

N° d'ordre : 3306

# THESE

présentée à

## L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Cécile LOUDET**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

### DOCTEUR

SPECIALITE : CHIMIE-PHYSIQUE

\*\*\*\*\*

**Les Bicelles Biphényles:  
un nouveau modèle de biomembrane pour l'étude de  
protéines membranaires par RMN des Solides.**

\*\*\*\*\*

Soutenue le 18 décembre 2006

**Après avis de :**

|                            |   |            |
|----------------------------|---|------------|
| Mme Valérie MARCHI-ARTZNER | <b>Chargée de Recherche CNRS</b>                  | Rapporteur |
| M. Burkhard BECHINGER      | <b>Professeur de l'Université de Strasbourg I</b> | Rapporteur |

**Devant la commission d'examen formée de :**

|                            |   |                    |
|----------------------------|---|--------------------|
| Mme Valérie MARCHI-ARTZNER | <b>Chargée de Recherche CNRS</b>                  | Rapporteur         |
| M. Burkhard BECHINGER      | <b>Professeur de l'Université de Strasbourg I</b> | Rapporteur         |
| M. Alain BRISSON           | <b>Professeur de l'Université de Bordeaux I</b>   | Président          |
| M. Dror WARSCHAWSKI        | <b>Chargée de Recherche CNRS</b>                  | Examineur          |
| Mme Reiko ODA              | <b>Chargée de Recherche CNRS</b>                  | Examineur          |
| M. Erick J. DUFOURC        | <b>Directeur de Recherche CNRS</b>                | Directeur de thèse |



à mes proches,



## **- Remerciements -**

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut Européen de Chimie et Biologie, à Pessac (UMR-MOBIOS 5144). Je tiens à remercier messieurs Jean-Jacques Toulmé et Léon Ghosez, co-directeurs de l'institut, ainsi que Jean-Marie Schmitter, directeur de l'UMR, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je tiens à adresser mes plus profonds remerciements à Erick J. Dufourc qui a dirigé ce travail de thèse. Finalement, mon école d'ingénieur sur Paris ne m'aura pas empêché de revenir sur Bordeaux pour cette fois non plus assister à tes cours mais travailler directement avec toi. Un grand merci pour avoir laissé ma curiosité de jeune chercheur s'exprimer très librement tout en me montrant le droit chemin. J'ai réellement apprécié explorer « le monde des bicelles » notamment par RMN et j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci pour ta considération, tes conseils et les rocks endiablés à certains congrès !

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt scientifique qu'ils ont porté à ce travail ; Mme Valérie Marchi-Artzner et M. Burkhard Bechinger pour avoir pris le temps de juger mon manuscrit en tant que rapporteurs, M. Alain Brisson pour avoir accepté de présider ce jury, et M. Dror Warschawski pour ses remarques très pertinentes.

Je tiens à remercier très sincèrement Reiko Oda avec qui ce fut un plaisir de collaborer pour la microscopie électronique et surtout pour la diffusion des rayons X. L'analyse des bicelles ne devait prendre que 2 heures mais au final elle nous a occupé, pour notre plus grande joie, pendant 6 mois... Je n'oublierai pas nos transferts RMN-SAXS en un temps record ! Merci pour ta grande disponibilité et ton enthousiasme si communicatif.

Je remercie Marie-France Achard du Centre de Recherche Paul Pascal pour avoir été à l'origine de ce sujet de thèse et Stéphane Gineste pour son aide dans les débuts de la synthèse lipidique.

Un immense merci à Axelle, notre ingénieur RMN, qui m'a été d'une aide précieuse pendant ces trois ans et qui a « supporté » avec le sourire toutes mes péripéties (ouverture multiple de rotors dans le sonde, manette cassée et j'en passe !)... Je n'oublierai pas tous nos fou rires devant le spectro (il n'y avait qu'un seul scan !... ha ces blagues de RMNistes !), nos longues discussions (enfants, grossesse, maison...), nos we ski... tout ça va me manquer !

Je remercie très chaleureusement tout le reste de l'équipe RMN : Lucie (mon aînée d'un an et mon professeur occasionnelle de guitare), Sébastien (pour avoir résolu tous mes petits problèmes rmn-informatiques et pour nos discussions estivales durant les pleins des spectros au Césamo !), Frantz (qui a participé à ce projet en tant que stagiaire pendant 1 mois), nos deux expatriés, Marie à Londres et Marc-Antoine en Suède, dont on apprécie chacune de leur visite, Yann, Benoît, Isabelle P., Isabelle L., et enfin la petite nouvelle Vanessa ! Je n'oublierai pas les anciens Fabien, Cécile et Christina qui ont toujours été de très bons conseils.

Un grand merci au groupe de Reiko Oda : Sabine pour m'avoir aidé entre autre à observer les bicelles (grises ET blanches !!) par microscopie électronique, Carole (pour être toujours là !), Wissam, Thomas L. (pour nos discussions « bicellaires » du début) et Roni.

Je tiens à remercier plus longuement Michel Laguerre et Nada Taïb (merci pour ta joie de vivre !) pour m'avoir aidé à « visionner » la Menk dans les membranes par modélisation moléculaire, ainsi que le reste du groupe, Julien (merci pour tes très bons conseils culinaires et vive Linux !), Juan et Jean.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Kathel Bathany pour l'analyse par spectrométrie de masse des lipides et des protéines, et à ses chers collègues, Stéphane (eh oui la neige tôle, ça existe !), Benoît (mon coloc de bureau des derniers mois ; Courage c'est bientôt la fin !), Fabien et Emmanuel (peut-être à bientôt en plongée !); je n'oublierai pas Anne et Tintin qui nous ont beaucoup apporté...

Un grand merci à l'équipe administrative : Béatrice, Marie-Danielle, Elisa, Stéphanie, Sandra et surtout Annie, pour sa disponibilité et sa bonne humeur permanente! Merci aussi à Gérard pour résoudre mes petits soucis de réseau et à Thierry pour son dévouement inégalable à régler tous mes problèmes « bricolo » !

Une pensée tout particulière aussi pour les Anciens de l'IECB : Marie, un grand merci pour ton aide précieuse dans la synthèse du lipide deutéré ! et pour tous ces très bons moments à la piscine, sur le parcours footing de Gradignan ou en route pour Pau... Arnaud L. (vive le jungle speed !), Aurélie B. (merci pour tous tes conseils et vive les fêtes de Pampelune avec une Twingo rose immatriculée 33 !), Christelle et Victor (« bienvenus chez moi » !), Peter, Beth, Nathalie, Joe, Carlos, Jez, Yoann, Claire, Jacques...

Une spécial dédicace à Thomas et Guerric, mes deux chers compères fondateurs du « kwaï » (vive les apéros IECBiens !) via les Doctoriales, et à leur tour accompagnateur jooger ou nageur ! Merci pour tous ces moments « ouais » que je n'oublierai pas de si tôt...

Merci à tous les autres membres de l'IECB qui ont contribué à cette unique ambiance de travail que même la Californie du Sud nous envie ! : Nico, Loïc, Céline, Delphine, Aurélie O., Anne-laure, Mélanie, Fred G., Ivan, Brice, Margo, Maria, Fred, Gyldas, Violaine, Martin T., Benoît R., Alexandra, Patricia, Benoît B., Stéphane, Xavier, Gosia, Claude, Mickaël, Emanuela...

Je tiens enfin à adresser ma plus profonde reconnaissance à toute ma famille, qui m'a toujours soutenue et conseillée tout au long de mon parcours, mes parents, mes frères Jean-christophe et Xavier, ceux qui se sont déplacés le 18 décembre, Maïté, Jean-Fabien, Brigitte, Maïette, Martine, Sabrina et tous ceux qui m'ont accompagné par la pensée...

Merci aussi à Marjo et Antoine, Isa et Cédric, Céline, Marie-Aude, Audrey, Gaby, Laure, Marie, Jeanne et Martin, Marion et Damien, Marie et Nico... pour leur amitié et leurs encouragements.

Et enfin un grand Merci à Julien, qui a toujours été à mes côtés, de près comme de loin...

Je remercie la région Aquitaine et le Centre National de la Recherche Scientifique pour avoir financé cette thèse.

# **- SOMMAIRE -**

Abréviations

Introduction Générale

## **Chapitre I. Introduction sur les biomembranes**

|            |   |             |
|------------|---|-------------|
| <b>I.1</b> | <b>Les membranes de la vie.....</b>                                       | <b>p 3</b>  |
|            | I.1.1 Structure et Composition des membranes biologiques                  |             |
|            | I.1.2 Rôle des membranes biologiques                                      |             |
| <b>I.2</b> | <b>Les membranes modèles.....</b>   | <b>p 8</b>  |
|            | I.2.1 Les dispersions aqueuses de phospholipides                          |             |
|            | I.2.2 Le modèle membranaire « Bicelle »                                   |             |
| <b>I.3</b> | <b>Les protéines membranaires.....</b>                                    | <b>p 24</b> |
|            | I.3.1 Les méthodes RMN pour l'étude structurale de protéines membranaires |             |
|            | I.3.2 Les peptides membranaires étudiés                                   |             |
| <b>I.4</b> | <b>Plan et objectifs de la thèse.....</b>                                 | <b>p 35</b> |

## **Chapitre II. Techniques Physico-chimiques utilisées**

|             |   |             |
|-------------|---|-------------|
| <b>II.1</b> | <b>La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....</b>              | <b>p 37</b> |
|             | II.1.1 Présentation générale de la RMN  |             |
|             | II.1.2 Les noyaux observés  |             |
|             | II.1.3 La RMN des Biomembranes  |             |
|             | II.1.4 La RMN en rotation à l'angle magique                                       |             |
|             | II.1.5 La théorie de l'échange à deux sites                                       |             |
|             | II.1.6 Aspects expérimentaux  |             |
| <b>II.2</b> | <b>La diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS).....</b>                  | <b>p 75</b> |
|             | II.2.1 La loi de Bragg  |             |
|             | II.2.2 Amplitudes et intensités diffractées                                       |             |
|             | II.2.3 Domaines structuraux observés en fonction de la valeur du vecteur d'onde q |             |
|             | II.2.4 Profil de densité électronique des biomembranes                            |             |
|             | II.2.5 Partie expérimentale   |             |

|  |             |
|--|-------------|
| <b>II.3 Cryofracture et observation par microscopie électronique à transmission.....</b> | <b>p 86</b> |
| II.3.1 Principe de la cryofracture   |             |
| II.3.2 Procédé expérimental  |             |
| II.3.3 Cryofracture et observation au MET des bicelles TBBPC/DCPC                        |             |
| <b>II.4 Autres techniques utilisées.....</b>   | <b>p 89</b> |
| II.4.1 L'extrusion   |             |
| II.4.2 La sonication   |             |
| II.4.3 La Diffusion Dynamique de la Lumière  |             |
| II.4.4 Le Dichroïsme Circulaire  |             |

## **Chapitre III. Synthèses des lipides et peptides marqués <sup>15</sup>N, et préparation des modèles membranaires**

|  |              |
|--|--------------|
| <b>III.1 Synthèses des lipides TBBPC et TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>.....</b>  | <b>p 93</b>  |
| III.1.1 Méthodologie des synthèses   |              |
| III.1.2 Résultats et Discussion  |              |
| III.1.3 Partie Expérimentale   |              |
| <b>III.2 Synthèses de peptides marqués <sup>15</sup>N.....</b>   | <b>p 106</b> |
| III.2.1 Principe de la synthèse peptidique en phase solide (SPPS)  |              |
| III.2.2 Résultats et Discussion  |              |
| III.2.3 Partie expérimentale de la synthèse peptidique de la Menk <sup>15</sup> N <sub>3</sub>   |              |
| <b>III.3. Formation des modèles membranaires.....</b>  | <b>p 115</b> |
| III.3.1 Préparation des liposomes de type MLVs   |              |
| III.3.2 Préparation des liposomes de type LUV par la technique d'extrusion   |              |
| III.3.3 Préparation des SUV  |              |
| III.3.4 Préparation des bicelles   |              |
| III.3.5 Reconstitution de la Menk <sup>15</sup> N <sub>3</sub> et Neu* <sup>15</sup> N <sub>4</sub> dans les modèles membranaires lipidiques |              |

## **Chapitre IV. Etudes Physico-chimiques du lipide TBBPC**

|  |              |
|--|--------------|
| <b>IV.1 Température de transition de phase du lipide TBBPC.....</b>      | <b>p 123</b> |
| IV.1.1 Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge                      |              |
| IV.1.2 Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire des Solides    |              |
| <b>IV.2 Dynamique du TBBPC dans des liposomes.....</b>                   | <b>p 129</b> |
| IV.2.1 Déconvolution des spectres RMN- <sup>2</sup> H et profils d'ordre |              |
| IV.2.2 Discussion  |              |
| IV.2.3 Estimation de la longueur des chaînes aliphatiques                |              |

|  |              |
|--|--------------|
| <b>IV.3 Déformation des liposomes de TBBPC sous un champ magnétique.....</b> | <b>p 139</b> |
| IV. 3. 1 Caractérisation par RMN <sup>31</sup> P                             |              |
| IV. 3. 2 Discussion  |              |

## **Chapitre V. Caractérisation physico-chimique des Bicelles TBBPC/DCPC**

|  |              |
|--|--------------|
| <b>V.1 Caractérisation des Bicelles TBBPC/DCPC par RMN des Solides <sup>31</sup>P.....</b>   | <b>p 145</b> |
| V.1.1 Spectres RMN <sup>31</sup> P du mélange binaire TBBPC/DCPC   |              |
| V.1.2 Diagrammes température-composition-hydratation du système TBBPC/DCPC   |              |
| V.1.3 Discussion   |              |
| V.1.4 Organisation de l'eau de la solution bicellaire  |              |
| <b>V.2 Observation par Microscopie Electronique à Transmission (MET) des Bicelles TBBPC/DCPC et estimation de leur taille.....</b> | <b>p 156</b> |
| V.2.1 Images MET des bicelles TBBPC/DCPC   |              |
| V.2.2 Taille des bicelles TBBPC/DCPC   |              |
| V.2.3 Discussion   |              |
| <b>V.3 Caractérisation de l'orientation des Bicelles TBBPC/DCPC par Diffraction des Rayons X aux petits angles (SAXS).....</b>     | <b>p 161</b> |
| V.3.1 Cliché de diffraction X aux petits angles des bicelles TBBPC/DCPC  |              |
| V.3.2 Discussion   |              |
| <b>V.4 Dynamique des Bicelles TBBPC/DCPC par RMN du deutérium.....</b>   | <b>p 165</b> |
| V.4.1 Système bicellaire TBBPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> (95 :5)/DCPC   |              |
| V.4.2 Bicelles TBBPC- <sup>2</sup> H <sub>27</sub> /DCPC   |              |
| V.4.3 Système TBBPC- <sup>2</sup> H <sub>27</sub> :DMPC(95 :5)/DCPC  |              |
| V.4.4 Superposition des trois systèmes bicellaires deutérés  |              |

## **Chapitre VI. Comparaison Bicelles Biphényles / Bicelles Saturées**

|   |              |
|---|--------------|
| <b>VI.1 Domaines d'existence des bicelles : caractérisation par RMN <sup>31</sup>P et <sup>14</sup>N.....</b>   | <b>p 177</b> |
| VI.1.1 Comparaison des spectres RMN <sup>31</sup> P et <sup>14</sup> N entre les deux types de bicelles en fonction de la température   |              |
| VI.1.2 Superposition des domaines d'existence des deux types de bicelles  |              |
| <b>VI.2 Dynamique des bicelles : caractérisation par RMN <sup>2</sup>H.....</b>   | <b>p 186</b> |
| VI.2.1 Comparaison de la dynamique des deux types de bicelles par l'analyse RMN- <sup>2</sup> H des chaînes lipidiques du TBBPC- <sup>2</sup> H <sub>27</sub> et DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> |              |

VI.2.2 Comparaison de l'organisation de l'eau entre les deux solutions bicellaires

**VI.3 Cinétique d'orientation dans un champ magnétique et de relaxation en dehors de  $B_0$  des bicelles : caractérisation par SAXS.....p 193**

VI.3.1 Clichés de diffraction X aux petits angles des bicelles

VI.3.2 Cinétique d'orientation des bicelles dans un champ magnétique

VI.3.3 Relaxation en dehors de  $B_0$  des bicelles après orientation dans un champ magnétique

VI.3.4 Etudes préliminaires sur les bicelles saturées dopées avec des ions lanthanides

**Chapitre VII. Bicelles Ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC**

**VII.1 Caractérisation par RMN des Solides  $^{31}\text{P}$  des systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC.....p 211**

VII.1.1 Système DMPC/DCPC + TBBPC

VII.1.2 Système TBBPC/DCPC + DMPC

VII.1.3 Systèmes intermédiaires DMPC/TBBPC/DCPC

**VII.2 Simulations de spectres RMN- $^{31}\text{P}$  associés aux systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC.....p 219**

VII.2.1 Spectre de poudre du système (TBBPC:DMPC, 3:7)/DCPC

VII.2.2 Spectres complexes des systèmes ternaires où (TBBPC:DMPC)=(4:6), (7:3) et (8:2)

**VII.3 Ebauche du diagramme Température-Composition lipidique du système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC.....p 224**

**Chapitre VIII. Applications des bicelles à l'étude de peptides membranaires**

**VIII.1 Comparaison entre les bicelles biphényles et saturées pour l'étude de biomolécules par Dichroïsme Circulaire à UltraViolets (DC-UV) et RMN- $^{15}\text{N}$ .....p 229**

VIII.1.1 Signal dichroïque (UV) de chaque type de bicelles

VIII.1.2 Applications des bicelles biphényles et saturées pour l'étude orientationnelle de peptides membranaires hélicoïdaux par RMN- $^{15}\text{N}$

**VIII.2 Etude du peptide membranaire Neu\* $^{15}\text{N}_4$ .....p 234**

VIII.2.1 Analyse par RMN- $^{31}\text{P}$  des bicelles saturées contenant le peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$

VIII.2.2 Analyse par RMN- $^{15}\text{N}$  en statique du peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$  inséré dans les bicelles saturées

|  |       |
|--|-------|
| <b>VIII.3 Etude du pentapeptide Menk<sup>15</sup>N</b> .....   | p 239 |
| VIII.3.1 Propriétés spécifiques au peptide Menk  |       |
| VIII.3.2 Etude de l'orientation de la Menk <sup>15</sup> N <sub>3</sub> dans les bicelles saturées et biphényles |       |

## **Chapitre IX. Conclusion et Perspectives**

Bibliographie



## **- Abréviations -**

Å : Angstroem ( $10^{-10}$  mètres)

ATR : Réflexion Totale Atténuée

Da : Dalton

DC: Dichroïsme Circulaire

DCPC : 1,2-dicaproyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DMPC : 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DSC : Differential Scanning Calorimetry

ESI : Electrospray Ionisation

FID : Free Induction Decay

Fmoc : 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

LUV : Large Unilamellar Vesicles

MALDI-Tof : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight

Menk : Méthionine Enképhaline

Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> : Méthionine Enképhaline marquée <sup>15</sup>N sur trois acides aminés

MET: Microscopie Electronique à Transmission

MLVs : Multi Lamellar Vesicles

Neu<sub>TM 35</sub> : Domaine transmembranaire du récepteur Neu sauvage formé de 35 résidus

Neu\*<sub>TM 35</sub> : Domaine transmembranaire du récepteur Neu\* muté formé de 35 résidus

Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> : Domaine transmembranaire du récepteur Neu\* muté formé de 35 résidus, marqué <sup>15</sup>N sur quatre acides aminés.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SAXS : Small Angle X-Ray Scattering

SUV: Small Unilamellar Vesicles

TFA: Acide TriFluoroacétique

TBBPC : 1-tétradécanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine

UV : Ultra Violet



## ***- Introduction Générale -***

La cellule biologique est l'unité structurale de base de tous les êtres vivants, des organismes unicellulaires (bactéries, levures, champignons, plancton...) à ceux supérieurs (comme les eucaryotes...), constitués de groupes cellulaires complexes. Toutes les cellules ou organites (noyau, réticulum endoplasmique...) sont délimités par une membrane protectrice, lieu d'échange et d'activités biologiques intenses. La membrane biologique a donc un rôle majeur dans la vie d'une cellule et il est donc essentiel de comprendre son fonctionnement. Toutefois, les membranes naturelles constituent des systèmes trop complexes pour pouvoir les analyser directement par des techniques biophysiques, telles que la RMN ou la diffraction X, qui apportent de nombreuses données structurales, dynamiques et morphologiques. Le challenge est donc de développer des modèles membranaires à la fois suffisamment simples pour pouvoir les étudier précisément et suffisamment représentatifs pour expliquer au mieux les mécanismes biologiques qui y ont lieu. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse. Nous nous sommes concentrés particulièrement sur le modèle de membrane lipidique de type bicelle, découvert il y a une vingtaine d'années. Ces objets, de forme bicouche discoïdale (de quelques centaines d'Å), présentent l'avantage de s'orienter dans un champ magnétique. Les bicelles les plus couramment utilisées de nos jours (constituées généralement des lipides DCPC et DMPC) adoptent l'orientation telle que la normale à leur bicouche soit perpendiculaire au champ magnétique  $B_0$ . Nous développons ici de nouvelles bicelles, constituées de DCPC et d'un lipide original le TBBPC, qui ont la spécificité de s'orienter telle que la normale à leur bicouche soit parallèle à  $B_0$ , sans ajout de paramagnétiques. Cette nouvelle orientation présente de nombreux avantages pour l'étude structurale et orientationnelle de biomolécules telles que les peptides. Notre objectif consiste à caractériser ces nouvelles bicelles par RMN des Solides, Diffusion des rayons X et Microscopie Electronique, et à étudier leurs applications dans l'analyse de biomolécules.

Un deuxième aspect des biomembranes, concernant l'étude des radeaux de lipides (encore appelés communément « rafts »), a été abordé au cours de ma thèse mais ne sera pas développé dans ce manuscrit. Ces microdomaines lipidiques, riches en cholestérol et sphingomyéline, présentent une rigidité particulière et seraient nécessaires au bon fonctionnement d'un grand nombre de récepteurs membranaires. Une analyse par RMN de la

composition lipidique de ces rafts a été débutée mais s'est avérée complexe. Une étude du comportement dynamique de ces domaines membranaires a alors été privilégiée ; plus précisément, des mélanges ternaires de lipides impliqués dans la composition des rafts de plantes et de champignons ont été analysés par RMN des Solides au deutérium, ce qui a aboutit à une publication : Beck, J. G. ; Mathieu, D. ; Loudet, C. ; Dufourc, E.J. « Plant Sterols : a better way to Regulate Membrane Thermal Variations », *accepté au FASEB Journal en Décembre 2006.*

# CHAPITRE I

## Introduction sur Les Biomembranes



Ce chapitre a pour objectif d'introduire les biomembranes et de situer le sujet de cette thèse dans son contexte. Après quelques généralités sur la constitution et le rôle des membranes biologiques, nous décrirons les différents modèles de membranes actuels, en mettant l'accent sur celui de type « bicelle ». Nous présenterons alors les nouvelles bicelles qui s'orientent avec leur normale parallèle au champ magnétique et qui font l'objet de ce travail. Enfin, nous introduirons les deux peptides marqués  $^{15}\text{N}$  dont on essaiera d'étudier l'orientation par RMN- $^{15}\text{N}$  au sein de bicelles : la Méthionine Enképhaline Menk $^{15}\text{N}_3$  et la forme mutée du récepteur à tyrosine kinase Neu\* $^{15}\text{N}_4$ .

## **I.1 Les membranes de la vie**

### I.1.1 Structure et Composition des membranes biologiques

Toutes les cellules biologiques sont constituées de membranes, que l'on qualifie de membranes plasmiques dans le cas où elles séparent le cytoplasme de l'environnement extérieur et de membranes intracellulaires lorsqu'elles délimitent des organites (mitochondries, noyau, chloroplastes, lysosomes...) (figure I.1). Les principaux constituants moléculaires de ces membranes sont les lipides et les protéines ; ces deux entités s'organisent de manière à former un édifice supramoléculaire, stabilisé par des interactions non covalentes de type hydrophile/hydrophobe et électrostatique.

Pour décrire la structure et la dynamique des membranes naturelles, le concept de « mosaïque fluide » a été proposé par Bothorel et Lussan (Bothorel et Lussan, 1970), puis développé par Singer et Nicolson (Singer et Nicolson, 1972) (figure I.2) ; la composition membranaire est en effet très hétérogène à la fois dans l'espace et le temps (ce qui justifie le terme « mosaïque ») et les espèces ont la capacité de se mouvoir dans le plan de la membrane (ce que traduit le mot « fluide »). Ce modèle est basé sur les propriétés amphiphiles des constituants membranaires, avec un arrangement des lipides en bicouche, dans laquelle s'intègrent les protéines.

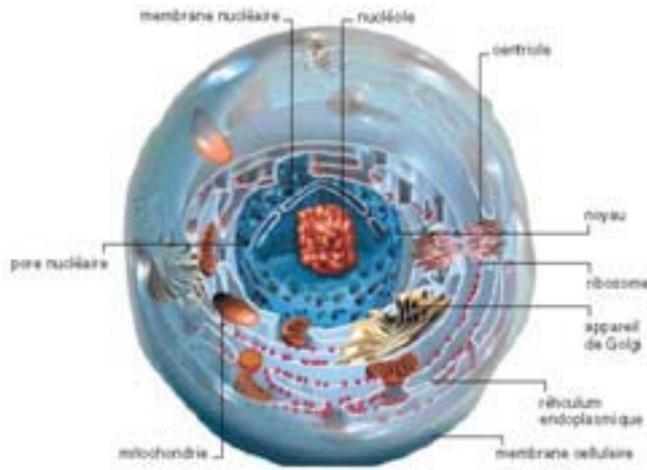


Figure I.1 Schéma d'une cellule biologique (Kermaïdic, 2001).  
Chaque entité fonctionnelle de la cellule est délimitée par une membrane

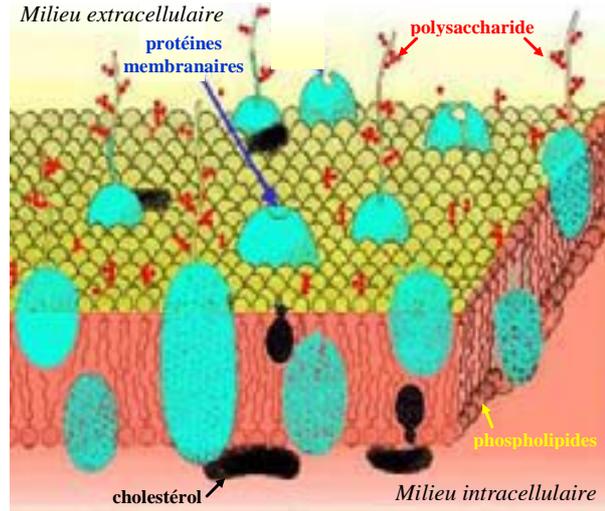


Figure I.2 Architecture moléculaire de la membrane plasmique selon le modèle de « mosaïque fluide », d'après (Singer et Nicolson, 1972), et (Capaldi, 1974).

|                              | Myéline | Erythrocyte | Mitochondrie | Microsome | E.Coli |
|------------------------------|---------|-------------|--------------|-----------|--------|
| <b>Cholestérol</b>           | 25      | 25          | 5            | 6         | 0      |
| <b>Phospholipides totaux</b> | 32      | 56          | 95           | 94        | 100    |
| <b>dont PE</b>               | 14      | 20          | 28           | 17        | 80     |
| <b>PS</b>                    | 7       | 11          | 0            | 0         | 0      |
| <b>PC</b>                    | 11      | 23          | 48           | 64        | 0      |
| <b>PI</b>                    | 0       | 2           | 8            | 11        | 0      |
| <b>PG</b>                    | 0       | 0           | 1            | 2         | 15     |
| <b>diPG</b>                  | 0       | 0           | 11           | 0         | 5      |
| <b>Sphingolipides totaux</b> | 32      | 18          | 0            | 0         | 0      |
| <b>Autres</b>                | 11      | 1           | 0            | 0         | 0      |

Tableau I.1 Composition lipidique de différentes membranes (en % de la quantité totale de lipides). PE, PS, PC, PI, PG : phosphatidyl éthanolamine, sérine, choline, inositol, glycérol ; diPG : diphosphatidylglycérol (cardiolipide), (Schechter, 1990).

Cette notion de mosaïque fluide a beaucoup évolué et depuis une dizaine d'années, l'organisation dynamique latérale des membranes biologiques est décrite par l'existence de microdomaines lipidiques indépendants dans le plan membranaire, encore appelés « rafts » (radeaux) (Edidin, 2001 ; Radhakrishnan et al., 2000 ; van Meer et Lisman, 2002). Ces régions confinées, riches en cholestérol et sphingomyéline, auraient une composition protéique spécifique (Simons et Ikonen, 1997) et présenteraient une rigidité particulière (Aussenac et al., 2003). Ces « îlots » membranaires, exemple d'une coopération fonctionnelle entre les lipides et les protéines membranaires, seraient à l'origine de nombreux processus biologiques complexes tels que le trafic membranaire ou le transfert d'informations (Jacobson et Dietrich, 1999 ; London et Brown, 2000 ; Simons et Ikonen, 1997 ; Verkade et Simons, 1997).

#### *a) Les lipides membranaires*

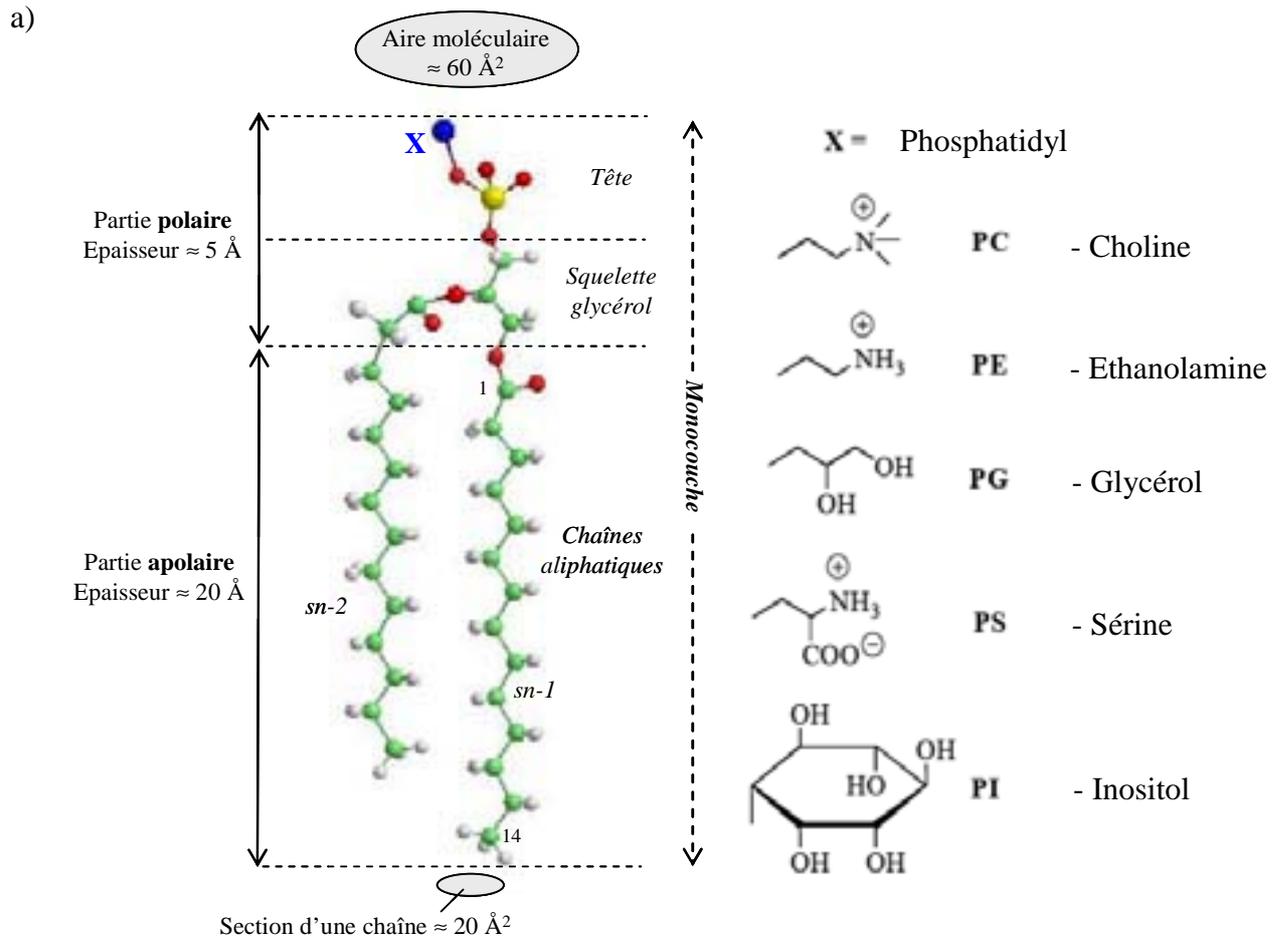
Ce sont des molécules dites amphiphiles ou amphipatiques, constituées d'une tête polaire hydrophile (glycérophospholipides, sucres ou groupes hydroxyles) et d'une partie hydrophobe (chaînes d'acides gras ou cycles). Elles ont donc la particularité de s'auto organiser dans l'eau de telle sorte à minimiser les interactions hydrophobes ; la structure en bicouche est la plus souvent adoptée, avec une partie apolaire au centre où l'eau n'a pas accès, et une partie polaire de part et d'autre de la bicouche, en contact avec le milieu aqueux.

Les principales classes de lipides membranaires sont les phospholipides (par exemple les diacylphosphatidylcholines), les stéroïdes (comme le cholestérol), les sphingolipides (par exemple la sphingomyéline) et les glycolipides (comme les monoglucozydglycérides) (figure I.3). La proportion des différents lipides est variable suivant le type de membrane considéré ; les phospholipides sont néanmoins les composants majeurs ; parmi eux, la phosphatidylcholine est l'un des plus abondants dans les membranes lipidiques (tableau I.1).

#### *b) Les protéines membranaires*

On distingue majoritairement deux classes de protéines membranaires selon leur association avec la bicouche lipidique :

- les protéines extrinsèques, hydrosolubles et arrimées à la membrane via des interactions avec les têtes polaires des lipides ou d'autres protéines de la membrane.
- les protéines intrinsèques (ou protéines transmembranaires), de nature amphipathique et en interaction majeure avec les parties apolaires des lipides.



### 1,2-dimyristoylphospholipides

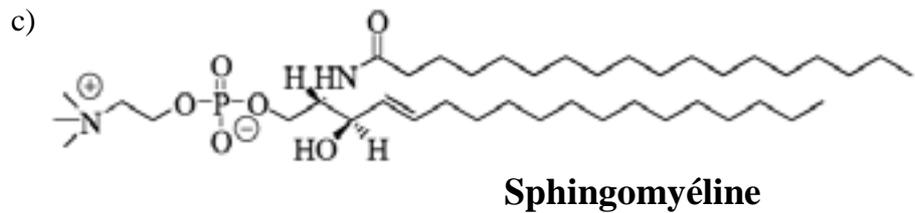
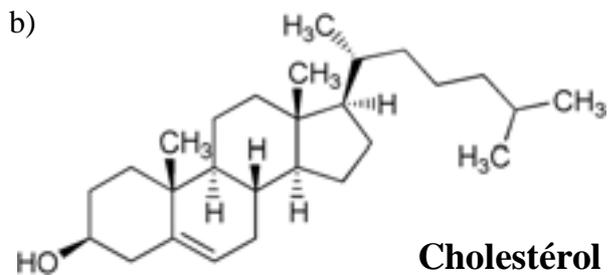


Figure I.3 Structures de quelques lipides membranaires de type a) phospholipides, b) stérols et c) sphingolipides.

Dans certains cas, la totalité de la protéine est localisée dans la bicouche, dans d'autres elle y est partiellement intégrée, laissant une partie de la chaîne polypeptidique accessible sur un seul ou sur les deux côtés de la membrane. Les protéines peuvent avoir un seul ou plusieurs domaines transmembranaires, comme la Bactériorhodopsine qui en possède sept.

Il est difficile de définir de manière générale la composition de la matrice membranaire ; en effet, la proportion des lipides par rapport aux protéines est très variable suivant le type cellulaire étudié : le pourcentage massique en protéines peut varier de 25% dans les membranes de fibres myélinisées à 75% dans les membranes mitochondriales. Il faut savoir que plus une membrane est riche en protéines, plus son activité est élevée.

La distribution lipidique et protéique est également différente entre les feuillettes externe et interne de la bicouche membranaire. Cette asymétrie de composition est bien sûr à mettre en relation avec une asymétrie de fonction.

### I.1.2 Rôle des membranes biologiques

Le premier rôle des membranes est de permettre des compartimentations. Cette séparation entre l'intérieur et l'extérieur permet ainsi de définir la cellule ou l'organite comme une entité propre. Les lipides participent en grande partie à cette structuration de l'édifice membranaire, assimilable à une enveloppe protectrice. Mais la survie et le fonctionnement d'une cellule ou d'un organite nécessitent aussi des échanges continus de matière, d'énergie et d'information de part et d'autre de la membrane qui les délimite. Ces fonctions de base sont associées aux protéines membranaires, qui se chargent de réguler ces échanges transmembranaires ; c'est le cas par exemple des canaux ioniques pour le transfert d'ions ou des aquaporines pour le transfert d'eau. Toutefois, les rôles des lipides et protéines ne semblent pas autant séparés. En effet, peu de protéines membranaires sont fonctionnelles hors de la membrane et peu de membranes purement lipidiques sont reconnues par l'organisme ; leurs interactions sont donc nombreuses.

Parmi les mécanismes de transferts à travers la membrane, trois catégories sont distinguables :

- la diffusion de petites molécules directement à travers la bicouche lipidique (des acides aminés, des sucres tel le glycérol, ou encore des ions inorganiques tel  $N_2$  ou  $O_2$ ),
- la diffusion facilitée de composés à travers la bicouche lipidique grâce à une protéine-transporteur,

- et le transport actif de composés à travers la bicouche lipidique grâce à une protéine-transporteur et une consommation d'énergie sous forme d'ATP.

La transformation d'énergie est réalisée par des complexes protéiques (ATP synthases), principalement localisés dans les membranes internes des mitochondries.

Les membranes servent également de barrières sélectives à l'information biologique. Celle-ci prend la forme de messagers extracellulaires (hormones, sucres, neurotransmetteurs) qui sont fixés par des récepteurs membranaires ; la reconnaissance spécifique entre ces deux entités induit un mécanisme de signalisation cellulaire, aboutissant à la réaction de la cellule face au signal qu'elle a reçu.

Une membrane biologique possède sa propre collection de récepteurs et de transporteurs, ce qui lui confère sa spécificité biologique.

Les membranes biologiques sont donc des systèmes très complexes, dont les fonctions et les propriétés sont variées. Les mécanismes biologiques qui y ont lieu restent encore mal caractérisés, vu le nombre important de partenaires mis en jeu et l'absence de techniques permettant leur analyse directe. Une étape de simplification est donc nécessaire pour appréhender l'étude des membranes biologiques. Cette approche biophysique restreint la membrane à deux ou trois constituants élémentaires. Ainsi, de nombreux modèles de membranes synthétiques, relativement simples à paramétrer, ont été mis au point ; ces membranes biomimétiques sont généralement constituées d'un seul type de lipides, auxquels on ajoute ensuite un autre composant membranaire (protéine, peptide, stérol...), une toxine, ou une substance antibiotique.

## **I.2 Les membranes modèles**

Plusieurs types de modèles membranaires ont été développés ces dernières années. Leur objectif ou leur « challenge » commun est d'être à la fois suffisamment simples pour pouvoir les étudier directement par des techniques biophysiques classiques (telles que la RMN ou la diffraction des rayons X) et suffisamment représentatifs pour expliquer au mieux les mécanismes membranaires naturels.

Parmi ces modèles, nous pouvons citer :

- les micelles ou micelles mixtes (Fernández et al., 2001 ; Arora et al., 2001 ; Lindberg et al., 2001 ; Sanders et Landis, 1995) ; ces objets isotropes ne présentent pas de parties lipidiques en bicouche que l'on retrouve dans les membranes naturelles.

- les amphipols ou polymères amphipatiques, constitués d'un squelette polymère hydrophile et de chaînes latérales hydrophobes ; on peut ainsi solubiliser des protéines membranaires dans l'eau (Tribet et al., 1996).

- des phases cristal-liquides constituées de surfactants fluorés (Kimura et al., 1996) ; leurs propriétés peuvent se rapprocher de celle des membranes biologiques mais leurs constituants sont très différents.

- les liposomes (ou vésicules) multilamellaires ou unilamellaires (Da Costa et al., 2006) ; ce sont les modèles les plus utilisés actuellement car ils sont très faciles à préparer et ils sont constitués d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides, comparables à celle des membranes naturelles.

- les extraits naturels de membranes ; ce sont les modèles les plus représentatifs mais aussi les plus complexes à analyser. Actuellement, ils ne sont appliqués que pour obtenir des informations structurales très spécifiques (Wang et al., 1997 ; Watts et al., 1995).

- les bicelles (Gabriel et Roberts, 1984 ; Sanders et Prosser, 1998), objets discoïdaux qui présentent une bicouche de phospholipides plane et qui ont la remarquable propriété de s'orienter spontanément dans un champ magnétique.

Dans notre étude, nous avons essentiellement considéré des modèles membranaires de type liposome et bicelle. Les vésicules nous permettront d'étudier la dynamique et la structure de phases lipidiques. Notre travail sera surtout concentré sur le développement d'un nouveau modèle de type bicelle, que nous comparerons à celui utilisé actuellement et que nous appliquerons à l'étude de l'orientation de peptides membranaires par rapport à la membrane.

### I.2.1 Les dispersions aqueuses de phospholipides

Les phospholipides sont composés d'un squelette glycérol dont les fonctions alcools en position 1 et 2 sont estérifiées par deux chaînes aliphatiques (figure I.3 a)). La nature de ces composés peut varier avec la longueur (10-24 carbones) et le degré d'insaturation de ces chaînes d'acides gras. La tête polaire X, qui peut-être zwitterionique (dans le cas du PC ou PE) ou chargée (par exemple PS), caractérise les différentes classes de phospholipides.

### a) *Le polymorphisme lipidique*

En phase aqueuse et au-delà d'une concentration critique très faible (par exemple  $10^{-12}$  M pour le DMPC), les lipides vont s'associer spontanément de telle sorte à limiter le contact de leur partie hydrophobe avec l'eau. Cette condition est remplie par de nombreuses organisations moléculaires, assimilables à des phases cristal-liquides, intermédiaires entre l'état liquide et solide (phase mésomorphe).

Ce polymorphisme lipidique est basé sur l'importance relative des parties hydrophobes et hydrophiles des lipides :

- lorsque celles-ci s'équilibrent, le lipide est schématisé par un cylindre et la phase lamellaire, correspondant à un empilement de bicouches de phospholipides espacées par des couches aqueuses, est adoptée (figure I.4.i)

- lorsque la partie hydrophile est légèrement plus importante que celle hydrophobe, les phases lamellaires deviennent plus flexibles et des vésicules multilamellaires encore appelés liposomes se forment (figure I.4.ii) ; c'est le cas de la PC, la PS ou encore la PI. A partir de ces vésicules multilamellaires (MLVs), on peut former, par extrusion ou sonication, des vésicules unilamellaires dont le diamètre varie de quelques centaines d'Å pour des SUV (Small Unilamellar Vesicles), à quelques milliers d'Å pour des LUV (Large Unilamellar vesicles), jusqu'à quelques microns pour des GUV (Giant Unilamellar Vesicles). L'intérêt de ces derniers modèles réside dans la présence d'une seule bicouche de lipides séparant le milieu intérieur du milieu extérieur, à l'image des membranes naturelles.

- si la partie hydrophobe du lipide est plus importante que celle hydrophile, celui-ci est représenté par une forme conique (avec la tête polaire au sommet du cône) et une phase hexagonale est privilégiée (figure I.4.iii) ; c'est le cas de la PE.

- la phase micellaire concerne les lysophospholipides (ne contenant qu'une seule chaîne aliphatique) et les lipides à chaînes courtes, non présents dans les membranes naturelles (figure I.4.iv).

De manière plus précise, Israelachvili a défini un paramètre de compactage  $p$  des lipides dont la valeur est directement liée à la structure adoptée par ceux-ci (Israelachvili et al., 1976). Ce paramètre est défini par :  $p = v/a_0 l_c$ , où  $v$  est le volume de la partie hydrophobe,  $a_0$  la surface optimale de l'interface entre l'eau et la partie hydrophobe et  $l_c$  la longueur maximale effective des chaînes hydrophobes. On distingue également des phases intermédiaires (figure I.4.v), résultant d'un mélange plus ou moins miscible entre plusieurs phospholipides de nature différente (Israelachvili et al., 1980).

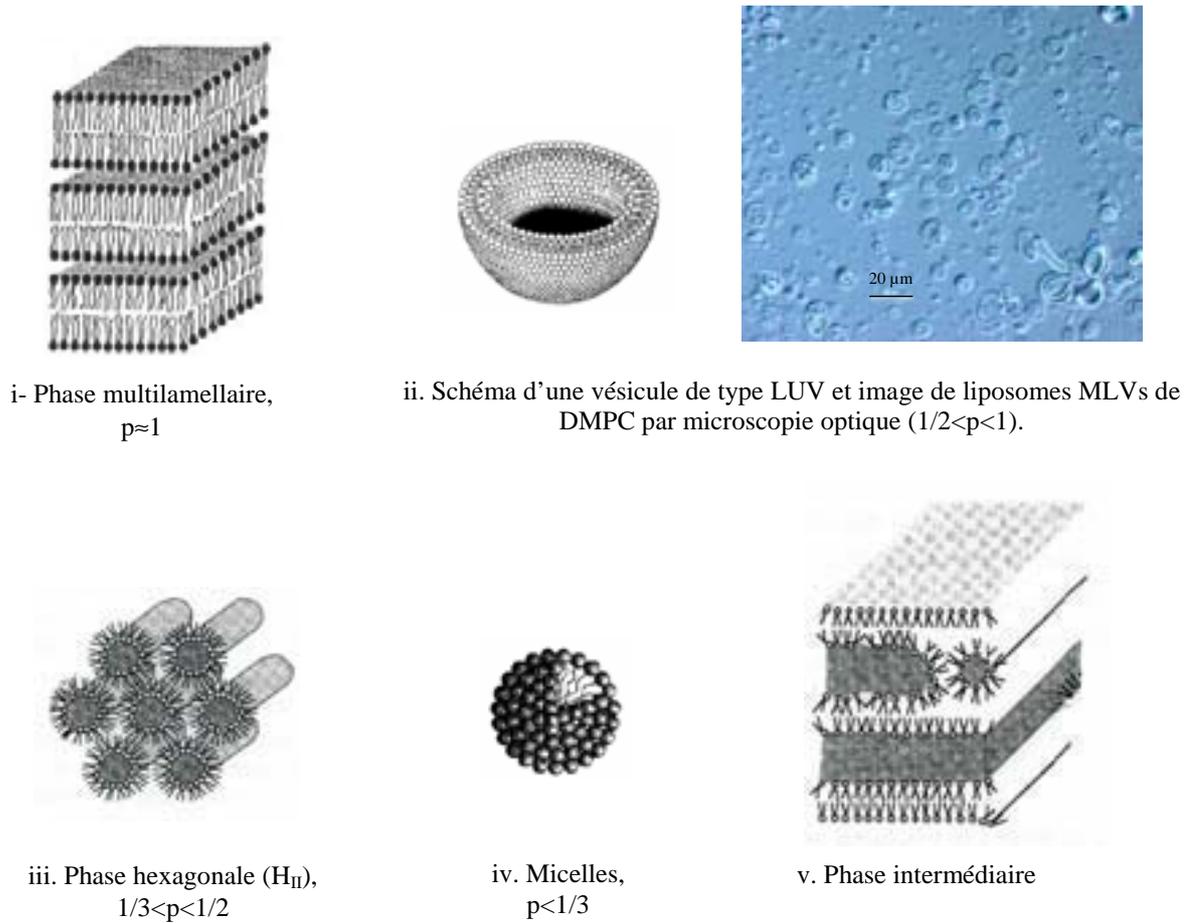


Figure 1.4 Représentations schématiques des différentes organisations adoptées par les lipides en phase aqueuse.

