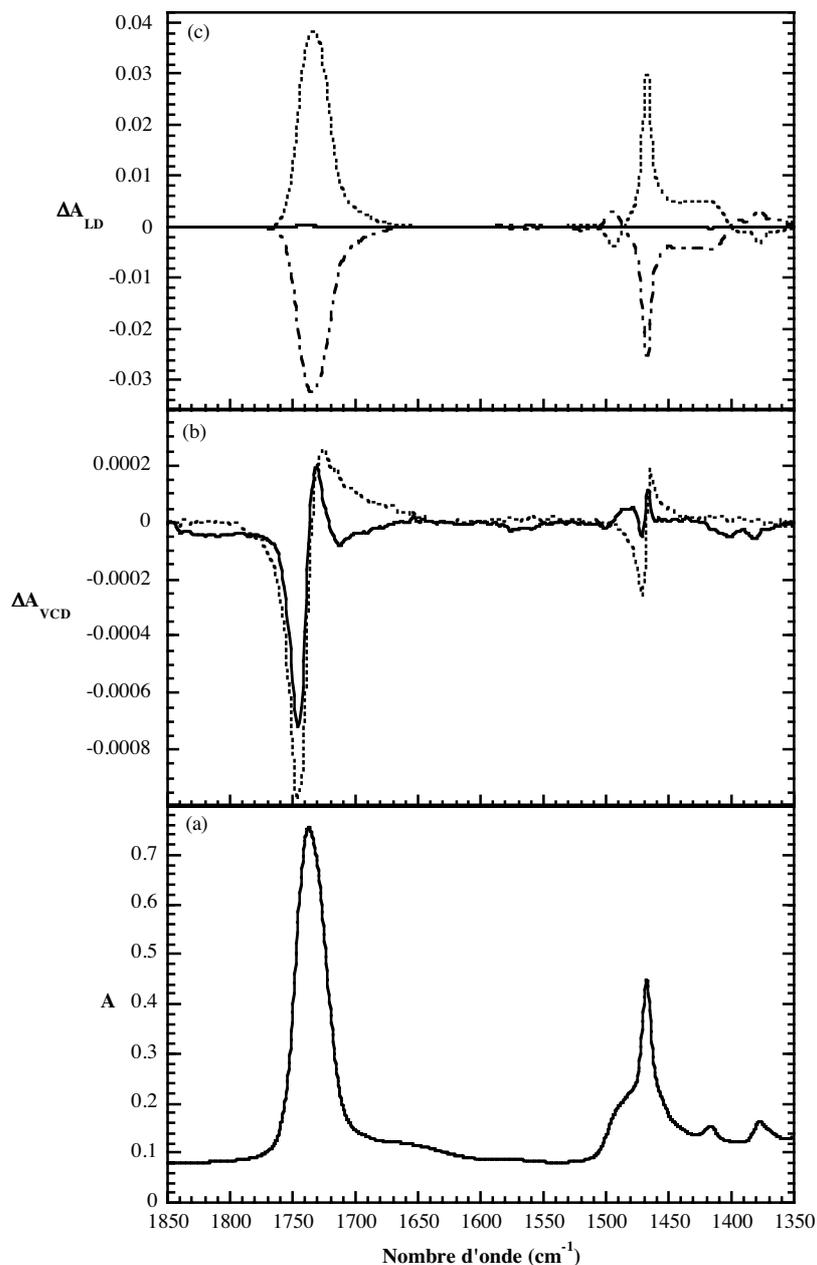


Figure 14 : Spectres IR (a), VCD (b) et LD (c) de multibicouches de L-DPPC supportées sur substrat de  $\text{CaF}_2$ . Les spectres VCD (résolution 4, temps d'acquisition de 1H20) et LD ont été enregistrés pour trois orientations différentes de l'échantillon. En trait pointillé,  $\theta = 0^\circ$ . En trait plein,  $\theta = 46^\circ$ . En trait discontinu,  $\theta = 91^\circ$ .

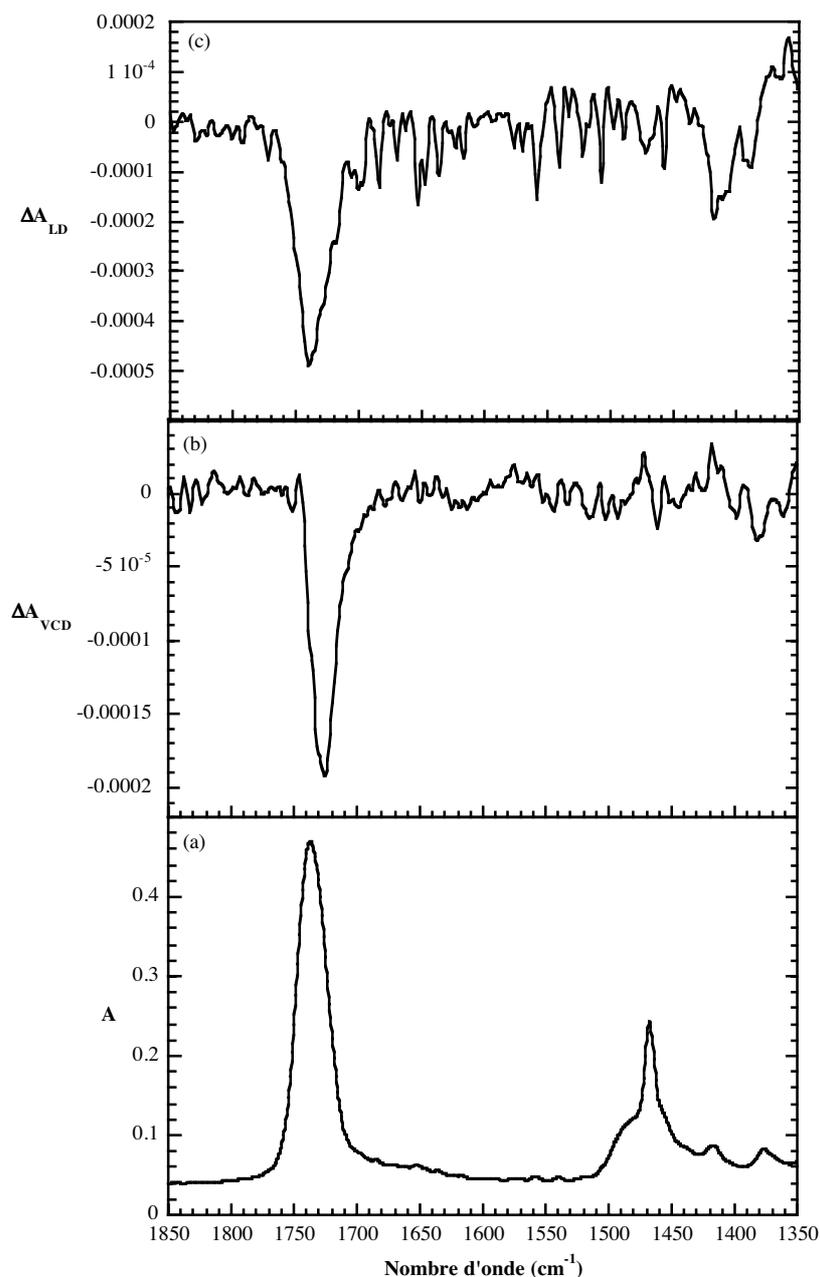


Figure 15 : Spectres IR (a), VCD (b) et LD (c) de multibouches de L-DMPC hydraté supportées sur substrat de  $\text{CaF}_2$ . Les spectres VCD (résolution 4, temps d'acquisition de 2H) et LD ont été enregistrés pour trois orientations différentes de l'échantillon. En trait pointillé,  $\theta = 0^\circ$ . En trait plein,  $\theta = 46^\circ$ . En trait discontinu,  $\theta = 91^\circ$ .

### III.4. Spectre VCD d'un polypeptide naturel, la mélittine

Dans cette partie, j'analyse les effets de dichroïsme circulaire vibrationnel de la mélittine en solution, le polypeptide que j'ai étudié en interaction avec les multicouches phospholipides à l'interface air-eau. Les concentrations des solutions de mélittine étudiées sont respectivement de  $1,25 \text{ mmolL}^{-1}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  salé ( $[\text{NaCl}] = 75 \text{ mmolL}^{-1}$ ) et de  $1 \text{ mmolL}^{-1}$

dans le méthanol. Les spectres d'absorbance et VCD présentés figure 16 ont été enregistrés à la résolution de  $4 \text{ cm}^{-1}$  avec un trajet optique de  $25 \mu\text{m}$  et un temps d'acquisition de 2 heures.