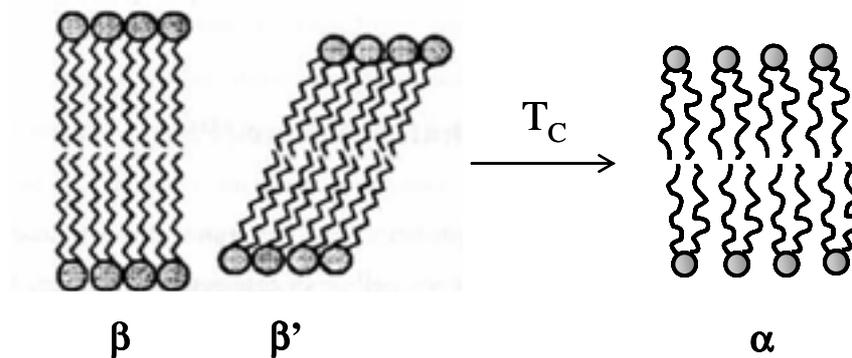


Figure 1.5 Les différentes conformations des chaînes hydrocarbonées lipidiques dans une bicouche

Parmi ces modèles membranaires, nous avons considéré pour notre étude des liposomes multilamellaires MLVs et unilamellaires (LUV et SUV).

*b) Le thermotropisme des phases lipidiques lamellaires*

Lorsqu'on augmente la température d'un système lipidique lamellaire, on observe le passage d'une phase ordonnée ou phase « gel », notée  $L_{\beta}$  ou  $L_{\beta'}$  (le signe « ' » indique que les chaînes des lipides sont inclinées par rapport à la normale à la bicouche, afin de diminuer les encombrements stériques), caractérisée par une conformation tout *trans* des lipides, à une phase fluide, notée  $L_{\alpha}$ , plus désordonnée comprenant des défauts « gauches » (figure I.5). Dans ce dernier cas, une augmentation du taux d'isomérisation *trans-gauche* des chaînes hydrocarbonées, entraîne une diminution de l'épaisseur hydrophobe des bicouches et une extension latérale des lipides. La température de transition de phase d'un lipide, noté  $T_C$ , traduit ce passage d'un état lamellaire « gel » compact à un état lamellaire fluide mobile. La valeur de  $T_C$  dépend de la longueur et du degré d'insaturation des chaînes d'acides gras. A titre d'exemple,  $T_C$  peut varier de  $-36^{\circ}\text{C}$  pour une PC possédant 16 atomes de carbone et une insaturation à  $74^{\circ}\text{C}$  pour une PE possédant 18 atomes de carbones et aucune insaturation (Cevc, 1983).

Les propriétés thermotropes et lyotropes des dispersions lipidiques en phase aqueuse ont abouti à l'établissement de diagrammes de phases température-hydratation spécifiques d'un seul lipide ou d'un mélange de lipides. On peut citer celui du DPPC, établi par diffraction des rayons X et des analyses d'enthalpie différentielle (Chapman et al., 1967 ; Rank et al., 1974).

Les techniques de diffraction des rayons X ou des neutrons aux petits angles (SAXS ou SANS) sont régulièrement utilisées pour caractériser ces différentes phases lipidiques ; elles permettent en effet de déterminer la forme et la taille des objets obtenus ainsi que la distance inter-particules (Riske et al., 2001 ; Bolze et al., 2000 ; McCaughan et Krimm, 1982).

La Résonance Magnétique Nucléaire du deutérium ou du phosphore est également une technique de choix pour déterminer les transitions des phases lipidiques ainsi que leur dynamique. Les mouvements intra et intermoléculaires des phospholipides engagés dans des phases lamellaires ont largement été décrits grâce au marquage sélectif au deutérium des molécules ou par détection directe de l'atome de phosphore des têtes polaires (Douliez et al., 1995 ; Dufourc et al., 1992 ; Dufourc, 1983 ; Davis, 1979 ; Gally et al., 1975 ; Seelig, 1977).

*c) Particularité du cholestérol*

L'influence du cholestérol sur les propriétés physiques des modèles membranaires a largement été étudié (Léonard et al., 2001 ; Simons et Ikonen, 2000 ; Léonard et Dufourc, 1991 ; Vist et Davis, 1990 ; Yeagle, 1985 ; Dufourc et al., 1984). Pour des concentrations supérieures à 20% molaire, le cholestérol supprime la transition entre les phases lamellaires  $L_{\beta}$  et  $L_{\alpha}$  ; il a ainsi pour effet de condenser les phospholipides en phase lamellaire fluide (augmentation de l'ordre) et d'espacer ceux en phase gel (augmentation du désordre) (Orädd et al., 2002).

### I.2.2 Le modèle membranaire « Bicelle »

*a) Présentation et historique du modèle*

Les travaux du groupe de Mary Roberts, débutés en 1984, vont contribuer à la création d'un nouveau modèle de membranes, appelé bicelles (« **Bilayered micelles** ») (Gabriel et Roberts, 1984 ; Gabriel et Roberts, 1986 ; Gabriel et Roberts, 1987 ; Gabriel et al., 1987 ; Bian et Roberts, 1990). Ces objets biomimétiques sont constitués d'un mélange approprié entre deux types de molécules : des lipides à chaînes aliphatiques longues (de 14 à 20 atomes de carbone) et des détergents (des sels biliaires ou des lipides à chaînes hydrocarbonées courtes, de 6 à 8 atomes de carbone).

Actuellement, la morphologie lipidique la plus reconnue qu'adopte ce système est une bicouche discoïdale, les lipides à chaînes longues se répartissant majoritairement dans la partie plane du disque et ceux à chaînes courtes dans le tore (figure I.6). Ces nano-disques appelés bicelles ne possèdent donc pas de compartiment aqueux interne comme les liposomes et présentent un domaine plan en bicouche, dont les propriétés sont proches d'une phase cristal liquide. Dans le cas des bicelles, cette phase cristal liquide est dite nématique, car elle présente un ordre d'orientation dans une seule direction de l'espace et pas d'ordre de position. Quand il y a un ordre d'orientation et un ordre de position dans une seule direction de l'espace, la phase est dite smectique, comme les phases lamellaires de lipides.

Cette structure bicellaire a clairement été mis en évidence par RMN pour des systèmes lipidiques de faible concentration ( $\approx 1,7\%$  (w :w)) par les travaux de Roberts ; ceux-ci ont été confirmés par la suite par des expériences de SANS (Lin et al., 1991).

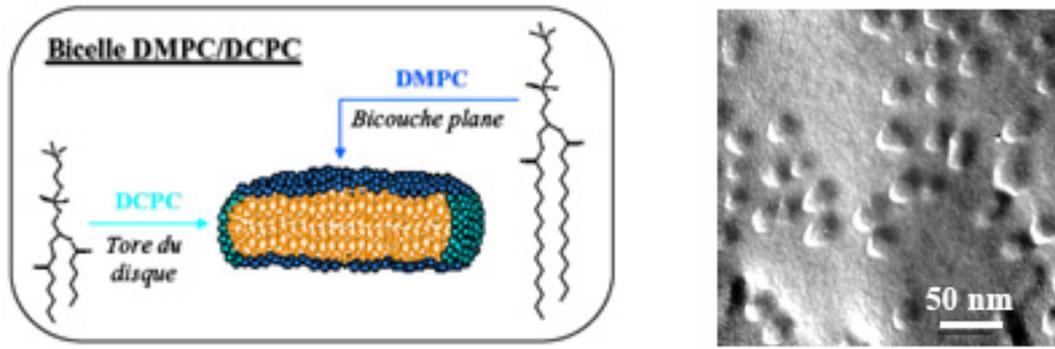


Figure I.6 : Schéma de la coupe transversale d'une bicelle constituée des lipides DMPC ( $C_{14}$ ) et DCPC ( $C_6$ ) et cliché de microscopie électronique de ces bicelles (Arnold et al., 2002).

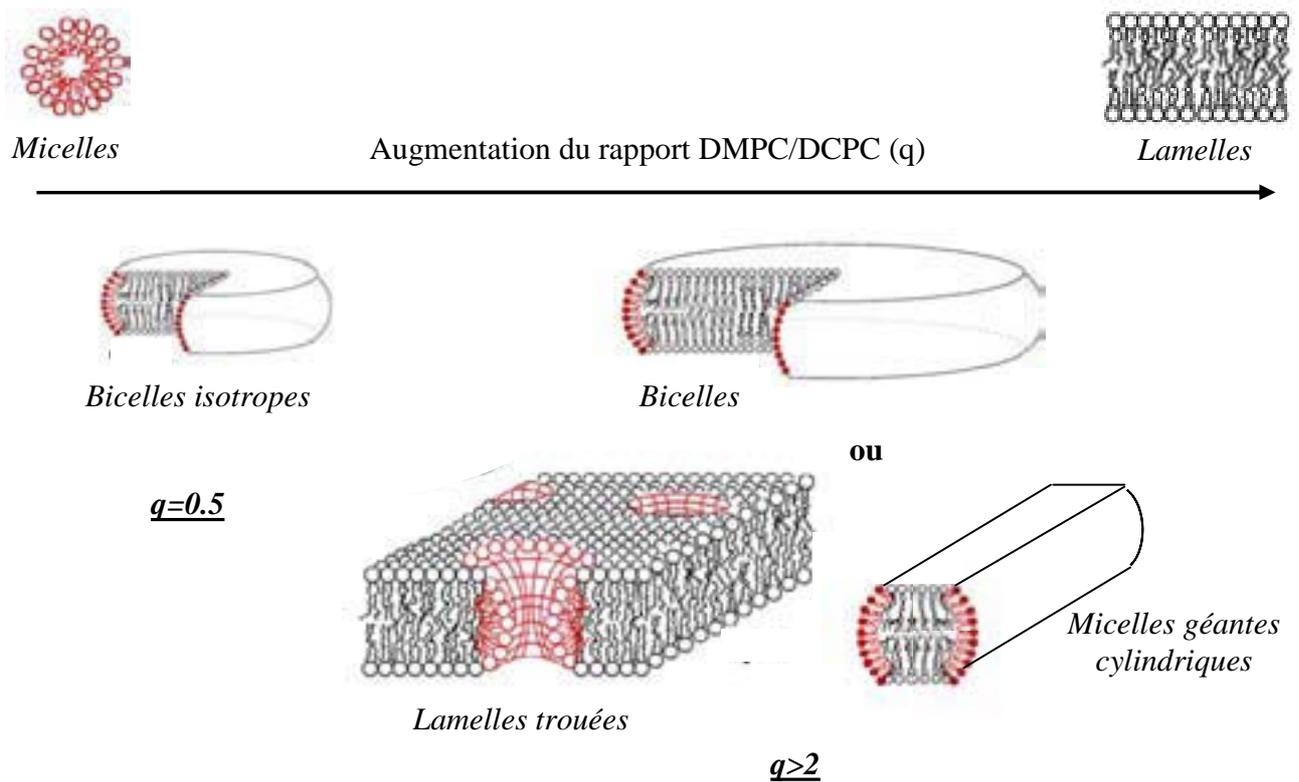


Figure I.7 : Les différentes morphologies proposées pour le système binaire DMPC/DCPC en fonction du rapport  $q$ , pour une hydratation de  $\approx 80\%$  (Prosser, 2002).

Pour des systèmes lipidiques plus concentrés ( $>3\%$  (w:w)), plusieurs morphologies ont été caractérisées par différentes techniques, suivant le rapport molaire  $q = [\text{lipide chaînes longues}]/[\text{lipide chaînes courtes}]$  (voir figure I.7) :

- pour  $q < 1$ , une phase isotrope a été mise en évidence par RMN et SANS correspondant à des micelles, des micelles mixtes ou des bicelles isotropes (« fast tumbling bicelles ») (Luchette et al., 2001).

- pour  $q > 2$  et dans une certaine gamme de températures, deux modèles structuraux s'opposent :

*le modèle bicellaire discoïdal* (Sanders et Schwonek, 1992 ; Sanders et Prosser, 1998 ; Sanders et Oxenoid, 2000) ; le système binaire DMPC( $C_{14}$ )/DCPC( $C_6$ ) (DM : Di-Myristoyl et DC : Di-Caproyl PhosphatidylCholine) avec 80% d'hydratation a été particulièrement étudié. Cette structure a été validée par RMN du deutérium (Vold et Prosser, 1996), RMN du phosphore (Raffard et al., 2000 ; Picard et al., 1999 ; Triba et al., 2005) et par des mesures de diffraction X aux petits angles (Hare et al., 1995). Ces disques ont également été observés par microscopie électronique pour un rapport molaire DMPC/DCPC égal à 3 ((Arnold et al., 2002), figure I.6). La taille des bicelles varie de 300 à 600 Å en fonction de la valeur du rapport  $q$  et selon la nature et la concentration en sels utilisés.

*le modèle des lamelles trouées*, proposé par le groupe de Katsaras qui s'appuie sur des mesures de SANS (Nieh et al., 2001 ; Nieh et al., 2002). Pour un rapport  $q = 3,5$ , une gamme de concentrations lipidiques de 0,1 à 0,25 g/ml et des températures comprises entre 35°C et 45°C, le système binaire DMPC/DCPC formerait une structure lamellaire perforée où le plan des lamelles serait essentiellement constitué du lipide à chaînes longues et le bord des trous par celui à chaînes courtes. Ce modèle a aussi été proposé par Bax (Gaemers et Bax, 2001) en s'appuyant sur des mesures de diffusion moléculaire par RMN et par Rowe et Neal (Rowe et Neal, 2003) par des mesures de fluorescence.

D'après de récentes études réalisées par microscopie optique polarisée (POM) et SANS (Nieh et al., 2004 ; Harroun et al., 2005 ; Katsaras et al., 2005), une autre alternative aux bicelles et lamelles trouées est proposée : le système DMPC/DCPC formerait une phase chirale nématique, constituées de micelles géantes cylindriques (« worm-like » or « ribbon-like » micelles), pour une composition lipidique en DMPC de  $\approx 75\%$ , des concentrations lipidiques variant de 2 à 40% et des températures comprises entre  $\approx 22$  et  $\approx 48^\circ\text{C}$ . van Dam et al. (van Dam et al., 2004), ont également observé par cryo-TEM (cryo-microscopie électronique à transmission) des micelles allongées quasi-cylindriques, pour le système

DMPC/DCPC avec  $2,2 < q \leq 3$  et dans des conditions d'hydratation très élevées ( $h > 95\%$ ). Dans ce type de structure, le DMPC occuperait toujours le plan de la bicouche (très restreint) et le DCPC les tores, ce qui est similaire au profil transversal d'une bicelle (voir figure I.7).

Dans la suite de notre étude et dans les conditions de concentration et de composition lipidique que nous avons utilisées, nous privilégierons toujours le modèle bicellaire, même s'il reste des ambiguïtés sur la structure adoptée par ce système binaire DMPC/DCPC. En effet, suivant les conditions expérimentales utilisées, le mélange binaire DMPC/DCPC peut adopter une structure isotrope, discoïdale, en micelles géantes ou éventuellement en lamelles trouées.

### *b) Les propriétés lyotropes et thermotropes des bicelles*

Nous venons de l'évoquer, la formation des objets bicellaires dépend des conditions d'hydratation (définie par :  $\text{masse des lipides} / (\text{masse des lipides} + \text{eau})$ ), de la composition lipidique et de la température du milieu.

Les diagrammes de phase du système binaire DMPC/DCPC, ont tout d'abord été établis par RMN du phosphore et du deutérium par Raffard et al. (Raffard et al., 2000) (il faut préciser que le terme de « phase » est employé ici pour qualifier un changement de polymorphisme lipidique détecté par RMN, ce qui ne correspond pas nécessairement à la définition de Gibbs d'une phase thermodynamique):

- pour une hydratation de 80% et une solution contenant 100 mM de KCl, le domaine d'existence des bicelles, noté B, s'étend de 65 à 88% en mole de DMPC, pour des températures comprises entre 25 et 45°C (figure I.8) ; pour des températures basses ( $< 20^\circ\text{C}$ ), une phase isotrope, notée I, (micelle mixtes ou bicelles de très petite taille) est observée, tandis qu'une phase lamellaire, notée L, est obtenue pour des températures hautes ( $> 45^\circ\text{C}$ ).

- pour une composition lipidique de 78% en mole de DMPC, soit un rapport  $q=3,5$ , (avec toujours 100 mM de KCl), le domaine d'existence des bicelles B, s'étend de 40 à 98% en hydratation pour des températures comprises entre 28 et 45°C (figure I.9 a)).

Plusieurs diagrammes, température en fonction de la concentration lipidique, ont aussi été proposés par le groupe de Katsaras suivant des mesures de SANS ; le dernier proposé pour un rapport  $q=3,2$  (Harroun et al., 2005) est présenté en figure I.9 b).

Les diagrammes de Raffard et Harroun sont assez similaires ; ils présentent les deux trois mésophases principales : une isotrope pour les faibles températures, une lamellaire pour les températures hautes et une phase chirale nématique pour les températures intermédiaires.

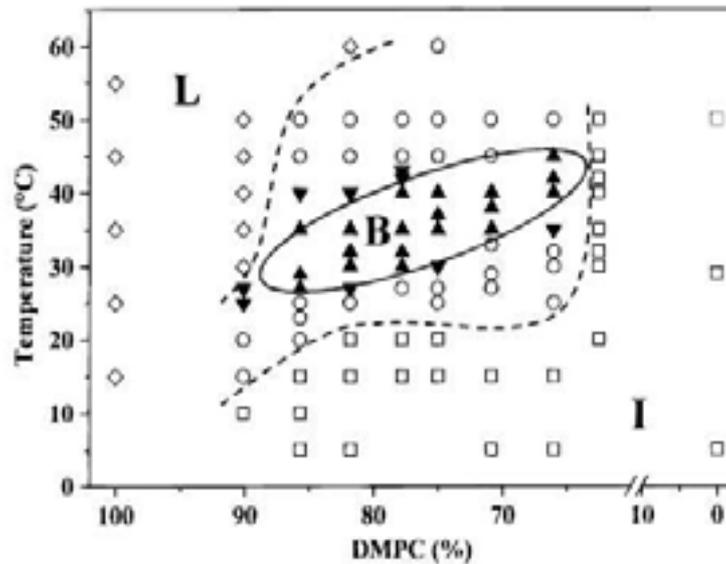


Figure I.8 : Diagramme de phase, établi par RMN  $^{31}\text{P}$ , du système binaire DMPC/DCPC en fonction de la température et de la composition en mole de DMPC, pour une hydratation de 80%. Les lettres désignent les phases lipidiques pures : **I** pour isotrope, **B** pour bicelles et **L** pour lamellaire (Raffard et al., 2000).

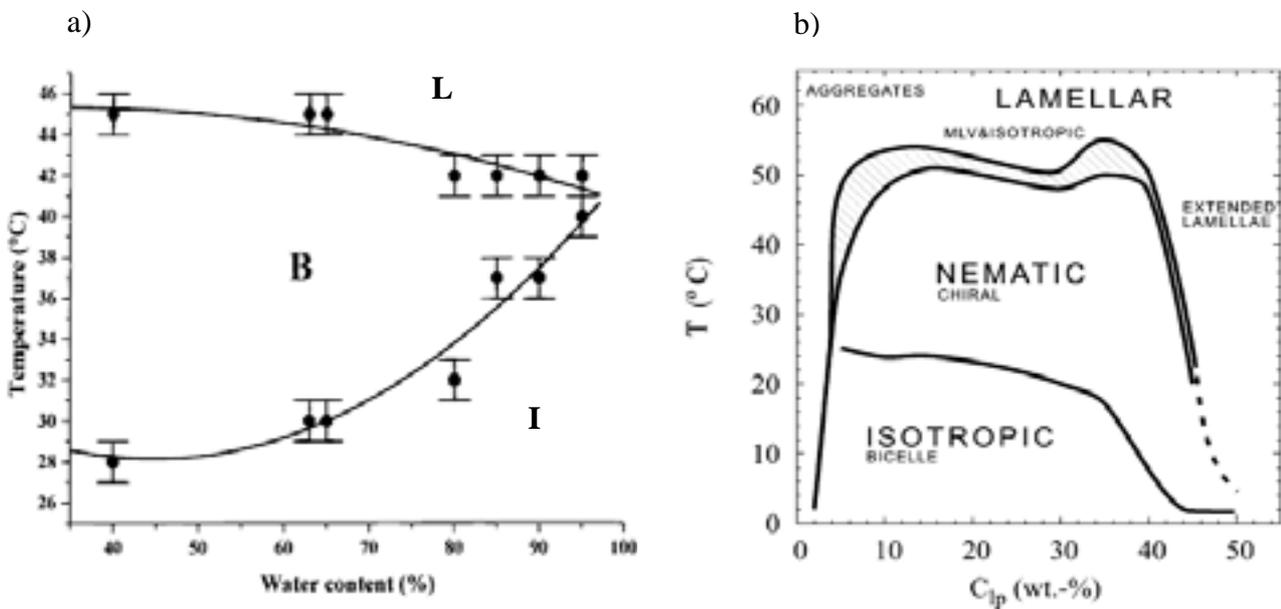


Figure I.9 : Diagrammes de phase du système binaire DMPC/DCPC en fonction de la température et a) de l'hydratation pour  $q=3.5$ , établi par RMN  $^{31}\text{P}$  (Raffard et al., 2000), et b) de la concentration lipidique, notée  $C_{lp}$ , pour  $q=3.2$ , établi par des mesures de SANS (Harroun et al., 2005).

La seule différence est que cette phase chirale correspond à des bicelles pour Raffard et des micelles géantes cylindriques pour Harroun ; le domaine d'existence de ces dernières semble néanmoins plus étendu en température que celui des bicelles.

*c) Orientation des bicelles dans un champ magnétique*

Les bicelles possèdent la propriété remarquable de s'orienter spontanément dans un champ magnétique intense (supérieur à 1 Tesla) (Sanders et Schwonek, 1992). L'origine de cet alignement dans un champ est due à l'anisotropie de susceptibilité magnétique  $\Delta$  des lipides, dont la symétrie est considérée comme axiale, à cause entre autre des mouvements de rotation autour de l'axe moléculaire. Dans ce cas,  $\Delta$  est définie par la différence entre la susceptibilité diamagnétique parallèle  $\Delta_{//}$ , et celle perpendiculaire  $\Delta_{\perp}$ , à l'axe principal de la molécule (Seelig et al., 1985). Si  $\Delta < 0$ , l'alignement par rapport au champ magnétique est perpendiculaire tandis qu'il sera parallèle pour  $\Delta > 0$ . Dans le cas des phospholipides constituant des bicelles, les chaînes hydrocarbonées ont un terme  $\Delta < 0$  et les liaisons esters du squelette glycérol ont un terme  $\Delta > 0$ . Or, ces dernières sont orientées perpendiculairement aux chaînes aliphatiques ; ainsi les deux fonctions participent à orienter l'axe principal de la molécule à  $90^\circ$  par rapport au champ magnétique. L'anisotropie diamagnétique globale des bicelles est donc négative et la normale à la bicouche de ces objets s'oriente perpendiculairement au champ magnétique statique (figure I.10). D'après Raffard et al (Raffard et al., 2000), ce degré d'orientation est amélioré en présence de sels KCl (100 mM).

Des ions lanthanides paramagnétiques ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ), dont l'anisotropie diamagnétique est largement positive et venant se positionner au niveau du phosphore  $\text{PO}_4^-$  des têtes lipidiques, peuvent être ajoutés à la solution bicellaire ; les objets discoïdaux vont alors s'orienter avec la normale à la bicouche parallèle au champ magnétique (basculement de  $90^\circ$ ) (Prosser et al., 1996 ; Prosser et al., 1998 ; Prosser et al., 1999 ; Crowell et Macdonald, 2001 ; Tiburu et al., 2001).

On peut également orienter la normale des bicelles avec une valeur d'angle donnée par rapport au champ magnétique grâce à des expériences de rotation de l'échantillon avec un angle variable (VASS : Variable Angle Sample Spanning) (Tian et al., 1999 ; Zandomenighi et al., 2001).

Les bicelles sont donc de véritables goniomètres moléculaires dans un champ magnétique, ce qui explique leur intérêt pour des expériences RMN.

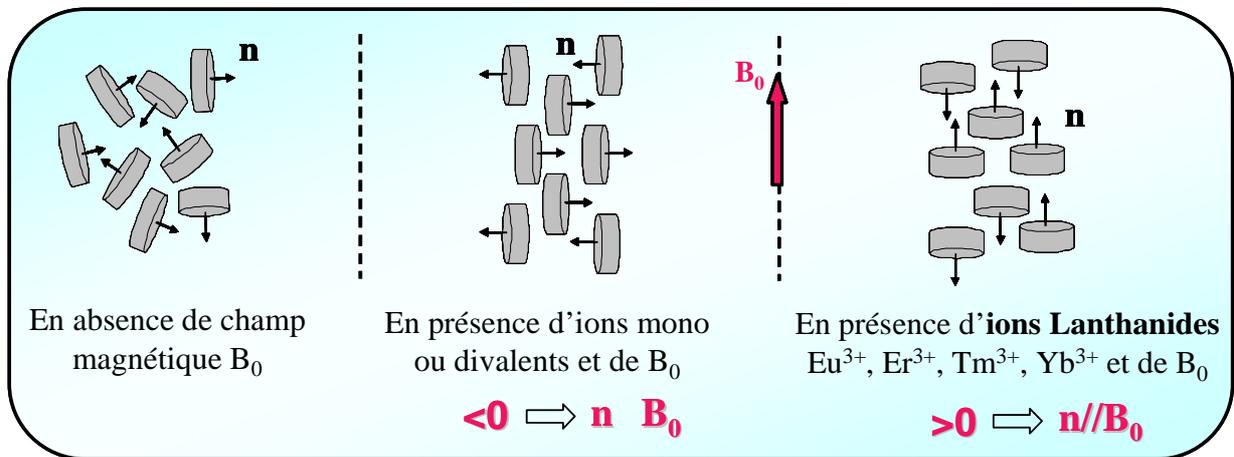


Figure I.10 : Orientation des bicelles de type DMPC/DCPC par rapport au champ magnétique statique  $B_0$ .

*d) Les bicelles et l'étude des biomolécules par RMN*

L'avantage de l'orientation spontanée des bicelles dans un champ magnétique réside dans le fait qu'il permet d'imposer à une molécule environnante ou insérée dans ce modèle membranaire, un alignement par rapport à  $B_0$ . Or, pour ce type d'échantillon cristal-liquide, les interactions anisotropes rencontrées et donc la fréquence des signaux RMN dépendent de l'orientation des molécules par rapport au champ magnétique (voir Chapitre II.1), ce qui permet d'en déduire des informations structurales. Cette propriété a trouvé de nombreuses applications dans l'étude structurale par RMN de protéines hydrosolubles et membranaires (Prosser et al., 2006) :

- dans le premier cas, les molécules solubles dans l'eau acquièrent un léger degré d'alignement dans le champ magnétique créé par le milieu orienté bicellaire. La mesure des couplages dipolaires résiduels permet alors de déterminer l'orientation relative des différentes parties de la molécule et d'obtenir des contraintes géométriques (distances inter-atomiques, valeurs d'angles) utilisables pour la détermination de la structure de la molécule étudiée (Bax et Tjandra, 1997 ; Bax et Tjandra, 1997 ; Tolman et al., 2001 ; Kurita et al., 2003 ; Lancelot et al., 2005).

- dans le cas des protéines membranaires, l'objectif est de déterminer leur structure directement dans un environnement membranaire. Mais il est très difficile d'obtenir des spectres de la biomolécule insérée dans les bicelles avec une résolution suffisante pour en déduire des informations structurales précises. La technique de rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique ( $54,7^\circ$ ) (HR-MAS, High Resolution-Magic Angle Spanning) permet de moyenniser les interactions anisotropes rencontrées pour ce type d'échantillon et donc d'améliorer cette résolution spectrale (Sizun et al., 2004) ; de plus, les informations structurales obtenues dans les bicelles sont souvent plus précises que celles obtenues avec d'autres modèles plus standards comme des bicouches de phospholipides (Carlotti et al., 2002 ; Sanders et Oxenoid, 2000).

Actuellement, les bicelles voient surtout leur utilité dans la détermination, par RMN  $^{15}\text{N}$ , de l'orientation adoptée par une protéine membranaire, marquée  $^{15}\text{N}$ , par rapport à la membrane (Park et al., 2005 ; Triba et al., 2006b ; Park et al., 2006). C'est d'ailleurs dans cet objectif que nous utiliserons les bicelles pour notre travail.

Il est aussi possible d'utiliser le mélange lipidique des bicelles avec des rapports molaires  $q$ , inférieurs à 1, ce qui forme des objets bicellaires de très petite taille, non orientés et aux propriétés isotropes. Des protéines membranaires liées à ces bicelles peuvent alors être étudiées par les techniques classiques de RMN structurales liquides. Cette procédure présente

des avantages par rapport à l'étude dans des micelles car le domaine en bicouche de la bicelle permet d'éviter le changement de structure de la protéine éventuellement induit par la forte courbure de la surface d'une micelle (Lindberg et al., 2003 ; Matsumori et al., 2006).

Il faut préciser que les détergents doux employés dans la composition des bicelles (3-(cholamidopropyl)diméthylammonio-2-hydroxy-1-propane-sulfonate (CHAPSO) et le DCPC) offrent un environnement inerte à l'étude de biomolécules et que l'activité enzymatique de plusieurs protéines membranaires reconstituées dans les bicelles est souvent conservée (Sanders et Landis, 1995).

De plus, les bicelles ne diffusent pas la lumière (échantillon translucide), ce qui permet de les utiliser aussi pour des expériences de spectroscopies optiques par fluorescence ou dichroïsme circulaire.

#### *e) Evolution du modèle bicellaire*

Des études récentes s'attachent maintenant à modifier la composition des bicelles afin de les faire évoluer vers un système plus physiologique : il est possible par exemple de remplacer les phospholipides contenant des fonctions esters, facilement hydrolysables, par des fonctions éthers, qui les rendent plus résistants à des pH extrêmes (Aussenac et al., 2005). D'autres types de protéines peuvent ainsi être étudiés, comme celles associées aux lipides de la membrane des *Archaea* bactéries, qui ont su s'adapter à des conditions de température et de pH extrêmes. Il est également possible de former des bicelles avec des lipides à chaînes plus longues ou contenant des degrés d'insaturation comme POPC (Triba et al., 2006a). De même, des assemblages bicellaires chargés peuvent être obtenus en incorporant des composés amphiphiles anioniques (DMPG) ou cationiques (DMTAP) (Crowell et Macdonald, 1999 ; Marcotte et al., 2003). Il est aussi possible d'incorporer du cholestérol (jusqu'à  $\approx 20\%$  en moles) (Minto et al., 2004 ; Tiburu et al., 2004).

#### *f) Orientation des bicelles avec leur normale parallèle au champ magnétique*

Nous avons vu qu'il était possible de moduler l'orientation des bicelles dans le champ magnétique soit par l'ajout d'ions lanthanides, soit en utilisant la technique VASS. Dans le premier cas, le paramagnétisme des ions tels  $\text{Eu}^{3+}$  ou  $\text{Yb}^{3+}$  perturbe fortement les expériences RMN en élargissant les raies ; le basculement de  $90^\circ$  entraînerait également le passage d'une phase bicellaire nématique à une phase lamellaire smectique (Katsaras et al., 1997 ; Prosser et al., 1998) ; de plus, ces ions pourraient se lier à une protéine membranaire insérée dans les bicelles, et venir perturber sa conformation et donc sa fonction. Dans le deuxième cas, la

technique VASS oblige une rotation systématique de l'échantillon, non adaptée à l'étude orientationnelle de protéines membranaires.

Des recherches ont donc été effectuées pour obtenir un alignement des bicelles dans le champ magnétique, différent de  $n \perp B_0$ , de manière spontanée et uniforme; l'orientation où la normale à la bicouche des bicelles est parallèle à  $B_0$  a été particulièrement étudiée. Il sera ainsi intéressant de pouvoir comparer les données structurales et dynamiques de biomolécules obtenues dans deux environnements lipidiques orientés différemment de  $90^\circ$ . Des premières études ont consisté à insérer dans les bicelles des composés possédant une susceptibilité diamagnétique  $\Delta$  positive, comme certains peptides (Picard et al., 1999) ou des composés aromatiques amphiphiles (Sanders et al., 1993); les cycles phényles ont en effet un  $\Delta$  largement positif (Sakurai et al., 1980; Visscher et al., 2006). Mais la quantité de ces additifs est souvent importante et les résultats ne sont pas entièrement satisfaisants. Pour parer à ces problèmes, le groupe de Cho (Tan et al., 2002; Cho, 2001) a développé un nouveau phospholipide, le dodécanoyl-2-(4-(4-biphényl)butanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (DBBPC), contenant deux cycles phényles sur l'une de ses chaînes aliphatiques; la susceptibilité diamagnétique de cette molécule est donc positive. Cette étude a montré que, pour un rapport molaire  $q=6$ , le mélange lipidique DBBPC/DCPC formait des bicelles stables, entre 10 et  $54^\circ\text{C}$ , dont l'orientation spontanée est telle que la normale à la bicouche est parallèle au champ magnétique statique.

Nous avons repris les bases de cette étude en considérant à la place du DBBPC (chaîne aliphatique en  $C_{12}$ ), le tétradécanoyl-2-(4-(4-biphényl)butanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine ou TBBPC, (chaîne hydrocarbonée en  $C_{14}$ ), dont la longueur de chaîne est plus proche de celle des lipides membranaires naturels (figure I.11). Suivant le même principe que Raffard et al. (Raffard et al., 2000), nous étudierons par RMN des Solides ( $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$  et  $^{14}\text{N}$ ) les différentes morphologies adoptées par ce système binaire TBBPC/DCPC en fonction de l'hydratation, la composition lipidique et la température du milieu; notre objectif étant de déterminer les domaines d'existence en fonction de ces conditions des bicelles TBBPC/DCPC, dont la normale s'oriente parallèlement au champ magnétique statique (voir Chapitre V). L'intérêt sera également de comparer ce nouveau modèle bicellaire avec celui dit classique, constitué des lipides DMPC/DCPC (voir Chapitre VI).

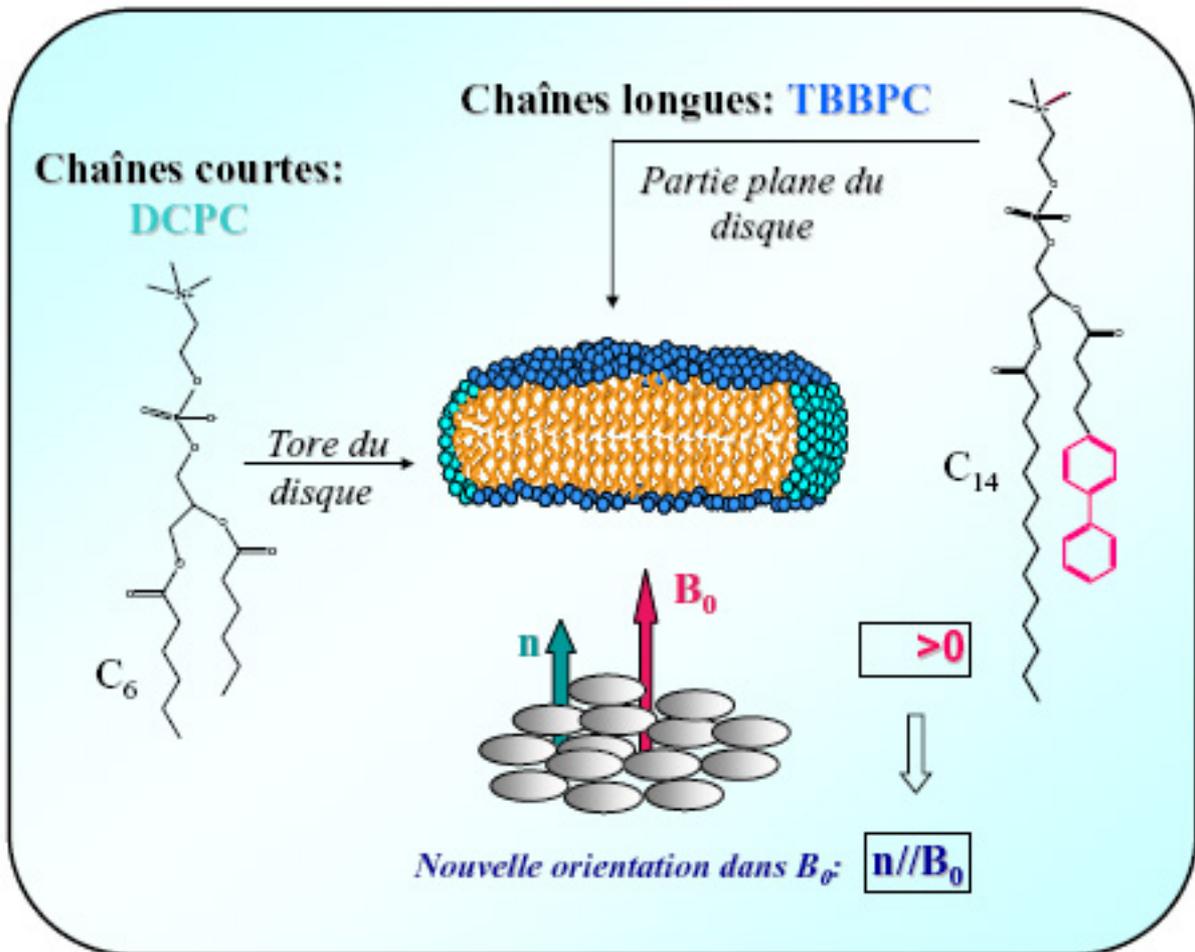


Figure I.11 : Nouvelles bicelles constituées de TBBPC et DCPC s'orientant telle que la normale à leur bicouche soit parallèle au champ magnétique statique.

## **I.3 Les protéines membranaires**

Plus de 30% des protéines codées par notre génome sont des protéines membranaires. Afin d'expliquer la fonction de chacune d'elle, il est nécessaire de déterminer leur structure tridimensionnelle dans leur environnement natif, à savoir la membrane lipidique. Cette tâche demeure encore un challenge de nos jours pour les principales techniques de détermination structurales que sont la Diffraction des rayons X et la Résonance magnétique Nucléaire en solution. En effet, il est difficile voire impossible de cristalliser une protéine au sein de sa membrane naturelle et ce type d'échantillon possède des propriétés anisotropes faisant appel à la RMN des Solides.

### I.3.1 Les méthodes RMN pour l'étude structurale de protéines membranaires

La première étape est l'expression chimique ou biologique des protéines, sélectivement ou totalement marquées avec des isotopes d'intérêt pour les études RMN, tel le carbone  $^{13}\text{C}$ , le deutérium  $^2\text{H}$  ou encore l'azote  $^{15}\text{N}$ ; le proton, noyau le plus abondant naturellement, est également largement utilisé. La combinaison des études RMN de ces différents noyaux permet d'obtenir des informations complémentaires sur la structure locale et globale d'une protéine.

#### *a) La RMN en solution*

La méthode pour résoudre la structure 3D d'une protéine en solution a été initialement développée par Wütrich (Wütrich, 1986); il s'agit de corréler les différentes informations structurales obtenues par des séquences du type : COSY (Correlation Spectroscopy (Aue et al., 1975), qui renseigne sur les couplages scalaires de type  $J^1$  à  $J^3$  (structure primaire), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy, (Braunschweiler et Ernst, 1983), qui fournit les couplages scalaires de type  $J^1$  à  $J^5$  (structure secondaire). Les données sur l'agencement de la protéine dans l'espace (structure tertiaire) sont obtenues par des séquences de type NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (Jeener et al., 1979), ou ROESY (Rotational Overhauser Enhancement Spectroscopy, (Bothner-By et al., 1984; Bax et Davis, 1985).

Il est possible d'appliquer cette procédure sur une protéine membranaire solubilisée dans un détergent (micelle); la protéine se situe alors dans un environnement membranaire isotrope. De plus, le développement d'une nouvelle séquence d'impulsion, TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) permet de déterminer des structures de

protéines membranaires de grande taille (environ 180 acides aminés) (Arora et al., 2001 ; Fernández et al., 2001). Cependant, comme nous l'avons déjà évoqué, la forte courbure d'une micelle peut contraindre la protéine à adopter une structure différente de celle observée naturellement. De plus, la bicouche lipidique plane d'une membrane naturelle doit imposer à cette structure protéique des contraintes différentes et des degrés de liberté plus restreints, qu'il faut prendre en considération. Ainsi, ces études préliminaires de protéines membranaires en solution ou dans des micelles donnent des premières indications structurales mais n'écartent pas l'analyse dans un modèle membranaire plus « réaliste », comme dans des liposomes ou des bicelles, ce qui fait appel à la RMN des Solides.

*b) La RMN des solides*

Les protéines membranaires peuvent être étudiées par RMN des solides sous plusieurs formes :

- des poudres lyophilisées ou des monocristaux ; dans ce cas l'interaction dipolaire est prédominante en mode statique. Cependant, par rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique (entre 10 et 20 KHz) et en se plaçant à basse température, il est possible de moyennner ces interactions anisotropes et d'attribuer les résonances de quelques résidus du squelette peptidique et des chaînes latérales (Egorova-Zachernyuk et al., 2001 ; McDermott et al., 2000 ; Lorch et al., 2005).

- associé à des modèles membranaires non orientés tels que les liposomes ; des études en rotation à l'angle magique (HR-MAS) sont alors envisageables afin de définir la structure ou l'orientation de la molécule par rapport à la membrane.

- associées à des modèles membranaires orientés ; parmi les systèmes les plus récents, on retrouve les bicelles que nous avons déjà évoqué dans la partie I.2.2 d). Une autre technique consiste à empiler des membranes lipidiques entre deux plaques de verre, que l'on oriente ensuite mécaniquement dans le champ magnétique (nécessité d'utiliser une bobine plate) ; cette méthode a été appliquée avec succès par le groupe de Tim Cross pour l'étude structurale de la Gramicidine A (Ketchem et al., 1993 ; Ketchem et al., 1996). En utilisant des bicouches de phospholipides orientées, le groupe d'Opella a également résolu la structure complète d'une protéine membranaire de bactériophage marquée à l'azote 15 (Marassi et al., 1997) et établi des corrélations structure-fonction au sein de la protéine Vpu du génome HIV-1 (Marassi et al., 1999) ; ils ont aussi comparé la diffusion rotationnelle de cette même protéine dans des bicelles et des bicouches orientées mécaniquement (Park et al., 2005). On peut aussi citer le travail de Bechinger qui a étudié par cette même technique l'insertion et

l'orientation de peptides transmembranaires de type poly-alanine marqués N<sup>15</sup> (Bechinger, 2001). L'orientation d'une protéine insérée dans des bicouches lipidiques orientées peut également être déterminée par la technique de PISEMA (Polarization Inversion with Spin Exchange at the Magic Angle) dans des expériences de RMN des solides à deux dimensions (Wang et al., 2000). Cette méthode d'empilement de membranes lipidiques entre deux lames est donc devenue assez courante aujourd'hui ; elle permet en effet d'insérer suffisamment de biomolécules dans les bicouches pour pouvoir les étudier par RMN. Ce modèle présente cependant un certain nombre d'inconvénients notamment dans la préparation de l'échantillon qui est assez difficile. L'hydratation des bicouches lipidiques est en effet mal contrôlée et souvent très faible, ce qui n'est pas représentatif des membranes naturelles. De plus, les impulsions radiofréquences utilisés en RMN des solides sont très intenses, ce qui entraîne une augmentation de la température de l'échantillon, qui est déshydraté et rapidement détérioré.

Pour étudier l'orientation de peptides membranaires, nous avons choisi dans notre cas le modèle des bicelles, dont les propriétés sont proches de celle des membranes naturelles ; ce sont en effet des systèmes dont l'hydratation est très élevée et contrôlée, leur dynamique est importante et ils existent à des températures physiologiques.

Comme on vient de le voir, beaucoup d'études s'attachent à déterminer la structure 3D des protéines pour ensuite remonter à leur fonction ; mais l'approche de la membrane dans son ensemble est également indispensable ; ainsi de plus en plus de recherches se consacrent actuellement aux interactions protéines-lipides ou aux modifications de la membrane lipidique au contact d'une protéine (modèle du matelas, (Killian, 1998 ; Killian et Nyholm, 2006)). Dans cette approche, la RMN des Solides du deutérium apporte de nombreuses informations sur la dynamique de la membrane et les perturbations qu'elle subit.

La RMN est certes une technique originale et compétitive pour l'étude des biomembranes, mais il ne faut pas se limiter qu'à celle-ci ; beaucoup d'autres techniques permettent d'avoir des informations complémentaires comme le dichroïsme circulaire qui renseigne sur la structure secondaire d'une protéine, la diffraction des rayons X (WAXS ou SAXS, Wide or Small Angle X-ray Scattering), qui donne des informations structurales mais nécessite l'obtention de cristaux ou de motifs répétés à grande échelle, la modélisation moléculaire, la spectroscopie Infra-Rouge et Raman, la fluorescence, la microscopie optique et électronique...

### I.3.2 Les peptides membranaires étudiés

Les deux peptides membranaires que nous avons considérés sont la Méthionine Enképhaline et une forme mutée du fragment transmembranaire d'un peptide de la famille des récepteurs à tyrosine kinase, *Neu/erbB-2*. Notre objectif est de préciser leur orientation par rapport à la membrane par RMN.

#### a) *La Méthionine Enképhaline*

Ce pentapeptide appartient à la famille des enképhalines, qui sont des neurotransmetteurs se fixant sur le même récepteur que la morphine dans le cerveau humain. Ils ont un effet analgésique en provoquant une diminution de la sensibilité.

La majorité des peptides enképhaliques ont en commun la séquence d'acides aminés suivante : -Phe-Gly-Gly-Tyr-, notée Enk ; ils sont issus de la protéolyse du précurseur : la pro-enképhaline (figure I.12), dont la maturation génère la Méthionine Enképhaline (Met-Enk), la Leucine Enképhaline (Leu-Enk) ainsi que deux autres peptides à sept et huit résidus (Enk-MRF et Enk-MRGL). La formule développée de la Met-Enk est présentée en figure I.13.

La Met-Enk et la Leu-Enk ont été identifiés pour la première fois par Hugues et Kosterlitz dans le cerveau de porc (Hughes et al., 1975) ; ces ligands morphiniques endogènes sont en effet sécrétés par le système nerveux central et sont présents dans les neurones et les terminaisons nerveuses. Ces composés sont qualifiés d'opioïdes car ils se fixent sur des récepteurs opiacés ; ceux-ci possèdent sept domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines intracellulaires guanosine triphosphate dépendantes (protéines G) (figure I.14). Il existe trois sortes de récepteurs opiacés : mu (  $\mu$  ), delta (  $\delta$  ) et kappa (  $\kappa$  ), très largement distribués dans le cerveau et qui modulent plusieurs fonctions dont la réponse à la douleur, au stress et le contrôle des émotions. Les récepteurs  $\mu$  et  $\delta$ , sur lesquels se fixent la Met-Enk et la Leu-Enk, contrôlent plus précisément l'effet euphorisant tandis que l'activation du récepteur entraîne des troubles de l'humeur.

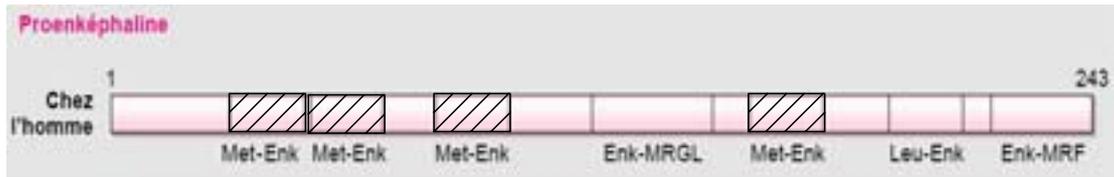


Figure I.12 : Schéma du précurseur Pro-enképhaline dont est issue la Méthionine Enképhaline.

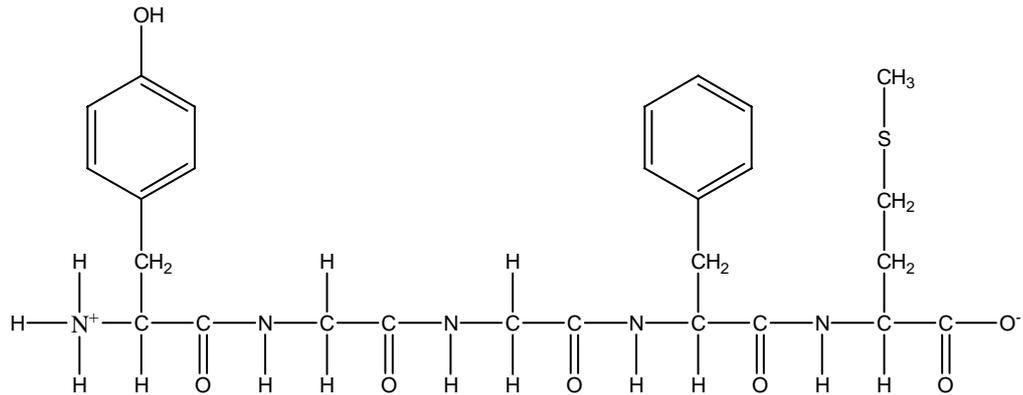


Figure I.13 : Formule développée de la Méthionine Enképhaline

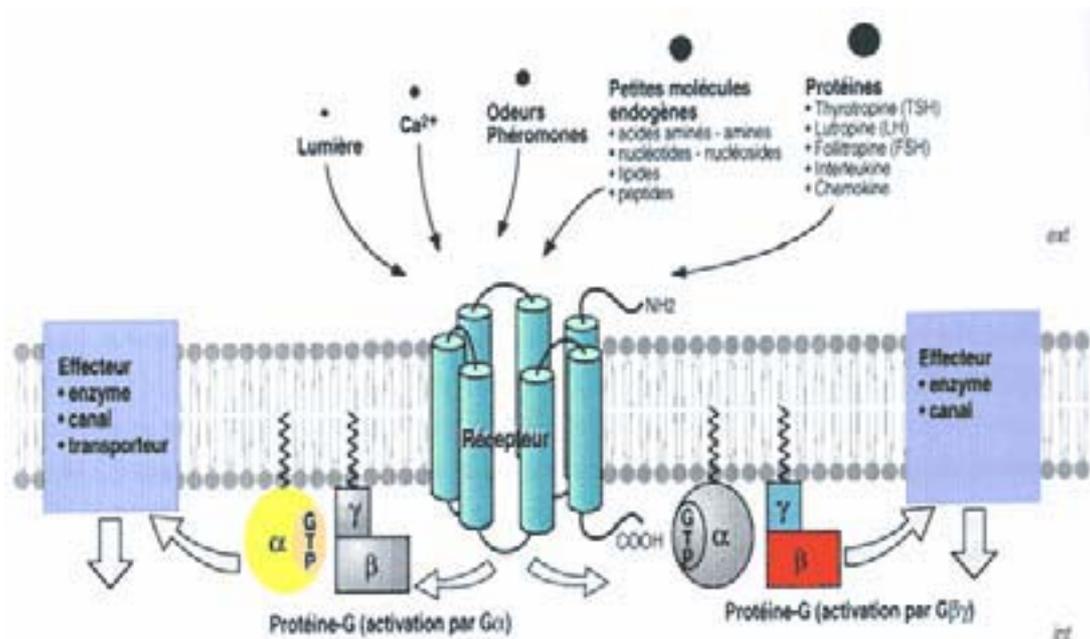


Figure I.14 : Schéma d'un récepteur opiacé à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G intracellulaires (Sarret).

Avant de se lier au récepteur opiacé, la Méthionine Enképhaline, que nous noterons dorénavant, Menk, entre en contact avec la membrane plasmique. De nombreuses études ont cherché à savoir si ce peptide adoptait une conformation particulière au moment de son interaction avec la membrane :

- d'après Graham et al. (Graham et al., 1992), la Menk ne s'agrège pas en solution aqueuse et ne présente pas de conformation stable définie (pelote statistique). Ils ont également montré qu'en présence de 50 mM de Sodium Dodécyle Sulfate (SDS), la Menk présente les caractéristiques d'un coude  $\beta$ , stabilisé par des interactions hydrophobes aromatiques entre les chaînes latérales de la tyrosine et de la phénylalanine (figure I.15).

- d'après Deber et Behnam (Deber et Behnam, 1984), la Menk s'associe par interactions hydrophobes avec des micelles de phospholipides neutres (lysophosphatidylcholine) et par attraction électrostatique avec des micelles de phospholipides chargés (lysophosphatidylglycérol). Les chaînes latérales des résidus méthionine, phénylalanine et éventuellement de la tyrosine sont en contact avec la partie intérieure apolaire des micelles tandis que la partie C-terminale du peptide serait localisée à la surface polaire des lipides.

- d'après Hick (Hicks et al., 1992), l'interaction entre la Menk et des micelles de SDS est plutôt de nature extrinsèque et celle avec des micelles de lysophosphatidylcholine, de nature légèrement intrinsèque.

- Marcotte et al. (Marcotte et al., 2003) ont étudié l'interaction de la Menk avec des bicelles neutres (Bic PC) et chargées (10% mol de DMPC est remplacé par DMPE, Bic PC/PE, ou DMPG, Bic PC/PG) ; la profondeur d'insertion du peptide dans la bicouche des bicelles est modulée par la composition de ces modèles membranaires et plus particulièrement par la balance entre les interactions hydrophobes et électrostatiques ; ainsi le degré de pénétration de la Menk dans ces différentes bicelles suit l'ordre suivant : Bic PC > Bic PC/PE > Bic PC/PG.

Toutes ces études tendent à localiser la Menk préférentiellement à l'interface entre les parties polaires et apolaires de la membrane. Ceci a aussi été suggéré par Sizun et al. (Sizun et al., 2004) en décelant des corrélations de type NOE entre le proton  $H_{\alpha}$  de la méthionine et des protons du squelette glycérol.

Marcotte et al. (Marcotte et al., 2004) ont également déterminé la structure tridimensionnelle de la Menk inséré dans des bicelles isotopes neutres (Bic PC) et chargées (Bic PG). Cette étude leur a permis de montrer que la Menk pouvait adopter plusieurs conformations pour un même environnement membranaire. Un autre résultat intéressant est

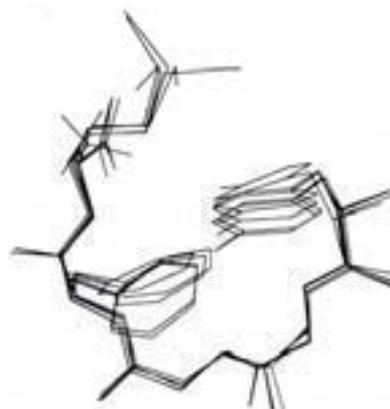
qu'environ 60% de la Menk initialement présente en solution s'associeraient avec la membrane des bicelles.

Nous essayerons de confirmer l'orientation de la Menk à l'interface de la membrane en étudiant son association avec des bicelles par RMN  $^{15}\text{N}$  ; pour cela, trois acides aminés seront marqués sélectivement à l'azote 15 (Menk  $^{15}\text{N}_3$ ) ; nous comparerons nos résultats avec les études précédentes et en particulier avec celle de modélisation moléculaire obtenue par le groupe de Michel Laguerre à l'IECB (UMR MOBIOS 5144) (Voir chapitre VIII).

a)



b)



*Figure I.15 : Structures de la Menk a) en solution dans  $\text{H}_2\text{O}$  et b) dans des micelles de SDS (Graham et al., 1992). Dans le premier cas, la structure adoptée est une pelote statistique et dans le deuxième, une structuration en coude  $\beta$  est obtenue.*

*b) Le fragment transmembranaire Neu\*<sub>TM35</sub>*

Le peptide Neu<sub>TM35</sub> (TM pour transmembranaire et 35 signifie qu'il est constitué de 35 résidus, figure I.16) est la partie membranaire du récepteur de facteur de croissance de l'épiderme *erbB-2* chez l'homme et de son homologue *neu* chez le rat. Ce sont des récepteurs à tyrosine kinase de classe I (Bargmann et al., 1986 ; Jones et al., 1998a), participant à la fonction de signalisation cellulaire et impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que le cycle cellulaire, la prolifération ou la différenciation cellulaire (Ullrich et Schlessinger, 1990). Ces récepteurs sont constitués de trois domaines (voir figure I.17) : une portion extracellulaire, capable de reconnaître un ligand spécifique, un unique fragment transmembranaire et un domaine intracellulaire, présentant une activité enzymatique de phosphorylation sur des résidus tyrosine. En présence d'un ligand, le récepteur activé forme un homodimère, stabilisé par des interactions hydrophobes inter domaines transmembranaires. Cette forme dimérique induit la propagation d'un signal intracellulaire via une cascade de réactions chimiques. La partie transmembranaire joue un rôle déterminant dans la fonction du récepteur ; en effet, la mutation unique d'un résidu valine par un résidu glutamique au sein de ce domaine membranaire induit des changements importants dans l'activité du récepteur ; en effet une prolifération cellulaire non régulée (processus de cancérisation) est induite en absence de ligand (Hynes et Stern, 1994). Cette forme mutée est notée Neu\*<sub>TM35</sub>.

De nombreuses études biophysiques ont été menées sur les formes natives ou mutées du fragment transmembranaire *Neu/erbB-2*. La détermination structurale et l'orientation adoptée par le peptide au sein de la membrane est une première étape pour comprendre la formation du dimère et sa stabilisation. D'après des expériences RMN, ce peptide adopte dans le trifluoroéthanol une structuration secondaire en hélice  $\alpha$  (3,6 résidus par tour) au sein de laquelle 17% des résidus forment une hélice de type  $\pi$  (figure I.17) ; la structure majoritaire en hélice  $\alpha$  du peptide a également été caractérisée par dichroïsme circulaire dans des bicelles (Goetz et al., 2001 ; Gullick et al., 1992).

Neu<sub>TM35</sub>\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> : <sup>1</sup>EQRASP**V**TFIIAT**V**E\***G**V**L**L**F**L**I**L**V**V**V**G**I**L**I**K**R**R**R**<sup>35</sup>

Figure I.16 : Séquence peptidique de la forme mutée et marquée <sup>15</sup>N sur quatre acides aminés du fragment transmembranaire Neu\*<sub>TM35</sub>; l'acide aminé muté (l'acide glutamique) est de couleur verte et ceux marqués <sup>15</sup>N de couleur rouge (3 valines et 1 leucine).

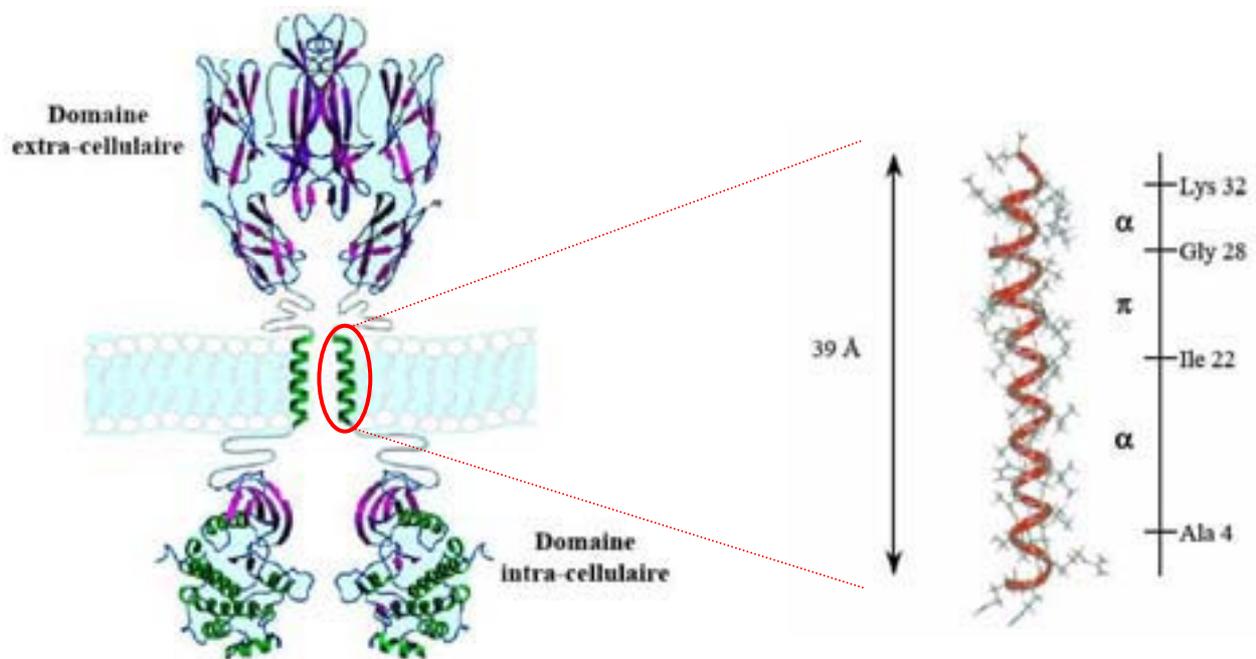


Figure I.17 : Représentation schématique d'un récepteur à tyrosine kinase de classe I et agrandissement du fragment transmembranaire, Neu<sub>TM35</sub>. La structure tridimensionnelle de ce dernier a été déterminée par RMN <sup>1</sup>H dans le TFE (Goetz et al., 2001); les régions structurées en hélice  $\alpha$  et en hélice  $\pi$  ainsi que la taille du peptide sont indiquées.

La RMN du deutérium « large bande » a permis également d'améliorer les connaissances sur la dynamique, les interactions et les changements de conformation du récepteur dans une membrane complètement hydratée. Pour cela, un marquage sélectif au deutérium des acides minés du peptide est nécessaire. L'équipe de C. Grant a ainsi déterminé l'orientation du peptide au sein de liposomes de POPC ou POPC/Cholestérol en marquant spécifiquement les alanines -CD<sub>3</sub>. D'après leur étude, en considérant que le domaine transmembranaire du récepteur adopte majoritairement une structure en hélice  $\alpha$ , ce peptide serait incliné d'un angle de 10 à 14° par rapport au référentiel lié à la normale à la bicouche ((Jones et al., 1997 ; Jones et al., 1998b), figure I.18). En deutérant les liaisons amides du peptide Neu<sub>TM35</sub> inséré dans des bicelles, l'équipe d' E. J. Dufourc a quant à elle montré que l'axe principal de l'hélice du fragment transmembranaire était orienté en majorité perpendiculairement au plan de la membrane ((Sizun et al., 2004), figure I.19).

Dans ce travail, nous essayerons de déterminer l'orientation du fragment transmembranaire muté Neu\*<sub>TM35</sub>, sélectivement marqué <sup>15</sup>N sur quatre acides aminés (noté Neu\* <sup>15</sup>N<sub>4</sub>), par des expériences de RMN <sup>15</sup>N en mode statique. La synthèse du peptide marqué <sup>15</sup>N a été effectuée dans le cadre de la thèse de Lucie Khemtémourian (Khemtemourian et al., 2006) et ne sera pas présentée ici.

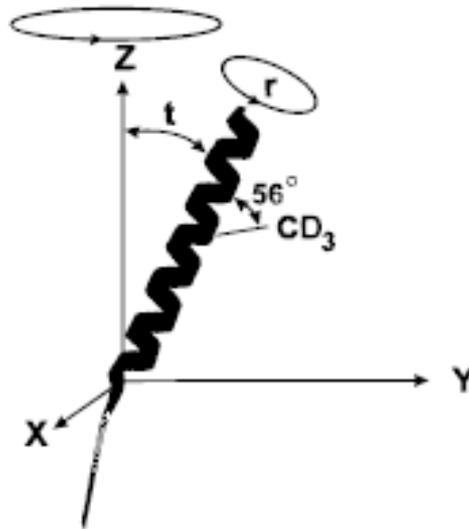


Figure I.18 : Représentation schématique de l'orientation du fragment transmembranaire, neu/erbB-2, dans des liposomes de POPC. Le peptide est supposée adopter une structure en hélice  $\alpha$  et est orienté d'un angle  $t=10-14^\circ$  par rapport à la normale à la bicouche Z. Le groupe méthyle,  $CD_3$ , de l'alanine marquée au deutérium est alors orienté d'un angle de  $56^\circ$  par rapport à un axe passant le long de l'hélice (Jones et al., 1998b).

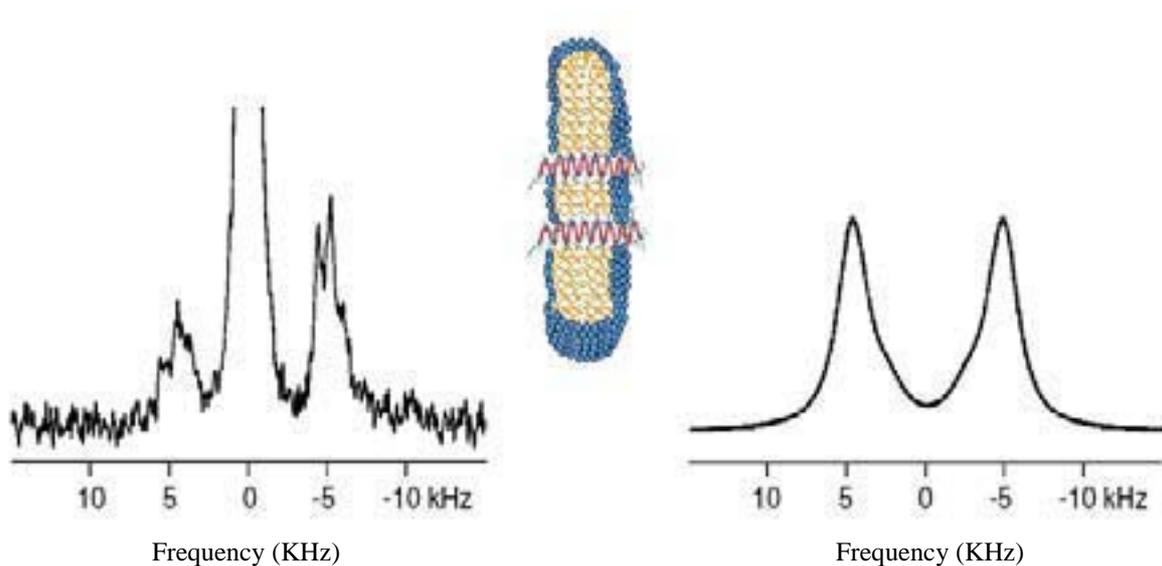


Figure I.19 : Spectre RMN  $^2H$  expérimental (gauche) et simulé (droite) du fragment transmembranaire Neu<sub>TM35</sub>, marqué au deutérium et inséré dans des bicelles de DMPC/DCPC ; l'hydratation du milieu est de 90% et le ratio peptide/lipide est de 1/1800. Le spectre simulé a été calculé en considérant l'axe principal de l'hélice peptidique perpendiculaire au plan de la bicelle (Sizun et al., 2004).

## **I.4 Plan et objectifs de la thèse**

L'objectif principal de cette thèse est le développement d'un nouveau modèle de bicelles, constitué des lipides TBBPC et DCPC, dont la spécificité est de s'orienter telle que la normale à leur bicouche soit parallèle au champ magnétique statique.

Cette étude débutera par la synthèse chimique du lipide original TBBPC, qui est à la base de cette nouvelle orientation. Nous nous attacherons ensuite à caractériser les propriétés physico-chimiques de ce système binaire TBBPC/DCPC, en décrivant en particulier les différentes morphologies qu'il adopte en fonction des conditions expérimentales, ainsi que sa dynamique. Une comparaison avec les bicelles DMPC/DCPC, qui s'orientent telle que la normale à leur bicouche soit perpendiculaire au champ magnétique, sera effectuée au cours de ce travail. Nous analyserons également les implications de ces nouvelles bicelles dans l'étude RMN de biomolécules ; nous essayerons, en particulier, de déterminer par RMN  $^{15}\text{N}$ , l'orientation par rapport à la membrane de deux peptides marqués  $^{15}\text{N}$ , la Méthionine Enképhaline Menk  $^{15}\text{N}_3$  et la forme mutée du fragment transmembranaire du récepteur à tyrosine kinase Neu\*  $^{15}\text{N}_4$ .

Pour plus de clarté, nous appellerons les bicelles constituées des lipides TBBPC/DCPC, les Bicelles Biphényles et celles constituées des lipides DMPC et DCPC, les Bicelles Saturées.

Ces différentes études ont été principalement réalisées par des techniques de RMN (Liquides et surtout Solides) et de Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). Nous développerons dans le chapitre II l'aspect théorique de ces deux techniques physiques, nécessaire à l'interprétation des résultats.

Le chapitre III détaillera les protocoles expérimentaux associés aux synthèses lipidiques, peptidiques et à la préparation des modèles membranaires.

La caractérisation physico-chimique du nouveau lipide TBBPC par RMN  $^{31}\text{P}$  et  $^2\text{H}$  sera présentée dans le chapitre IV, et celle des bicelles TBBPC/DCPC par RMN  $^{31}\text{P}$  et  $^2\text{H}$ , SAXS et microscopie électronique dans le chapitre V.

Le chapitre VI sera consacré à la comparaison, par RMN des Solides ( $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$  et  $^{14}\text{N}$ ) et SAXS, des bicelles biphényles avec celles saturées.

Le chapitre VII abordera l'étude par RMN des solides  $^{31}\text{P}$  de bicelles ternaires constituées des lipides TBBPC, DMPC et DCPC.

Le chapitre VIII développera l'étude par RMN  $^{15}\text{N}$  de l'orientation des peptides Menk  $^{15}\text{N}_3$  et Neu\*  $^{15}\text{N}_4$  par rapport à la membrane, lorsque ceux-ci sont associés aux bicelles biphényles et à celles saturées.

Enfin, nous ferons le bilan des résultats obtenus dans le chapitre IX et nous verrons dans quelles perspectives ils s'inscrivent.

## CHAPITRE II

Techniques

Physico-chimiques utilisées



## II.1 La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

### II. 1. 1 Présentation générale de la RMN

La résonance magnétique nucléaire est un phénomène physique qui s'applique aux atomes dont le noyau possède un moment magnétique,  $\mu$ , et un moment cinétique de spin,  $I$ , non nuls. Les opérateurs de spin associés à ces deux moments sont reliés par la relation :

$$\hat{\mu} = \gamma \hat{I} \quad (\text{II.1})$$

dans laquelle  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique caractéristique de chaque noyau, et  $\hbar = h/2\pi$ ,  $h$  étant la constante de Planck.

Une population de spins nucléaires  $I$ , placée dans un champ magnétique statique  $B_0$ , est soumise à plusieurs interactions qui peuvent être externes (champ magnétique appliqué) ou internes (champs locaux dans l'échantillon). Afin de décrire les couplages des spins nucléaires avec leur environnement, le concept d'hamiltonien de spin nucléaire,  $\hat{H}$  (opérateur énergie), a été introduit par Abragam (Abragam, 1961). Cet hamiltonien se décompose en la somme d'un hamiltonien de couplage externe et un hamiltonien relatif aux couplages internes :

$$\hat{H} = \hat{H}_{ext} + \hat{H}_{int} \quad (\text{II.2})$$

#### a) *Le couplage externe Zeeman*

L'effet Zeeman provient du couplage entre les moments magnétiques nucléaires  $\mu$  des noyaux et le champ magnétique statique  $B_0$  ; il est formalisé par l'hamiltonien  $\hat{H}_0$  qui s'écrit :

$$\hat{H}_0 = -\mu \hat{B}_0 = -\gamma \hat{I}_z \hat{B}_0 \quad (\text{II.3})$$

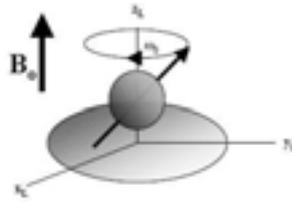
où  $\hat{I}_z$  représente l'opérateur de spin dans la direction z parallèle à  $B_0$ .

En présence de  $B_0$ , il y a une levée de dégénérescence en  $2I+1$  niveaux d'énergie dont la valeur est égale à :

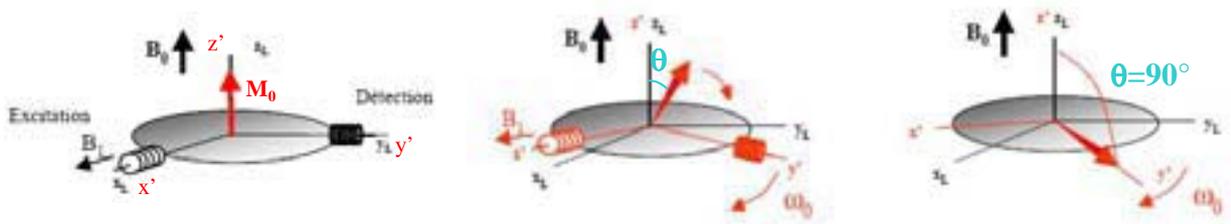
$$E_m = -\gamma m B_0 \quad (\text{II.4})$$

$m$  est compris entre  $-I$  et  $+I$ .

1) L'équilibre



2) La perturbation par le champ magnétique B\_1



3) La relaxation

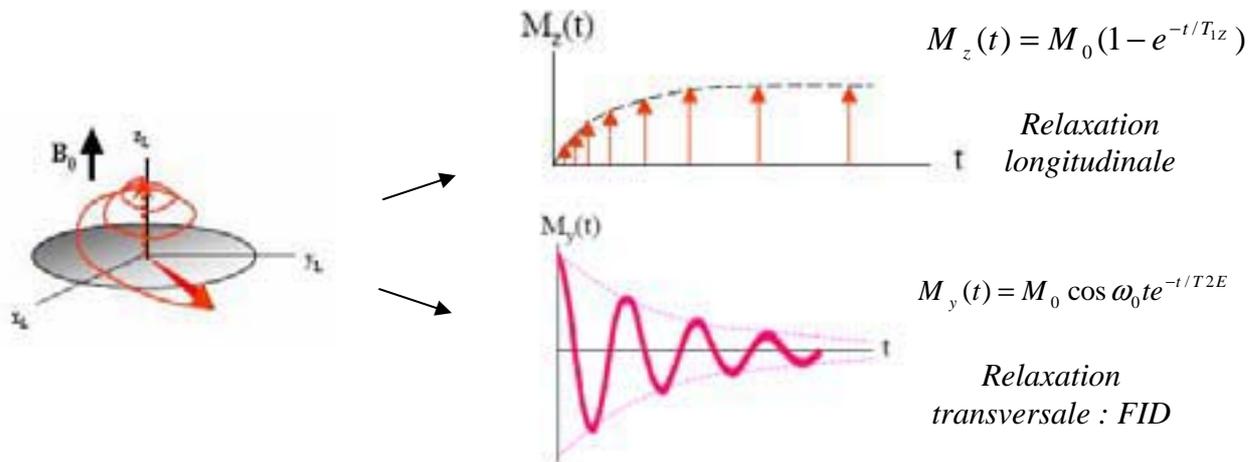


Figure II.1 : Représentation des trois étapes principales d'une expérience de RMN ;  $x_L$ ,  $y_L$  et  $z_L$  représente le référentiel du laboratoire et  $x'$ ,  $y'$  et  $z'$  le référentiel tournant (Dufourc, 2004).

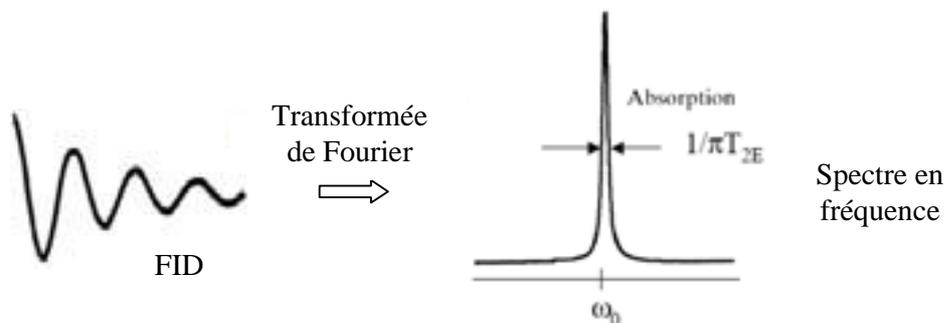


Figure II.2 : Passage du domaine temporel à celui fréquentiel par la transformée de Fourier (Dufourc, 2004).

Une transition entre ces états d'énergie équidistants a lieu si la loi de Bohr ( $\Delta E = h\nu$ ) est respectée et si  $\Delta m = \pm 1$ . Cette transition se traduit par l'observation d'une seule raie de résonance qui se produit à la fréquence de résonance du noyau considéré  $\omega_0$ , appelé encore fréquence de Larmor, qui est proportionnelle au champ magnétique appliqué :

$$\omega_0 = 2\pi\nu = \gamma B_0 \quad (\text{II.5})$$

Un autre couplage externe a lieu au cours d'une expérience de RMN, avec un champ radiofréquence  $B_1$ , permettant l'acquisition des signaux.

Ainsi l'hamiltonien relatif aux interactions externes traduit le couplage entre les moments magnétiques nucléaires  $\mu$  et le champ externe résultant  $B$  :

$$\hat{H}_{ext} = \hat{H}_Z = -\hat{\mu}\hat{B} = -\hat{\mu}(\hat{B}_0 + \hat{B}_1) = \hat{H}_0 + \hat{H}_1 \quad (\text{II.6})$$

### b) Principe d'une expérience RMN

Une expérience de RMN comprend trois principales étapes (figure II.1) :

**1. L'équilibre** : les spins nucléaires, placés dans un champ magnétique, précessent à la fréquence de Larmor  $\omega_0$ . Les spins se répartissent sur les  $2I+1$  niveaux d'énergie selon la loi statistique de Boltzman. L'aimantation résultante le long de l'axe z (colinéaire à  $B_0$ ) est notée  $M_0$ .

**2. La perturbation** : la distribution des spins sur les différents niveaux d'énergie est perturbée par un champ radiofréquence  $B_1$ , oscillant à la fréquence  $\omega_0$ . Ce champ est appliqué le long de l'axe  $x'$  (du référentiel tournant) pendant une durée  $\tau = \theta / \gamma B_1$  de sorte que le vecteur résultant  $M_0$  bascule d'un angle  $\theta$  le long de l'axe  $y'$  (précession autour de  $B_1$ ).

**3. La relaxation** : lorsque le champ  $B_1$  cesse, le système retourne progressivement à l'état d'équilibre initial. Ce retour à l'équilibre se décompose en une relaxation longitudinale (ou spin-réseau) selon l'axe z, de temps caractéristique  $T_{1z}$ , et une relaxation transversale (ou spin-spin) par rapport au plan xy de détection, de temps caractéristique  $T_2$ . Dans le premier cas, l'évolution du signal suit une exponentielle croissante selon l'axe z et dans le deuxième cas, l'évolution du vecteur aimantation par rapport à l'axe y suit la forme d'une cosinusoïde d'argument  $(\omega_0 t)$ , convoluée par une exponentielle décroissante. Ce dernier phénomène constitue le signal de précession libre des spins ou FID (Free Induction Decay).  $T_2$  peut-être

obtenu par la mesure à mi-hauteur de la largeur de raie RMN, en absence d'inhomogénéité du champ magnétique.

La relaxation longitudinale est liée à la dynamique rapide de l'environnement moléculaire du noyau considéré ; son étude donne des informations sur les mouvements moléculaires à l'échelle de la nanoseconde. La relaxation transverse donne quant à elle des informations sur la dynamique lente des molécules ou de leurs assemblages (à l'échelle de la microseconde ou de la seconde).

Le passage du domaine temporel au domaine fréquentiel est assuré par un outil mathématique, la transformée de Fourier (figure II.2) ; celle-ci conduit à l'obtention d'un spectre composé de raies dont la position en fréquence rend compte des couplages internes électriques et magnétiques des noyaux, et dont la largeur est associée à la dynamique et à l'orientation des molécules.

### c) Couplages internes

L'hamiltonien relatif aux interactions internes,  $\hat{H}_{\text{int}}$  traduit le couplage entre les moments magnétiques nucléaires  $\mu$  et les champs locaux présents dans l'échantillon (Mehring, 1983) :

$$\hat{H}_{\text{int}} = \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_{ADC} + \hat{H}_Q \quad (\text{II.7})$$

L'hamiltonien  $\hat{H}_J$  décrit les interactions spin-spin indirectes entre les moments magnétiques de deux noyaux d'une même molécule, via les électrons de liaison. Les couplages J, indépendants de la valeur du champ  $B_0$ , peuvent être homo- ou hétéro- nucléaires.

$\hat{H}_D$  exprime l'interaction directe entre deux dipôles magnétiques  $\hat{\mu}_A$  et  $\hat{\mu}_B$  associés respectivement aux noyaux A et B, qui sont voisins dans l'espace. Cette interaction, indépendante de  $B_0$ , est aussi appelée couplage dipolaire et décroît rapidement avec la distance  $r_{AB}$ . Elle peut se produire entre deux noyaux de même nature (couplage homonucléaire) ou de nature différente (couplage hétéronucléaire).

L'hamiltonien relatif à l'anisotropie de déplacement chimique,  $\hat{H}_{ADC}$ , est associé au couplage entre le moment magnétique nucléaire et le champ magnétique local induit par la circulation des électrons autour du noyau sous l'effet du champ magnétique statique. La fréquence de résonance est donc sensible à la densité électronique autour du noyau et à son anisotropie ; cette interaction, encore appelée, blindage électronique, est dépendante de  $B_0$ .

L'interaction quadrupolaire,  $\hat{H}_Q$ , traduit le couplage entre le moment électrique quadrupolaire d'un noyau et le gradient de champ électrique (GCE) local, créé par l'environnement des charges extérieures au noyau. Cette interaction n'a lieu que pour des spins  $I > 1/2$  qui possèdent un moment quadrupolaire, et est indépendante de  $B_0$ .

D'après les formules (II.6) et (II.7), l'hamiltonien total d'un spin nucléaire placé dans un champ magnétique s'écrit :

$$\hat{H}_{total} = \hat{H}_Z + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_{ADC} + \hat{H}_Q \quad (II.8)$$

Ces interactions ne sont pas équivalentes ; elles dépendent du type de noyau considéré ainsi que de la nature des échantillons. Selon que les systèmes sont dits « solides » (anisotropie des interactions internes) ou « liquides » (interactions isotropes), certaines composantes de l'hamiltonien total seront privilégiées. Le tableau ci-dessous présente les ordres de grandeur (en Hertz) des différents hamiltoniens cités précédemment pour des échantillons « solides » et « liquides ».

|                         | Zeeman<br>$\hat{H}_Z$ | Spin-spin<br>indirect $\hat{H}_J$ | Dipôlaire<br>$\hat{H}_D$ | Blindage<br>électronique<br>$\hat{H}_{ADC}$ | Quadrupolaire<br>$\hat{H}_Q$           |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------|---|--|
| $\hat{H}$ (Hz) Solides  | $10^8$                | $10^2$                            | $10^4$                   | $10^4$                                      | $10^6$ ( $I > 1$ )<br>ou 0 ( $I < 1$ ) |
| $\hat{H}$ (Hz) Liquides | $10^8$                | $10^2$                            | 0                        | $10^4$                                      | 0                                      |

Tableau II.1 : Ordre de grandeur des hamiltoniens (en hertz) pour des systèmes dits « solides » et « liquides »

Un système est qualifié d'isotrope si ses propriétés physico-chimiques ne dépendent pas de la direction de mesure ; les mouvements moléculaires sont très rapides et toutes les orientations de la molécule sont équiprobables. C'est le cas des liquides, pour lesquels les temps de relaxation sont longs ( $\approx 4$  sec ou plus) et les signaux RMN sont détectés sur une petite fenêtre de fréquences (entre 5 et 25 kHz à 500 MHz).

Un système est qualifié d'anisotrope si à l'inverse ses propriétés physico-chimiques dépendent de la direction de mesure. Les mouvements moléculaires sont plus lents et certaines directions d'orientation sont privilégiées. C'est le cas des monocristaux, des poudres et des milieux organisés tels que les cristaux liquides et les membranes. Dans ce cas, les

temps de relaxation sont beaucoup plus courts ( $\approx 1$  ms) et les signaux RMN peuvent s'étendre sur une large fenêtre de fréquences (de 25 à 500 KHz à 500 MHz).

Pour notre étude, nous avons travaillé avec des modèles de membranes (bicelles et liposomes), assimilables à des phases cristal-liquides. Ce sont donc des milieux organisés anisotropes, soumis à l'ensemble des interactions vues précédemment. Ces interactions magnétiques internes vont nous donner des informations concernant la structure et la dynamique de nos systèmes.

## II. 1. 2 Les noyaux observés

Pour décrire la structure et la dynamique de nos modèles membranaires, deux noyaux principaux ont été choisis : le phosphore ( $^{31}\text{P}$ ) et le deutérium ( $^2\text{H}$ ).

Le phosphore est présent naturellement au niveau des têtes polaires des lipides comme sur la phosphatidylcholine. Il n'y a qu'un seul atome de phosphore par lipide ce qui facilitera l'identification des raies de résonance ; de plus c'est un isotope d'abondance naturelle proche des 100%, il n'y a donc pas à effectuer au préalable de marquage isotopique.

Le deutérium quant à lui a une abondance naturelle faible ( $<0.05\%$ ) ; on l'incorpore par synthèse chimique notamment sur les chaînes aliphatiques des lipides (voir chapitre III.1).

Ces deux noyaux seront détectés via des expériences de RMN large bande en statique (échantillon « solides »). La RMN du phosphore nous donnera des informations sur la phase lipidique adoptée par nos modèles membranaires suivant les conditions expérimentales utilisées et la RMN du deutérium précisera la dynamique des chaînes lipidiques par mesure des éclatements quadrupolaires.

Des expériences RMN  $^{14}\text{N}$  en statique seront également réalisées sur nos modèles bicellaires afin d'analyser la dynamique des têtes lipidiques. L'azote  $^{14}\text{N}$  est en effet présent naturellement au niveau de la choline et son abondance naturelle est de 99,6%. Un marquage isotopique ne sera donc pas nécessaire.

Pour étudier l'orientation des peptides par rapport à la membrane des modèles bicellaires, un marquage isotopique  $^{15}\text{N}$  de certaines liaisons NH des peptides sera effectué (voir chapitre III.3). Il sera ainsi possible de détecter le couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  par des expériences RMN  $^{15}\text{N}$  en statique ; celles-ci nous permettront de remonter aux angles entre les liaisons  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  et le champ magnétique statique, et donc à l'orientation du peptide.

La partie suivante nous présente les interactions magnétiques prédominantes suivant le type de noyau observé.

*a) Le Phosphore-31 et l'azote-15 : Anisotropie de Déplacement Chimique*

Le phosphore-31 et l'azote-15 sont des noyaux de spin  $I=1/2$ . En plus de l'effet Zeeman, deux interactions sont prédominantes : l'anisotropie de déplacement chimique et le couplage dipolaire phosphore-proton ou azote-proton. Celui-ci peut être éliminé par découplage des protons ; il reste donc le blindage électronique qui induit un champ magnétique local faisant écran au champ statique  $B_0$  ; le champ effectif perçu par le noyau s'exprime alors :

$$B_{eff} = B_0 - \sigma B_0 = B_0(1 - \sigma) \quad (\text{II.9})$$

où  $\sigma$  est le tenseur d'anisotropie de déplacement chimique (encore appelé tenseur d'écran).

La fréquence de résonance s'obtient par :

$$\omega = \omega_0(1 - \sigma) \quad (\text{II.10})$$

où  $\omega_0$  est la fréquence de Larmor.

L'hamiltonien nucléaire pour les noyaux phosphore-31 et azote-15 s'écrit alors (Dufourc et al., 1992) :

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_{ADC} = -\gamma \hat{I}_Z \hat{B}_0(1 - \sigma) \quad (\text{II.11})$$

Dans le référentiel du laboratoire, cet hamiltonien s'exprime par la formule suivante :

$$\hat{H} = -\omega_0 \hat{I}_Z + \sigma_{iso} + \frac{2}{3} \Delta\sigma \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} + \frac{\eta}{2} \cos 2\alpha \sin^2\beta \quad (\text{II.12})$$

où  $\sigma_{iso}$  est la moyenne isotrope du tenseur d'écran ( $Tr\{\bar{\sigma}\}/3$ ) appelée communément constante d'écran en RMN des liquides,  $\Delta\sigma$  représente l'anisotropie de déplacement chimique ( $\Delta\sigma = \sigma_{zz} - [(\sigma_{xx} + \sigma_{yy})/2]$ ) et  $\eta$  est le paramètre d'asymétrie ( $\eta = (\sigma_{xx} - \sigma_{yy})/\sigma_{zz}$  et  $0 \leq \eta \leq 1$ ).  $\alpha$  et  $\beta$  sont les angles d'Euler de la transformation de coordonnées permettant de passer du système d'axes moléculaires, associé au tenseur de blindage, à celui lié au référentiel du laboratoire.

b) *Le deutérium et l'azote-14 : Interaction quadrupolaire*

Les atomes de deutérium et d'azote-14 ont un spin nucléaire égal à 1. Ils possèdent donc un moment électrique quadrupolaire, noté  $eQ$ , où  $e$  est la charge élémentaire de l'électron et  $Q$  le moment quadrupolaire du noyau. Avec ce type de noyau, l'interaction interne prédominante est quadrupolaire, qui traduit le couplage entre le moment magnétique nucléaire et le GCE.

Dans le référentiel du laboratoire, l'hamiltonien total s'écrit (Davis, 1983) :

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_Q = -\omega_0 \hat{I}_z + \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} (3\hat{I}_z^2 - \hat{I}^2) \frac{3\cos^2 \beta - 1}{2} + \frac{\eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha}{2} \quad (\text{II.13})$$

où  $\alpha$  et  $\beta$  expriment le système d'axes du CGE du noyau dans le référentiel du laboratoire, le terme  $eq=V_{zz}$  est le gradient de champ électrique au noyau,  $\eta$  est le paramètre d'asymétrie du CGE ( $0 \leq \eta \leq 1$ ) et  $\hat{I}$  l'opérateur de spin ( $\hat{I}^2 = \hat{I}_x^2 + \hat{I}_y^2 + \hat{I}_z^2$ ).

d) *Le Couplage dipolaire  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$*

L'interaction dipolaire entre deux noyaux  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  de spin respectif  $I=1/2$  et  $S=1/2$ , voisins dans l'espace d'une distance  $r_{NH}$ , et de moments magnétiques respectifs  $\mu_H$  et  $\mu_N$ , est définie par l'hamiltonien (Davis et Auger, 1999) :

$$\hat{H}_D = \frac{\mu_H - \mu_N}{r_{NH}^3} - 3 \frac{(\mu_H r_{NH})(\mu_N r_{NH})}{r_{NH}^5} \quad (\text{II.14})$$

Après transformation des coordonnées dans le référentiel du laboratoire, l'hamiltonien total, soumis à l'interaction Zeeman et au couplage dipolaire, s'écrit :

- pour le système de spins I, associé ici aux protons  $^1\text{H}$  :

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_D = -\omega_0 \hat{I}_z - \frac{\gamma_H \gamma_N}{r_{NH}^3} \frac{3\cos^2 \beta - 1}{2} (3\hat{I}_z \hat{S}_z - \hat{I}\hat{S}) \quad (\text{II.15})$$

- pour le système de spins S, associé ici à l'azote  $^{15}\text{N}$  :

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_D = -\omega_0 \hat{S}_z - \frac{\gamma_H \gamma_N}{r_{NH}^3} \frac{3\cos^2 \beta - 1}{2} (3\hat{I}_z \hat{S}_z - \hat{I}\hat{S}) \quad (\text{II.16})$$

où  $\beta$  est l'angle entre le vecteur reliant les noyaux  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$ , et le champ magnétique statique.

Les termes  $\gamma_H$  et  $\gamma_N$  désignent les rapports gyromagnétiques de chaque noyau.

D'après l'expression de ces différents hamiltoniens, la dépendance angulaire, en  $\alpha$  et  $\beta$ , des spectres RMN est clairement mise en évidence. Ainsi, le déplacement chimique du phosphore est lié à l'orientation de son nuage électronique par rapport au champ magnétique, les éclatements quadrupolaires des spectres  $^2\text{H}$  et  $^{14}\text{N}$  dépendent respectivement de l'orientation des liaisons  $\text{C}-^2\text{H}$  et  $\text{C}-^{14}\text{N}$  par rapport à  $B_0$ , et le couplage dipolaire  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  dépend de l'orientation de la liaison  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$  par rapport à  $B_0$ . Pour des échantillons « solides » étudiés en statique, cette orientation du système par rapport au champ magnétique prend toute son importance ; c'est le cas des membranes biomimétiques.

### II. 1. 3 La RMN des Biomembranes

#### a) *Le phosphore $^{31}\text{P}$*

Comme nous venons de le voir, l'atome de phosphore interagit avec le champ magnétique principalement via son nuage électronique ; ce dernier dépend du mode de liaison du noyau phosphore avec ses voisins et présente généralement un caractère anisotrope. Le champ effectif perçu par le noyau n'est donc pas le même dans toutes les directions de l'espace. L'effet d'écran sera minimal le long de l'axe ayant la plus faible densité électronique et maximal le long de l'axe moléculaire possédant la plus forte densité électronique. Cette constante d'écran  $\sigma$  est alors décrite par un tenseur de rang deux. Dans son système d'axes principal, ce tenseur est diagonal :

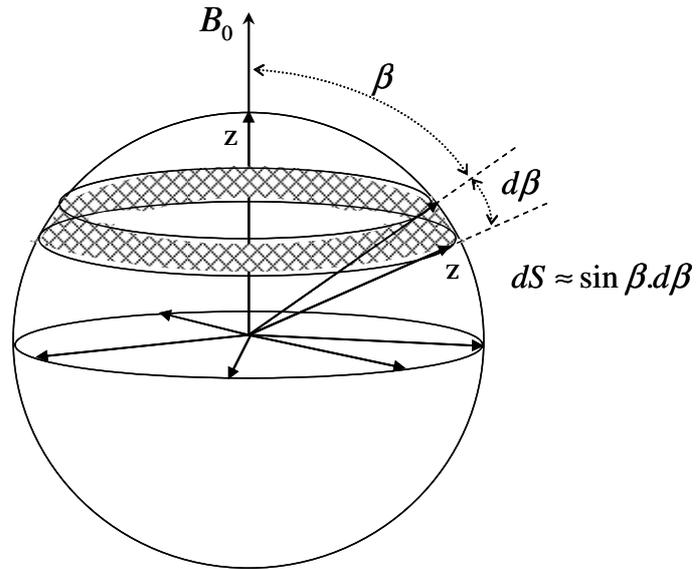
$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{xx} & & \\ & \sigma_{yy} & \\ & & \sigma_{zz} \end{pmatrix} \quad (\text{II.17})$$

$\sigma_{xx}$ ,  $\sigma_{yy}$  et  $\sigma_{zz}$  sont les valeurs propres du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique.