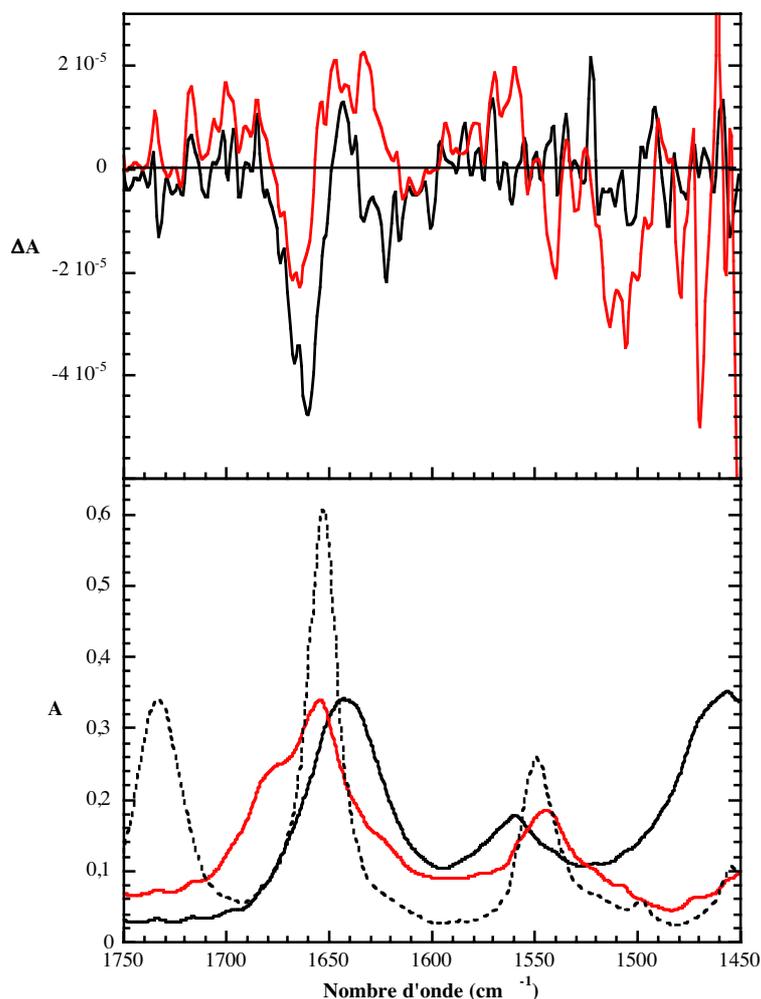


Figure 16 : Spectres IR et VCD de la mélittine en solution dans  $\text{D}_2\text{O}$  à la concentration de  $3,56 \text{ mg/mL}$  (courbes noires) et dans le méthanol à la concentration de  $2,85 \text{ mg/mL}$  (courbes rouges). La courbe en pointillés représente le spectre d'absorption du PBG dans le méthanol à la concentration de  $3,33 \text{ mg/mL}$ . Les spectres VCD de la mélittine ont été obtenus avec un chemin optique de  $25 \mu\text{m}$  à la résolution  $4 \text{ cm}^{-1}$  et pour un temps d'acquisition de 2 H.

Les spectres d'absorbance de la mélittine dans les deux solvants présentent des allures différentes, synonymes d'une distribution des structures secondaires différente. Par comparaison avec la bande d'absorption du PBG à  $1652,8 \text{ cm}^{-1}$  caractéristique d'une structure en hélice- $\alpha$ , la fréquence et la largeur de la bande d'absorption de la mélittine située à  $1642,5 \text{ cm}^{-1}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$ , sont plutôt représentatives d'un mélange d'hélices et de structures désordonnées. Dans le méthanol, la bande d'absorption centrée à  $1654,2 \text{ cm}^{-1}$  montre qu'il

existe des molécules de mélattine en hélice- $\alpha$ . Néanmoins, les épaulements situés à  $1678\text{ cm}^{-1}$  et à  $1623\text{ cm}^{-1}$  montrent qu'il existe également des coudes- $\beta$  et des feuillets- $\beta$ .