#### Les cristaux

Dans une poudre polycristalline (constituée d'une multitude de monocristaux), les atomes de phosphore sont orientés de façon aléatoire par rapport au champ magnétique. Plus exactement, les axes principaux (noté ici  $z$ ) de tous les tenseurs d'anisotropie de déplacement chimique sont distribués sur la surface d'une sphère (voir figure II.3.a)). La probabilité d'avoir cet axe  $z$  orienté entre  $\beta$  et  $d\beta$  ( $\beta$  étant l'angle formé entre l'axe principal du nuage électronique du phosphore et le champ magnétique  $B_0$ ) est alors égale à :  $P(\beta) = 1/2 \sin \beta d\beta$ .

a)



b)

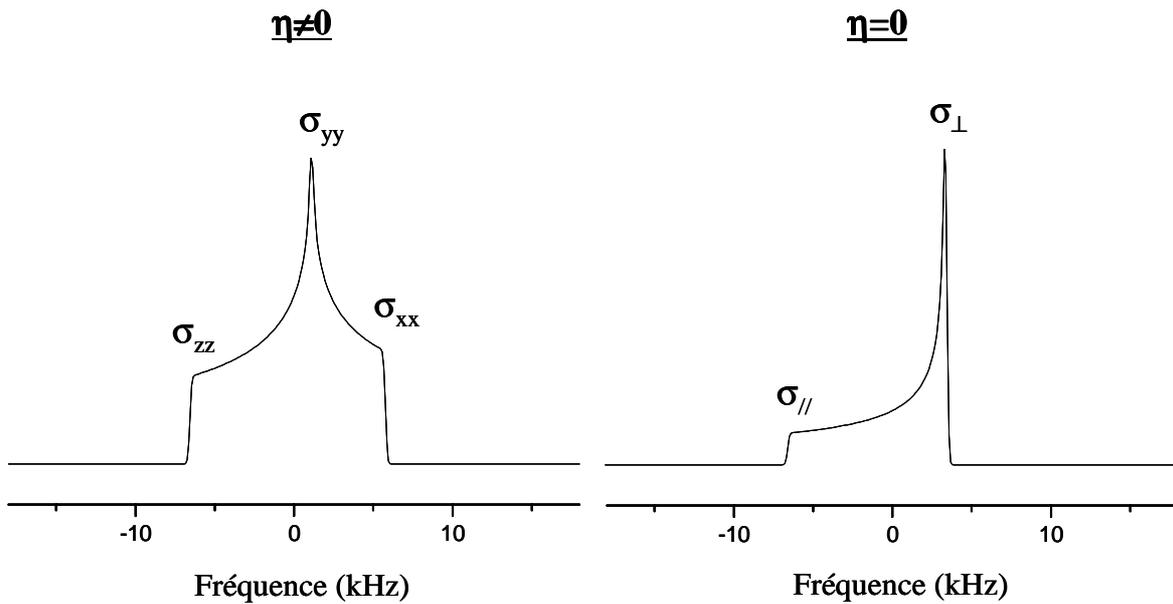


Figure II.3 : a) Représentation de la distribution sphérique des axes  $z$  associés aux tenseurs de blindage électronique des atomes de phosphore dans le cas d'un échantillon polycristallin. b) Spectres RMN- $^{31}\text{P}$  types, associés à des molécules dont le paramètre d'asymétrie  $\eta$  est différent de zéro (spectre de gauche) et égal à zéro (spectre de droite).

Le spectre RMN  $^{31}\text{P}$  se présente donc comme la superposition des fréquences de résonances, associées à chaque orientation par rapport à  $B_0$ , et pondérées par leur probabilité d'existence. La figure II.3.b) représente le type de spectre phosphore obtenu dans le cas de molécules ayant un paramètre d'asymétrie  $\eta$  différent de zéro (spectre de gauche) et égal à zéro (spectre de droite) ; dans ce dernier cas, on constate que l'orientation la moins favorable correspond à  $\beta=0^\circ$  (parallèle à  $B_0$ ) et celle la plus probable à  $\beta=90^\circ$  (perpendiculaire à  $B_0$ ).

Les poudres de phospholipides peuvent être assimilées à une multitude de grains monocristallins, orientés au hasard par rapport à  $B_0$ . Le spectre RMN résultant, appelé spectre de poudre (figure II.4.a), permet d'accéder aux valeurs des composantes principales du tenseur de blindage électronique ( $\sigma_{xx}$ ,  $\sigma_{yy}$ ,  $\sigma_{zz}$ ), en considérant la fréquence des épaules du spectre et la discontinuité spectrale. Ces valeurs ont été déterminées pour des vésicules de DMPC à très basse température (168 K), pour laquelle tous les mouvements des lipides sont bloqués :  $\sigma_{xx}=-123$  ppm,  $\sigma_{yy}=-24$  ppm,  $\sigma_{zz}=147$  ppm (Dufourc et al., 1992).

### Les bicouches lipidiques

La présence de mouvements moléculaires anisotropes dans la membrane lipidique va provoquer des modifications dans la forme du spectre de poudre. En particulier, des mouvements de rotation rapide, colinéaires à la normale à la bicouche  $n$ , confèrent au lipide une symétrie axiale ( $\eta=0$ ). Dans ce cas, les composantes  $\sigma_{xx}$  et  $\sigma_{yy}$  du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique deviennent égales et l'on ne différencie plus que deux composantes principales  $\sigma_{//}$  et  $\sigma_{\perp}$ , respectivement colinéaire et perpendiculaire à l'axe principal du mouvement (figure II.4.b). Le tenseur statique se simplifie alors en un tenseur résiduel exprimé dans le référentiel lié à la bicouche (l'axe  $z$  étant parallèle à  $n$ ) :

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{\perp} & & \\ & \sigma_{\perp} & \\ & & \sigma_{//} \end{pmatrix} \quad (\text{II.18})$$

La partie isotrope  $\sigma_{iso}$  de ce tenseur est définie par l'expression :

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \sigma_{ii} = \frac{1}{3} [\langle \sigma_{//} \rangle + 2\langle \sigma_{\perp} \rangle] \quad (\text{II.19})$$

Considérons des bicouches orientées par rapport au champ magnétique :

- si la normale au plan de la bicouche est parallèle à l'axe z du référentiel du laboratoire ( $\parallel$  à  $B_0$ ), la fréquence de résonance  $\nu_{\parallel}$  s'exprime d'après l'équation (II.10) :

$$\nu_{\parallel} = \nu_0(1 - \langle \sigma_{\parallel} \rangle) \quad (\text{II.20})$$

- si la normale à la bicouche est perpendiculaire à  $B_0$ , on a une équation analogue pour la fréquence de résonance  $\nu_{\perp}$  :

$$\nu_{\perp} = \nu_0(1 - \langle \sigma_{\perp} \rangle) \quad (\text{II.21})$$

Dans le cas de vésicules de phospholipides, dont les mouvements sont à symétrie axiale, la normale à la bicouche est orientée de manière aléatoire par rapport à  $B_0$ . La fréquence RMN de résonance s'écrit alors :

$$\nu(\beta) = \nu_0 \left( 1 - \sigma_{iso} - \frac{2}{3} \langle \Delta\sigma \rangle \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) \quad (\text{II.22})$$

où  $\beta$  est l'angle entre l'axe directeur du phospholipide, que l'on considère colinéaire à la normale à la bicouche n, et le champ magnétique.

Dans la pratique, on estime l'anisotropie de déplacement chimique par rapport à la fréquence dite isotrope  $\nu_{iso} = \nu_0(1 - \sigma_{iso})$  :

$$\Delta\nu(\beta) = \nu(\beta) - \nu_{iso} = -\frac{2}{3} \Delta\sigma \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \quad (\text{II.23})$$

les fréquences  $\nu(\beta)$  et  $\nu_{iso}$  sont exprimés en Hertz ou en ppm.

En symétrie axiale, l'anisotropie de déplacement chimique  $\Delta\sigma$  du tenseur prend la forme :

$$\Delta\sigma = \langle \sigma_{\parallel} \rangle - \langle \sigma_{\perp} \rangle = \frac{3}{2} (\langle \sigma_{\parallel} - \sigma_{iso} \rangle) \quad (\text{II.24})$$

$\Delta\sigma$  peut-être directement déterminé sur le spectre RMN en considérant les positions extrêmes des fréquences de résonance qui correspondent à  $\beta=0^\circ$  et  $\beta=90^\circ$  :

$$\Delta\sigma = \Delta\nu(90^\circ) - \Delta\nu(0^\circ) \quad (\text{II.25})$$

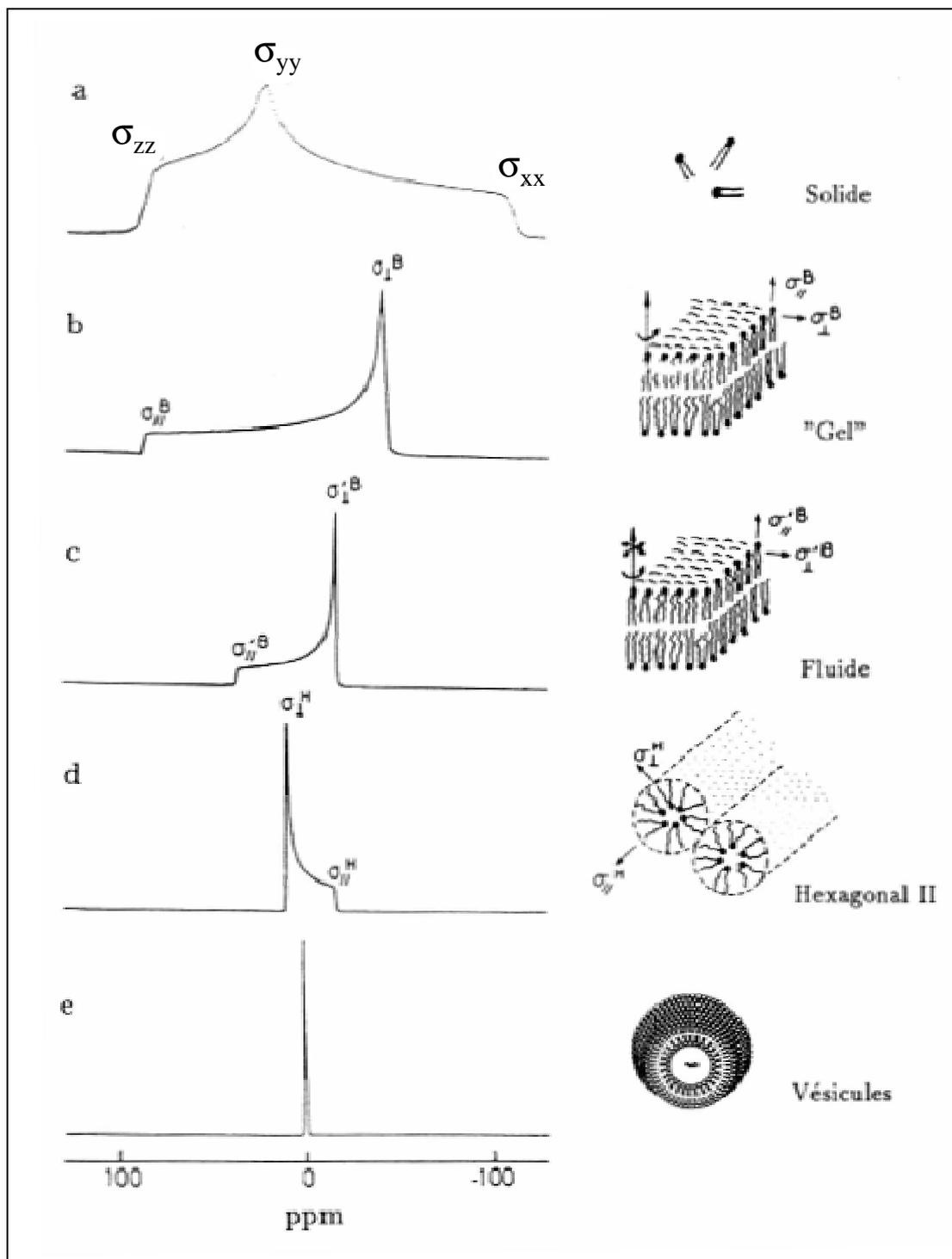


Figure II.4 : Formes des spectres RMN du phosphore en fonction de la phase lipidique (Dufourc, 1986).

Le phosphore est le noyau de choix pour définir qualitativement le type de phase lipidique dans laquelle un phospholipide est engagé. La forme du spectre RMN est en effet affectée par la dynamique du système et son état d'organisation.

La figure II.4 représente les différentes formes de spectres RMN  $^{31}\text{P}$  possibles en fonction du type de phase considéré :

- un échantillon ne possédant aucun mouvement présente le spectre de poudre, avec les valeurs propres du tenseur de blindage électronique  $\sigma_{xx}$ ,  $\sigma_{yy}$ ,  $\sigma_{zz}$  (figure II.4.a).

- l'introduction de mouvement à symétrie axiale génère le spectre II.4.b qui ne présente plus qu'un pic et un épaulement ; les éléments principaux du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique sont alors  $\sigma_{//}$  et  $\sigma_{\perp}$ . Ce spectre est caractéristique d'une phase lamellaire « gel »  $L_{\beta}$ . Si en plus de ce mouvement de rotation axiale, il apparaît une oscillation autour du même axe et des mouvements de la tête polaire, on observe un « rétrécissement » du spectre de poudre, caractéristique d'une phase lamellaire fluide  $L_{\alpha}$  (figure II.4.c). Ainsi la mesure de l'anisotropie de déplacement chimique donne une indication directe sur l'existence d'autres mouvements en plus de la rotation axiale.

- dans le cas des phases hexagonales ( $H_{II}$ ), une rotation rapide autour de l'axe des cylindres conduit au spectre II.4.c.

- pour des petites vésicules de phospholipides isotropes (leur diamètre étant inférieur à 100 nm), le spectre obtenu est constitué d'une seule raie de résonance, centrée sur la fréquence isotrope  $\nu_{iso}$  (figure II.4.d).

Dans le cas d'échantillons orientés dans le champ magnétique, on obtient des raies fines dont la fréquence dépend de la valeur de l'angle  $\beta$  entre la normale à la bicouche  $n$  et  $B_0$ , pour chaque phospholipide (formule II.22). Ainsi, des bicelles, constituées des phospholipides DMPC et DCPC et orientées de telle sorte que leur normale  $n$  soit perpendiculaire à  $B_0$ , présente le spectre RMN caractéristique figure II.5.b), sur lequel deux raies de résonance sont observables : le pic à -10,6 ppm est attribué aux lipides situés dans la partie plane du disque, perpendiculaire à  $B_0$  (en majorité DMPC) et le pic à -3,6 ppm résulte d'une diffusion rapide des phospholipides situés dans le tore du disque bicellaire (majoritairement DCPC). Ce spectre RMN  $^{31}\text{P}$  permet une identification rapide de l'existence de bicelles.

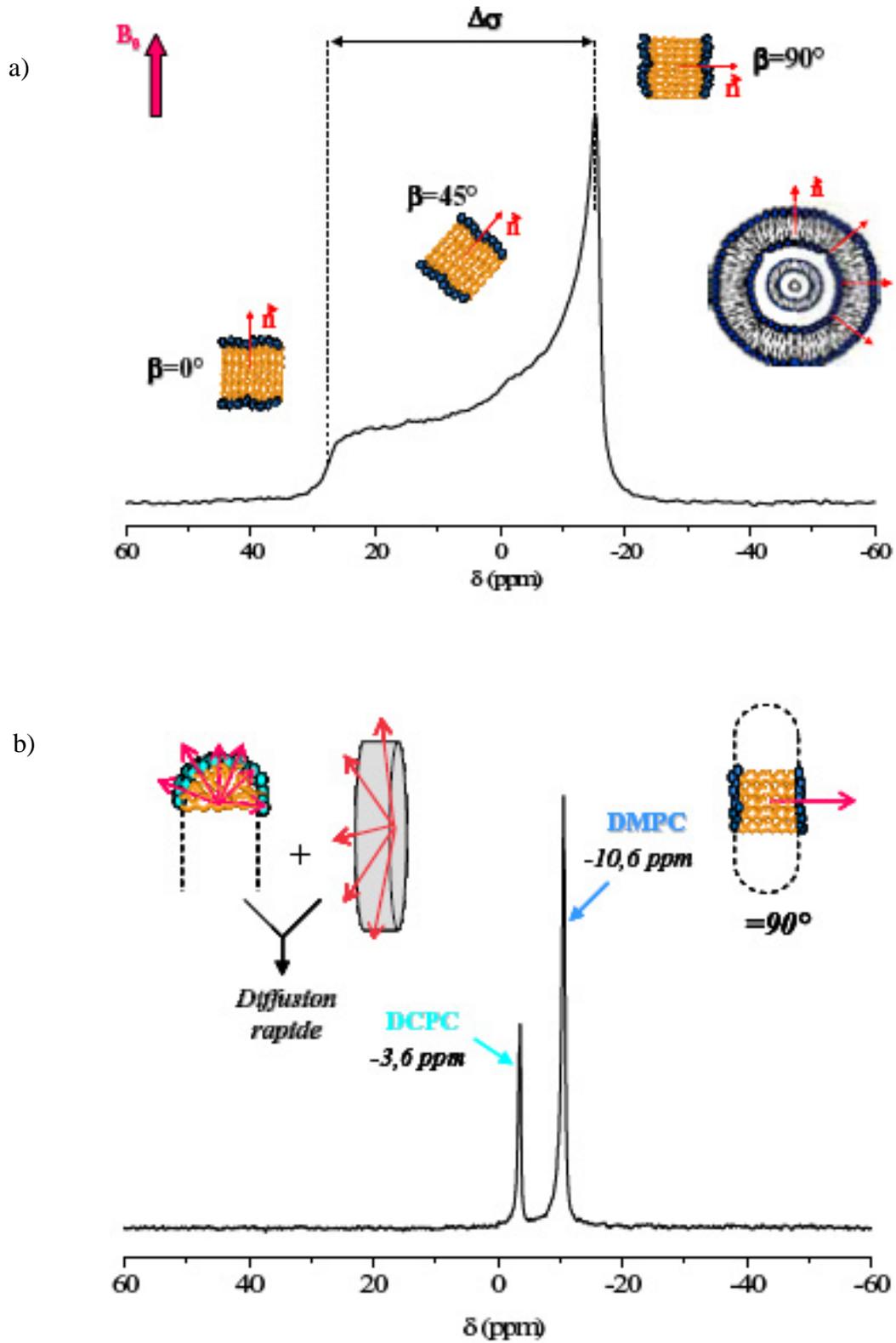


Figure II.5 : Spectres de RMN du phosphore  $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage des protons), a) de liposomes MLVs de DMPC et b) de bicelles DMPC/DCPC, orientées telles que la normale à leur bicouche soit perpendiculaire à  $B_0$ .

Cas de la distribution cylindrique

Jusqu'à présent, nous avons vu l'allure des spectres RMN-<sup>31</sup>P associés à une distribution sphérique des phospholipides. Que devient maintenant la forme spectrale en RMN du phosphore quand les lipides adoptent une organisation en cylindre ?

Soit un cylindre de phospholipides, orienté dans un champ magnétique ;  $\alpha$  est l'angle entre l'axe principal du cylindre ( $z$ ) et  $B_0$ , et  $\varphi$  est l'angle azimutal (figure II.6.a)).

On vient de voir que pour une distribution sphérique, la fréquence de résonance du phosphore dépend de l'angle  $\beta$ , entre la normale à la bicouche et  $B_0$ , en  $(3\cos^2 \beta - 1)/2$ . Dans le cas d'une distribution cylindrique, le cosinus directeur de cet angle  $\beta$  devient dépendant de  $\alpha$  et  $\varphi$  ( $\cos \beta = \sin \alpha \cos \varphi$ ). La fréquence de résonance du phosphore s'écrit alors :

$$\nu = A \frac{3\sin^2 \alpha \cos^2 \varphi - 1}{2} \quad (\text{II.26})$$

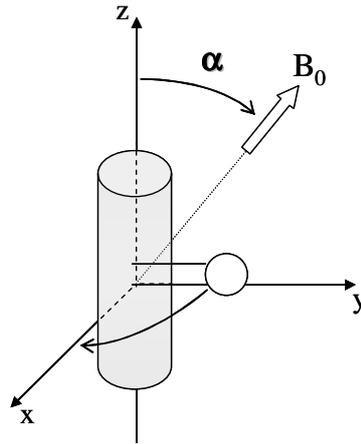
où  $A$  est une constante de proportionnalité.

De même, la probabilité  $P(\nu)$  d'avoir l'orientation  $\beta$  associée à la fréquence  $\nu$  devient :

$$P(\nu) \propto [(2\nu + 1)(3\sin^2 \alpha - 2\nu - 1)]^{-1/2} \quad (\text{II.27})$$

La figure II.6.b) présente les types de spectres phosphore que l'on obtient lorsque l'angle  $\alpha$  est égal à  $0^\circ$  (spectre de gauche),  $54,7^\circ$  (spectre du milieu) et  $90^\circ$  (spectre de droite) par rapport à  $B_0$ . Dans le premier cas, l'axe principal du cylindre est orienté parallèlement au champ magnétique. Tous les phospholipides constitutifs du cylindre sont donc orientés perpendiculairement à  $B_0$  ; l'angle entre l'axe principal des phospholipides et  $B_0$ , que l'on note  $\beta$ , est égal à  $90^\circ$ . Ceci se traduit sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P par un pic fin dont le déplacement chimique est spécifique de l'organisation en cylindre et donc différent du déplacement chimique isotrope. Dans les deux autres cas, l'axe principal du cylindre est orienté à  $54,7^\circ$  par rapport à  $B_0$  et perpendiculairement à  $B_0$ . Les différents angles  $\beta$  entre l'axe principal des phospholipides et le champ magnétique varient entre  $0^\circ$  et  $360^\circ$ . Ces distributions cylindriques des orientations sont caractérisées par une forme spectrale en phosphore complexe, dont l'anisotropie de déplacement chimique  $\Delta\sigma$  augmente avec la valeur de l'angle  $\alpha$ .

a)



b)

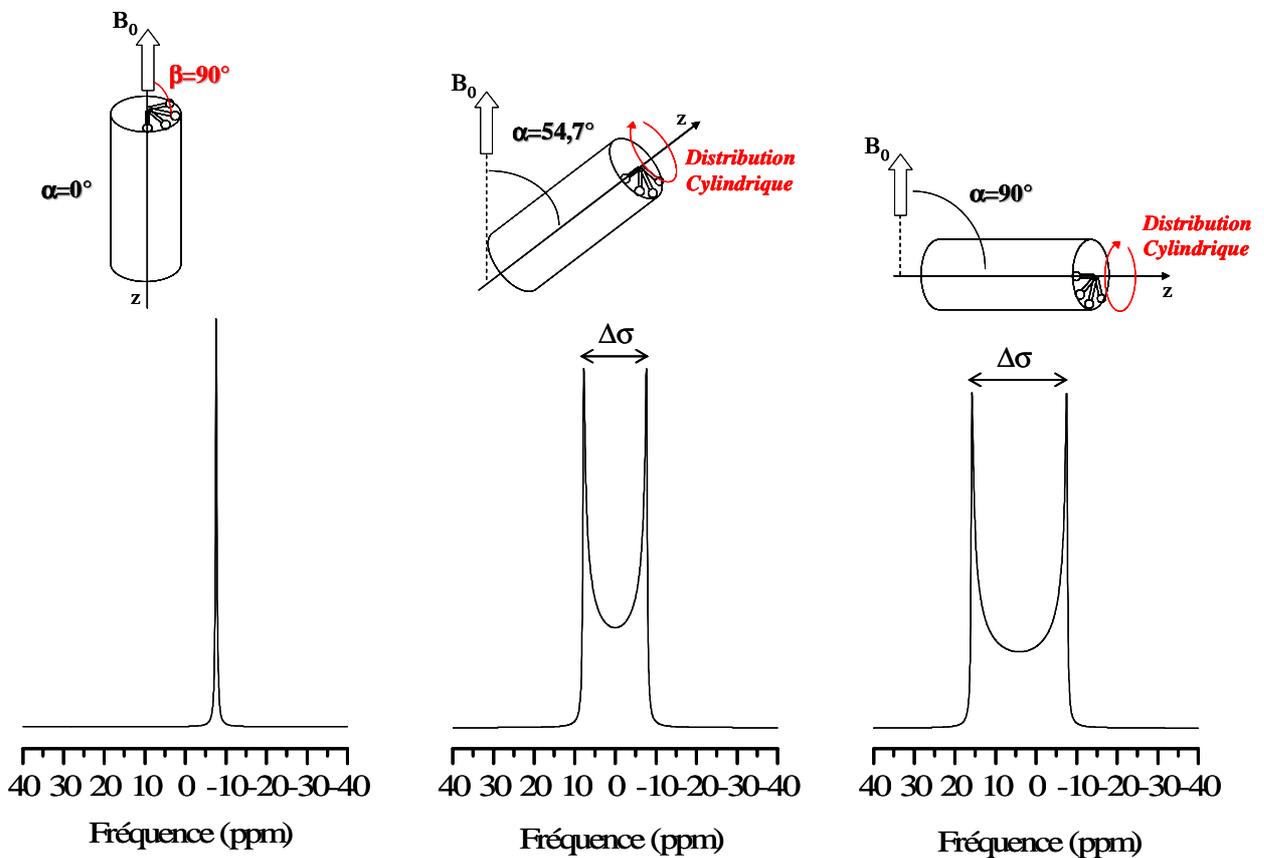


Figure II.6 : a) Représentation d'une distribution cylindrique de phospholipides orientés dans un champ magnétique ;  $\alpha$  est l'angle entre l'axe principal du cylindre et  $B_0$  et  $\beta$  est l'angle azimutal. b) Spectres RMN- $^{31}\text{P}$  types associés à l'orientation où l'angle  $\alpha$  entre l'axe principal du cylindre et  $B_0$  est égal à  $0^\circ$  (spectre de gauche),  $54,7^\circ$  (spectre du milieu) et  $90^\circ$  (spectre de droite).

b) Le deutérium  $^2\text{H}$  et l'azote  $^{14}\text{N}$

Pour des noyaux de spin  $I > 1/2$ , nous avons vu que l'interaction quadrupolaire dominait les autres couplages internes avec le champ magnétique. Le deutérium et l'azote 14 ont un spin  $I=1$  ( $m=-1, 0$  ou  $+1$ ). Sous l'effet Zeeman et celui quadrupolaire, ils présentent trois niveaux d'énergie non équidistants pour lesquels deux transitions ( $\Delta m \pm 1$ ) sont possibles. Ces transitions sont à l'origine d'un doublet de raies, centré sur la fréquence de Larmor  $\omega_0$ , sur le spectre RMN (figure II.7). L'écart en fréquence entre ces deux raies,  $\Delta \nu_Q(\alpha, \beta)$ , est appelé l'éclatement quadrupolaire et est défini par :

$$\Delta \nu_Q(\alpha, \beta) = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} + \frac{\eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha}{2} \quad (\text{II.28})$$

Le terme  $\frac{e^2 q Q}{h}$  représente la constante de couplage quadrupolaire statique, notée  $A_Q$ . Dans le cas des liaisons méthylènes carbone-deutérium  $\text{C}-^2\text{H}$ , que l'on retrouve sur les chaînes deutérées des lipides,  $A_Q=167$  kHz (Burnett et Muller, 1971). L'angle  $\beta$  définit l'orientation des liaisons  $\text{C}-^2\text{H}$  ou  $\text{C}-^{14}\text{N}$  par rapport à l'axe  $z$  du référentiel du laboratoire, parallèle au champ magnétique  $B_0$  (on considère que l'axe  $z$  du CGE est colinéaire aux liaisons  $\text{C}-^2\text{H}$  ou  $\text{C}-^{14}\text{N}$ ) (figure II.8).

Dans le cas des lipides possédant une symétrie axiale, le paramètre d'asymétrie  $\eta=0$ . L'équation de l'éclatement quadrupolaire se simplifie alors :

$$\Delta \nu_Q(\beta) = \frac{3}{2} A_Q \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \quad (\text{II.29})$$

Cette relation met clairement en évidence la dépendance angulaire en  $\beta$  de l'éclatement quadrupolaire  $\Delta \nu_Q$ . Si cet angle  $\beta = 54,7^\circ$  (l'angle magique), l'éclatement quadrupolaire s'annule.

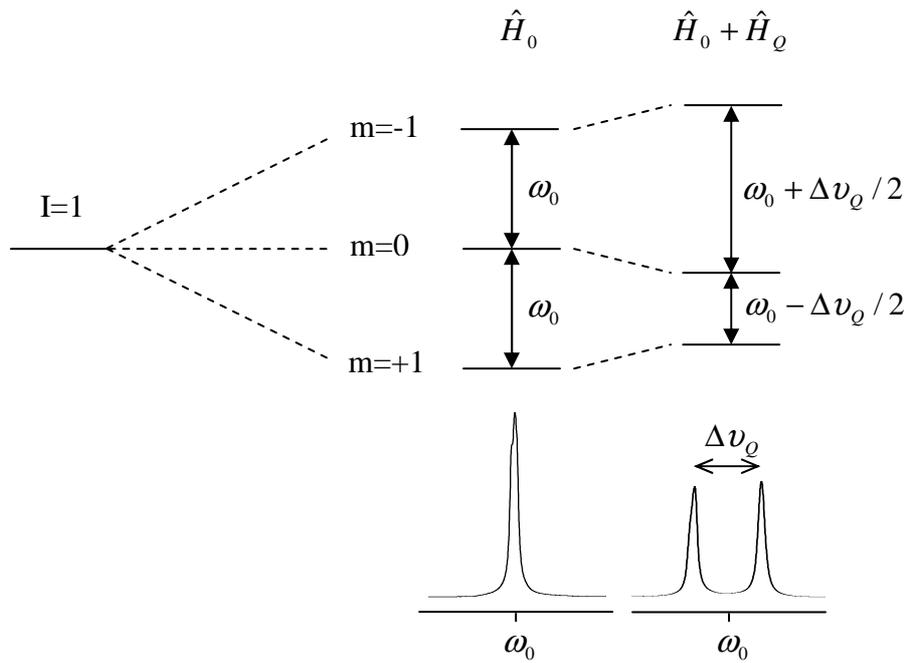


Figure II.7 : Niveaux d'énergie magnétique et raies de résonance pour un noyau de spin  $I=1$ .

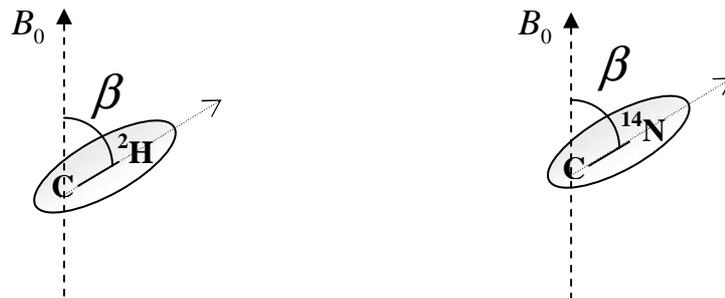


Figure II.8 : Représentation de l'angle  $\beta$  entre les liaisons  $C-^2H$  ou  $C-^{14}N$  et le champ magnétique statique  $B_0$ . Les parties ovales grisées correspondent au CGE du deutérium ou de l'azote 14, dont l'axe principal est approximativement colinéaire aux liaisons  $C-^2H$  ou  $C-^{14}N$ .

Les cristaux

Dans le cas de poudres polycristallines, les liaisons C-<sup>2</sup>H ou C-<sup>14</sup>N sont orientées selon une distribution sphérique par rapport au champ magnétique. Suivant le même principe qu'en RMN des solides <sup>31</sup>P, le spectre RMN du deutérium ou de l'azote 14 correspond à la somme des résonances associées à chaque orientation, pondérées par leur probabilité d'existence  $P(\beta)$ . De même, pour des molécules à symétrie axiale ( $\eta = 0$ , figure II.9.e), l'orientation la plus probable  $\beta = 90^\circ$  correspond aux raies les plus intenses, dont l'éclatement quadrupolaire est égal à :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4}A_Q \quad (\text{II.30})$$

Les bicouches lipidiques

La majorité des mouvements moléculaires des lipides et des protéines membranaires, à l'exception des mouvements collectifs ou de diffusion latérale, sont qualifiés de rapides ; leur temps de corrélation est inférieur à la microseconde. Comme pour la RMN du phosphore, ces mouvements vont moduler la forme des spectres de RMN du deutérium ou de l'azote 14. Plus le désordre du système augmente (fluctuations, rotation axiale, oscillation...), plus l'interaction quadrupolaire est moyennée et les éclatements quadrupolaires deviennent petits (figure II.9.b, c et d). Dans le cas de petites vésicules, dont les mouvements de réorientation sont considérés comme isotropes (temps de corrélation très courts), une seule raie isotrope est observée sur le spectre RMN, à la fréquence de déplacement chimique isotrope des liaisons C-<sup>2</sup>H ou C-<sup>14</sup>N (figure II.9.a).

Dans le cas d'échantillons orientés, comme les bicelles, les spectres obtenus sont intenses et bien résolus puisque seules certaines orientations par rapport au champ magnétique sont adoptées. La figure II.10.a) présente le spectre RMN du deutérium obtenu pour des bicelles DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>/DCPC, où les chaînes aliphatiques des lipides DMPC sont totalement deutérées, et où  $\beta = 90^\circ$  est la seule orientation privilégiée.

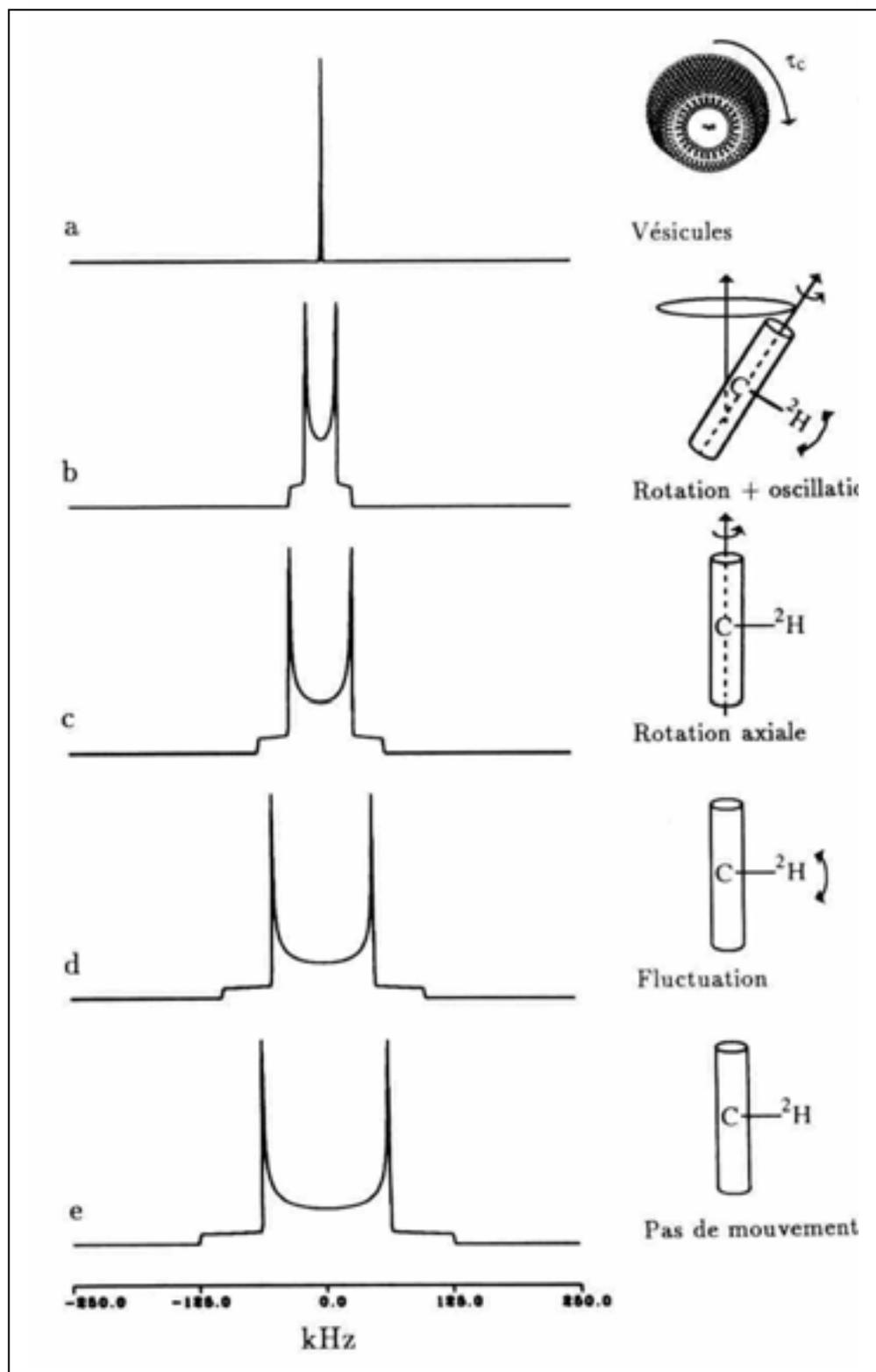


Figure II.9 : Influence des mouvements moléculaires en milieu membranaire sur la forme des spectres RMN du deutérium (Dufourc, 1986).

Afin de décrire l'amplitude des mouvements moléculaires membranaires, Seelig (Seelig, 1977) a introduit la notion de paramètre d'ordre, qui permet de quantifier l'état d'organisation d'un système.

Pour cela, considérons une bicouche membranaire dont les molécules sont animées uniquement de mouvements à symétrie axiale ( $\eta = 0$ ). Attachons un système d'axes P (x, y, z) à un site particulier d'une molécule (par exemple une liaison C-<sup>2</sup>H, l'axe z étant colinéaire à cette liaison) et un autre système d'axes B (x', y', z'), associé à la normale à la bicouche  $n$ . Les fluctuations dans l'espace et dans le temps des axes de P par rapport à z' (ou  $n$ ) peuvent alors être estimées par les paramètres d'ordre, notés  $S_{ii}$ , qui s'expriment :

$$S_{ii} = \frac{3\langle \cos^2 \theta_i \rangle - 1}{2} \quad (\text{II.31})$$

où  $i=x, y, z$ . Le terme  $\langle \cos^2 \theta_i \rangle$  indique une moyenne dans le temps des fluctuations angulaires de l'axe  $i$  par rapport à l'axe z', colinéaire à  $n$ . L'orthogonalité des cosinus directeurs ( $\sum_i \cos^2 \theta_i = 1$ ), entraîne la relation  $S_{xx} + S_{yy} + S_{zz} = 0$ . Comme le tenseur du GCE, correspondant à une liaison C-<sup>2</sup>H ou C-<sup>14</sup>N, est considéré à symétrie axiale ( $\eta = (S_{xx} - S_{yy})/S_{zz} = 0$ ), on obtient :

$$S_{zz} = -2S_{xx} = -2S_{yy} \quad (\text{II.32})$$

Dans ce cas précis, le paramètre d'ordre  $S_{zz}$  est suffisant pour rendre compte des fluctuations de la molécule dans la phase lamellaire. L'équation (II.29) peut alors s'écrire :

$$\Delta v_Q(\beta') = \frac{3}{2} A_Q \frac{3\cos^2 \beta' - 1}{2} S_{zz} \quad (\text{II.33})$$

où  $\beta'$  est l'angle entre la normale à la bicouche  $n$  et le champ magnétique  $B_0$ .

Il est souvent difficile de différencier les paramètres d'ordre individuels. On définit alors le paramètre d'ordre orientationnel d'une liaison C-<sup>2</sup>H ou C-<sup>14</sup>N, qui donne une mesure globale de l'ordre résiduel dans la membrane par rapport à la normale à la bicouche :

$$S^{CD} = \prod_{j=1}^n S_{zz}^j \quad (\text{II.34})$$

où  $j$  dénombre les mouvements anisotropes distincts présents dans le système.

L'expression (II.33) devient alors :

$$\Delta\nu_Q(\beta') = \frac{3}{2} A_Q \frac{3\cos^2\beta' - 1}{2} S^{CD} \quad (\text{II.35})$$

On constate que la mesure de l'éclatement quadrupolaire entre les pics les plus intenses (correspondant à l'orientation  $\beta' = 90^\circ$ ) donne une estimation directe du paramètre d'ordre  $S^{CD}$  ; dans ce cas la relation de proportionnalité entre  $\Delta\nu_Q$  et  $S^{CD}$  se simplifie :

$$\Delta\nu_Q(90^\circ) = \frac{3}{4} A_Q S^{CD} \quad (\text{II.36})$$

Il en est de même pour les bicelles DMPC/DCPC qui s'orientent de telle sorte que leur normale  $n$  soit perpendiculaire à  $B_0$ . La figure II.10.a) présente le spectre RMN- $^2\text{H}$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (deutéié sur ses deux chaînes  $\text{sn}_1$  et  $\text{sn}_2$  des positions 2 à 14, voir figure II.10.b)), constitutif des bicelles DMPC- $^2\text{H}_{54}$ /DCPC. L'orientation privilégiée  $n \perp B_0$ , entraîne une très bonne résolution du spectre, permettant de mesurer facilement les éclatements quadrupolaires, correspondant aux différents groupes C- $^2\text{H}$  sur les chaînes du lipide. Ces groupements aliphatiques n'ont pas la même dynamique suivant leur emplacement sur la chaîne lipidique, ce qui se traduit par des éclatements quadrupolaires plus ou moins grands. La mesure de ces derniers permet de calculer les paramètres d'ordre  $S^{CD}$  d'après l'équation (II.36) ; Il est ensuite possible d'établir un profil d'ordre reportant les  $S^{CD}$  par rapport à la position des atomes de deutérium sur la chaîne aliphatique des lipides (figure II.10.c)). On constate que plus on remonte sur la chaîne d'acide gras vers le squelette glycérol, plus l'éclatement quadrupolaire et donc le paramètre d'ordre est grand, ce qui est synonyme d'une rigidité du système plus importante.

Remarque : la dynamique des groupes aliphatiques en position 2 et 3 n'est pas équivalente entre les deux chaînes  $\text{sn}_1$  et  $\text{sn}_2$  du lipide DMPC. La structure du squelette glycérol fait en effet remonter la chaîne  $\text{sn}_2$  par rapport à celle  $\text{sn}_1$ , en formant un coude avec les C- $^2\text{H}_2$  en position 2 (les deux protons ne sont pas équivalents, on distingue ainsi la position 2S et 2R, dont la dynamique est aussi différente) et 3 ; cette configuration confère davantage de mobilité à ces groupes aliphatiques, ce qui se traduit sur le profil d'ordre par des paramètres d'ordre plus faibles par rapport aux C- $^2\text{H}_2$  en position adjacente (de 4 à 7). Pour la chaîne  $\text{sn}_1$ , les deutérons en position 2 et 3 ont la même dynamique que ceux des positions 4 à 7.

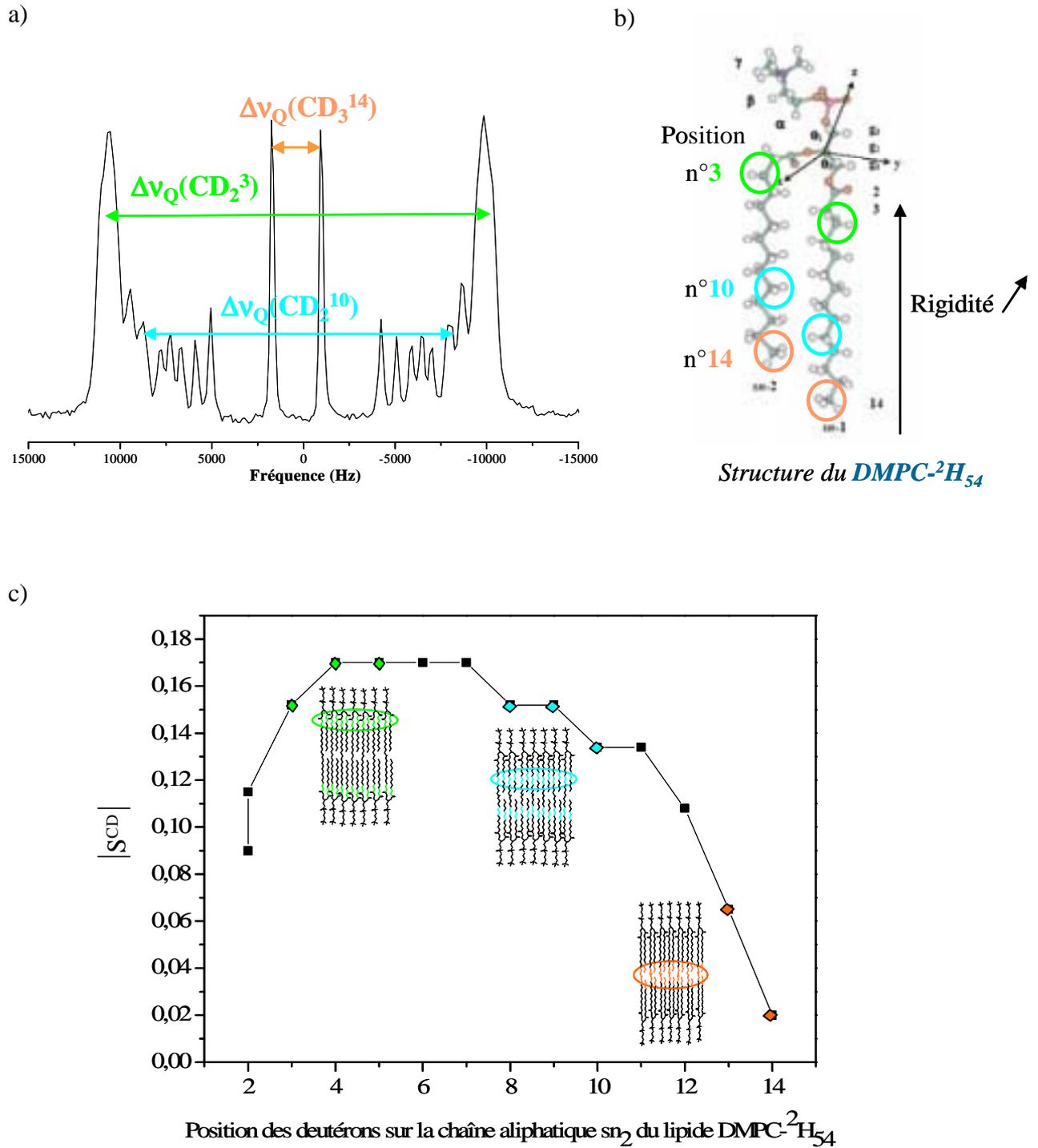


Figure II.10 : a) Spectre RMN en deutérium (séquence Echo solide) du  $DMPC-^2H_{54}$ , constitutif des bicelles  $DMPC-^2H_{54}/DCPC$  qui s'orientent telle que leur normale soit perpendiculaire à  $B_0$  (Aussenac et al., 2003a), b) Structure moléculaire du  $DMPC-^2H_{54}$  et c) Profil d'ordre présentant l'évolution du paramètre d'ordre  $S^{CD}$  en fonction de la position des atomes deutérium sur la chaîne lipidique  $sn_2$  du  $DMPC-^2H_{54}$ .

Remarque sur la décomposition de  $S^{CD}$  en mouvements élémentaires

Il est intéressant de préciser que le paramètre d'ordre  $S^{CD}$  peut-être décomposé en trois contributions :  $S_{coll}$ ,  $S_{int\ ra}$  et  $S_{mol}$  :

-  $S_{coll}$  décrit les mouvements collectifs de déformation des membranes (ondulations des bicouches)

-  $S_{int\ ra}$  est associé aux mouvements intramoléculaires, comme des vibrations ou des changements conformationnels de la chaîne lipidique induits par des isomérisations *gauche-trans* des liaisons C-C.

- et  $S_{mol}$  tient compte des mouvements moléculaires, comme la rotation du lipide autour de son axe principal, la diffusion latérale des lipides ou encore la réorientation de l'axe de rotation de la molécule autour de la normale à la bicouche dans un cône de précession (terme anglo-saxon associé : « wobbling in a cone »).

$$\text{Dans le cas général : } S^{CD} = \langle S_{coll} \rangle * \langle S_{int\ ra} \rangle * \langle S_{mol} \rangle$$

Dans le cas des bicelles, le terme  $S_{coll}$  peut-être pris égal à 1 ; les fluctuations de surface peuvent en effet être négligées vu la petite taille des objets bicellaires (400 à 600 Å) et leur viscosité. Ainsi :  $S_{Bicelle}^{CD} = \langle S_{int\ ra} \rangle * \langle S_{mol} \rangle$ .