Le spectre VCD de la mélattine dans  $\text{D}_2\text{O}$  présente dans le domaine de fréquences du mode amide I une première bande négative vers  $1663\text{ cm}^{-1}$ , une deuxième bande positive vers  $1645\text{ cm}^{-1}$  et une troisième bande négative vers  $1625\text{ cm}^{-1}$ . Cette forme est caractéristique d'une structure secondaire en hélices- $\alpha$  (voir tableau 1). On peut remarquer que la forme générale de la bande est conservée dans le cas du méthanol. Cependant, l'intensité de la bande à  $1663\text{ cm}^{-1}$  est plus faible que dans  $\text{D}_2\text{O}$ . Les absorbances de la bande amide I étant de 0,34 dans les deux solvants, ce résultat suggère que, dans le méthanol, la proportion en hélices- $\alpha$  est plus faible et qu'il existe des structures en feuillets- $\beta$  et en coudes- $\beta$ . Ceci est en accord avec l'allure du spectre d'absorbance. En effet, la présence de structures en feuillets- $\beta$  et en coudes- $\beta$  introduit une contribution à la bande VCD négative du mode amide I d'une hélice- $\alpha$  qui provoque une diminution de son intensité. Par ailleurs, la connaissance du rapport d'anisotropie pour la bande VCD négative du mode amide I du PBG (figure 7) nous permet d'estimer la proportion en hélice- $\alpha$  de la mélattine dans  $\text{D}_2\text{O}$  et dans le méthanol (voir tableau 3).

	A	$\Delta A$	g	Proportion d'hélices- $\alpha$
PBG	0,61	$9,39 \cdot 10^{-5}$	$1,54 \cdot 10^{-4}$	100%
Mélattine dans $\text{D}_2\text{O}$	0,34	$4,75 \cdot 10^{-5}$	$1,40 \cdot 10^{-4}$	91%
Mélattine dans MeOH	0,34	$2,77 \cdot 10^{-5}$	$8,15 \cdot 10^{-5}$	53%

Tableau 3 : Calcul des proportions en hélices- $\alpha$ , de la mélattine dans  $\text{D}_2\text{O}$  et le méthanol d'après le rapport d'anisotropie pour le PBG, un polypeptide en hélice- $\alpha$  pure dans le chloroforme.

Ces calculs confirment les hypothèses sur les structures secondaires supposées à partir des spectres d'absorbance. Dans  $\text{D}_2\text{O}$ , la mélattine n'existe pas seulement sous forme d'hélices- $\alpha$  mais existe également sous forme de structures désordonnées. Dans le méthanol, la proportion

en hélices- $\alpha$  est encore plus faible que dans D<sub>2</sub>O à cause de la présence de feuillettes- $\beta$  et des coudes- $\beta$ .

Bien que ces résultats constituent une étude préliminaire pour la détermination des structures secondaires de la mélittine en fonction du solvant, il faut cependant souligner que le rapport signal sur bruit des spectres VCD obtenus peut être encore amélioré. En effet, ces études réalisées avec notre premier montage expérimental exposé à l'air nécessiteraient d'être reprises avec le nouveau montage confiné dans une boîte purgée avec de l'air sec. Nous espérons dans ces conditions obtenir de meilleurs spectres dont l'analyse permettrait de confirmer et de préciser les résultats ci-dessus.

#### **IV. Conclusion**

Nous avons montré qu'il était possible de réaliser un montage de spectroscopie de dichroïsme circulaire vibrationnel à partir d'un montage de modulation de polarisation. Le montage actuel permet d'obtenir des spectres de qualité identique à ceux obtenus dans les laboratoires confirmés de L.A. Nafie et T.A. Keiderling. Pour la première fois, des spectres de phospholipides constituant les membranes naturelles ont été obtenus. Les différentes expériences réalisées ont montré néanmoins que l'échantillonnage joue un rôle déterminant sur la qualité des spectres VCD. Par ailleurs, les spectres de la mélittine en solution sont encourageants pour poursuivre les études avec d'autres polypeptides. Les vésicules et les multicouches supportées laissent également entrevoir des perspectives prometteuses pour l'étude des protéines membranaires. En somme, malgré les difficultés actuelles d'échantillonnage et de détectivité, la spectroscopie VCD semble être une technique d'avenir pour la détermination *in situ* des structures secondaires des peptides et des protéines.