Dans le cas particulier d'une molécule rigide (comme le cholestérol ou le squelette glycérol des lipides) oscillant dans un cône (pas de désordre conformationnel),  $S_{coll}$  est également pris égal à 1. De plus, les liaisons C-D sont toutes fixées les unes par rapport aux autres ;  $S_{int\ ra}$  peut alors être considéré comme un terme géométrique en  $(3\cos^2 \gamma_i - 1)/2$ , où  $\gamma_i$  est l'angle entre les liaisons C-D et l'axe principal du mouvement de la molécule. Le paramètre d'ordre devient alors directement proportionnel à  $S_{mol}$ , qui est identique pour toutes les liaisons C-D :

$$S_i^{CD} = S_{mol} \frac{3\cos^2 \gamma_i - 1}{2} \quad (\text{II.37})$$

Les orientations des liaisons C-D sont déterminées à partir de plusieurs sources de données expérimentales (cristallographie, diffraction des neutrons ou dynamique moléculaire). On définit ensuite l'axe principal du mouvement  $n$  dans un système d'axes attaché à la partie rigide de la molécule. La position de  $n$  est déplacée jusqu'à ce qu'elle vérifie les résultats

expérimentaux ; il est alors possible de calculer  $S_{mol}$  suivant l'équation (II.37) (Aussenac et al., 2003b).

Nous venons de voir que la RMN du deutérium, via la mesure des éclatements quadrupolaires et du calcul des paramètres d'ordre, donne des informations sur l'amplitude des mouvements de fluctuation des liaisons C-<sup>2</sup>H ou C-<sup>14</sup>N d'une molécule lipidique membranaire. Il est aussi possible de connaître la vitesse de ces mouvements moléculaires en mesurant les temps de relaxation magnétiques nucléaires ( $T_{1Z}$  ou  $T_2$ ). Toutefois, aucune mesure de ce type n'a été effectuée au cours de cette thèse, l'aspect théorique de la relaxation magnétique ne sera donc pas développé ici.

c) L'azote <sup>15</sup>N et le proton <sup>1</sup>H

L'interaction dipolaire entre deux noyaux <sup>15</sup>N et <sup>1</sup>H se traduit sur le spectre RMN par un doublet de raies, centré sur le déplacement chimique spécifique de l'environnement électronique du noyau considéré. L'écart en fréquence entre ces deux raies est l'éclatement dipolaire, noté  $\Delta\nu_D$ , qui s'exprime :

$$\Delta\nu_D(\beta) = \frac{\gamma_{15N}\gamma_{1H}}{r_{15N-1H}^3} \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} S^{NH} \quad (\text{II.38})$$

$r_{15N-1H}$  est la distance entre les noyaux <sup>15</sup>N et <sup>1</sup>H,  $\beta$  est l'angle entre le vecteur reliant les atomes <sup>15</sup>N et <sup>1</sup>H et le champ magnétique statique  $B_0$ , et  $S^{NH}$  est le paramètre d'ordre associé à la liaison <sup>15</sup>N-H (équivalent à  $S^{CD}$ ).

Deux interactions sont donc présentes pour le noyau azote 15 : l'anisotropie de déplacement chimique (ADC) et le couplage dipolaire <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N (D) ; le type de spectre RMN obtenu va donc être une combinaison entre les deux et va dépendre de l'importance de chacune.

Pour des échantillons anisotropes non orientés, le spectre RMN <sup>15</sup>N résulte de la superposition de tous les doublets de raies, associés chacun à une orientation du vecteur <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H par rapport à  $B_0$  (voir spectres de gauche figure II.11) ; le type de spectre obtenu est alors très large et difficilement interprétable.

Pour un système orienté par exemple à 90°, le spectre <sup>15</sup>N sera constitué d'un doublet de raies centré sur la fréquence  $\omega_{\perp}$  (voir spectres de droite figure II.11).

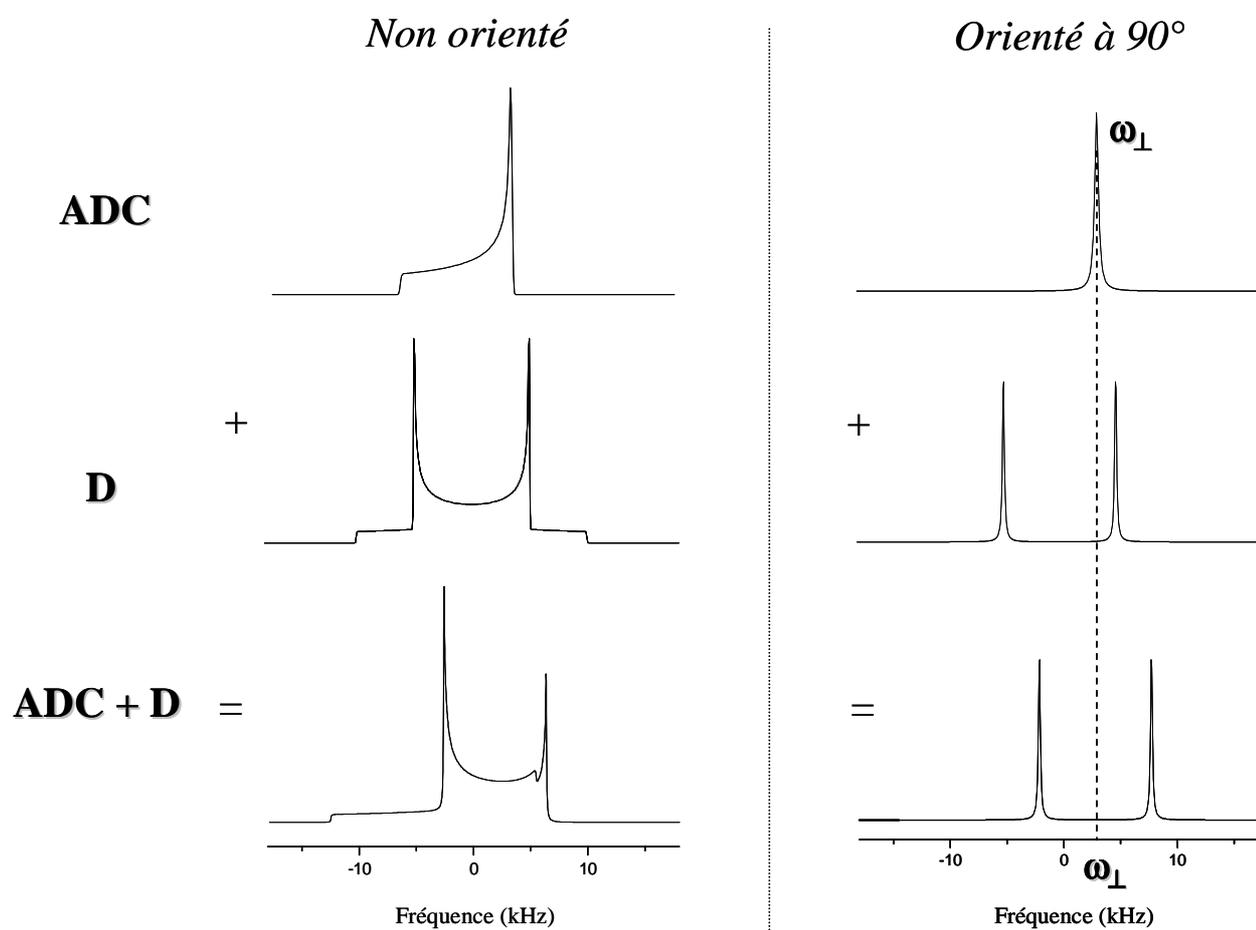


Figure II.11 : Spectres  $^{15}\text{N}$  types associés à l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique (ADC), au couplage dipolaire (D) et à la combinaison des deux (ADC+D) à contribution égale, pour des échantillons non orientés (spectres de gauche) et orientés à  $90^\circ$  (spectres de droite).

#### II. 1. 4 La RMN en rotation à l'angle magique

La technique RMN de rotation à l'angle magique (MAS pour Magic Angle Spanning) consiste à faire tourner très rapidement de façon mécanique un échantillon orienté à  $54,7^\circ$  par rapport au champ magnétique externe. Nous avons vu que la plupart des interactions magnétiques anisotropes internes avaient une dépendance angulaire en  $\frac{3\cos^2\beta - 1}{2}$  par rapport au champ magnétique statique. Ce terme s'annule pour  $\beta = 54,7^\circ$ , que l'on appelle l'angle magique. Ainsi, si la vitesse de rotation de l'échantillon est supérieure à l'interaction magnétique anisotrope considérée, il est possible de moyenniser cette dernière. On se rapproche alors des conditions de la RMN des liquides, où l'effet Zeeman, le blindage électronique isotrope et le couplage indirect entre deux spins sont les seules interactions magnétiques à considérer.

La vitesse de rotation de l'échantillon nécessaire pour moyenniser les interactions anisotropes va dépendre de la nature du système (phases, températures...) et du type de noyau considéré :

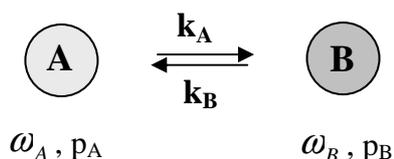
- pour le proton, l'interaction dipolaire homonucléaire  $^1\text{H}-^1\text{H}$ , dans un échantillon anisotrope tel que les membranes, est très importante ( $\approx 80$  kHz) ; du fait de la dynamique intrinsèque du système, cette interaction est généralement diminuée. Il est alors possible d'obtenir des spectres à haute résolution de lipides ou peptides membranaires pour des vitesses de rotation supérieures à 10 kHz.

- pour le phosphore, il est possible d'annuler l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique en tournant à des vitesses de l'ordre de 8 kHz.

- pour le deutérium, il est actuellement impossible de moyenniser l'interaction quadrupolaire qui varie entre 20 et 200 kHz. (la vitesse de rotation maximale de nos jours est d'environ 70 kHz pour un rotor de  $\approx 0,5$  mm de diamètre).

### II. 1. 5 La théorie de l'échange à deux sites

Considérons deux espèces A et B, capables de s'échanger. La théorie de l'échange à deux sites, issu du processus de Markoff, peut alors s'appliquer (Abragam, 1961). Notons  $\omega_A$  et  $\omega_B$  les fréquences respectives des molécules A et B, et  $k_A$  et  $k_B$  les probabilités par unité de temps, pour que ces deux molécules échangent leur site :



On distingue trois types d'échange suivant la valeur des constantes de vitesses  $k_A$  et  $k_B$  (voir figure II.12):

- si  $k_A, k_B \ll \omega_A - \omega_B$ , on parle d'échange *lent* ; dans ce cas, le spectre RMN est constitué de deux raies de résonance bien distinctes de fréquence  $\omega_A$  et  $\omega_B$ .

- si  $k_A, k_B \gg \omega_A - \omega_B$ , l'échange est dit *rapide* à l'échelle de la RMN ; dans ce cas le spectre RMN est constitué d'une seule raie de résonance, à la fréquence moyenne  $\omega_R$  qui s'exprime :

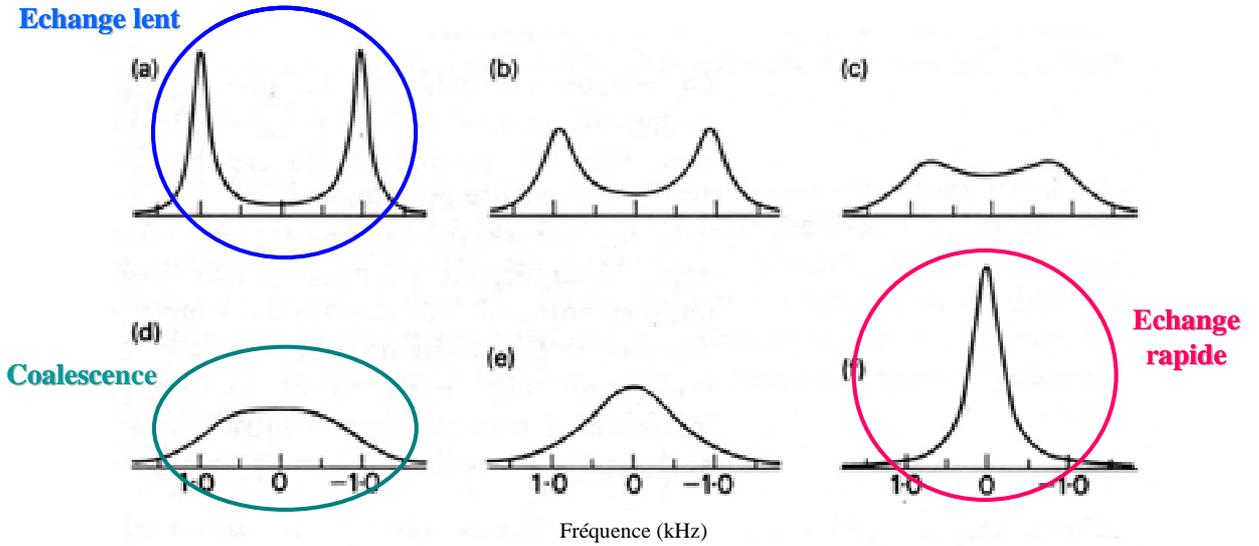
$$\omega_R = p_A \omega_A + p_B \omega_B = p_A \omega_A + (1 - p_A) \omega_B \quad (\text{II.39})$$

où  $p_A$  et  $p_B$  sont les fractions de population respectives des espèces A et B.

- lorsque aucune des deux inégalités précédentes n'est vérifiée, les échanges sont dits dans le régime des vitesses intermédiaires. On distingue plus particulièrement l'étape de coalescence où  $k_A, k_B \# \omega_A - \omega_B$ .

Dans ce travail, nous étudierons l'interaction entre le peptide marqué Menk- $^{15}\text{N}_3$  et des modèles membranaires de type liposomes et bicelles. En dessous d'une concentration critique, le peptide va totalement interagir avec la membrane ; au-delà de cette concentration critique, un état d'équilibre est atteint, entre une forme du peptide liée à la membrane et une forme libre en solution. Dans ce contexte, nous essayerons, à partir de l'allure des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  du peptide, de qualifier le type d'échange entre la forme liée et la forme libre du peptide et de déterminer un coefficient de partage (rapport de proportionnalité (forme liée) / (forme libre)) entre ces deux états peptidiques.

a) Échantillons en phase isotrope



b) Spectres de poudre

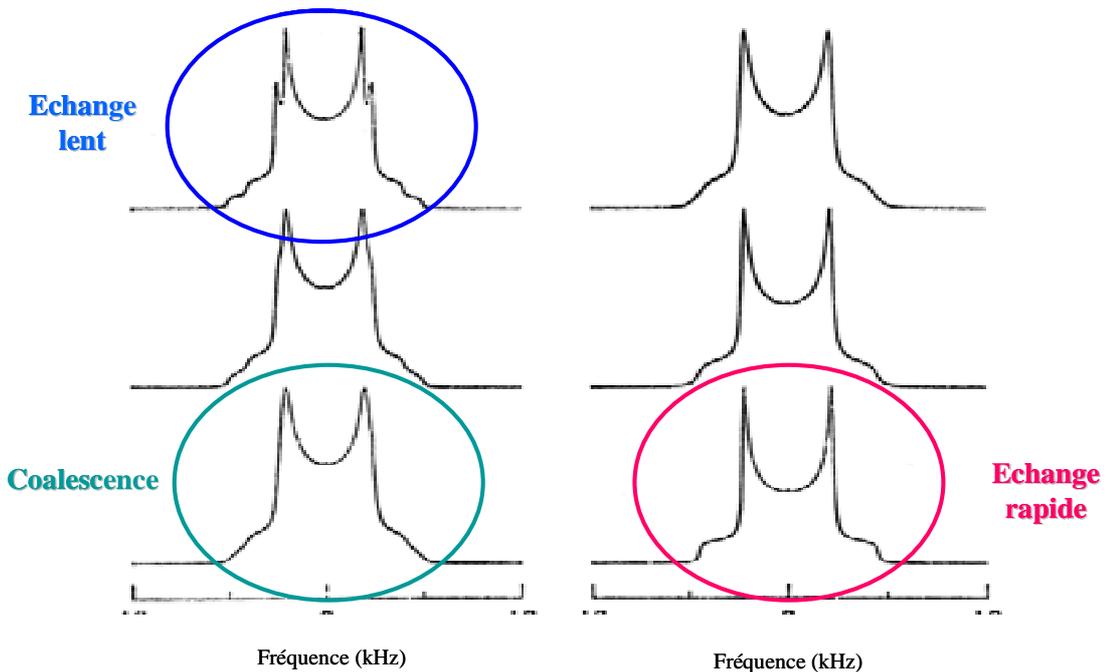


Figure II.12 : Formes des spectres RMN en fonction de la nature de l'échange a) pour des échantillons en phase isotrope et b) pour des noyaux en milieu anisotrope soumis aux interactions magnétiques internes quadrupolaires ou dipolaires ( $\eta = 0$ ) (d'après (Dufourc, 2004)).

## II. 1. 6 Aspects expérimentaux

### a) *Acquisition des données*

L'ensemble des expériences RMN du phosphore  $^{31}\text{P}$  a été réalisé avec un spectromètre Bruker Biospin Avance 400 MHz (sonde QNP - Quattro Nuclei Probe) ; les expériences de RMN du deutérium  $^2\text{H}$  et de l'azote  $^{14}\text{N}$  ont été effectuées sur les spectromètres Biospin Avance 500 MHz (sonde CP MAS bas  $\gamma$ ) et 300 MHz (sonde CP MAS) ; les noyaux  $^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}$  ont été observés avec les spectromètres 400 MHz (sonde BBI – Broad Band Inverse) et 500 MHz (sonde CP MAS bas  $\gamma$  ou sonde HR-MAS). Les logiciels associés aux spectromètres sont de type BRUKER XWIN-NMR 3.1 et TopSpin 1.3.

Plusieurs points sont à noter avant de lancer une acquisition en RMN des solides :

- les interactions magnétiques internes que l'on rencontre pour des échantillons anisotropes statiques correspondent à des gammes de fréquences très importantes (jusqu'à 250 KHz pour l'éclatement quadrupolaire). Il faut donc une fenêtre d'irradiation suffisamment large pour permettre de détecter l'ensemble du signal en RMN des solides. Cette fenêtre d'irradiation s'étend sur une gamme de fréquence de  $2/\tau_{90^\circ}$ ,  $\tau_{90^\circ}$  étant le temps pendant lequel l'impulsion radio fréquence est appliquée. Ainsi, plus cette durée d'impulsion est brève, plus la couverture spectrale est grande. Généralement,  $\tau_{90^\circ}$  est égal à quelques microsecondes en RMN des solides.

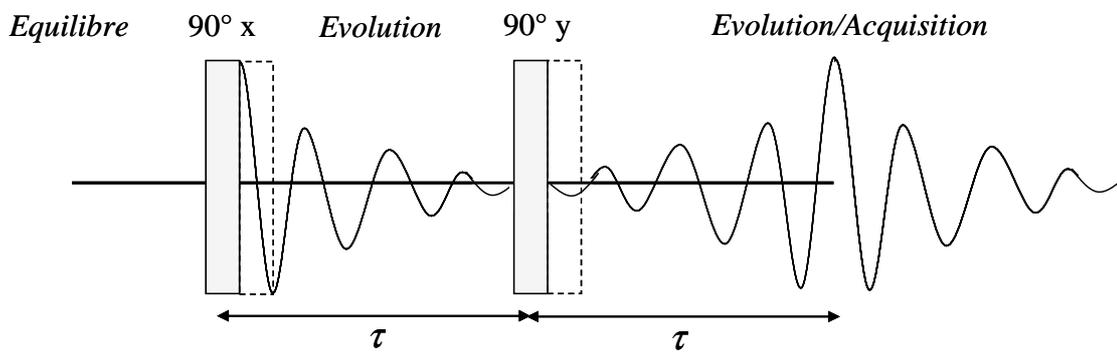
- les temps de relaxation pour des échantillons dits « solides » sont courts, ce qui se traduit par un amortissement rapide de la FID. L'information du signal est donc concentrée sur un nombre restreint de points au début de la cosinusoïde amortie dans le temps. Après une impulsion radio fréquence, un délai machine incompressible, appelé temps mort, est nécessaire pour permettre le bon fonctionnement du système électronique de l'émetteur et du récepteur du signal et ne pas engendrer de distorsions sur le spectre RMN. Ce temps mort devient discriminant en RMN des Solides.

### **Les séquences d'impulsion d'écho:**

Pour s'affranchir du problème lié au temps mort, des séquences d'impulsion d'écho ont été mis au point (Hahn, 1950). Elles sont constituées de deux impulsions de champ radio fréquence, séparées par un temps  $\tau$ , et conduisent à déplacer l'origine des temps du signal RMN au-delà du temps mort du récepteur. Le délai  $\tau$  doit être plus grand que la durée du

temps mort, mais suffisamment court pour éviter de perdre en rapport signal sur bruit sous l'effet de la relaxation. L'acquisition du signal se fait au sommet de l'écho après un délai de  $2\tau$ . Pour les noyaux de spin  $I=1/2$  (cas du phosphore), nous utiliserons la séquence d'écho de Hahn (Rance et Byrd, 1983) et pour ceux de spin  $I>1/2$  (cas du deutérium et de l'azote 14), la séquence d'écho quadrupolaire (Davis et al., 1976)(figures II.13).

**Echo Solide:** refocalise les interactions **D** et **Q**



**Echo de Hahn:** refocalise les interactions **ADC** et **J**

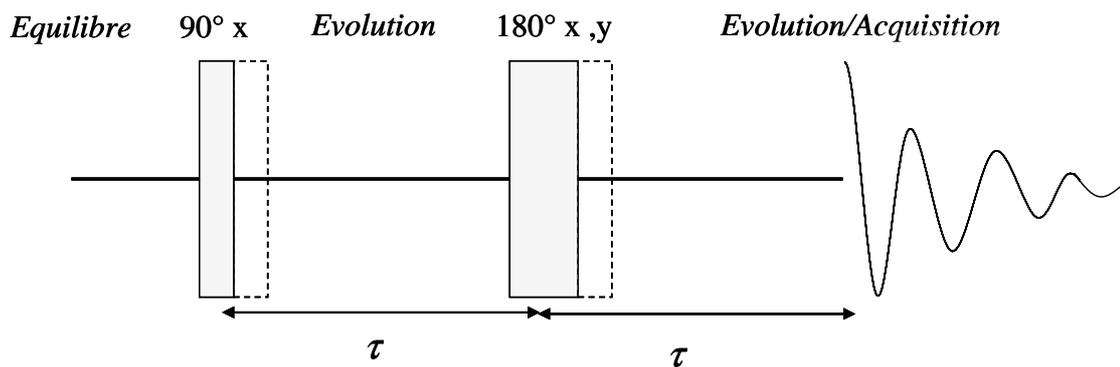


Figure II.13 : Séquences d'impulsion d'écho a) quadrupolaire et b) de Hahn, utilisées pour l'analyse d'échantillons anisotropes. Les traits en pointillés représentent le délai du temps mort.

**La séquence d'Hartmann-Hahn** (Hartmann et Hahn, 1962)

Cette séquence a pour objectif d'améliorer la sensibilité de détection d'un noyau peu abondant (comme l'azote  $^{15}\text{N}$ ), en présence d'un noyau très abondant (comme le proton  $^1\text{H}$ ). L'idée est d'établir un transfert de polarisation entre ces deux types de noyaux qui interagissent via un couplage dipolaire très important. Ce transfert peut être décrit de la manière suivante : à température ambiante, l'aimantation  $M_{^{15}\text{N}}$  est très faible par rapport à celle des protons  $M_{^1\text{H}}$ ; en effet d'après la loi de Curie, l'aimantation  $M$  est proportionnelle à la susceptibilité magnétique  $\chi$ , qui elle-même est reliée au rapport gyromagnétique  $\gamma$  du noyau étudié ( $\gamma_{^{15}\text{N}} = -2,7 \cdot 10^7 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $\gamma_{^1\text{H}} = 26,7 \cdot 10^7 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) :

$$M_{^{15}\text{N}} = \frac{\chi_{^{15}\text{N}} B_0}{T_L} \quad M_{^1\text{H}} = \frac{\chi_{^1\text{H}} B_0}{T_L} \quad (\text{II.40})$$

$T_L$  est la température du laboratoire, et :

$$\chi = \frac{N \gamma^2 \hbar^2 I(I+1)}{3k_B} \quad (\text{II.41})$$

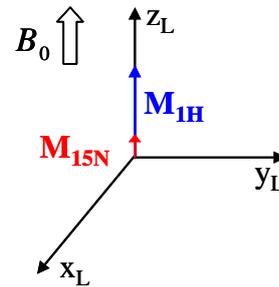


Figure II.14 : Schéma des aimantations  $M_{^1\text{H}}$  et  $M_{^{15}\text{N}}$  dans le référentiel du laboratoire.

avec  $N$  la population de noyaux considérés,  $\hbar$  la constante de Planck,  $I$  le nombre de spin et  $k_B$  la constante de Boltzmann ;

Le principe d'Hartmann-Hahn (1962) est de se servir du réservoir des protons pour obtenir une aimantation  $M_{^{15}\text{N}}$  plus importante. Pour cela, on procède en deux étapes :

- 1) on « refroidit » les protons
- 2) on établit un contact thermique c'est-à-dire un échange d'énergie entre les deux réservoirs  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$

La première étape consiste à appliquer aux noyaux protons un champ radio fréquence  $B_1$  de telle sorte que l'aimantation  $M_{^1\text{H}}$  reste polarisé sur l'axe  $y_L$  (voir figure II.15.a)). On parle aussi de « spin lock ». L'aimantation  $M_{^1\text{H}}$  s'exprime alors :

$$M_{^1\text{H}} = \frac{\chi_{^1\text{H}} B_1}{T_{^1\text{H}}} \quad (\text{II.42})$$

Comme  $B_1 \ll B_0$ , la température  $T_{^1\text{H}} \ll T_L$  pour garder l'aimantation  $M_{^1\text{H}}$  constante, ce qui justifie l'expression « refroidir » les protons.

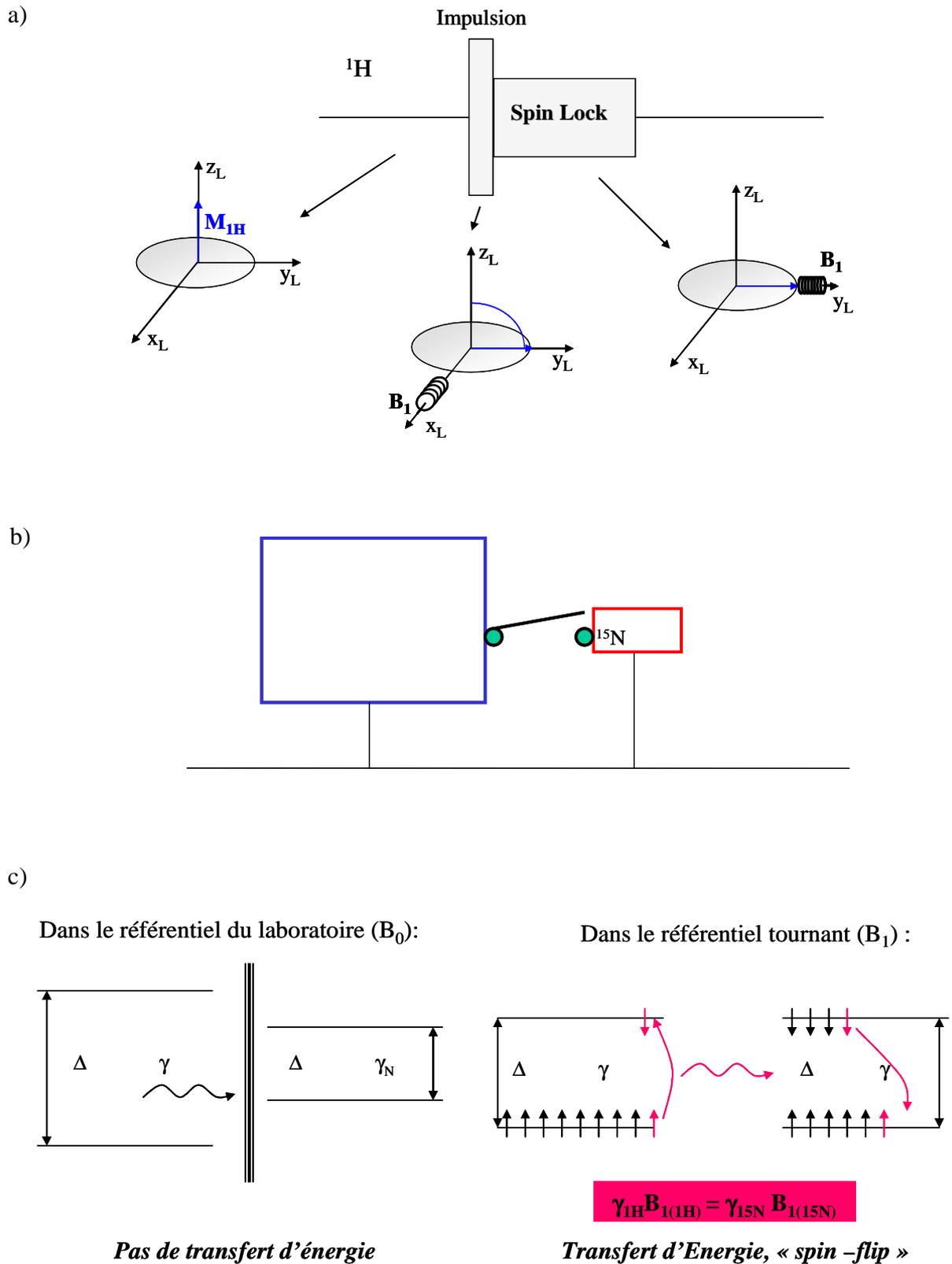


Figure II.15 : Représentation a) du phénomène de Spin Lock pour les protons, b) des deux réservoirs  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  et c) du transfert de polarisation des noyaux  $^1\text{H}$  vers  $^{15}\text{N}$  après le spin lock des protons (Dufourc, 2004).

Un transfert d'énergie entre les réservoirs  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  est alors possible (figure II.15.b) et c) ; en effet dans le référentiel tournant (associé à  $B_1$ ), on a la relation :

$$\begin{aligned} \Delta E_{1H} &= \Delta E_{15N} \\ \gamma_{1H} B_{1(1H)} &= \gamma_{15N} B_{1(15N)} \end{aligned} \quad (\text{II.43})$$

La séquence d'Hartmann-Hahn (aussi appelée Séquence CP pour Cross Polarization), est schématisée ci-dessous ; un découplage large bande des protons est réalisé pendant l'acquisition afin d'améliorer le rapport signal sur bruit.

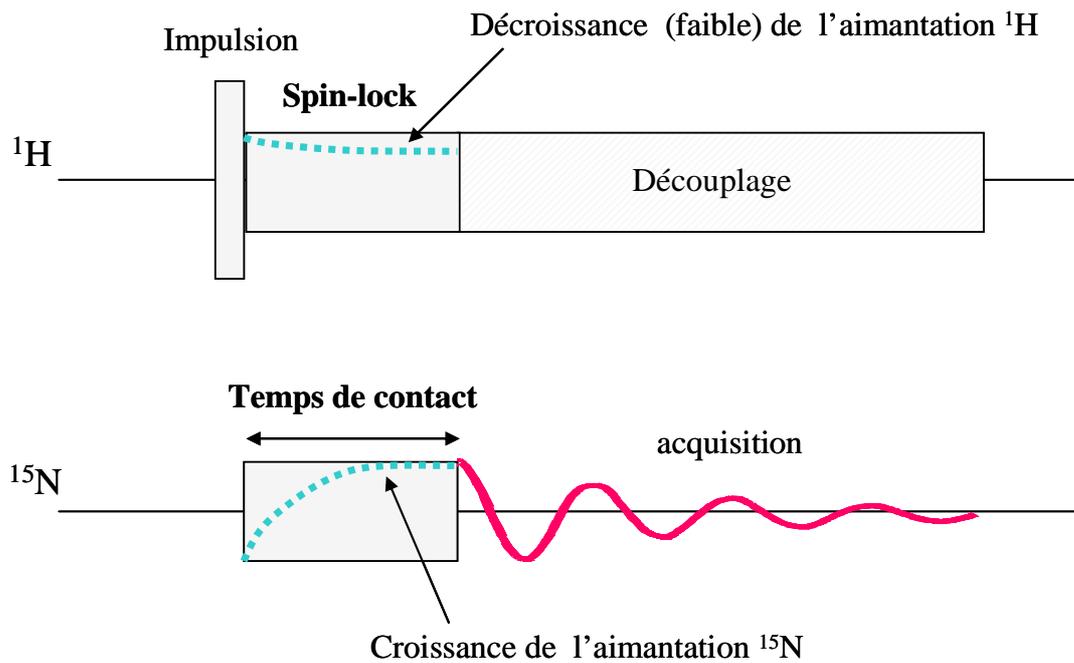


Figure II.16 : Représentation de la séquence d'Hartmann-Hahn.

*b) Traitement des données*

Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, la FID est convoluée par une exponentielle décroissante de type  $e^{(-LBt)}$  (opération de filtrage). Le terme LB, exprimé en hertz (Hz), peut varier de quelques Hz en RMN des liquides à plusieurs centaines d'Hz en RMN des Solides.

Il est difficile de mesurer directement les éclatements quadrupolaires individuels sur les spectres de poudre d'échantillons non orientés ; en effet la dépendance orientationnelle en fréquence par rapport au champ magnétique et le recouvrement des signaux entraînent des largeurs de spectre importantes. Davis et Bloom ont développé deux méthodes permettant d'analyser la dynamique de ces systèmes non orientés :

- *le calcul des moments spectraux :*

Le moment d'ordre n d'un spectre de poudre s'exprime selon Davis par (Davis, 1979) ; (Bloom et al., 1981)) :

$$M_n = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} \omega^n S(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{+\infty} S(\omega) d\omega} \quad (\text{II.44})$$

où la fréquence  $\omega$  est définie par rapport à la fréquence isotrope  $\omega_{iso}$ , arbitrairement égale à zéro (centre du spectre) et  $S(\omega)$  définit l'intensité de la raie à la fréquence  $\omega$ . Dans le cas de spectres symétriques comme en RMN du deutérium, les moments de rang impair deviennent nuls ; on limite alors le domaine d'intégration aux fréquences positives ou on change le signe des fréquences négatives dans l'algorithme.

Dans le cas de spectres de poudres à symétrie axiale, Davis (Davis, 1983) a montré que le premier moment  $M_1$  en RMN- $^2\text{H}$  et le deuxième moment  $M_2$  en RMN- $^{31}\text{P}$  sont respectivement liés aux grandeurs  $\overline{\Delta\nu_Q}$  et  $\overline{\Delta\sigma}$ , caractérisant la dynamique du système étudié, par les relations :

$$M_1 = \frac{4\pi}{3\sqrt{3}} \overline{\Delta\nu_Q} \quad M_2 = \frac{16\pi^2}{45} \overline{\Delta\sigma^2} \quad (\text{II.45})$$

Le calcul du premier moment en RMN- $^2\text{H}$  permet donc de suivre la dynamique globale d'une chaîne deutérée et le calcul du second moment en RMN- $^{31}\text{P}$  la dynamique de la tête phosphate.

Dans notre étude, le calcul des moments spectraux sera utilisé pour caractériser les modifications de la forme et de la largeur des spectres correspondant à des liposomes de TBBPC. On pourra ainsi connaître la température  $T_C$  de transition de phase (gel-fluide) de ce lipide, qui est caractérisée par une diminution importante des moments  $M_1$  ou  $M_2$ . Le point d'inflexion de la courbe reportant les moments  $M_1$  ou  $M_2$  en fonction de la température ( $^{\circ}\text{C}$ ) permet de déterminer directement la valeur de  $T_C$  (voir figure ci-dessous).

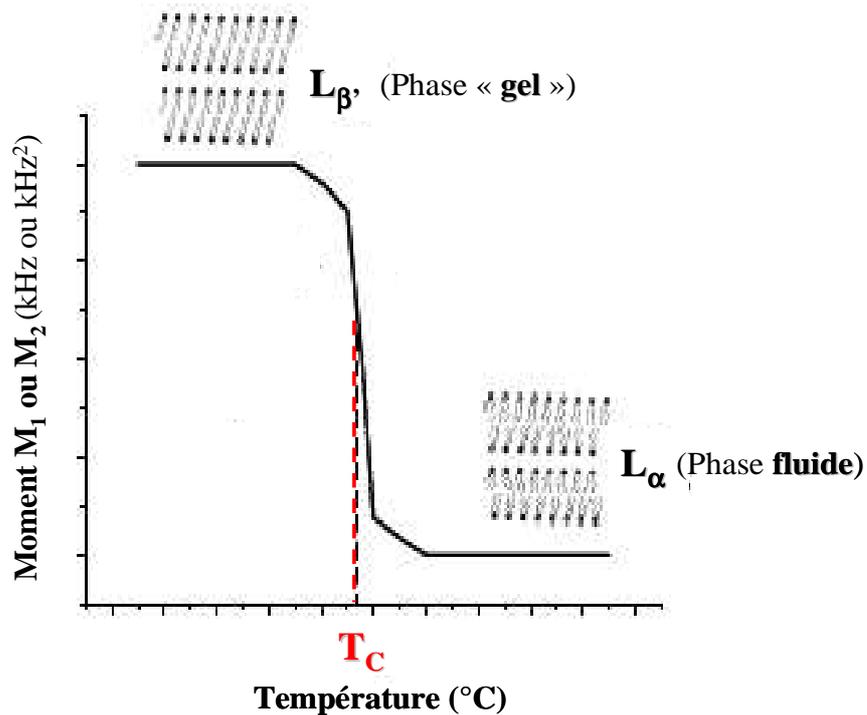


Figure II.17 : Graphe type reportant les valeurs des moments  $M_1$  (kHz) ou  $M_2$  ( $\text{kHz}^2$ ) en fonction de la température ; le point d'inflexion de la courbe permet de déterminer la valeur de la température de transition de phase gel-fluide,  $T_C$ .

- la déconvolution spectrale appelée aussi « De-Pake-ing » (Bloom et al., 1981). Cette méthode consiste à reconstituer un spectre de poudre orienté à  $90^{\circ}$  par rapport au champ magnétique, à partir d'un spectre de poudre non orienté. On ne considère donc qu'une seule orientation, ce qui permet en RMN du deutérium de distinguer et de mesurer les éclatements quadrupolaires associés à chaque site moléculaire et de remonter ainsi à leur dynamique (figure II.18).

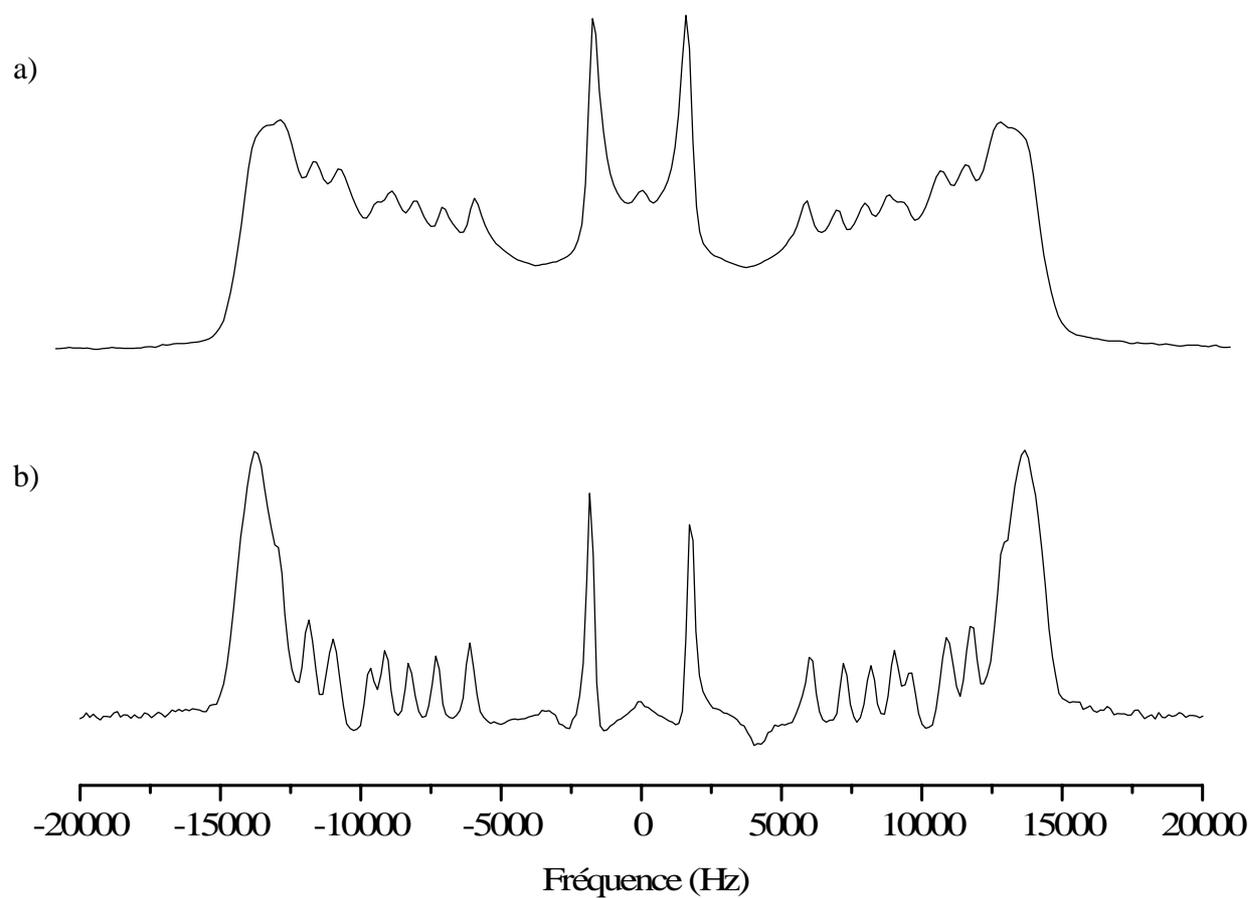


Figure II.18 : Illustration de la technique de déconvolution : a) spectre RMN de poudre en deutérium (séquence Echo solide) de liposomes MLVs de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (échantillon non orienté), b) spectre précédent déconvolué (échantillon orienté à  $90^\circ$  par rapport à  $B_0$ ).

## II.2 La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)

La diffusion des Rayons X aux petits angles est une méthode de caractérisation directe et performante des propriétés structurales des membranes. La position et l'intensité des maxima de diffusion renseignent à la fois sur l'homogénéité de l'échantillon (séparation de phases), la nature des phases lipidiques (lamellaires, cristallines...) et les caractéristiques spatiales (période de répétition du motif lamellaire, épaisseur de l'objet...). Des détails sur la structure des bicouches lipidiques (organisation moléculaire) peuvent aussi être obtenus car l'intensité diffusée reflète la distribution de la matière diffusante. Cette technique permet d'avoir des informations sur des objets dont la taille varie de quelques Å à environ 1000 Å.

Cette partie rappelle les bases de la diffusion des rayons X aux petits angles que nous appliquerons à l'étude des modèles membranaires de type bicelle.

### II.2.1 La loi de Bragg

Le principe d'une expérience de diffusion consiste à envoyer un faisceau monochromatique sur un échantillon et de mesurer l'intensité diffusée par ce dernier (figure II.19). Dans le cas de la diffusion des rayons X, l'interaction onde-matière s'effectue entre les photons du faisceau incident et les électrons de l'échantillon ; les fluctuations de densité électronique de nos modèles membranaires vont donc moduler l'intensité diffusée.

La diffusion d'une structure possédant un motif de répétition, comme les bicouches lipidiques, peut être définie en terme de réflexions par des plans d'égale densité de diffusion (figure II.20). D'après la théorie des interférences, ces ondes réfléchies ne sont en phase et donc en interférences constructives que pour certains angles ; ceux pour lesquels la différence de marche, notée  $\delta$ , entre le faisceau diffusé et le faisceau incident, est un multiple de la longueur d'onde du faisceau  $\lambda$ . Cette différence de marche s'exprime :

$$\delta = \lambda r S \quad (\text{II.46})$$

où  $r = \overrightarrow{OO'}$  et  $S = k - \overrightarrow{k_0}$

L'interaction du rayonnement avec la matière est de nature élastique, c'est-à-dire qu'elle s'effectue sans transfert d'énergie ; les vecteurs d'onde final  $k$  et initial  $\overrightarrow{k_0}$  ont donc même module  $1/\lambda$  ( $k = 2\pi/\lambda$ ).

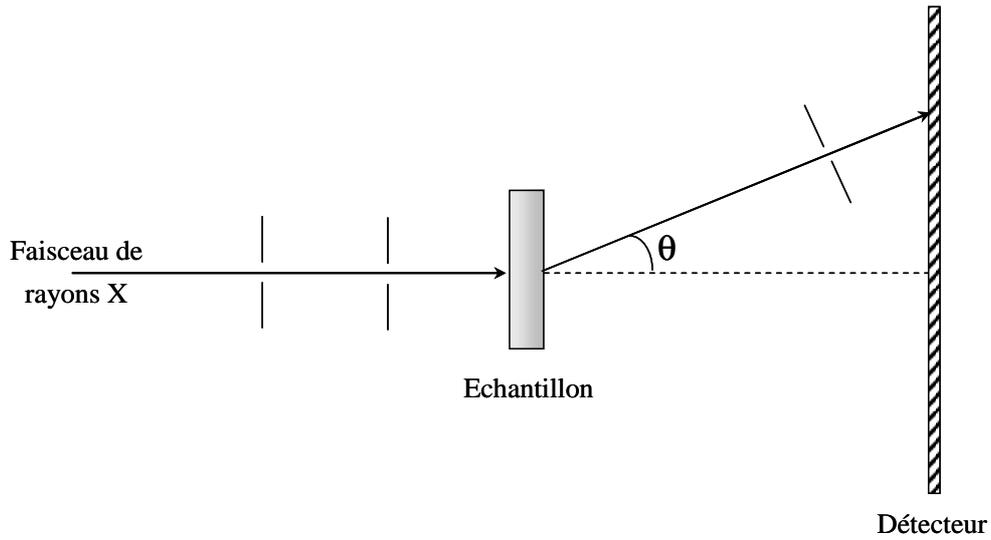


Figure II.19 : Schéma simplifié d'un montage de diffusion.

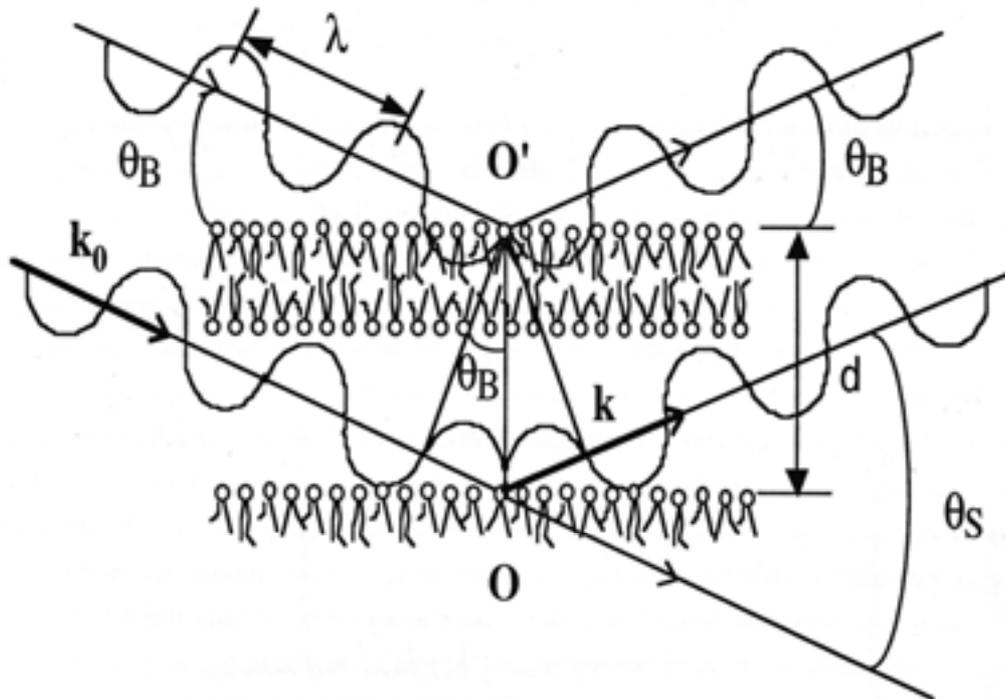


Figure II.20 : Schéma illustrant la loi de Bragg.  $\lambda$  est la longueur d'onde du faisceau,  $k_0$  le vecteur d'onde de l'onde incidente,  $k$  celui de l'onde réfléchie,  $\theta_B$  est l'angle entre le plan des bicouches et l'angle incident (ou la moitié de l'angle  $\theta_S$  entre le rayon incident et le rayon diffusé) et  $d$  est le motif de répétition de la structure lamellaire, d'après (Faure, 1996).

D'après l'équation (II.46) et la figure II.20, on établit la relation de Bragg :

$$\delta = \lambda d \vec{k}_0 \sin(2\theta_B) = 2d \sin(\theta_B) = h\lambda \quad (\text{II.47})$$

$h = 0, \pm 1, \pm 2 \dots$

où  $\theta_B$  est l'angle entre le plan des bicouches et le rayon incident ou la moitié de l'angle entre le rayon diffusé et le rayon incident ( $\theta_s/2$ ) ;  $\lambda$  est la longueur d'onde du faisceau,  $h$  l'ordre de la diffusion et  $d$  la distance entre deux bicouches.

Par convention, les spectres de diffusion des rayons X expriment l'intensité diffusée,  $I$ , en fonction du vecteur d'onde de diffraction  $q$  qui est relié au vecteur  $S$  par l'expression :

$$q = 2\pi S \quad (\text{II.48})$$

D'après les équations (II.46), (II.47) et (II.48) le module du vecteur  $q$  s'exprime :

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta_B)}{\lambda} = \frac{2\pi h}{d} \quad (\text{II.49})$$

L'unité standard de  $q$  est  $\text{\AA}^{-1}$ .

Dans le cas d'une phase lamellaire, le vecteur d'onde de diffusion  $q$ , devient donc proportionnel à l'inverse de la distance de répétition,  $d$ , de la structure lamellaire étudiée. Un spectre de diffusion d'une phase lamellaire se présente donc sous la forme de  $x$  pics régulièrement espacés par la distance  $2\pi/d$ . Le nombre de pics de Bragg sur le graphe  $I=f(q)$ , renseigne sur l'état d'organisation d'un échantillon ; plus ce dernier est structuré, plus l'ordre de la diffusion  $h$ , est grand, plus le nombre de pics présents sur le graphe est important. La position en  $q$  des pics permet de calculer les distances de répétition  $d$  de chaque motif.

### II.2.2 Amplitudes et intensités diffusées

L'amplitude de diffusion  $A(q)$  est reliée à la distribution de densité électronique  $\rho(r)$  de l'entité diffusante par une transformation de Fourier.  $\rho(r)$  est le nombre d'électrons par unité de volume à la position  $r$  ; un élément de volume  $dV$  à la position  $r$  contient donc  $\rho(r)dV$  électrons.

L'amplitude de diffusion du volume total V irradié s'exprime alors :

$$A(q) = A_e \int_V \rho(r) e^{-iqr} d^3 r \quad (\text{II.50})$$

$A_e$  est l'amplitude de diffusion d'un seul électron (James, 1967).

L'intensité de diffusion  $I(q)$  est donnée par le produit de l'amplitude de diffusion  $A(q)$  par son amplitude conjuguée  $A(q)^*$  :

$$I(q) = A(q).A(q)^* = I_e \int_V \rho(r) \rho(\vec{r}') e^{-iq(r-\vec{r}')} d^3 r d^3 \vec{r}' \quad (\text{II.51})$$

où  $I_e$  est la valeur de l'intensité diffusée par un électron.

Cette intensité diffusée peut être décomposée en un produit de deux termes : l'un relié au facteur de forme, noté  $F(q)$ , l'autre au facteur de structure, noté  $S(q)$  :

$$I(q) = \sum_{i=1}^k \frac{N_i}{V} \Delta n_i^2 F(q) S(q) \quad (\text{II.52})$$

$N_i$  est le nombre d'espèces de type  $i$ ,  $V$  est le volume total irradié et  $\Delta n_i$  représente l'excès électronique pour l'espèce  $i$  ; si l'on considère une espèce de densité électronique  $n_1$  dans un solvant de densité électronique  $n_2$  (pris comme référence), l'excès ou le contraste électronique est défini par  $\Delta n = n_1 - n_2$ . Plus le contraste électronique entre une espèce et le solvant est grand, plus l'intensité diffusée est importante.

Le facteur de forme  $F(q)$  renseigne sur la taille et la forme des particules diffusantes tandis que le facteur de structure  $S(q)$  rend compte des corrélations entre particules. Dans le cas particulier d'objets isolés sans interaction, le facteur de structure est constant et égal à 1 ; l'amplitude diffusée permet alors de déterminer le facteur de forme de l'objet.  $S(q)$  est égal à  $N$  quand il y a  $N$  interférences constructives entre les particules diffusantes et zéro quand il n'y a que des interférences destructives.

### II.2.3 Domaines structuraux observés en fonction de la valeur du vecteur d'onde $q$

Nous avons vu que le vecteur d'onde de diffusion  $q$  est inversement proportionnel à la distance  $d$  (équation II.49) ; ainsi plus  $q$  est petit, plus la distance observée dans l'échantillon est grande.

On distingue généralement trois domaines structuraux sur les graphes  $I=f(q)$ , suivant l'échelle des vecteurs  $q$  considérée (figure II.21) :

- pour des  $q$  grands ( $>1/R_C$ ,  $R_C$  étant inférieur à  $\approx 10 \text{ \AA}$ ), la fenêtre d'observation dans l'échantillon est très petite ; un contraste électronique n'est visible qu'à l'interface entre deux milieux de densité électronique différente. Cette zone renseigne donc sur la présence d'interfaces bien définies dans l'échantillon ; c'est aussi la région où s'applique la loi de Porod car l'intensité diffusée suit une décroissance asymptotique en  $q^{-4}$ .

- la zone des  $q$  intermédiaires ( $1/R < q < 1/R_C$ ,  $R$  étant la taille caractéristique de l'assemblage étudié et  $R_C \approx 10 \text{ \AA}$ ) permet de mesurer des interactions intra particules ; la diffusion est dominée dans ce cas par le facteur de forme  $F(q)$  qui permet de remonter à la taille et à la forme d'un objet. Une décroissance en  $q^{-1}$  est associée à des particules de forme cylindrique, en  $q^{-2}$  à des lamelles et en  $q^{-4}$  à des sphères.

- pour des  $q$  petits ( $q < 1/R$ ), des informations sur les corrélations inter particules peuvent être obtenues (mais c'est aussi le cas pour les domaines de  $q$  précédents) ; la diffusion est alors dominée par le facteur de structure  $S(q)$ , représenté par des pics de Bragg, dont la position en  $q$  permet de calculer la distance de répétition  $d$  d'une structure lamellaire.

Dans certains cas, la contribution du facteur de structure est majoritaire et masque celle du facteur de forme ; dans d'autres cas, c'est la situation inverse. Il arrive aussi de pouvoir distinguer les deux contributions sur un même graphe  $I=f(q)$ .

Ces deux facteurs permettent de remonter, par transformée de Fourier, à la distribution spatiale de la densité électronique de notre structure.

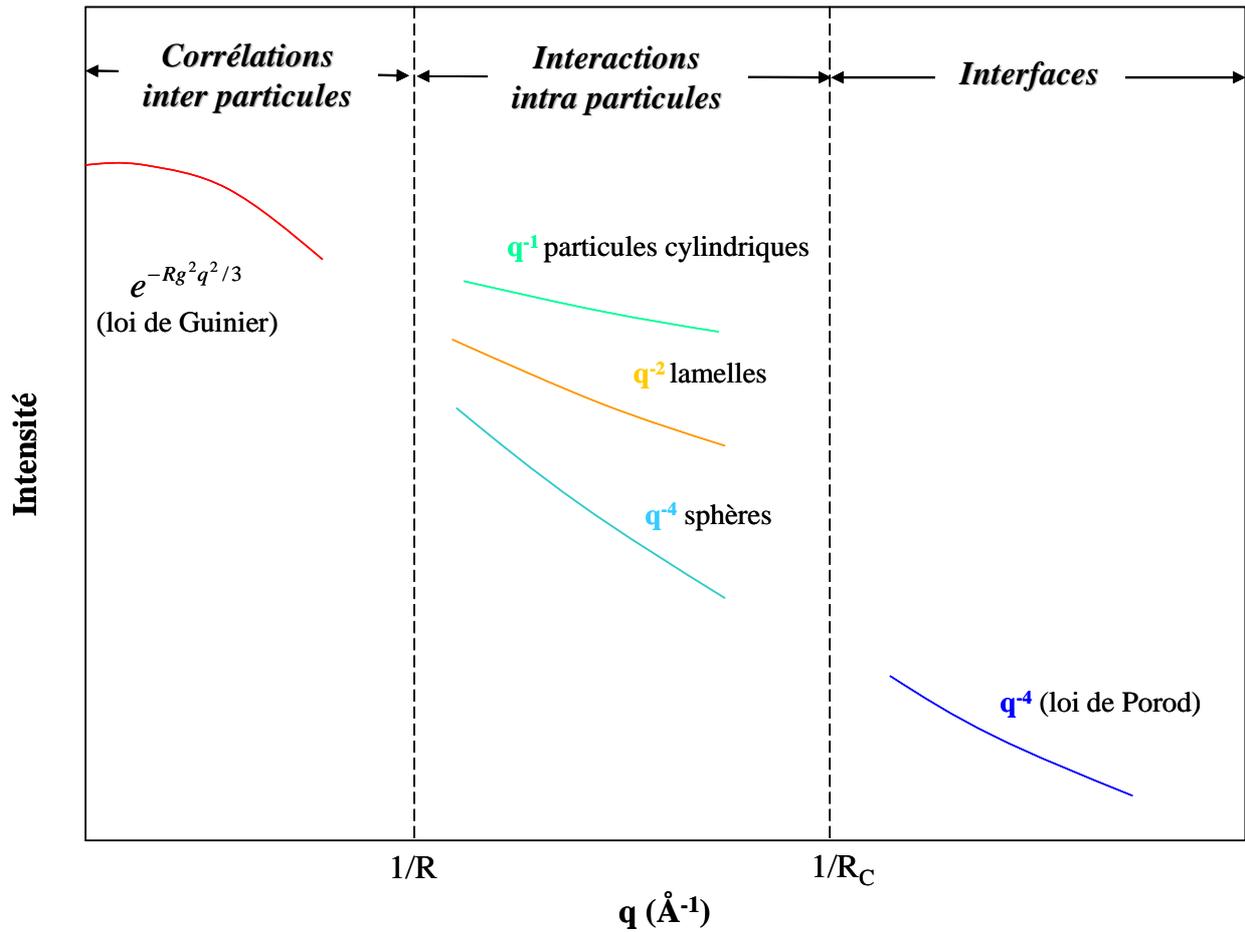


Figure II.21 : Domaines structuraux en fonction de la valeur du vecteur d'onde de diffusion  $q$  ;  $R$  représente la taille de l'objet observé et  $R_C \approx 10 \text{ \AA}$  d'après (Li, 2005).

#### II.2.4 Profil de densité électronique des biomembranes

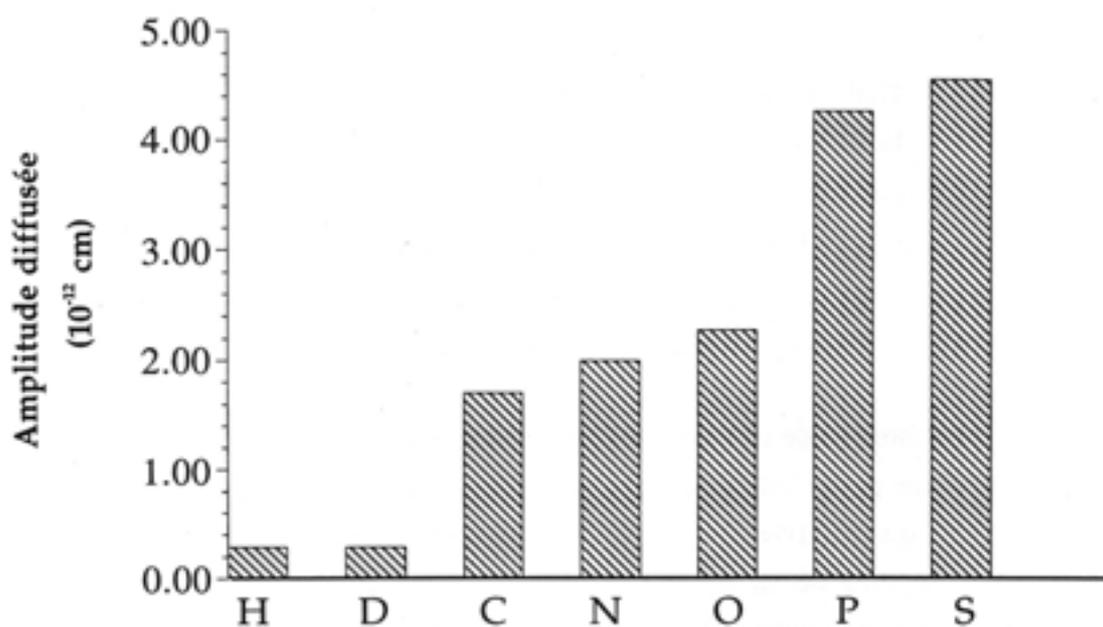
L'analyse quantitative de l'intensité diffusée permet de décrire l'organisation moléculaire du système étudié. Comme on l'a déjà évoqué, l'amplitude de l'onde cohérente diffusée dépend de la nature du noyau et plus précisément du nombre d'électrons par atome : ainsi, plus la densité électronique d'un atome est importante, plus l'intensité diffusée est grande. La figure II.22.a) présente les amplitudes diffusées par rayons X par les atomes que l'on rencontre le plus souvent dans les biomolécules, comme les lipides. On constate que les atomes de phosphore et de soufre, dont la densité électronique est grande, sont ceux qui diffusent le plus les rayons X.

La diffusion des rayons X est souvent comparée à celle des neutrons ; le principe est en effet le même à la différence que l'interaction onde-matière s'effectue entre les neutrons du faisceau et ceux de l'échantillon. Toutefois la relation entre l'amplitude diffusée et la nature des atomes n'est pas aussi simple que pour les rayons X. La figure II.22.b) est l'analogue de celle a) dans le cas des neutrons. On constate par exemple que l'atome de phosphore diffuse beaucoup moins bien les neutrons que les rayons X.

A partir de l'amplitude diffusée par rayons X par chaque atome, il est possible d'établir des profils de densité électronique spécifique à l'échantillon analysé. Ainsi, dans le cas des bicouches de phospholipides, l'atome de phosphore est celui qui participe le plus à la diffusion. Le profil de densité électronique associé à des bicouches de dipalmitoylphosphatidylcholine est présenté en figure II.23.a). Ce graphe met clairement en évidence la relation de proportionnalité entre densité électronique et intensité diffusée : les têtes lipidiques constituées d'un atome de phosphore participeront davantage à la diffusion X que les chaînes aliphatiques. Les bicelles étant constituées d'une bicouche de phospholipides, le même type de profil de densité électronique pourra être considéré.

On constate que le profil de densité neutronique associé à des bicouches de dipalmitoylphosphatidylcholine (figure II.23.b)) est différent de celui électronique. Les profils d'amplitude diffusée par rayons X ne sont donc pas comparables à ceux diffusée par neutrons.

a)



b)

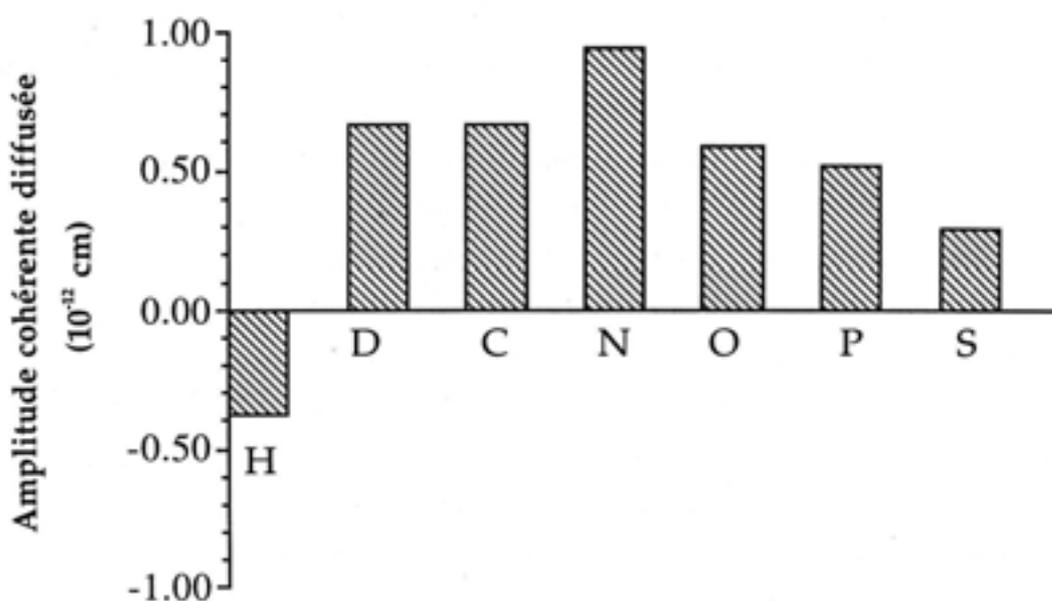
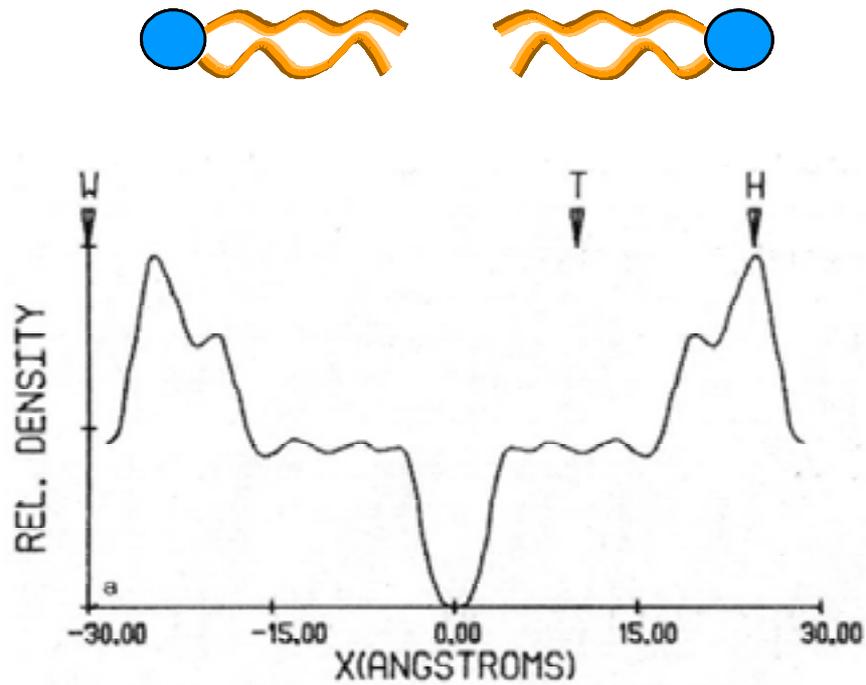


Figure II.22 : Amplitudes diffusées par les principaux atomes constitutifs des lipides a) pour la diffusion des rayons X ; ces valeurs sont obtenues en multipliant le numéro atomique par l'amplitude diffusée par un électron (James, 1967). b) pour la diffusion des neutrons (Bacon, 1972).

a)



b)

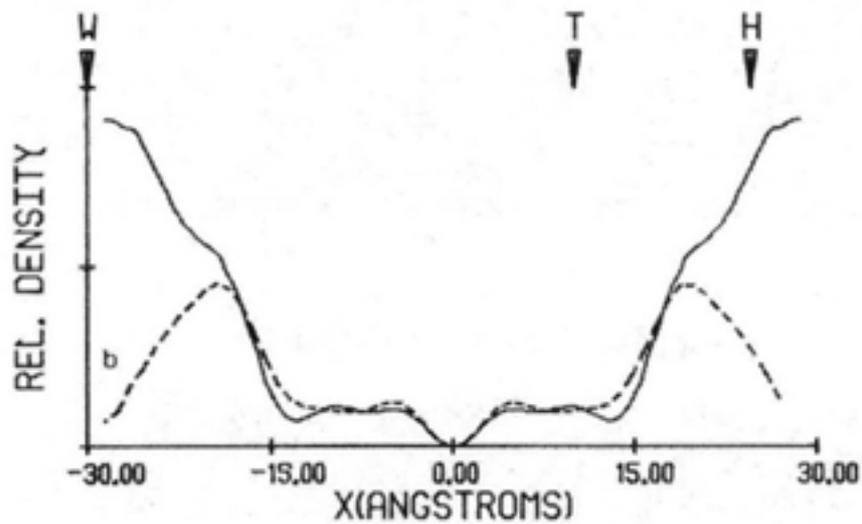


Figure II.23 : a) Profil de densité électronique et b) Profil de densité de neutrons, associé à des bicouches hydratées de dipalmitoylphosphatidylcholine ( $L\text{-}\alpha\text{-DPC}$ ) dont le motif de répétition est de  $57,7 \text{ \AA}$  ; W= water indique la présence d'eau autour des bicouches, T=tails correspond aux chaînes aliphatiques des lipides et H=headgroup à leur tête polaire (McCaughan et Krimm, 1982).

Remarque : l'intensité diffusée dépend complètement de l'endroit où traverse le faisceau de rayons X dans l'échantillon et plus exactement de la quantité de matière diffusante qu'il rencontre sur son passage. Comme il est impossible de cibler exactement le même endroit dans l'échantillon pour toutes les expériences, une normalisation des intensités détectées suivant la concentration des produits analysés sera nécessaire.

### II.2.5 Partie expérimentale

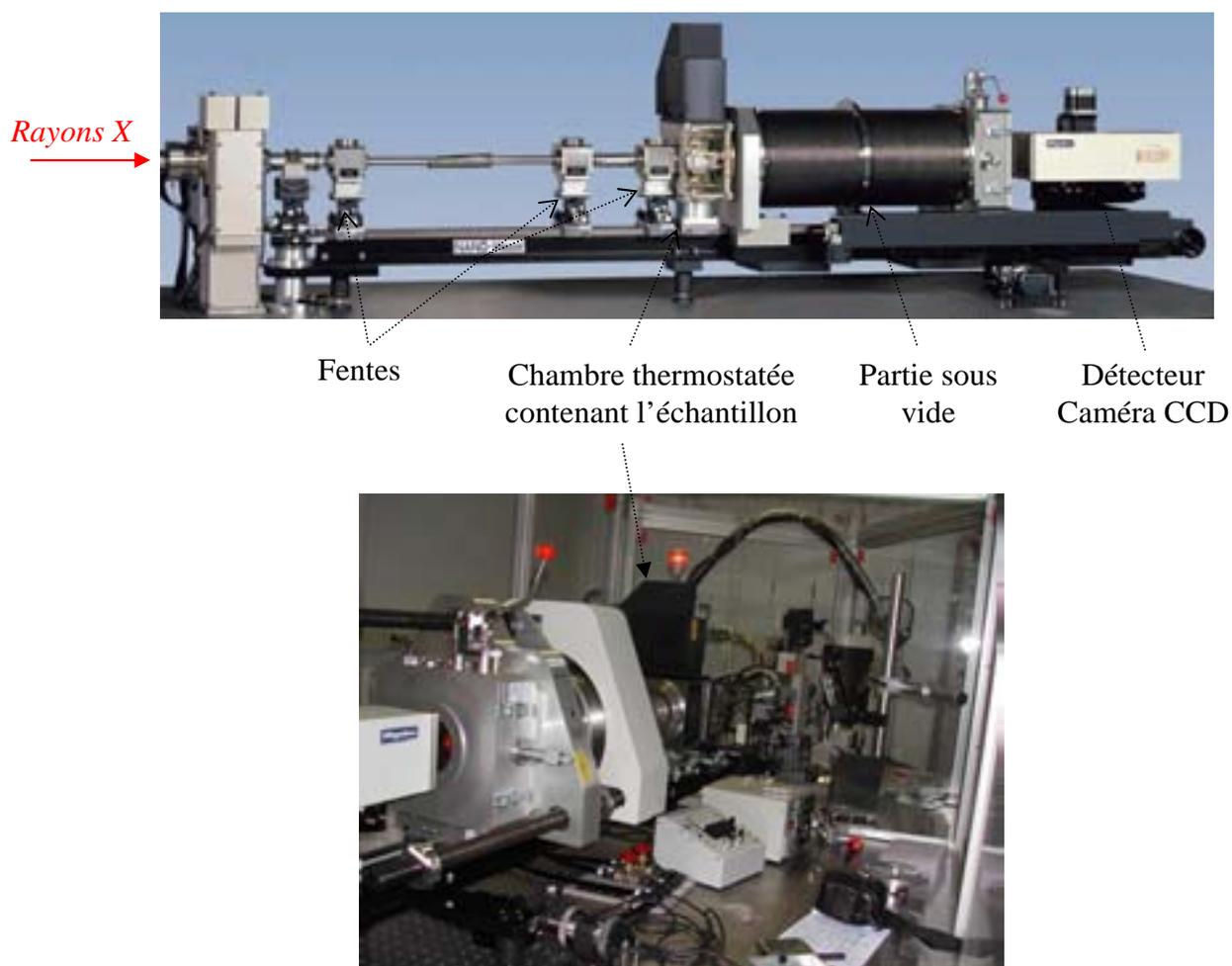
L'appareil de diffusion X utilisé pour ce travail est un Rigaku Nanoviewer (générateur Micro-source, MicroMax 007, Japon), récemment installé à l'IECB (2004) (photos II.1). Les rayons X sont produits par le bombardement d'une anode par des électrons, eux-mêmes générés par le chauffage d'un filament de tungstène. L'anode en cuivre tournante de ce système (fonctionnant à 40 kV et 20 mA) produit des rayons X à la fois pour l'analyse de composés cristallins aux grands angles (WAXS), et l'analyse d'échantillons amorphes aux petits angles (SAXS). Cette anode est couplée à un miroir confocal à double couche et produit un faisceau monochromatique de longueur d'onde  $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ . Le trajet des rayons X entre l'échantillon et le détecteur se fait sous vide et est facilement modulable.

La distance échantillon-détecteur est fixée dans notre cas à 425 mm (ce qui équivaut à une fenêtre en q comprise entre 0,02 et  $0,35 \text{ \AA}^{-1}$ ) et les trois fentes utilisées pour focaliser le flux des rayons X ont pour diamètre respectif 0,6 mm, 0,4 mm et 0,7 mm.

La détection du signal diffusé se fait grâce à une caméra CCD Mercury. Le signal résiduel obtenu au centre de la cible lorsque le faisceau de rayons X est arrêté par un cash (appelé « beam stop ») ainsi que les intensités diffusées par les solutions tampons utilisées, sont mesurés séparément puis soustraits au signal de l'échantillon. Celui-ci est placé dans un capillaire de 1,5 mm de diamètre (Glaskapillaren GLAS, Germany) que l'on scelle.

Le cliché de diffusion à deux dimensions obtenu est analysé avec le logiciel Rigaku Nanoviewer, qui permet une intégration circulaire (sur  $360^\circ$ ) ou linéaire (verticalement ou horizontalement) de l'intensité du signal récolté. Les différentes données graphiques sont ensuite traitées avec le logiciel Origin.

Pour les expériences de diffusion X sur les bicelles, le capillaire contenant l'échantillon, est placé horizontalement dans une chambre régulée à  $35^\circ\text{C}$ , de telle sorte que le faisceau des rayons X arrive perpendiculairement au capillaire (voir figure II.24).



Photos II.1 : Appareil de Diffusion des rayons X (SAXS et WAXS) installé à l'IECB, de la marque Rigaku Nanoviewer.

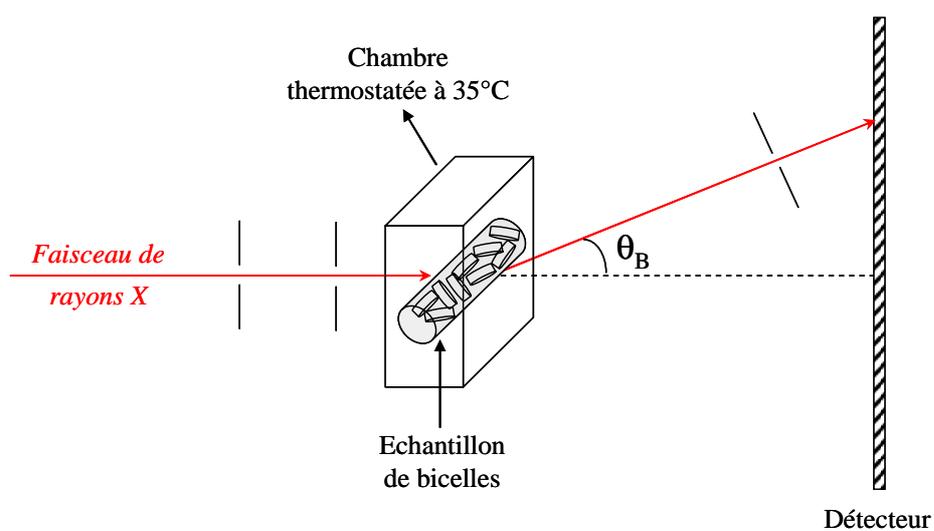


Figure II.24 : Schéma du montage utilisé pour l'analyse des bicelles par diffusion des rayons X.

## II.3 Cryofracture et observation par microscopie électronique à transmission

### II.3.1 Principe de la cryofracture

La cryofracture est une technique de congélation permettant d'observer, à l'aide d'un microscope électronique à transmission (MET), la structure d'échantillons fluides à l'échelle du nanomètre. Ces échantillons peuvent être des gels, des dispersions colloïdales, des phases organisées de tensioactifs ou des cellules biologiques. Il est ainsi possible de localiser des protéines dans la bicouche lipidique d'une membrane cellulaire ou de connaître la structure interne de phases cristal liquides (CRPP).

### II.3.2 Procédé expérimental

Un très faible volume d'échantillon (1 à 2  $\mu\text{L}$ ) est posé sur une plaquette porte-objet en cuivre (d'une surface  $\approx 1 \text{ mm}^2$ ). Une plaquette identique est disposée sur cette goutte d'échantillon de façon à créer un « sandwich » d'échantillon d'une épaisseur de l'ordre de 20 micromètres. Cet ensemble est ensuite plongé brusquement dans un bain de propane liquide ( $\approx -200^\circ\text{C}$ ), lui-même refroidit par de l'azote liquide. Cette congélation ultrarapide permet de préserver l'organisation interne de l'échantillon ; les molécules constituant la phase fluide n'ont en effet pas le temps de cristalliser comme elles le feraient si la température était diminuée progressivement (on parle de glace amorphe). Le but recherché est donc une vitrification de l'échantillon.

Le « sandwich » est introduit dans la table porte-échantillon, toujours sous azote liquide, puis l'ensemble est placé dans l'enceinte de l'appareil de cryofracture maintenue à une pression très faible ( $\approx 10^{-6} \text{ mBar}$ ) et une température très basse ( $-200^\circ\text{C}$ ) (photo II.2).

Les deux plaquettes de cuivre sont alors séparées de manière mécanique, à l'aide d'un couteau, ce qui entraîne la fracture de l'échantillon aux endroits de moindre résistance (figure II.25.i)). La ligne de fracture passe en effet par les zones de faible cohésion de l'échantillon, comme par exemple, la zone hydrophobe d'une couche lipidique dans le cas d'une membrane (Meyer et Richter, 2001).

Un ombrage métallique constitué d'un mélange de platine et de carbone est ensuite effectué sur la surface fracturée, avec un angle de  $45^\circ$  (figure II.25.ii)). Le métal se dépose avec une

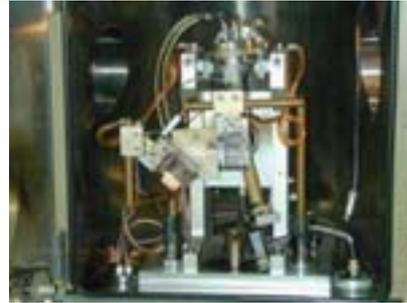
épaisseur caractéristique du relief de la surface ; ceci permet d'obtenir une empreinte de la surface fracturée, encore appelée réplique. Une deuxième couche uniforme de carbone est projetée, avec un angle de 90°, afin d'augmenter la résistance mécanique de la surface fracturée de la réplique (figure II.25.iii)). L'ensemble est ensuite ramené à température et pression ambiante. Les répliques métalliques sont récupérées du plan de fracture (figure II.25.iv)) et nettoyées dans un solvant adapté, puis elles sont déposées sur des grilles de microscopie électronique.

Les répliques préparées par cryofracture sont ensuite observées au microscope électronique à transmission. L'image de la surface est obtenue grâce à un faisceau d'électrons projeté verticalement sur la réplique (figure II.26). Le carbone est traversé par les électrons alors que le platine les réfléchit de façon plus ou moins totale selon l'épaisseur rencontrée par le faisceau. Un film photographique situé sous l'échantillon, permet de retranscrire les informations sur le relief de la surface en contraste de gris : les zones de la réplique où le platine s'est accumulé apparaissent en noir, les zones sans platine sont blanches et les zones sans relief sont grises car le platine y est réparti uniformément.

### II.3.2 Cryofracture et observation au MET des bicelles TBBPC/DCPC

Le dépôt des échantillons de bicelles TBBPC/DCPC sur les plaquettes porte-objet est effectué à température ambiante. La cryofracture est réalisée avec un système de type Balzers BAF 300 (Balzers, Liechtenstein), sous un vide de  $2 \cdot 10^{-6}$  mBar et une température de -145°C. La fracture des bicelles est sensée se produire au milieu de la bicouche lipidique de la partie plane, zone supposée la moins résistante. Les répliques sont ensuite récupérées et nettoyées avec une solution eau/éthanol (1 :2), puis déposées sur des grilles en cuivre de microscopie de 300 mesh.

Les observations des répliques de bicelles TBBPC/DCPC sont effectuées avec un microscope électronique à transmission FEI EM120 (Unité de Biophysique Structurale, Equipe d'Alain Brisson), fonctionnant à 120 kV. Les images sont enregistrées avec une caméra Gatan SSCCD 2kx2k puis traitées à l'aide du logiciel GIMP.



Photos II.2 : Table porte-échantillon et intérieur de l'enceinte de l'appareil de cryofracture utilisé à l'IECB.

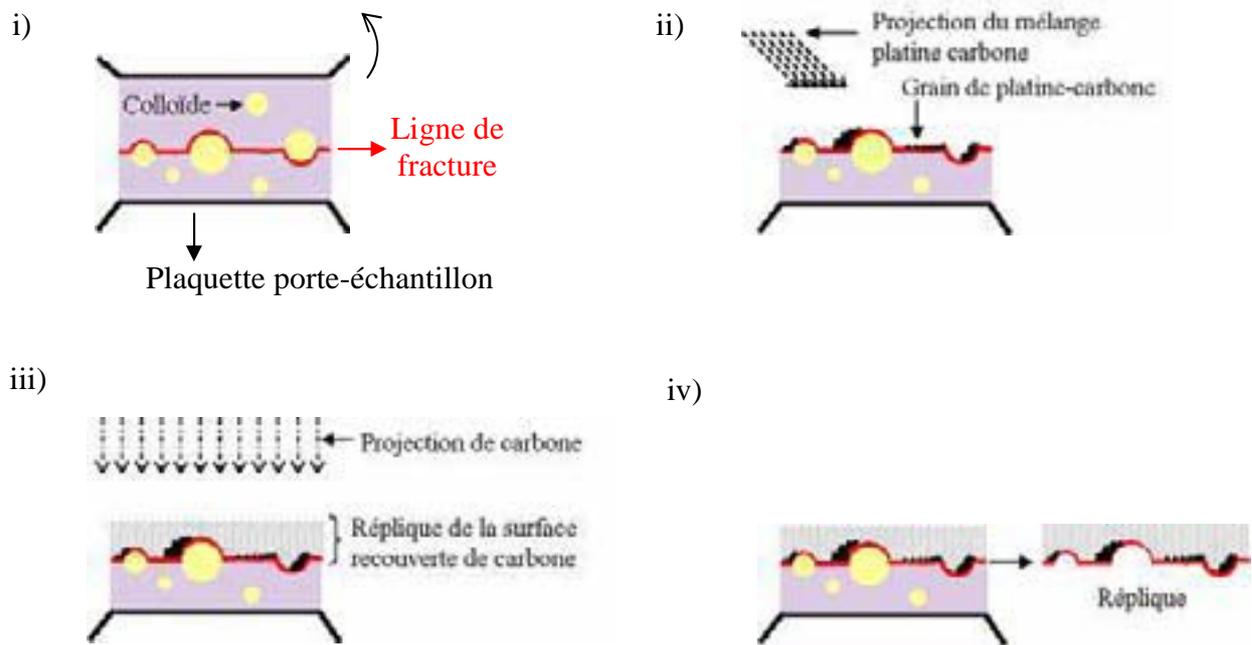


Figure II.25 : schémas i) de la ligne de fracture dans l'échantillon ii) de la projection du mélange platine-carbone à 45° sur la surface fracturée, iii) de la projection d'une couche de carbone à 90°, iv) de la récupération de la réplique.

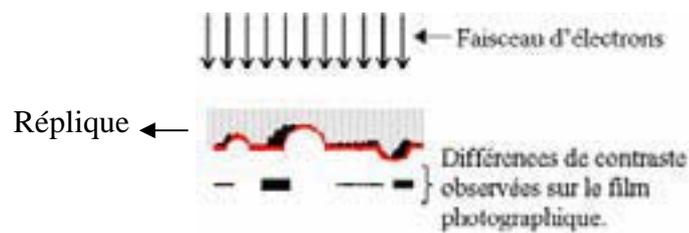


Figure II.26 : Schéma de l'observation des répliques au microscope électronique à transmission.

## II.4 Autres techniques utilisées

### II.4.1 L'extrusion

L'extrusion permet de préparer des vésicules unilamellaires de lipides dont le diamètre est maîtrisé. Le principe est de faire passer une suspension de vésicules multilamellaires (voir chapitre III.3), préalablement préparée, à travers des filtres de porosité choisie, sous pression d'azote ( $\approx 20$  bars) et à une température supérieure à celle de la transition de phase du mélange lipidique considéré ; 10 passages au travers de l'extrudeuse sont généralement nécessaires pour obtenir une suspension homogène de vésicules unilamellaires. La taille de celles-ci est ensuite vérifiée par diffusion de la lumière.

L'extrudeuse utilisée au laboratoire provient de la compagnie Northern Lipids Inc. (Canada) ; sa capacité est de 1,5 mL et elle peut être thermostatée (photo II.3). Les filtres sont en polycarbonate (Cyclopore, Whatman) et leur porosité varie de 50 nm à 800 nm.



*Photo II.3 : Extrudeuse thermostatée de 1,5 ml de la marque Northern Lipids Inc., utilisée au laboratoire.*

### II.4.2 La sonication

La sonication est utilisée dans notre cas pour préparer des vésicules unilamellaires de petite taille ( $< 100$  nm). Pour cela, une microsonde est plongée dans une suspension de MLVs, préalablement préparée, et des cycles de vibration d'une certaine amplitude sont appliqués pendant une durée déterminée ; la sonication n'est pas effectuée en continu pour éviter un

échauffement trop important de la solution et pour laisser les vésicules s'équilibrer entre deux cycles de vibration.

Le sonificateur utilisé (Vibra cell, 500 W) provient de la compagnie Bioblock Scientific.

### II.4.3 La diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière consiste à envoyer un laser (He/Ne,  $\lambda=633$  nm) sur un échantillon et à mesurer les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée par les objets présents, à un angle donné en fonction du temps. Ces fluctuations sont dues au mouvement brownien des particules en solution. La taille de ces dernières (de quelques nm à quelques  $\mu\text{m}$ ) ainsi que l'homogénéité de la solution peuvent ainsi être déterminées.

Les quatre graphes types (capture d'écran figure II.27), obtenus avec le logiciel ALV-5000 utilisé au laboratoire, sont la fonction de corrélation, le Count Rate Trace (fluctuations de l'intensité diffusée au cours du temps), la différence entre les données et le fit utilisé (Residuals Data-Fit) et la fonction de distribution des temps de corrélation, qui permet de déterminer la taille des particules observées.

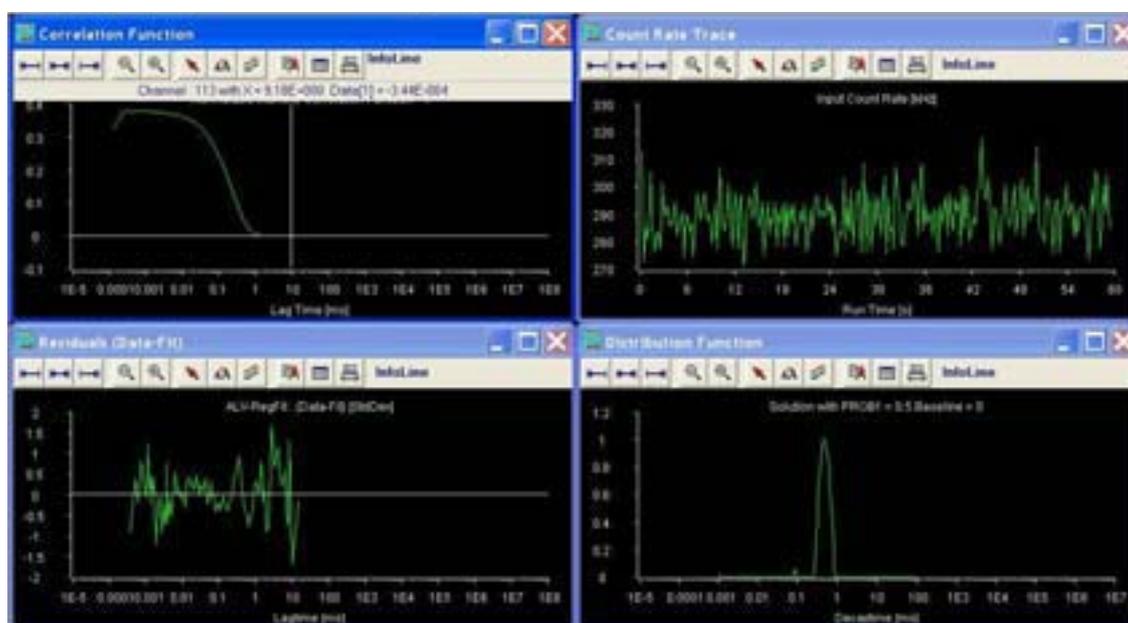


Figure II.27 : Graphes types obtenus pour l'analyse d'échantillons par Diffusion Dynamique de la Lumière.

Les échantillons sont placés dans des tubes en pyrex de 4 mm de diamètre. L'appareil utilisé est de type ALV/CGS-3 (ALV-GmbH, Allemagne) et peut être thermostaté.

#### II.4.4 Le Dichroïsme Circulaire

Le Dichroïsme Circulaire est une technique sensible à la chiralité des objets observés. Elle permet en particulier de connaître la structure secondaire adoptée par des peptides ou protéines en solution ou insérés dans des modèles de membranes. La figure II.28 présente les spectres dichroïques caractéristiques d'une structure peptidique en hélice  $\alpha$ , en feuillet  $\beta$ , en hélice de type II et en pelote statistique.

Les analyses de Dichroïsme Circulaire sont effectuées avec un dichrographe Mark VI (Jobin-Yvon). Les spectres sont enregistrés sur une gamme de longueurs d'onde comprise entre 180 nm à 270 nm, avec un défilement de  $0,5 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$  et un incrément de  $0,5 \text{ nm}$ . Des cuves en quartz, de trajet optique égal à  $0,1 \text{ mm}$ , sont utilisées et le signal du blanc (eau) est systématiquement soustrait.

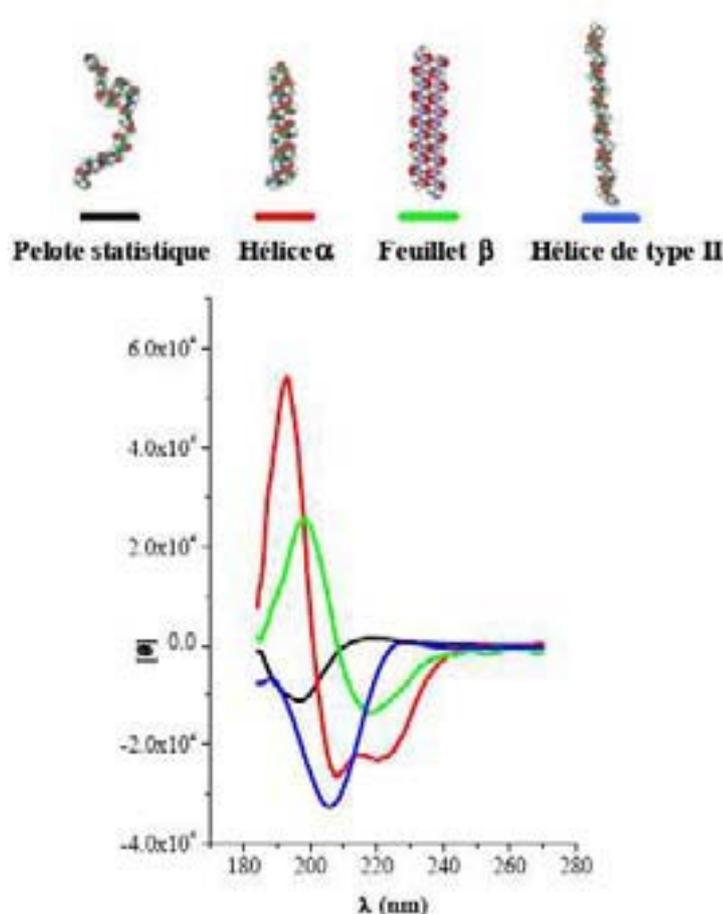


Figure II.28 : Spectres dichroïques caractéristiques des principales structures secondaires adoptées par des peptides ou protéines : la pelote statistique, l'hélice  $\alpha$ , le feuillet  $\beta$  et l'hélice de type II.



## CHAPITRE III

Synthèses des lipides  
et peptides marqués  $^{15}\text{N}$ ,  
et préparation des modèles membranaires



Dans notre approche, une biomembrane est constituée principalement de deux éléments: les lipides et les protéines. Parmi les espèces membranaires que nous avons considérées pour notre étude, certaines n'existent pas dans le milieu naturel ou nécessitent un marquage isotopique spécifique ; nous avons donc tout d'abord synthétisé séparément ces différents composés pour ensuite les assembler et les analyser. Ce sont ces étapes de synthèses qui sont développées dans ce chapitre : nous présenterons tout d'abord celle des lipides constitutifs des nouvelles bicelles s'orientant avec leur normale parallèle au champ magnétique, puis nous aborderons la synthèse de deux peptides marqués à l'azote 15, la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> et Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub>, pour finir par la préparation de nos modèles membranaires regroupant ces différentes entités.

### III.1 Synthèses des lipides TBBPC et TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>

La spécificité de l'orientation  $n/B_0$  des bicelles TBBPC/DCPC repose sur ce nouveau lipide TBBPC, dont l'originalité est d'avoir deux cycles phényles sur l'une de ces chaînes aliphatiques, entraînant une anisotropie de susceptibilité magnétique du système positive. Toute notre étude est donc basée initialement sur la synthèse de ce phospholipide innovant, qui a été effectuée par voie organique, afin de préparer un composé avec une structure bien définie et une bonne pureté. Le marquage isotopique au deutérium des lipides se montre également très utile pour sonder par RMN-<sup>2</sup>H la dynamique de ces derniers au sein de modèles membranaires ; ainsi le phospholipide TBBPC et son analogue, sélectivement deutéré sur sa chaîne aliphatique en C<sub>14</sub>, TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>, ont été synthétisés.