## Bibliographie

- [1] L. A. Nafie. 1995. *J. Mol. Strut.*, 347, 83.
- [2] J. P. Mathieu. *Cours de physique expérimentale. Chap. XXI. Pouvoirs rotatoires.* 2<sup>e</sup> Ed. SEDES. 1965.
- [3] J. P. Pérez, R. Carles and R. Fleckinger. *Électromagnétisme. Fondements et applications.* 2<sup>e</sup> Ed. Masson. 1996.
- [4] M. Urbanova and al. *Fourier transform vibrational circular dichroism FT-VCD spectroscopy.* Bruker. Application Note, 52.
- [5] G. Holzwarth and al. 1974. *JACS*, 96, 251.
- [6] J. A. Schellman. 1975. *Chem. Rev.*, 75(3), 323.
- [7] T. B. Freedman and al. 1995. *Biopolymers*, 37, 265.
- [8] P. J. Stephens and F. J. Devlin. 2000. *Chirality*, 12, 172.
- [9] L. A. Nafie. 1996. *Appl. Spectrosc.*, 50 (5), 14 A.
- [10] L. A. Nafie and M. Diem. 1979. *Appl. Spectrosc.*, 33, 130.
- [11] L. A. Nafie and al. 1979. *JACS*, 101, 496.
- [12] L. A. Nafie, R. K. Dukor and T. B. Freedman. *Vibrational circular dichroism.* In *Handbook of vibrational spectroscopy (Vol. 1, 731).* Edited by J. M. Chalmers and P. R. Griffiths (Wiley, Éd. 2002).
- [13] L. A. Nafie and D. W. Vidrine. *Double modulation fourier transform spectroscopy.* In *Fourier transform infrared spectroscopy (Vol. 3, Chap. 3).* Edited by J. R. Ferraro and L. B. Basile (Academic Press, Éd. 1982).
- [14] C. A. McCoy and J. A. de Haseth. 1988. *Appl. Spectrosc.*, 42(2), 336.
- [15] B. B. Lal and L. A. Nafie. 1982. *Biopolymers*, 21, 2161.
- [16] A. C. Sen and T. A. Keiderling. 1984. *Biopolymers*, 23, 1519.
- [17] V. P. Gupta and T. A. Keiderling. 1992. *Biopolymers*, 32, 239.
- [18] V. Baumruck and T. A. Keiderling. 1993. *JACS*, 115, 6939.
- [19] B. I. Baello and al. 1996. *Anal. Biochem.*, 250, 212.
- [20] G. M. Roberts and al. 1988. *JACS*, 110, 1749.
- [21] P. Malon and al. 1988. *Biopolymers*, 27, 733.

- [22] M. Diem and al. 1992. *J. Phys. Chem.*, 96, 548.
- [23] T. A. Keiderling and al. 1999. *Bioorg. Med. Chem.*, 7, 133.
- [24] P. Pancoska and al. 1991. *Biochemistry*, 30, 5089.
- [25] P. Pancoska and al. 1993. *Protein Science*, 2, 411.
- [26] C. Zhao and P. L. Polavarapu. 2001. *Biopolymers*, 62, 336.
- [27] P. Malon and al. 1988. *Biopolymers*, 27, 733.
- [28] E. D. Lipp and L. A. Nafie. 1985. *Biopolymers*, 24, 799.



## CONCLUSION

Les résultats obtenus dans cette thèse ont permis de montrer qu'il est possible de stabiliser par différentes méthodes des multicouches de phospholipides à l'interface air-eau. La difficulté d'obtention de la bicouche de DMPC par la méthode au-delà du collapse et par injection directe met en évidence l'influence des conditions expérimentales sur la stabilité de ce système. Le taux d'humidité de l'air ambiant et l'état physique du film déposé à la surface semblent deux facteurs déterminants dans la formation d'une bicouche stable de DMPC. La différence de stabilité entre ce système et la tricouche de DOPS souligne le rôle des charges électrostatiques des têtes polaires des phospholipides dans l'organisation de ces multicouches. Ces premiers résultats ouvrent la voie à de nouvelles expériences qui permettront d'établir une liste plus exhaustive des facteurs impliqués dans la stabilisation de ces systèmes. Comme nous l'avons vu, cette recherche peut être menée en parallèle avec des calculs de dynamique moléculaire. Ainsi, nous espérons réussir à mettre au point la méthode par injection directe qui permettrait d'utiliser de petites quantités de phospholipides et de peptides. La méthode par injection de vésicules s'avère également prometteuse pour la formation de bicouches supportées sous une monocouche d'OTMS polymérisée à l'interface air-eau. Il serait désormais intéressant d'envisager l'étude avec des phospholipides fluides, seuls ou en mélange, chargés ou non (par exemple un mélange DOPS-DOPC). Ainsi, nous nous rapprocherions de l'organisation et de la diversité des charges électrostatiques des membranes réelles.

Par comparaison avec les monocouches, l'étude de l'insertion de la mélittine dans les multicouches stabilisées à l'interface air-eau a montré que l'épaisseur hydrophobe joue un rôle déterminant dans la nature des interactions membranes-protéines. Ce résultat engage à poursuivre cette étude avec d'autres peptides et à l'étendre aux protéines malgré les difficultés liées au problème de leur dénaturation. La méthode par injection de vésicules laisse notamment entrevoir des perspectives intéressantes avec l'utilisation de protéoliposomes qui formeraient directement une membrane mixte, phospholipides-protéines. L'injection dans la

sous-phase aqueuse de peptides uniquement solubles dans des solvants organiques pose le problème de la dégradation des multicouches phospholipidiques, comme nous avons pu le constater au cours d'essais réalisés avec le FP23, peptide de fusion de la glycoprotéine GP41 du virus du SIDA.

Alors que les méthodes précédentes permettent d'envisager l'étude de l'interaction de peptides ou protéines sur des systèmes stabilisés à l'interface air-eau, les résultats préliminaires obtenus en spectroscopie VCD laissent supposer qu'il sera possible d'obtenir, grâce à cette nouvelle technique, des informations sur les peptides et protéines insérées en vésicules. En effet, le montage optique actuel dont la détectivité et la sensibilité sont plus performantes que le montage utilisé pour les premières expériences, va permettre d'approfondir et de préciser les études réalisées sur les phospholipides en solution ou en vésicules. Pour les phospholipides en multibicouches organisées, le problème du dichroïsme linéaire contourné, une information à la fois structurale et orientationnelle pourra être obtenue. L'ensemble de ces possibilités nous laisse penser que la spectroscopie VCD va devenir une méthode d'investigation pertinente pour l'étude des interactions membranes-protéines.

De nouveaux systèmes membranaires modèles reproduisant l'épaisseur des membranes naturelles en bicouche ont été réalisés à l'interface air-eau. Deux méthodes originales ont été conçues pour stabiliser des multicouches phospholipidiques à la surface de l'eau. La première méthode a permis de former des bicouches de DMPC et des tricouches de DOPS par compression au-delà du collapse des monocouches sur une cuve de Langmuir modifiée. La deuxième méthode a consisté à réaliser une bicouche de DMPC supportée sous une monocouche de silane polymérisée à l'interface air-eau par éclatement de vésicules. L'épaisseur et l'organisation des systèmes ont été déterminées grâce à la microscopie à l'angle de Brewster et la spectroscopie PM-IRRAS. Une étude a ensuite été menée sur l'interaction de ces nouveaux systèmes membranaires modèles avec la mélittine, un peptide cytotoxique du venin d'abeille. Les premiers résultats obtenus sur la tricouche de DOPS ont montré que la mélittine était plutôt redressée dans la tricouche.

Afin d'améliorer les études sur les interactions membranes-protéines, une nouvelle technique spectroscopique a été développée : la spectroscopie de dichroïsme circulaire vibrationnel. Cette technique, implantée pour la première fois en France, est sensible aux propriétés des molécules chirales. Les résultats préliminaires obtenus sur des phospholipides (en solution, en vésicules ou en multicouches supportées) et sur la mélittine laissent entrevoir un avenir prometteur pour le VCD pour la détermination des structures secondaires de peptides et de protéines insérés dans des vésicules lipidiques ou des multicouches supportées.

Mots-clés : membranes modèles, multicouches phospholipidiques, mélittine, interactions membranes-protéines, microscopie à l'angle de Brewster, PM-IRRAS, VCD.

New model systems of biological membranes have been realized at the air-water interface. Two methods have been developed to stabilize phospholipid multilayers on the water surface. The first one has shown the formation of a DMPC bilayer and a DOPS trilayer by compression beyond the collapse on a modified Langmuir trough. The second one has allowed realization of a DMPC supported bilayer under a silane polymerized Langmuir monolayer by vesicles bursting. The thickness and the organization of each system have been determined by Brewster Angle Microscopy and PM-IRRAS spectroscopy. Those new systems have been studied in interaction with melittin, a cytotoxic peptide. The first results with the DOPS trilayer have shown that melittin is rather tilted in the trilayer.

To improve the sensitivity of membrane-protein interactions studies, a new experimental method, sensitive to molecule chirality, has been developed : the Vibrational Circular Dichroism (VCD) spectroscopy. It is the first setup in France. The preliminary results obtained on phospholipids (in solution, vesicles or supported multilayers) and melittin have shown that VCD is a promising technique to determine secondary structure of peptides or proteins inserted in phospholipid vesicles or multilayers.

Keywords : model membrane, phospholipid multilayers, melittin, membrane-protein interactions, BAM, PM-IRRAS, VCD.