#### III.1.1 Méthodologie des synthèses

##### *Synthèse du TBBPC*

Le 1-tétradecanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (TBBPC) a été synthétisé en suivant majoritairement le protocole utilisé par Tan et al. (Tan et al., 2002) pour la préparation du 1-dodecanoyl-2-BBPC.

Les différentes étapes de cette synthèse sont détaillées dans la figure III.1 : une acylation de type Friedel et Crafts, en présence du catalyseur AgCl<sub>3</sub>, entre l'anhydride succinique **1** et l'unité biphényle **2**, permet de former l'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque **3** ; ce dernier est ensuite réduit (réaction de Clemenson) en présence de zinc et

HgCl<sub>2</sub>, afin d'obtenir l'acide 4-(4-biphényle)butanoïque **4**. Le lyso lipide 1-Myristoyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (lyso-MPC) **5**, commercialisé par Avanti Polar Lipids, est ensuite couplé par une réaction d'estérification à l'acide **4** en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et d'acide dimyristoyl phosphatidique (DMAP) pour former le composé final **6**, le lipide 1-tétradecanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (TBBPC).

La synthèse du TBBPC a été effectuée en collaboration avec Stéphane Gineste du Centre de Recherche Paul Pascal (Pessac) qui s'est occupé en totalité de la préparation du composé **4**.

#### *Synthèse du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> sélectivement deutéré sur sa chaîne aliphatique en C<sub>14</sub>*

Le principe de la synthèse du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> est le même que pour le non deutéré, à savoir une réaction d'estérification entre l'acide 4-(4-biphényle)butanoïque (synthétisé suivant la même procédure que précédemment) et le lyso lipide, 1-Myristoyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine, à la seule différence que celui-ci est cette fois deutéré sur sa chaîne aliphatique (<sup>2</sup>H<sub>27</sub>). Ce dernier est commercialisé par Avanti Polar Lipids mais à un coût très élevé ; nous avons donc décidé d'effectuer nous même la synthèse de ce lyso lipide deutéré qui s'obtient en trois étapes (voir figure III.2) : la fonction acide du composé **7** est tout d'abord activée sous forme d'anhydride avec le DCC pour former l'anhydride de l'acide myristique deutéré <sup>2</sup>H<sub>54</sub> (MAA-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>), **8**. Ce dernier est ensuite couplé à la tête polaire choline **9** dans le diméthylformamide (DMF) en présence de DMAP, qui joue le rôle de catalyseur. Le lipide 1,2-dimyristoyl-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>) **10** ainsi obtenu, est ensuite lysé au niveau de sa position *sn*2 par l'enzyme phospholipase A<sub>2</sub> dans l'éther pour former le lyso lipide deutéré 1-Myristoyl-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>) **11**. La dernière étape, identique à celle appliquée pour la synthèse du TBBPC non deutéré, permet de coupler le composé **11** au **4** afin d'obtenir le lipide deutéré final **12**, le 1-tétradecanoyl-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>).

Cette synthèse s'est effectuée en suivant en grande partie les protocoles développés dans la thèse d'Erick J. Dufourc (Dufourc, 1983). La principale modification se situe au niveau de l'utilisation de la phospholipase A<sub>2</sub> pour obtenir le lyso-MPC. Il est en effet possible de synthétiser ce dernier directement à partir des composés **8** et **9**, en « quenchant » la réaction au bout de 2 min avec de l'eau, pour ne pas laisser évoluer la réaction jusqu'à la

formation du DMPC ; la fonction alcool primaire est en effet plus réactive que celle secondaire. Dans notre cas, cette méthode n'a pas eu de rendements corrects et n'a donc pas été privilégiée.

Nous avons également testé l'action de la phospholipase A<sub>2</sub> dans l'eau à la place de l'éther, pour former le lyso-lipide à partir du lipide à deux chaînes (Menashe et al., 1986); (Larijani et al., 2001) pour cela de petites vésicules unilamellaires de type SUV (voir partie III.3 Formation des modèles membranaires) de 1,2-dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) ont tout d'abord été préparées par sonication, puis l'enzyme a été additionnée en large excès à cette suspension lipidique (7 fois plus d'unités actives par rapport à ce qui est nécessaire théoriquement) et l'ensemble a été incubé pendant plus d'une nuit à 40°C sous agitation douce. Cette procédure fonctionne mais s'est avérée être moins efficace et moins rapide que celle utilisant l'éther ; nous ne l'avons donc pas poursuivie.

La caractérisation des différents composés deutérés s'est effectuée principalement par spectrométrie de masse en mode ESI (Electro Spray Ionisation), qui permet de vérifier rapidement la masse exacte des ions  $[M+H]^+$ , présents dans le milieu réactionnel ; la RMN nécessite quant à elle l'observation de plusieurs noyaux ( $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$  et  $^2\text{H}$ ) pour obtenir une validation complète de la structure moléculaire synthétisée. La deutériation d'un produit est de plus facilement reconnaissable sur le spectre de masse par la présence d'un massif isotopique. Pour certains composés, l'espèce  $[M+\text{Na}]^+$  était la seule forme visible sur les spectres de masse ; Le mélange de solvants suivant : MeOH/CHCl<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>OH (7:2 :1) a alors été utilisé, où les ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de la solution ammoniacale (à 30%) modifient l'équilibre des contre-ions dans le milieu et favorisent l'observation de l'espèce  $[M+H]^+$  sur le spectre de masse (Hsu et Turk, 2003) ; (Milne et al., 2006) ; (Byrne et al., 2005).

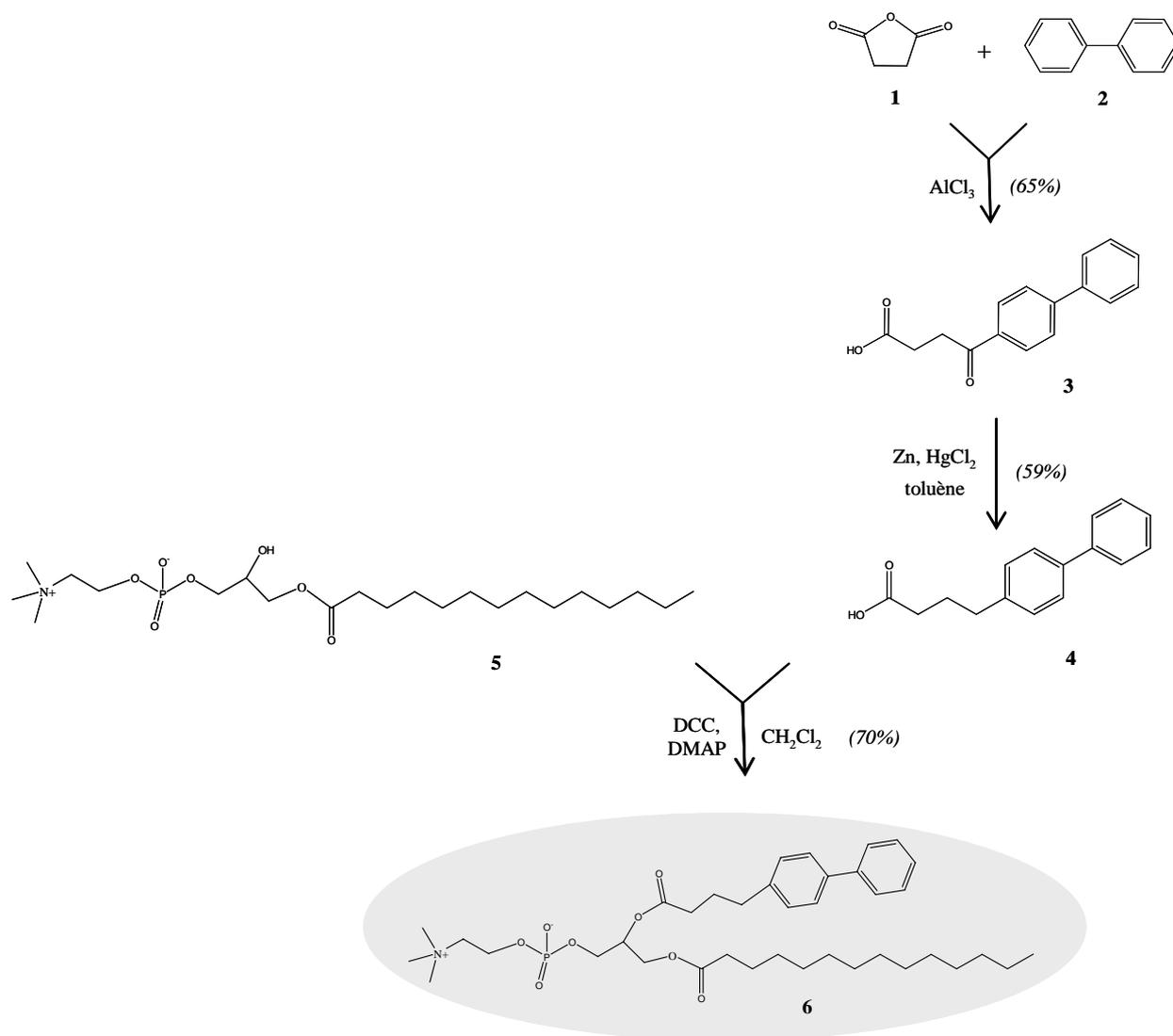


Figure III.1 : Schéma de synthèse du lipide TBBPC, **6**. Le rendement de chaque réaction est indiqué entre parenthèses.

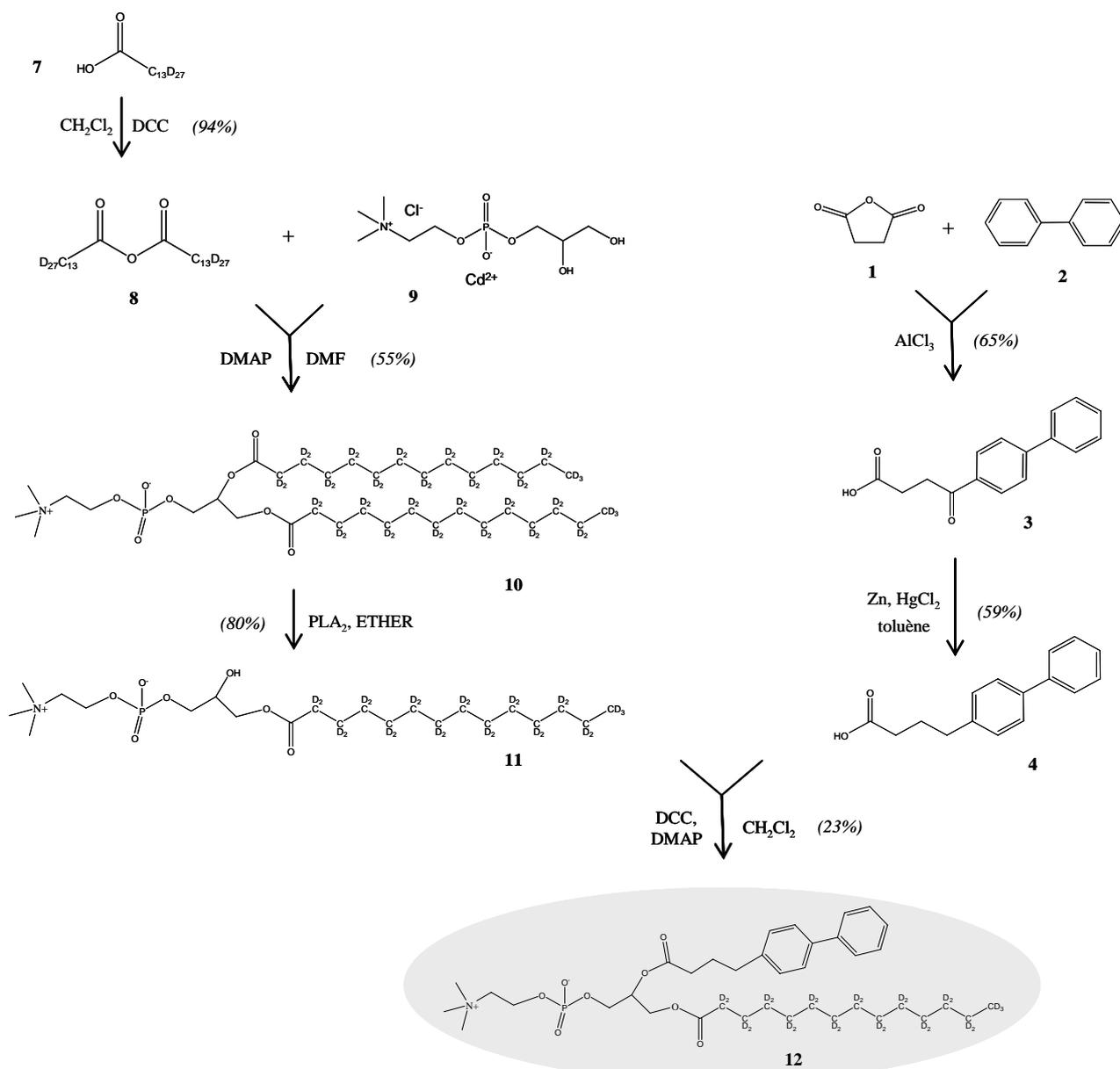


Figure III.2 : Schéma de synthèse du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>, sélectivement deutéré sur sa chaîne aliphatique sn<sub>1</sub> (12). Le rendement de chaque réaction est indiqué entre parenthèses.

### III.1.2 Résultats et Discussion

Le lipide TBBPC pur a été obtenu avec un rendement satisfaisant de 70%, supérieur à celui de Tan et al. (Tan et al., 2002) (60%). Ainsi, nous montrons que la réaction d'estérification entre le lyso lauroylphosphatidylcholine (chaîne aliphatique en C<sub>12</sub>) peut être facilement appliquée sur le lyso myristoylphosphatidylcholine (chaîne aliphatique en C<sub>14</sub>), dont la longueur de chaîne est plus représentative de celle des lipides membranaires naturels. Le spectre RMN-<sup>1</sup>H attribué du TBBPC en solution dans C<sup>2</sup>HCl<sub>3</sub> est présenté en figure III.3.

Le rendement total de la synthèse du lipide deutéré TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> est quant à lui relativement faible (≈ 9% sur les 4 étapes) ; ceci provient en grande partie de la dernière étape d'estérification qui n'a pas eu un aussi bon rendement que dans le cas du lipide non deutéré (23% au lieu des 70% précédents). Ceci peut s'expliquer en partie par la formation de produits secondaires non deutérés au cours de la réaction ; des pics de rapport m/z 480,2 et m/z 702,4 sont en effet détectés sur le spectre de masse du produit final TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> (figure III.5). L'acide biphenyle (4) aurait réagi avec l'alcool primaire du squelette glycérol, remplaçant ainsi la chaîne aliphatique deutérée sn<sub>1</sub> du TBBPC. Une structure possible de ces produits secondaires, établie uniquement d'après leur rapport m/z, est présentée ci-dessous :

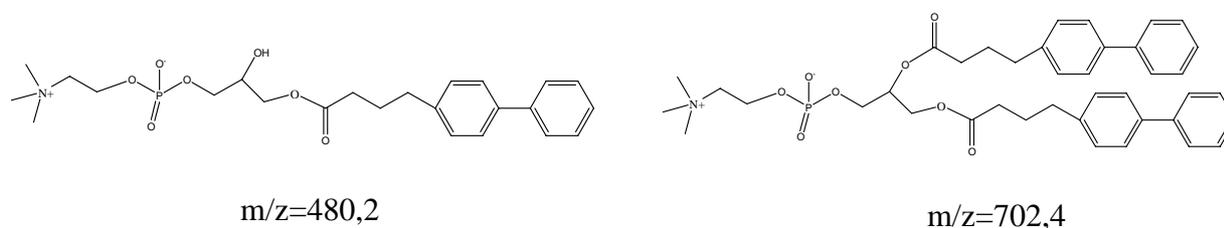


Figure III.4 : Hypothèse de la structure des produits secondaires non deutérés formés lors de la dernière étape dans la synthèse du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>.

Il aurait été intéressant de renouveler la synthèse du lipide deutéré TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>, en essayant d'optimiser les conditions opératoires, afin d'améliorer le rendement total de la réaction et particulièrement celle de la dernière étape. Toutefois, notre objectif était d'obtenir suffisamment de produit final pur (ici ≈ 110 mg) pour permettre des analyses RMN et non d'améliorer la productivité de cette synthèse, qui aurait nécessité plusieurs mois de travail supplémentaires.

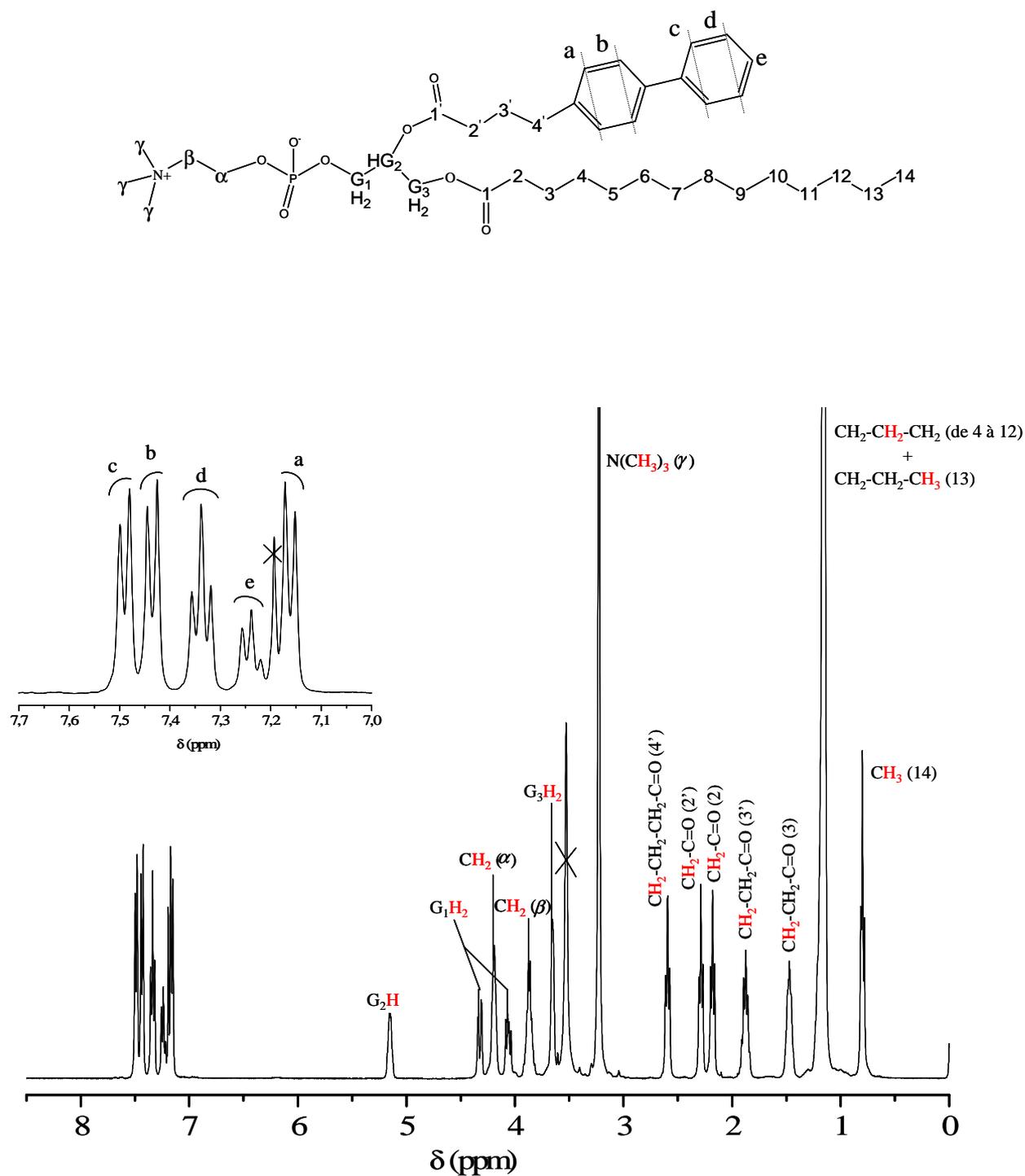


Figure III.3 : Structure numérotée du lipide TBBPC et son spectre  $\text{RMN-}^1\text{H}$  dans le chloroforme deutéré  $\text{C}^2\text{HCl}_3$ . Les pics barrés par une croix correspondent à des traces de solvants organiques (chloroforme à  $\approx 7,3$  ppm et méthanol à  $\approx 3,6$  ppm).

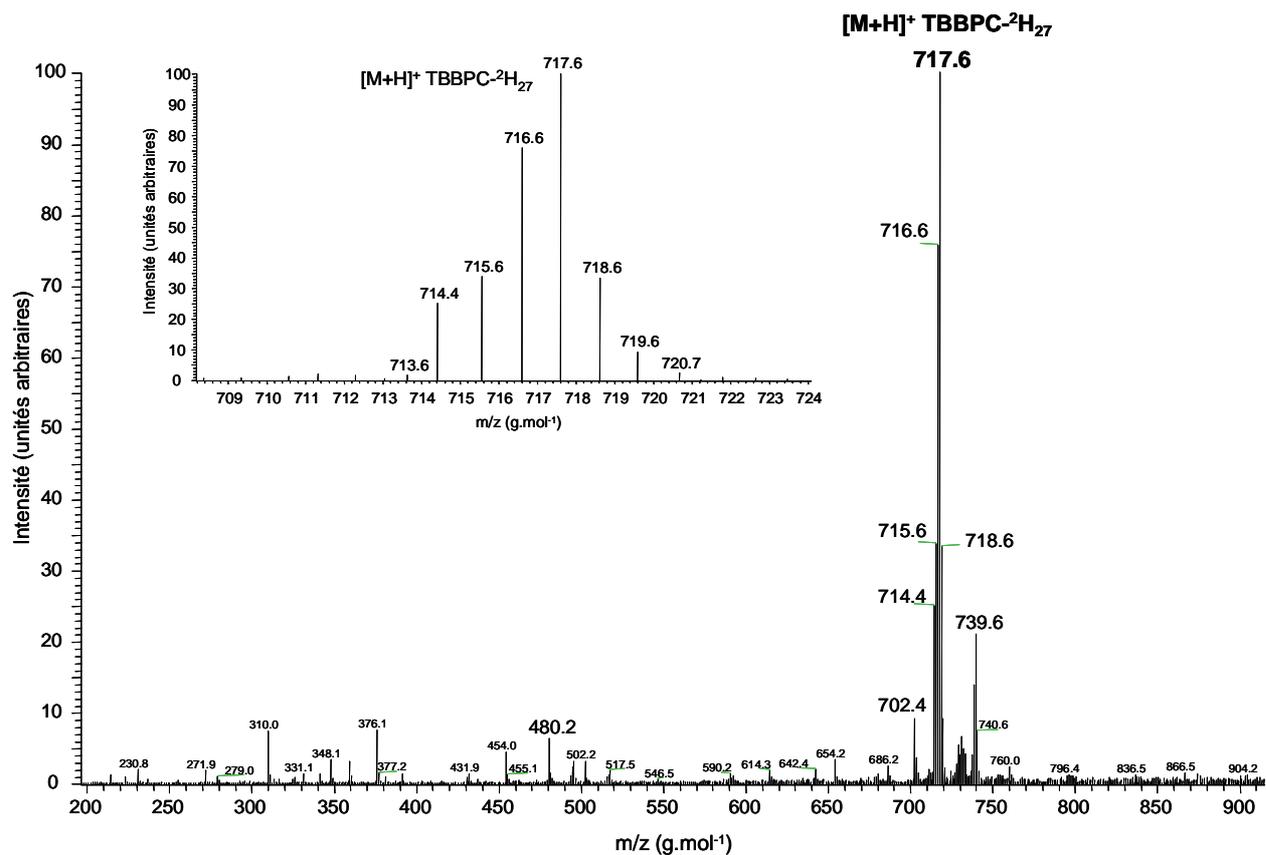


Figure III.5 : Spectre de masse (mode ESI, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>OH (7:2:1)) du produit final obtenu pour la synthèse du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>. Un agrandissement du massif isotopique du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> est présenté.

### III.1.3 Partie Expérimentale

Tous les réactifs utilisés proviennent de Sigma-Aldrich sauf le lyso lipide 1-Myristoyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine qui a été fourni par Avanti Polar Lipids et l'Acide Myristique deutéré qui provient de Euriso-top. La majorité des solvants est fournie par Atlantic Labo et VWR.

Les pesées sont réalisées avec une balance de précision Mettler-Toledo (à 0,01 mg). Tous les réactifs sont préalablement séchés sous vide et le dichlorométhane est distillé sur CaH<sub>2</sub>.

#### *Synthèse de l'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque (Eggers et al., 2001).*

Un mélange d'anhydride succinique (45 mmol, 1 eq., 4,48 g), et de biphényle (49 mmol, 1,1 eq., 7,51 g) est chauffé dans 35 ml de nitrobenzène jusqu'à dissolution complète, puis refroidi à température ambiante. 11,86 g (89 mmol, 2 eq.) de chlorure d'aluminium sont ajoutés, et le mélange est maintenu à température ambiante sous agitation magnétique pendant 24 heures. 15 ml d'eau et 5 ml d'acide chlorhydrique sont ensuite additionnés. Le précipité est filtré sur fritté (porosité 2) et lavé avec 25 ml d'eau distillée et 25 ml d'éther. Le produit est ensuite purifié sur colonne de silice avec le système d'élution chloroforme-acétone (2 : 1, v : v). 7,43 g (29 mmol) d'un produit blanc d'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque sont ainsi obtenus.

Rendement de la réaction  $\approx$  65%.

#### *Synthèse de l'acide 4-(4-biphényle)-butanoïque*

7,76 g (12 mmol, 2 eq) de zinc en poudre ( $\leq$  10  $\mu$ m) et 0,60 g de chlorure de mercure (2,2 mmol, 0,4 eq.) sont introduits dans un ballon de 100 ml. 9 ml d'eau et 0,5 ml d'acide chlorhydrique (37%) sont ensuite ajoutés sous agitation magnétique à 0°C. Après 30 minutes d'agitation, 12 ml d'acide chlorhydrique sont additionnés lentement. 1,50 g d'acide 4-(4-biphényl)-4-oxobutanoïque (5,9 mmol, 1,0 eq.) et 5 ml de toluène sont alors ajoutés. Le mélange est chauffé à reflux pendant 20 heures. Après retour à température ambiante, 10 ml d'eau sont ajoutés. Le produit est ensuite extrait à l'éther. La phase aqueuse est séchée sur sulfate de sodium. Après élimination du solvant, le produit est purifié sur colonne de silice (dichlorométhane comme éluant). 0,85 g (3,5 mmol) d'un produit blanc d'acide 4-(4-biphényle)-butanoïque sont ainsi obtenus.

Rendement de la réaction  $\approx$  59%.

*Synthèse du TBBPC (1-tétradecanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine) (Tan et al., 2002).*

Les réactifs 1-Myristoyl-2-Hydroxy-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (2,14 mmol, 1 eq., 1 g, précédemment lyophilisé), l'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque (3,21 mmol, 1,5 eq., 0,77 g), le dicyclohexylcarbodiimide (6,42 mmol, 3 eq., 1,33 g) et l'acide dimyristoyl phosphatidique (2,14 mmol, 1 eq., 0,26 g) sont dissous dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec, à température ambiante et sous argon. La solution est agitée dans ces conditions pendant deux jours. Un précipité blanc de sels d'urée, formé au cours de la réaction, est éliminé par filtration. Le produit brut est ensuite purifié deux fois sur colonne chromatographique ouverte (diamètre 2,5 cm, 80 mg de silice dans CHCl<sub>3</sub>) en utilisant le système d'élution CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65 :35 :4, v :v). Le suivi de la colonne se fait par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant le même système de solvants précédent et en révélant sous lampe-UV. Les fractions contenant le lipide sont regroupées et le solvant est évaporé sous vide ; après lyophilisation, 1 g (1,45 mmol) de TBBPC (poudre blanche) sont alors obtenus.

Rendement de la réaction  $\approx$  70%.

Caractérisation physico-chimique du TBBPC : RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), (ppm): 7.49 (d, 2, 2.6 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.29 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.17 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.88 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.15 (s, 20H, fatty CH<sub>2</sub>), 0.8 (t, 3H, CH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), (ppm): 173.83, 173.08, 141.06, 140.68, 139.12, 129.15, 129.1, 128.98, 128.96, 127.32, 127.13, 70.92, 66.55, 63.66, 63.16, 59.46, 54.63, 34.83, 34.33, 33.87, 32.14, 31.17, 29.90, 29.87, 29.75, 29.58, 29.53, 29.37, 26.74, 25.08, 22.91, 14.35; spectre de masse (ESI, full ms, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2 :1)): *m/z* 689.5 (689 calculé); IR-TF :  $\nu_{\text{stretching}}$  (cm<sup>-1</sup>): 2923 (CH<sub>asym</sub>), 2852 (CH<sub>sym</sub>), 1732 (C=O), 1378 (O=C-CH<sub>3</sub>), 1229 (O-C=O), 1087 and 1067 (O-CH<sub>2</sub>),  $\nu_{\text{bending}}$  (cm<sup>-1</sup>): 1487 and 1468 (CH<sub>asym</sub>), 1410 (CH<sub>sym</sub>).

*Synthèse de l'anhydride de l'acide myristique <sup>2</sup>H<sub>54</sub> (MAA-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>) (Selinger et Lapidot, 1966) ; (Wang et al., 1998).*

50 ml d'une solution de DCC (10 mmoles, 1 eq.,  $\approx$  2 g) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec, sont ajoutés à 150 ml d'une solution d'acide myristique deutéré (<sup>2</sup>H<sub>27</sub>) (20 mmoles, 2 eq., 5,1 g) dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec. La solution est agitée à température ambiante et sous atmosphère d'azote pendant une nuit. Un précipité blanc de sels d'urée, formé au cours de la réaction, est éliminé par filtration. Le solvant est ensuite évaporé et le produit final est recristallisé dans l'acétone. 4,6 g (9,4 mmol) de MAA-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> sont ainsi obtenus.

Rendement de la réaction  $\approx 94\%$ .

Caractérisation du produit par IR-TF :  $\nu_{\text{stretching}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1740 ( $\text{O}-\underline{\text{C}}=\underline{\text{O}}_{\text{sym}}$ ), 1796 ( $\text{O}-\underline{\text{C}}=\underline{\text{O}}_{\text{asym}}$ ), 2091 ( $\text{C}-\text{D}_{\text{sym}}$ ), 2194 ( $\text{C}-\text{D}_{\text{asym}}$ ).

*Synthèse du 1,2-dimyristoyl-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>) (Dufourc, 1983) ; (Patel et al., 1979).*

Avant la réaction, le composé *sn*-Glycero-3-phosphocholine (GPC,  $\text{CdCl}_2$ ) est lyophilisé, l'anhydride MAA-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> est séché sous vide pendant 3 heures et le solvant N, N-diméthylformamide (DMF) est mis à reflux pendant 30 min avec du  $\text{CaH}_2$ , puis distillé sous atmosphère d'argon.

Les réactifs GPC,  $\text{CdCl}_2$  (1,36 mmoles, 1 eq, 0,6 g) MAA-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> (3,4 mmoles, 2,5 eq., 1,7 g) et DMAP (2,9 mmoles, 2,1 eq., 0,35 g) sont dissous, sous atmosphère d'argon, dans 70 ml de DMF chaud ( $55^\circ\text{C}$ ), fraîchement distillé. La solution, protégée de la lumière, est agitée à  $40^\circ\text{C}$  pendant 5 heures, toujours sous argon. Le suivi de la réaction se fait par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant le système  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (65 :35 :4) comme éluant et le Bleu de Molybdène comme révélateur (Kates, 1975). Le DMF est ensuite évaporé sous vide et le solide résiduel est dissout dans 40 ml de  $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$  (5 :4 :1, v :v). Cette solution est passée (10 ml par 10 ml) sur une colonne échangeuse de cations (diamètre 2,5 cm, résine de type Dowex, 3,5 mmol en charge/g de résine), afin de remplacer les ions cadmium  $\text{Cd}^{2+}$ , accrochés à la tête choline, par des cations  $\text{H}^+$ . Chaque élution de 10 ml est complétée par 200 ml du même solvant. Ce dernier est ensuite évaporé et le produit obtenu est purifié sur colonne chromatographique ouverte (2,5 cm de diamètre, 80 mg de silice dans  $\text{CHCl}_3$ ). Le gradient d'élution utilisé est le suivant : 250 ml de  $\text{CHCl}_3$ , 300 ml de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (1 :1) et environ 1l de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (2 :8). Le suivi de la purification est effectué par CCM avec le système d'élution  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (65 :35 :4) et le Bleu de Molybdène comme révélateur. Les fractions contenant un mélange de DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> et de lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> sont regroupées et le solvant est évaporé sous vide. Le produit est dissout à nouveau dans  $\approx 20$  ml de  $\text{CHCl}_3$  et filtré sur porosité 4 afin d'éliminer toute trace éventuelle de silice, issue de la colonne de purification (étant donné la forte proportion de méthanol utilisée). Au final,  $\approx 0,5$  g d'une poudre blanche sont récoltés.

Rendement de la réaction  $\approx 55\%$ .

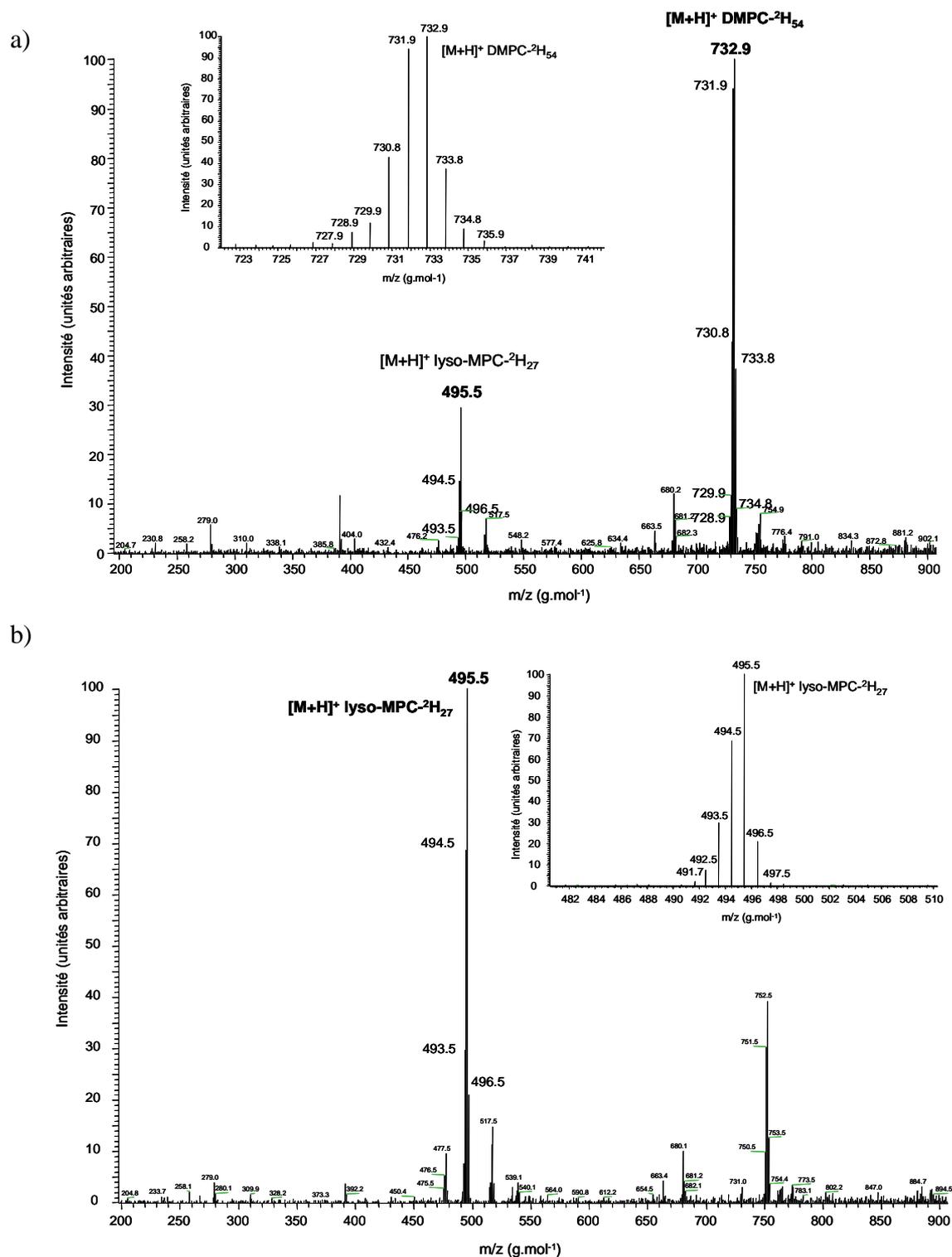


Figure III.6 : Spectres de masse (mode ESI, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>OH (7 : 2 : 1)) du produit final obtenu a) pour la synthèse du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> (les deux espèces majoritaires sont le DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> et le lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>) et b) pour la synthèse du lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>. Un agrandissement des massifs isotopiques caractéristiques a) du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> et b) du lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> est présenté.

Remarque : ce rendement n'est qu'approximatif car la proportion entre les deux lipides DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> et lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> n'a pas été déterminée avec précision (par RMN <sup>31</sup>P par exemple), même si les analyses CCM montrent que le DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> est présent en large majorité par rapport au lyso-lipide.

Caractérisation des produits : spectres de masse ESI (ionisation positive, full ms, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>OH (7 : 2 : 1)) : *m/z* 732,8 (732 calculé pour le DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>) et *m/z* 495,5 (calculé 494) pour le lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> (figure III.6.a)).

*Synthèse du 1-Myristoyl-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphocholine (Lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>) (Dufourc, 1983) ; (Oldfield et al., 1978) ; (Hubbell et McConnell, 1971).*

Les 0,5 g du mélange DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> + lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>, précédemment obtenus, sont dissous dans 2 ml de méthanol, puis 100 ml de diéthyl éther sont ajoutés, suivi de 1 ml de phospholipase A<sub>2</sub> (Sigma, extrait de pancréas de porc, 10000 unités/ml, sachant qu'une unité lyse 1 μmole de lipide). La solution est agitée vigoureusement et l'addition de 1 ml supplémentaire d'enzyme est renouvelée au bout de 30 min. La réaction est alors agitée pendant 4 heures à température ambiante jusqu'à ce que le lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> précipite ; la chaîne acyle libre reste dans la phase éther qui est éliminée par filtration. Le précipité est lavé par Et<sub>2</sub>O et récupéré du filtre par dissolution dans CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2 : 1). Le solvant est alors évaporé et les 0,4 g (0,81 mmol) de lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> obtenus, sont séchés sous vide.

Rendement de la réaction ≈ 80%.

Caractérisation du lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> : spectre de masse ESI (ionisation positive, full ms, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>OH (7 : 2 : 1)) : 495,5 (494 calculé) (figure III.6.b)).

*Synthèse du 1-tétradécanoyl-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>)*

Le Lyso-MPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> (0,81 mmol, 1 eq., 0,4 g), l'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque (1,21 mmol, 1,5 eq., 0,29 g), le dicyclohexylcarbodiimide (0,24 mmoles, 3 eq., 0,5 g) et l'acide dimyristoyl phosphatidique (0,81 mmoles, 1 eq., 0,1 g) sont dissous dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec, à température ambiante et sous argon. La solution est agitée dans ces conditions pendant deux jours. Un précipité blanc de sels d'urée, formé au cours de la réaction, est éliminé par filtration. Le produit brut est ensuite purifié deux fois sur colonne chromatographique ouverte (diamètre de 2,5 cm, 80 mg de silice dans CHCl<sub>3</sub>) en utilisant le système d'élution CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65 : 35 : 4, v : v). Le suivi de la colonne se fait par

chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant le même système de solvants précédent et en révélant sous lampe-UV. Les fractions contenant le lipide TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  sont regroupées et le solvant est évaporé sous vide ; après lyophilisation,  $\approx 0,19$  mmol (0,13 g) de produit final sont obtenus.

Rendement de la réaction  $\approx 23\%$ .

Caractérisation du produit final : spectre de masse ESI (ionisation positive, full ms, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub>OH (7 :2 :1) : m/z 717,6 (716 calculé pour le TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ ), m/z 495 (494 calculé pour le lyso-MPC- $^2\text{H}_{27}$ ) et m/z 480, 2 et 702,4 (pour les produits secondaires formés) (le spectre de masse est présenté figure III.5).

## III.2 Synthèses de peptides marqués $^{15}\text{N}$

Deux peptides, marqués à l'azote 15, ont été étudiés au cours de cette thèse : la Méthionine Enképhaline Menk  $^{15}\text{N}_3$ , marquée 3 fois, et Neu\* $^{15}\text{N}_4$ , marqué 4 fois. L'intérêt du marquage isotopique de certains de leurs acides aminés est de déterminer ultérieurement leur orientation par rapport à la membrane par RMN  $^{15}\text{N}$ . Ces deux peptides ont été synthétisés sur phase solide au laboratoire à l'aide d'un synthétiseur automatique. Seule la synthèse de la Menk  $^{15}\text{N}_3$  a été réalisée dans le cadre de cette thèse, celle de Neu\* $^{15}\text{N}_4$  a été effectuée par Lucie Khemtémourian au cours de sa thèse (Khemtemourian et al., 2006). Après avoir rappelé le principe de la synthèse peptidique en phase solide, nous présenterons la partie expérimentale associée à la préparation de la Menk  $^{15}\text{N}_3$ .

### III.2.1 Principe de la synthèse peptidique en phase solide (SPPS)

La synthèse linéaire de peptides sur support solide (résine polymérique) a été introduite par Merrifield en 1963 (Merrifield, 1963); elle permet de synthétiser rapidement des peptides très longs (jusqu'à 100 résidus) par fixation séquentielle de chaque acide aminé constituant la chaîne peptidique. Dans notre cas, nous avons utilisé la stratégie FastFmoc qui se décompose en 4 étapes majeures (figure III.7) :

- la déprotection par la pipéridine du groupement Fmoc du 1<sup>er</sup> acide aminé lié à la résine par son extrémité C-terminale ; une fonction amine primaire est ainsi libérée.
- l'activation du groupement carboxylique du 2<sup>ème</sup> acide aminé à fixer par le mélange HBTU/HOBt.

- le couplage entre le 1<sup>er</sup> acide aminé déprotégé et le 2<sup>ème</sup> activé par formation d'une liaison amide. Le succès de ce couplage dépend en partie de l'accessibilité du résidu fixé à la résine par l'acide aminé activé ; ainsi, ce dernier est généralement présent en excès de 4 (0,25 mmol de résine pesée initialement) ou 10 résidus (0,1 mmol de résine pesée initialement) ; le rendement d'un couplage varie de 98% à 99% en fonction de la séquence peptidique.

- le « capping » ou le blocage des fonctions amines des acides aminés qui n'auraient pas réagi lors du couplage, par un traitement à l'anhydride acétique. Ces fonctions libres pourraient en effet réagir avec le résidu à fixer suivant ce qui formerait des peptides tronqués, possédant des délétions en milieu de chaîne.

Après ces 4 étapes, le premier cycle est terminé et un deuxième peut commencer par la déprotection de l'amine sur le peptide en élévation. Ces étapes sont répétées jusqu'à l'obtention du peptide final.

Après chaque déprotection réussie du groupement Fmoc par la pipéridine, des sels de carbamate se forment ; la mesure de leur conductivité en temps réel permet de suivre de manière automatique le succès de l'élévation.

#### *Protection des groupements latéraux*

Certains acides aminés possèdent des groupements réactifs sur leur chaîne latérale, susceptibles de réagir lors de la synthèse peptidique avec l'amine déprotégé de l'acide aminé à greffer. Ainsi, des groupements protecteurs sont greffés initialement sur ces chaînes latérales réactives afin d'éviter toute réaction secondaire éventuelle. Dans le cas de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, seule la tyrosine possède un groupement protecteur t-butyl (tBu, de masse 56.06 Da) sur sa chaîne latérale.

#### *Clivage de la résine et déprotection des groupements latéraux*

A la fin de la synthèse, les peptides subissent un traitement acide (avec 95% de TFA) permettant d'éliminer les groupements protecteurs des chaînes latérales et de cliver le peptide de sa résine. Ces deux entités sont séparées par filtration ; le peptide est ensuite précipité dans l'éther froid, puis récupéré par filtration ou centrifugation. Le procédé de clivage appliqué dans notre cas est détaillé dans la partie expérimentale III.2.3.

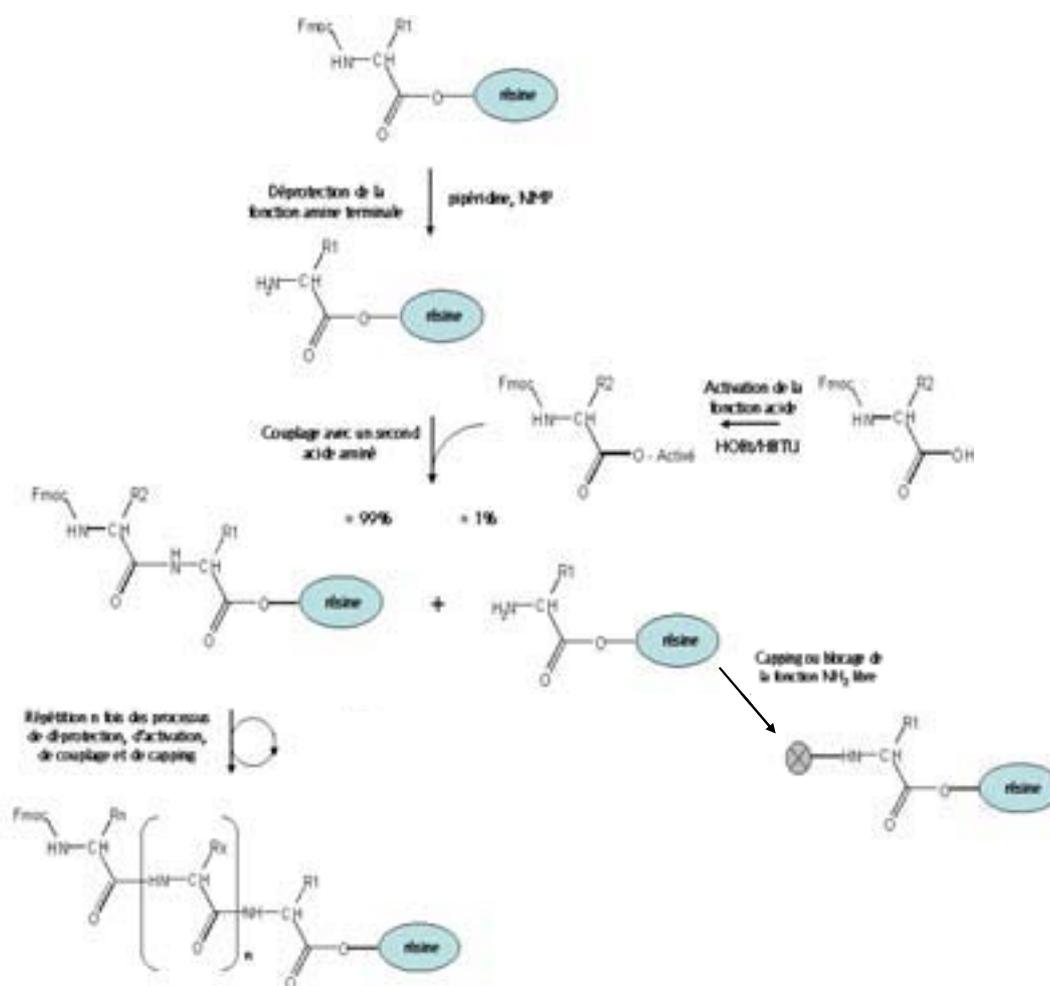


Figure III.7: Représentation des quatre étapes (déprotection, activation, couplage et capping) de la synthèse peptidique sur support solide par la méthode FastMoc.  $R_1$  est le groupement latéral de l'acide aminé 1,  $R_2$  celui de l'acide aminé 2 et  $R_n$  celui de l'acide aminé terminal.

*Caractérisation de la pureté du peptide synthétisé*

Le brut de synthèse ainsi obtenu est ensuite analysé par spectrométrie de masse et par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), afin de vérifier la pureté du peptide synthétisé et la présence éventuelle d'intermédiaires de synthèse. En fonction, une purification du peptide par HPLC est effectuée ou non.

*Séquence des peptides synthétisés :*

Les acides aminés marqués à l'azote 15 sont de couleur rouge, ceux présentant une hydrophobicité importante sont en caractère gras.

Séquence de la Méthionine Enképhaline **Menk-<sup>15</sup>N<sub>3</sub>** (voir sa structure développée figure III.10) :



Séquence de **Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub>**



Cette synthèse a été réalisée par Lucie Khemtémourian dans le cadre de sa thèse (Khemtemourian et al., 2006). Les détails concernant la synthèse de ce peptide ne seront pas développés ici.

**III.2.2 Résultats et Discussion**

La synthèse peptidique proprement dite de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> n'a pas posé de problème ; le suivi par conductivité montre que le greffage des quatre acides aminés sur la résine, préchargée de la méthionine, s'est effectué correctement.

Le clivage du peptide de la résine s'est effectué en deux fois, chacune sur la moitié de la quantité (peptide+résine) initiale, permettant de tester d'autres conditions de clivage si la première ne donne pas satisfaction.

Pour le premier clivage, une solution de TFA (95%)/eau (2,5%)/TIS (2,5%) a été utilisée (les détails de la procédure de clivage sont présentés dans la partie expérimentale III.2.3). L'analyse par spectrométrie de masse en mode MALDI-Tof, montre que le peptide résultant est pur et ne contient plus de groupement protecteur tBu. Nous avons donc appliqué la même procédure de clivage sur la deuxième moitié du peptide encore attaché à la résine. Cette fois, le spectre de masse réalisé en mode ESI montre un reste de tBu (figure III.8) : en plus du pic du peptide à m/z 577,1, un autre pic à m/z 633,1 est détecté, correspondant à un ajout de

masse de 56 Da, à savoir le tBu. Nous avons alors renouvelé l'opération de clivage sur cette même quantité de peptide en utilisant la solution de clivage suivante : TFA (94,5%)/H<sub>2</sub>O (2,5%)/EDT (2,5%)/TIS (1%), l' EDT étant un acteur supplémentaire pour piéger les groupes protecteurs. Malgré cela, un reste de tBu est toujours détectable par spectrométrie de masse en mode ESI. Pour éliminer totalement ce tBu, nous aurions pu testé encore une autre solution de clivage contenant des cristaux de phénols et du thioanisole, en plus du TFA, de l' EDT et du TIS, mais nous n'avons pas appliqué cette procédure par crainte de perdre trop de produit. De plus, la présence d'un reste de tBu ne gêne pas la poursuite de nos analyses.

Il faut noter que pour des raisons techniques, l'analyse du peptide après le premier clivage n'a pas été effectuée par spectrométrie de masse en mode ESI mais en mode MALDI-Tof, qui est plutôt une technique adaptée aux peptides longs ; en effet, dans la gamme de masse de la Menk <sup>15</sup>N<sub>3</sub>, certains pics provenant de la matrice de la cible peuvent perturber l'analyse et cacher éventuellement le pic correspondant au tBu. De plus, le peptide sans tBu s'est peut-être mieux ionisé que celui avec tBu en mode MALDI-Tof qu'en ESI et inversement. Ainsi, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que le peptide résultant du premier clivage ne contenait pas lui non plus un reste de tBu.

Au final, 80 mg de Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> sont obtenus, ce qui représente un rendement de synthèse après clivage de 56%. Le rendement théorique de synthèse se calcule en fonction du nombre d'étapes et en considérant que le rendement de chaque étape de synthèse est de 99%. Pour un pentapeptide, le rendement théorique devrait donc être de  $(0.99^4)*100$ , soit 96%, ce qui est bien supérieur à 56%. Dans notre cas, cette perte de 40% provient en majorité du clivage sur la deuxième moitié du peptide+résine ; il a en effet été renouvelé deux fois et beaucoup de produit a été perdu du à une faible précipitation du peptide dans l'éther.

Afin de préciser la pureté de la Menk <sup>15</sup>N<sub>3</sub> synthétisée, le peptide a été analysé par HPLC en phase inverse (les conditions chromatographiques utilisées sont détaillées dans la partie expérimentale). D'après le chromatogramme (figure III.9), le temps de rétention de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> est de 14,5 min, ce qui correspond à un mélange d'éluants constitué environ de 87% d'eau et de 13% d'acétonitrile. L'intégration du pic de la Menk <sup>15</sup>N<sub>3</sub> par rapport aux autres pics présents sur le chromatogramme permet de conclure que le peptide brut est pur à 90%. Peu d'impuretés sont donc présentes. Une purification complète du peptide par HPLC n'a donc pas été effectuée car elle aurait fait perdre beaucoup de produit et aurait nécessité beaucoup de temps pour n'améliorer la pureté du peptide que de quelques pourcents.

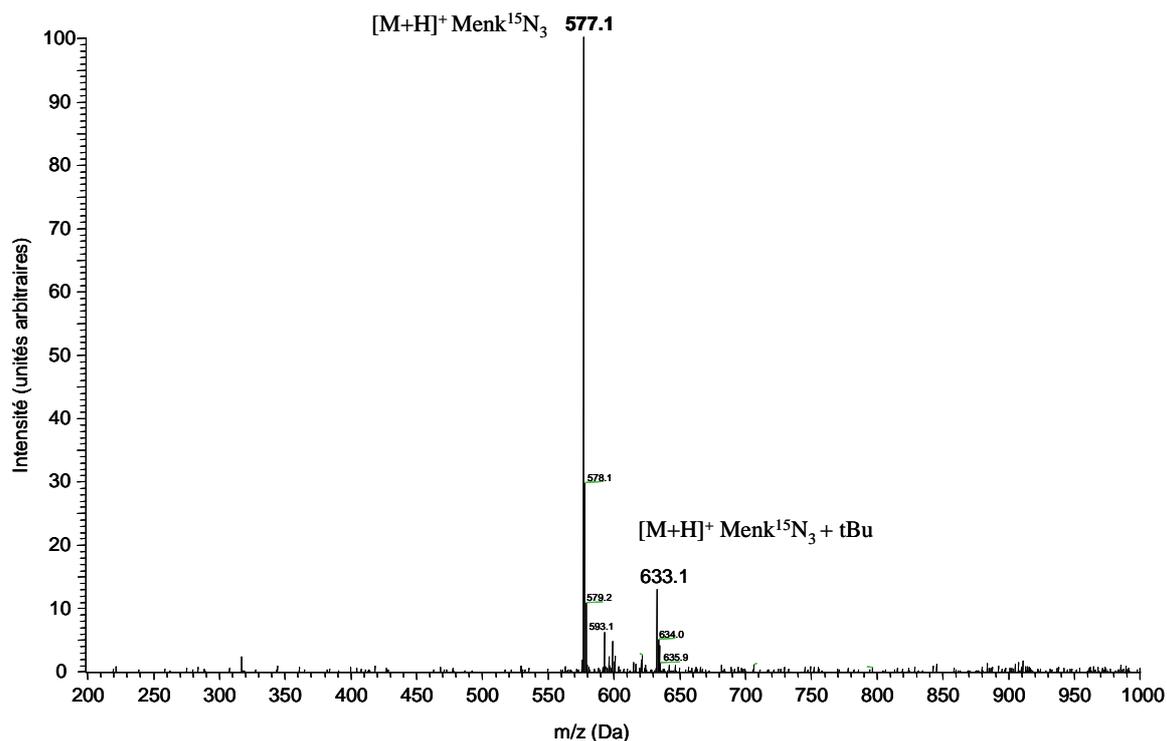


Figure III.8 : Spectre de masse en mode ESI du peptide  $\text{Menk}^{15}\text{N}_3$  après le 2<sup>ème</sup> clivage et sans purification par HPLC.

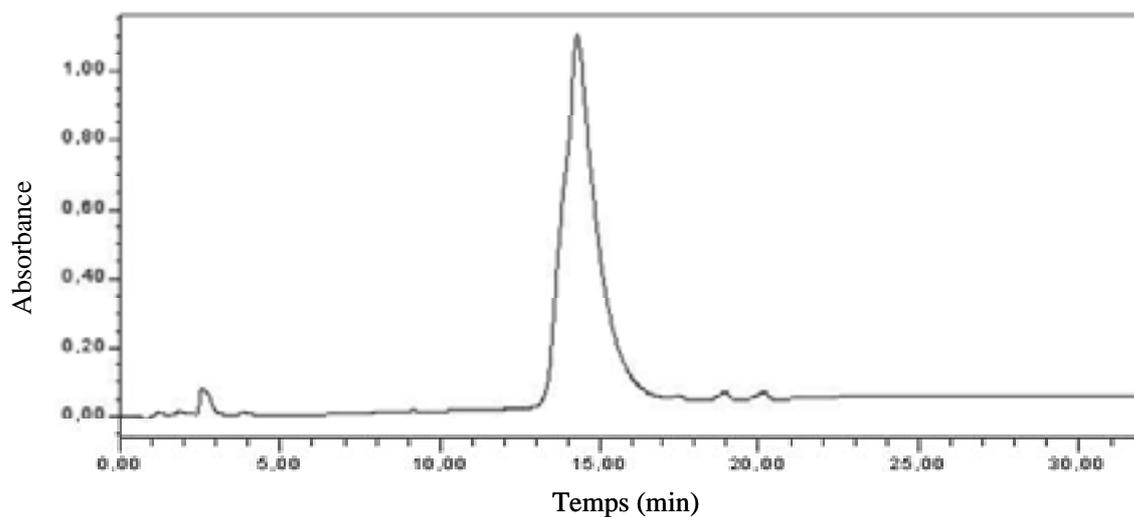


Figure III.9 : Chromatogramme du brut de synthèse de la  $\text{Menk}^{15}\text{N}_3$  obtenu par HPLC en phase inverse sur une colonne analytique  $\text{C}_{18}$  avec le gradient d'élution suivant : le solvant A ( $\text{H}_2\text{O}$ ) varie de 100% à 75% et B ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) de 0% à 25% en 30 min.

Une analyse RMN  $^1\text{H}$  de la Menk $^{15}\text{N}_3$  en solution dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (90 :10) a également été réalisée (figure III.10). Elle confirme la présence de petites impuretés. L'attribution des raies de résonance du spectre proton à une dimension s'est faite en corrélant les différents signaux obtenus sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  à deux dimensions par des séquences de type COSY (mise en évidence des constantes de couplage de  $J^1$  à  $J^3$ ) et TOCSY (mise en évidence des constantes de couplage de  $J^3$  à  $J^5$ ).

### III.2.3 Partie expérimentale de la synthèse peptidique de la Menk $^{15}\text{N}_3$

La synthèse peptidique a été réalisée avec un synthétiseur semi-automatique Applied Biosystems Synthesiser 433A (PE Biosystem, Courtaboeuf, France), selon la stratégie FastMoc. La résine FMoc-L-Met-Wang a été fournie par Neosystem, les acides aminés N- $\alpha$ -Fmoc et les activateurs N-hydroxybenzotriazole (HOBt) et 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate (HBTU) proviennent de la compagnie VWR-NovaBiochem (Läufelfingen, Suisse). La tyrosine est protégée sur sa chaîne latérale par un groupement tBu. Les acides aminés marqués  $^{15}\text{N}$ , les deux glycines et la phénylalanine, ont été obtenus auprès d'Euriso-top (CEA, Gif-sur-Yvette, France). La N-méthylpyrrolidone (NMP), la pipéridine, l'anhydride acétique, le diméthylformamide (DMF), le dichlorométhane (DCM) et le diisopropylethylamine (DIEA) ont été fournis par SDS (Peypin, France). Le triisopropylsilane (TIS) vient de ACROS organics (Geel, Belgique), le 1,2-éthanedithiol (EDT) provient de Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) et le TFA de Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). L'acétonitrile (de type HPLC) provient de chez Fisher (Gell Belgium). L'eau ultra-pure est préparée à l'aide d'un appareil Mili-Q (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France).

#### *Synthèse peptidique*

0,25 mmol de résine Wang préchargée avec une méthionine FMoc-L-Met substituée à 0,77 mmol.g $^{-1}$ , est utilisée. Les acides aminés libres sont présentés avec un excès de 4 par rapport à la résine. La stratégie FastMoc est appliquée suivant 4 étapes par cycle : i) déprotection des groupements FMoc par la pipéridine, ii) activation du groupement carboxyliques des acides aminés libres par un mélange HBTU/HOBt (37,9 g/13,6 g) dans 200 ml de DMF, iii) couplage par formation d'une liaison amide avec une solution de NMP contenant 35% de DIEA iv) et capping pour piéger d'éventuels peptides tronqués avec une solution d'anhydride acétique/DIEA/HOBt (19 ml/9 ml/0,8 g) dans 400 ml de NMP.

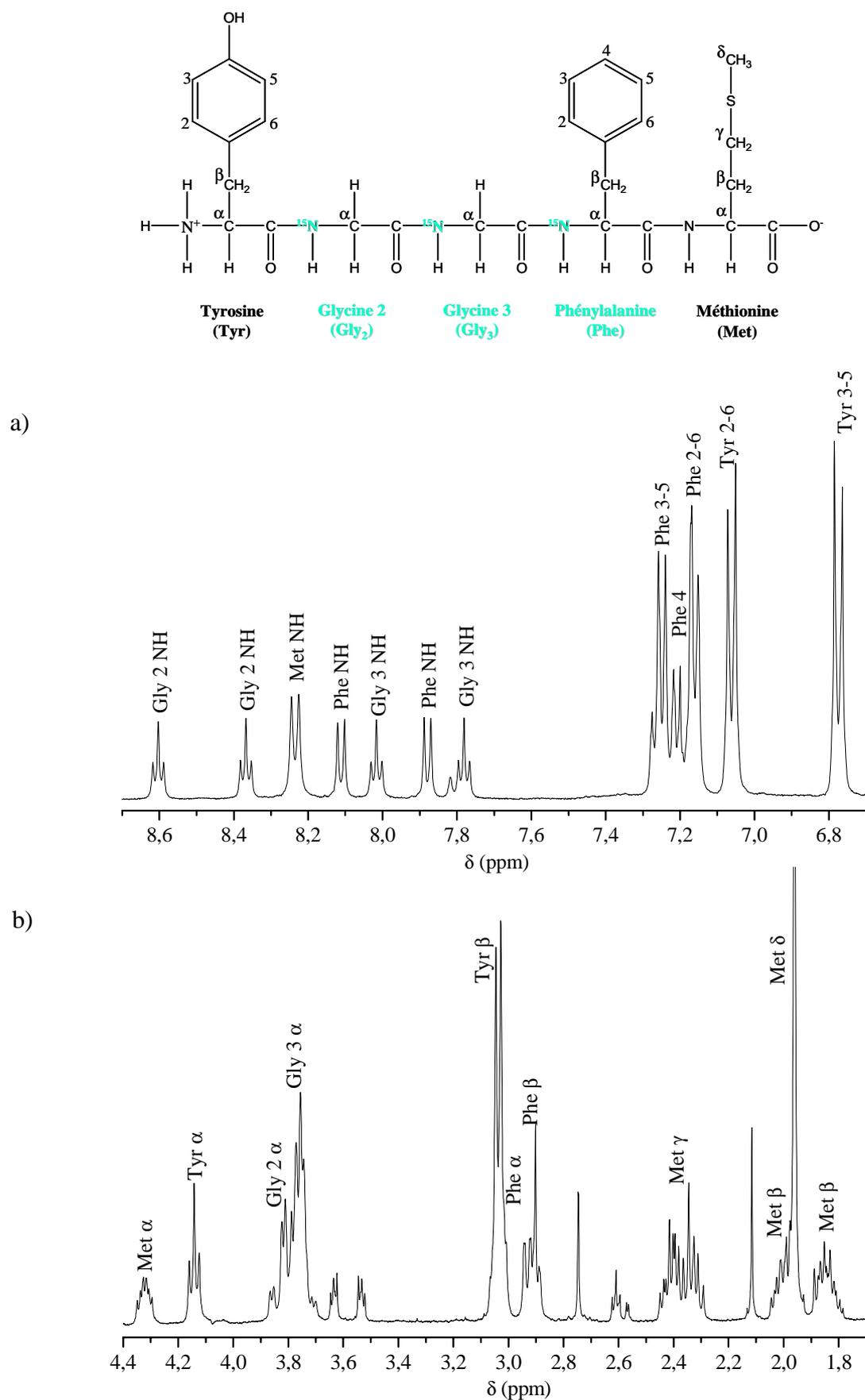


Figure III.10 : Structure développée et numérotée de la Menk  $^{\text{15}}\text{N}_3$  et son spectre attribué RMN- $^1\text{H}$  en solution dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (90 :10) entre a) 1,7 et 4,4 ppm et b) 6,7 et 8,7 ppm.

Chaque étape de déprotection est suivie par conductivité.

#### *Clivage du peptide de la résine*

Le clivage du peptide de la résine s'est effectué en deux parties, chacune sur la moitié de la quantité initiale :

- pour le 1<sup>er</sup> clivage, une solution de TFA (95%)/2,5% eau/2,5%(TIS) est utilisée à 0°C. 10 ml de cette solution sont ajoutés à 0,5 g du mélange peptide-résine, placé dans un erlenmeyer. Après 2 heures sous agitation (non magnétique pour ne pas broyer la résine), le clivage et la déprotection sont terminés. La résine est alors séparée du peptide libre et des groupements protecteurs par filtration sur un verre fritté de porosité 4. Un lavage de la résine avec du TFA et du DCM est effectué. Le peptide, présent dans le filtrat, est ensuite précipité dans l'éther froid ( $\approx$  100 ml). Le peptide est séparé des différents solvants par filtration puis récupéré du fritté par solubilisation avec une solution d'H<sub>2</sub>O/MeOH (9 :1). Le solvant est ensuite évaporé et le peptide lyophilisé.

Caractérisation du peptide clivé par spectrométrie de masse en mode MALDI-Tof : un seul pic à m/z 577,16 correspondant à la masse du peptide Menk <sup>15</sup>N<sub>3</sub>.

- pour le clivage sur la 2<sup>ème</sup> partie du peptide+résine, la même méthode que pour le premier clivage est tout d'abord appliquée.

Caractérisation par spectrométrie de masse en mode ESI : en plus du pic du peptide à m/z 577,1, un autre pic à m/z 633,1 est détecté, correspondant au tBu.

L'opération de clivage sur cette même quantité de peptide est alors renouvelée en utilisant la solution de clivage suivante : TFA (94,5%)/H<sub>2</sub>O (2,5%)/EDT (2,5%)/TIS (1%) tout en conservant la même procédure que précédemment.

Caractérisation par spectrométrie de masse en mode ESI : le pic m/z 633.1 du tBu est toujours présent, à côté de celui du peptide à m/z 577.1.

#### *Vérification de la pureté de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> par HPLC*

Pour préciser la pureté de la Menk <sup>15</sup>N<sub>3</sub>, le peptide est analysé par HPLC en phase inverse. La colonne analytique utilisée est de type C<sub>18</sub> avec une porosité de 100 Å ; les solvants utilisés sont A : H<sub>2</sub>O (+0,1% TFA) et B : CH<sub>3</sub>CN (+0,09% TFA) et le gradient d'élution linéaire est le suivant : l'éluant A varie de 100% à 75% et l'éluant B de 0% à 25% en 30 min.

### III.3. Formation des modèles membranaires

Une fois les lipides et les peptides synthétisés séparément, l'objectif est ensuite de les assembler afin d'étudier leurs interactions. Les modèles membranaires lipidiques que nous avons considérés sont de type vésicules multilamellaires (MLVs), vésicules unilamellaires larges et petites (LUV et SUV) et bicelles. Dans le cadre de ce travail, la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> a été incorporée dans des MLVs et des bicelles et Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> dans des bicelles DMPC/DCPC uniquement. Cette partie présente les procédures utilisées pour préparer ces différents modèles membranaires.

#### III.3.1 Préparation des liposomes de type MLVs (Multi Lamellar Vesicles)

Après avoir pesé la quantité adéquate de phospholipides (généralement stockés sous forme de poudre), ces derniers sont hydratés avec un large excès d'eau (dédeutérée dans le cas de lipides deutérés) afin d'atteindre un certain pourcentage d'hydratation (l'hydratation est définie comme : masse (eau) / masse totale (eau+lipides)) : par exemple, 80% d'hydratation revient à peser 25 mg de lipides dans 100 µl d'eau. Les échantillons sont ensuite agités avec un vibreur de type « vortex », puis soumis à des cycles de congélation (environ 30 sec dans l'azote liquide à -78°C) - réchauffement au bain marie (environ 10 min à une température supérieure à celle de transition de phase du lipide considéré, par exemple 40°C pour des phospholipides de DMPC) – et agitation au vortex ; ces cycles sont répétés jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène (généralement 3 ou 4 cycles sont nécessaires). Cette procédure classique permet de former des vésicules multilamellaires dont le diamètre dépasse quelques microns. Il est à noter que plus le nombre de cycles de formation des liposomes est important, plus les vésicules deviennent unilamellaires et leur taille diminue. Traikia et al (Traikia et al., 2000) ont montré par microscopie électronique et par RMN-<sup>31</sup>P que pour un mélange lipidique de dioleoylphosphatidylcholine et d'acide dioleoylphosphatidique (DOPC/DOPA), 10 cycles « congélation-chauffage » suffissent pour former des vésicules unilamellaires polydisperses en taille.

Dans le cas de liposomes comprenant plusieurs constituants membranaires (phospholipides, stérols, sphingolipides), ceux-ci sont d'abord co-solubilisés dans un même solvant organique (généralement chloroforme/méthanol (90 :10) dans le cas de

phospholipides standards). Après évaporation du solvant, le film lipidique est repris avec un large excès d'eau puis lyophilisé ; l'opération est répétée habituellement deux fois afin d'éliminer toute trace de solvant organique. Les poudres sont ensuite hydratées et des liposomes sont formés suivant la procédure décrite précédemment.

### III.3.2 Préparation des liposomes de type LUV (Large Unilamellar Vesicles) par la technique d'extrusion

Après la formation de liposomes MLVs, l'échantillon est passé dans un appareil d'extrusion, équipés de filtres (polycarbonate) de porosité choisie (400 nm ou 800 nm dans notre cas). La manipulation est réalisée sous pression d'azote (pas plus de 30 bars) et le système est réglé à une température supérieure à celle de transition de phase du lipide considéré (par exemple à 30°C pour le DMPC). Dix passages successifs dans l'extrudeuse sont habituellement effectués afin d'obtenir une suspension de liposomes unilamellaires de taille homogène ; plus la porosité des filtres utilisés est faible, plus les vésicules sont petites, plus la solution finale est translucide. Les échantillons sont ensuite analysés par diffusion de la lumière afin de vérifier le diamètre des vésicules formées ; pour cela, la solution étudiée ne doit pas être trop concentrée, une étape de dilution est parfois nécessaire.

### III.3.3 Préparation des SUV (Small Unilamellar Vesicles)

Les SUV peuvent être préparées selon deux méthodes :

- l'extrusion : la procédure est la même que celle utilisée pour la formation des LUV, en utilisant des filtres de porosité plus faible (50 ou 80 nm). Toutefois, afin d'éviter de monter trop fort en pression dans l'extrudeuse, il est préférable de préparer dans un premier temps une suspension de LUV (filtres de 400 nm par exemple) que l'on extrude ensuite sous forme de SUV.

- la sonication : une microsonde (3 mm de diamètre, de forme conique) est plongée dans une suspension de MLVs, préalablement préparée, et des cycles de vibration « 5 s on / 5 s off » de 25% d'amplitude sont appliqués pendant 90 min jusqu'à l'obtention d'une solution translucide de SUV. Le diamètre des vésicules est ensuite vérifié par diffusion de la lumière.

Les vésicules SUV préparées par sonication sont généralement plus polydisperses en taille que celles formées par extrusion.

### III.3.4 Préparation des bicelles

Les échantillons de bicelles sont formés d'un mélange de lipides à chaînes aliphatiques longues (dans notre cas, le DMPC ou le TBBPC) et courtes (le DCPC). Pour tout type de bicelle, la procédure généralement appliquée est celle décrite par Raffard et al. : après avoir pesé la quantité adéquate de phospholipides (la composition lipidique est souvent exprimée par rapport à la fraction molaire  $X = [\text{lipides chaîne longue}] / [\text{lipides totaux}]$ ), les poudres sont hydratées puis centrifugées une première fois à 6500 rpm pendant 5 min ; après une vive agitation avec un vibreur de type vortex, les échantillons sont ensuite soumis à des cycles successifs de congélation dans l'azote liquide (environ 30 sec), réchauffement au bain marie (10 min à 50°C), agitation au vortex puis centrifugation (6500 rpm pendant 5 min). Il est habituellement nécessaire de renouveler 3 fois ces cycles afin d'obtenir des bicelles.

Il faut noter que cette procédure n'est appliquée que dans le but d'accélérer la formation des bicelles ; celle-ci se fait aussi de manière spontanée mais plus lente, à condition de respecter les conditions d'hydratation, de composition lipidique et de température favorables à la formation des bicelles (pour les bicelles DMPC/DCPC, se reporter aux diagrammes de phase établis par Raffard et al. (Raffard et al., 2000)) : ainsi, des bicelles DMPC/DCPC (avec 78% en mole de DMPC, 80% d'hydratation et dans une solution à 100 mM en KCl) ont été préparées sans appliquer de cycles, en laissant simplement les poudres de phospholipides hydratées pendant 4 heures à l'étuve à 40°C.

Remarque : La synthèse chimique du TBBPC entraîne une acidité de ce dernier en solution, ce qui empêche la formation des bicelles TBBPC/DCPC. (reste du réactif acide biphenyle ou acidité provenant des colonnes échangeuses de cations). Une neutralisation du pH de la solution lipidique de TBBPC a donc été réalisée, avant de préparer des bicelles TBBPC/DCPC, en ajoutant quelques gouttes d'une solution de NaOH (à 50 mM) ; cette opération a été suivie d'une lyophilisation.

Les bicelles DMPC/DCPC sont également instables aux pH acides ( $\text{pH} \leq 4$ ), qui entraînent l'hydrolyse des liaisons esters. Aussenac et al (Aussenac et al., 2005) ont montré que cette stabilité au pH des bicelles DMPC/DCPC pouvait être augmentée en remplaçant les liaisons esters des lipides par des liaisons éthers.

### III.3.5 Reconstitution de la Menk $^{15}\text{N}_3$ et Neu\* $^{15}\text{N}_4$ dans les modèles membranaires lipidiques

#### *a) Elimination du TFA des peptides*

L'acide trifluoroacétique (TFA) est utilisé lors du clivage et de la purification du peptide par HPLC. Ce TFA va jouer le rôle de contre-ion au niveau des acides aminés chargés positivement. Il est donc important de l'éliminer, afin d'éviter toute erreur de masse et tout désagrément lors de la formation des modèles membranaires et des différentes analyses spectroscopiques (Infra-Rouge, Dichroïsme Circulaire). Pour cela, le peptide est traité par une solution d'acide chlorhydrique (HCl) dont le nombre de mole est trois fois en excès par rapport à celui des ions TFA ; l' HCl ayant un pka de -7, plus faible que celui du TFA (pka=0,5), ce dernier va être protoné et ainsi facilement éliminé par lyophilisation. Les ions  $\text{Cl}^-$ , moins encombrant que le TFA, constituent ainsi les nouveaux contre-ions des acides aminés positifs du peptide. Afin de déterminer le nombre d'ions initial de TFA par résidu positif du peptide, un dosage par RMN  $^{19}\text{F}$  a été mis au point, en considérant une solution de TFE, de concentration connue, comme référence externe.

Le peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$  contient 5 résidus chargés positivement (4 arginines et 1 lysine) ; les contre-ions TFA y sont donc associés après clivage et purification par HPLC. Pour réaliser le dosage de ces ions par RMN  $^{19}\text{F}$ , 65  $\mu\text{l}$  d'une solution de TFE à 10 mM dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  (40 :35 :25) sont mis dans un capillaire, lui-même placé dans un tube RMN liquide contenant 540  $\mu\text{l}$  de Neu\* $^{15}\text{N}_4$  (+ TFA). Le spectre RMN  $^{19}\text{F}$  obtenu est présenté en figure III.11 : le pic à 77,1 ppm correspond au triplet caractéristique du TFE, utilisé ici comme référence, et le pic à -75,7 ppm est attribué au TFA associé au peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$ . Après intégration des pics, on détermine que la proportion en masse de TFA, sur la quantité totale de peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$  synthétisé et purifié, est de 19%, ce qui représente en moyenne 1,6 contre-ions TFA par résidu positif du peptide. Ce résultat confirme l'intérêt d'enlever le TFA, présent en quantité non négligeable, avant de poursuivre les analyses.

Le dosage par RMN  $^{19}\text{F}$  du peptide après lavage avec une solution d'HCl et lyophilisation montre que ce traitement est efficace puisque le pic du TFA associée à Neu\* $^{15}\text{N}_4$  est maintenant très faible ; la majorité des ions TFA a donc été enlevée et remplacée par les ions  $\text{Cl}^-$ . De plus, dans les conditions de concentration en acide utilisées, le peptide ne subit pas de dégradation, ce qui est vérifié par analyse MALI-Tof.

Cette procédure a été appliquée avec succès sur d'autres peptides synthétisés au laboratoire notamment sur les peptides BH<sub>4</sub> et Bax liés au phénomène d'apoptose (Sani et al., accepté en Septembre 2006).

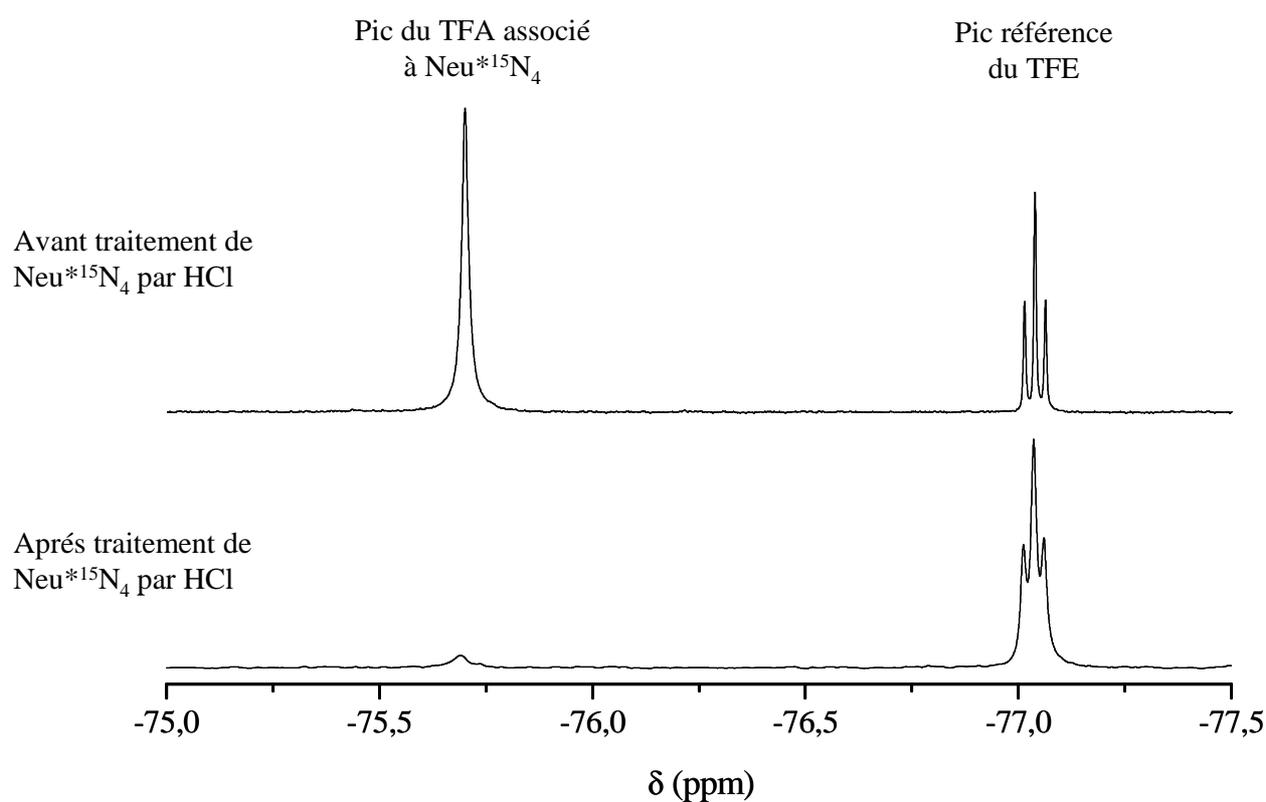


Figure III.11 : Spectre RMN <sup>19</sup>F du peptide Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> avant et après traitement avec HCl ; une solution de TFE à 10 mM est pris comme référence.

*b) Préparation des modèles membranaires (peptides+lipides)*

Une fois débarrassé de ses contre-ions TFA, le fragment peptidique transmembranaire Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> est incorporé dans des bicelles DMPC/DCPC (h=80%, X=78% en mole de DMPC, avec un ratio peptide/lipides de 1/150) en effectuant au préalable une co-solubilisation des différents constituants dans le trifluoroéthanol (TFE). Après évaporation du solvant et deux étapes successives de lyophilisation, la poudre obtenue est hydratée avec une solution aqueuse contenant 100 mM de KCl. Les cycles de formation des bicelles, explicités précédemment, sont ensuite réalisés.

Le peptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> ne possédant pas de résidus positifs dans sa séquence, il n'a pas été nécessaire d'éliminer les contre-ions TFA par le traitement à l'HCl.

Pour la formation des modèles bicellaires DMPC/DCPC (h=80% et X=78% en mole de DMPC) et TBBPC/DCPC (h=80% et X=87,5% en mole de TBBPC) contenant le pentapeptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, une solution aqueuse mère, de concentration définie en peptide, est tout d'abord préparée. Le volume nécessaire de cette solution mère est ensuite ajouté à celle comprenant les lipides en respectant un ratio peptide/lipides de 1/25 et une hydratation finale de 80% (avec 100 mM de KCl pour les bicelles DMPC/DCPC et 100 mM en NaCl pour les bicelles TBBPC/DCPC). Les cycles de formation des bicelles, explicités précédemment, sont ensuite réalisés.

Dans le cas des modèles membranaires de type liposomes contenant le pentapeptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, une solution aqueuse mère de concentration connue en peptide est également préparée. Le volume nécessaire de cette solution mère est ensuite ajouté à une suspension de liposomes de type MLVs ou LUV, préalablement formée, de telle sorte que le ratio peptide/lipides soit de 1/25.

### Conclusion

Les synthèses des lipides TBBPC et TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ , et du peptide Menk $^{15}\text{N}_3$  que nous venons de voir sont des étapes clés dans notre étude, car elles conditionnent toutes les analyses ultérieures. Il faut donc y consacrer du temps (toujours plus que ce qui est prévu initialement !) et le faire avec soin. Certaines synthèses organiques, notamment celle des lipides deutérés, sont délicates à mettre en œuvre et nécessitent un temps d'adaptation. Le pentapeptide Menk $^{15}\text{N}_3$  a été préparé quant à lui sans trop de difficulté vu sa petite taille, ce qui n'est pas le cas de tous les peptides ; la synthèse de Neu\* $^{15}\text{N}_4$  (35 résidus, dont une majorité hydrophobe) ainsi que sa purification par HPLC (réalisées par Lucie Khemtémourian) a nécessité beaucoup plus d'investissements en temps et en argent.



## CHAPITRE IV

### Etudes Physico-chimiques du lipide TBBPC



Le lipide TBBPC constitue la base et l'originalité de toute notre étude ; il est donc intéressant de caractériser certaines de ses propriétés physico-chimiques avant d'étudier ses applications dans la formation de modèles membranaires de type bicelle. Ce chapitre est consacré dans un premier temps à la détermination de la température de transition de phase gel-fluide du TBBPC. La dynamique du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ , formulé en liposomes, sera ensuite analysée par RMN- $^2\text{H}$  et comparée à celle de MLVs de DMPC- $^2\text{H}_{54}$ . Enfin, nous étudierons l'influence du champ magnétique sur la forme des vésicules de TBBPC.

## IV.1 Température de transition de phase du lipide TBBPC

### IV. 1. 1 Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie Infrarouge, sensible aux vibrations des liaisons chimiques, peut s'avérer être un outil efficace pour analyser des changements d'organisations moléculaires, comme ceux des chaînes aliphatiques des lipides en fonction de la température. Plus précisément, les positions en nombre d'onde des vibrations antisymétriques et symétriques des méthylènes constituant les chaînes hydrophobes, respectivement situés vers  $2920\text{ cm}^{-1}$  et  $2850\text{ cm}^{-1}$ , renseignent sur le caractère plus ou moins flexible des chaînes. Une augmentation de conformations trans au détriment de conformations cis, traduisant une organisation des chaînes, s'accompagne en effet d'une diminution des nombres d'onde associés aux vibrations des CH.

Dans notre cas, des liposomes MLVs du lipide TBBPC ont été préparés dans l'eau avec une hydratation de 80%. Le spectre IR en transmittance obtenu à température ambiante est présenté figure IV.1.a). Les vibrations caractéristiques des groupements fonctionnels du lipide TBBPC sont observées :  $\nu_{\text{CH}}$  (élongation) autour des  $2900\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C=O}}$  (élongation) à  $1732\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CH}}$  (déformation) vers  $1480\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{O-C=O}}$  (élongation) à  $1228\text{ cm}^{-1}$  et  $\nu_{\text{O-CH}_2}$  (élongation) vers  $1080\text{ cm}^{-1}$ . Un agrandissement en absorbance (l'inverse de la transmittance) des vibrations d'élongation associées aux CH est présenté figure IV.1.b). On constate que  $\nu_{\text{CH}}(\text{symétrique}) = 2852\text{ cm}^{-1}$  et  $\nu_{\text{CH}}(\text{antisymétrique}) = 2923\text{ cm}^{-1}$ . Aucune diminution des nombres d'onde associés aux vibrations d'élongation des groupements  $\text{CH}_2$  n'est constatée ; les chaînes aliphatiques du TBBPC sont donc dans un état fluide. La température de transition de phase  $T_m$  du lipide TBBPC est donc inférieure à la température ambiante.

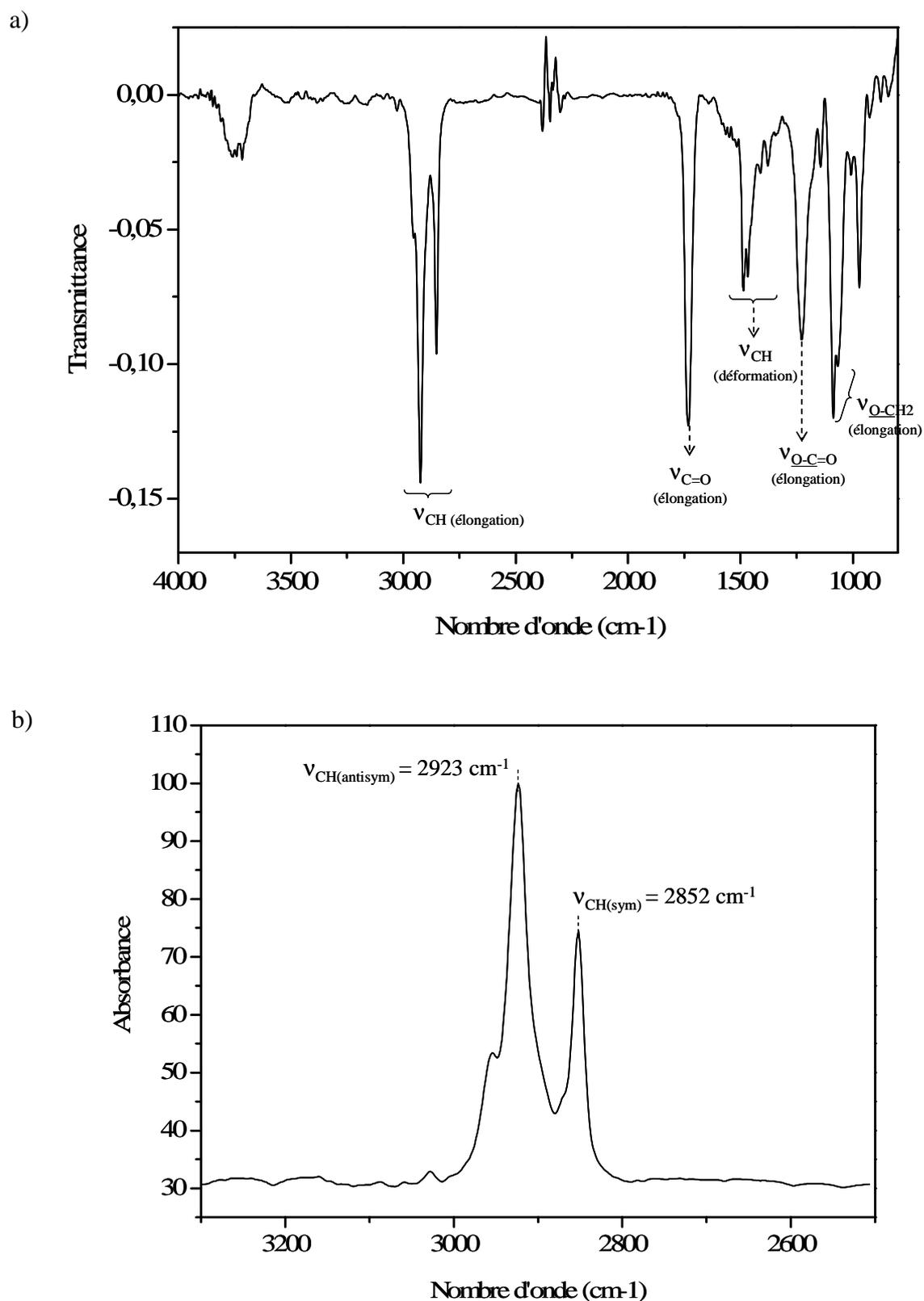


Figure IV.1: a) Spectre Infrarouge en transmittance du lipide TBBPC formulé en liposomes MLVs dans  $\text{H}_2\text{O}$  ( $h=80\%$ ), à température ambiante b) Agrandissement en absorbance des bandes de vibration des CH des chaînes aliphatiques du TBBPC.

Afin de déterminer précisément cette température  $T_m$  du TBBPC, une étude par calorimétrie (DSC) ou par InfraRouge en température aurait pu être menée. Toutefois, nous avons voulu montrer que la RMN des Solides  $^{31}\text{P}$  et  $^2\text{H}$  étaient également adaptées à l'analyse des transitions de phases lipidiques gel-fluide.

#### IV. 1. 2 Caractérisation par Résonance Magnétique Nucléaire des Solides

##### a) RMN des Solides $^{31}\text{P}$

Des liposomes MLVs de TBBPC (h=80% dans  $\text{H}_2\text{O}$ ) ont été analysés par RMN des solides  $^{31}\text{P}$  en faisant varier la température de  $-10^\circ\text{C}$  à  $30^\circ\text{C}$  par pas de  $5^\circ\text{C}$ . Les différents spectres RMN du phosphore obtenus sont présentés figure IV.2.a) :

- pour des températures inférieures à  $0^\circ\text{C}$ , le spectre observé est très large et mal résolu (rapport signal sur bruit faible), ce qui est associé à une phase lipidique gel, où tous les mouvements moléculaires sont limités,

- pour des températures supérieures à  $0^\circ\text{C}$ , l'anisotropie de déplacement chimique  $\Delta\sigma$  diminue ( $\Delta\sigma=7,7$  kHz soit 47,5 ppm à  $10^\circ\text{C}$  alors qu'elle est égale à  $\approx 25,4$  kHz soit 157 ppm à  $-10^\circ\text{C}$ ) et les spectres sont mieux définis. Cette forme spectrale caractérise l'état fluide d'une phase lamellaire non orientée à symétrie axiale (voir chapitre II.1) ; l'épaulement le plus intense correspond à l'orientation la plus probable pour laquelle  $\beta=90^\circ$  ( $\beta$  étant l'angle entre la normale à la bicouche et le champ magnétique).

Ainsi, d'après l'allure générale des spectres RMN  $^{31}\text{P}$ , un changement d'organisation moléculaire du lipide, correspondant au passage d'une phase gel à fluide, se produit pour une température proche de  $0^\circ\text{C}$ .

Afin de déterminer la valeur exacte de la température de transition de phase  $T_m$  du TBBPC, les moments  $M_2$  ( $M_2 = (16\pi^2/45)\overline{\Delta\sigma^2}$ , voir chapitre II.1) sont calculés pour chaque spectre en phosphore précédent. Pour cela, les spectres RMN sont tout d'abord transférés sur le logiciel Origin ; pour chacun d'eux, on définit ensuite les limites spectrales (en fréquence) à considérer et grâce à une routine « NMRFriend » (mise au point par Sébastien Buchoux, non publiée) la valeur de  $M_2$  est calculée automatiquement. Les moments  $M_2$  sont alors reportés en fonction de la température et le point d'inflexion de la courbe obtenue correspond à  $T_m$ . Dans notre cas, les spectres en phosphore n'ont pas été enregistrés en dessous de  $-10^\circ\text{C}$  ; ainsi la courbe  $M_2=f(T^\circ)$  ne retranscrit pas complètement le passage de la phase gel, associée à des moments  $M_2$  élevés, à celle fluide, dont les moments  $M_2$  sont plus faibles (figure IV.2.b)).

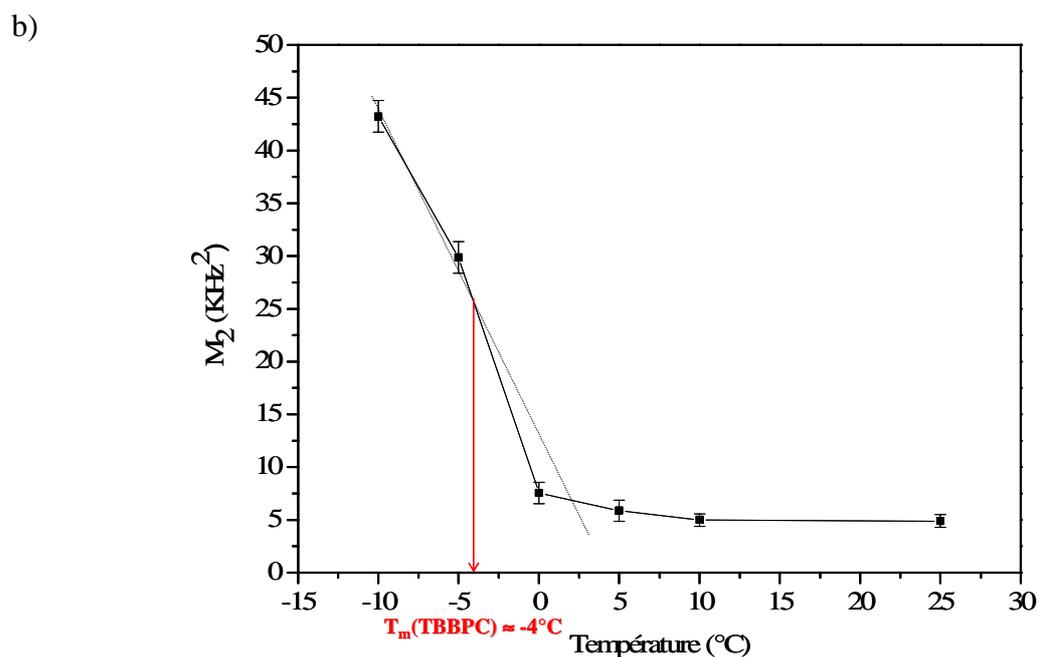
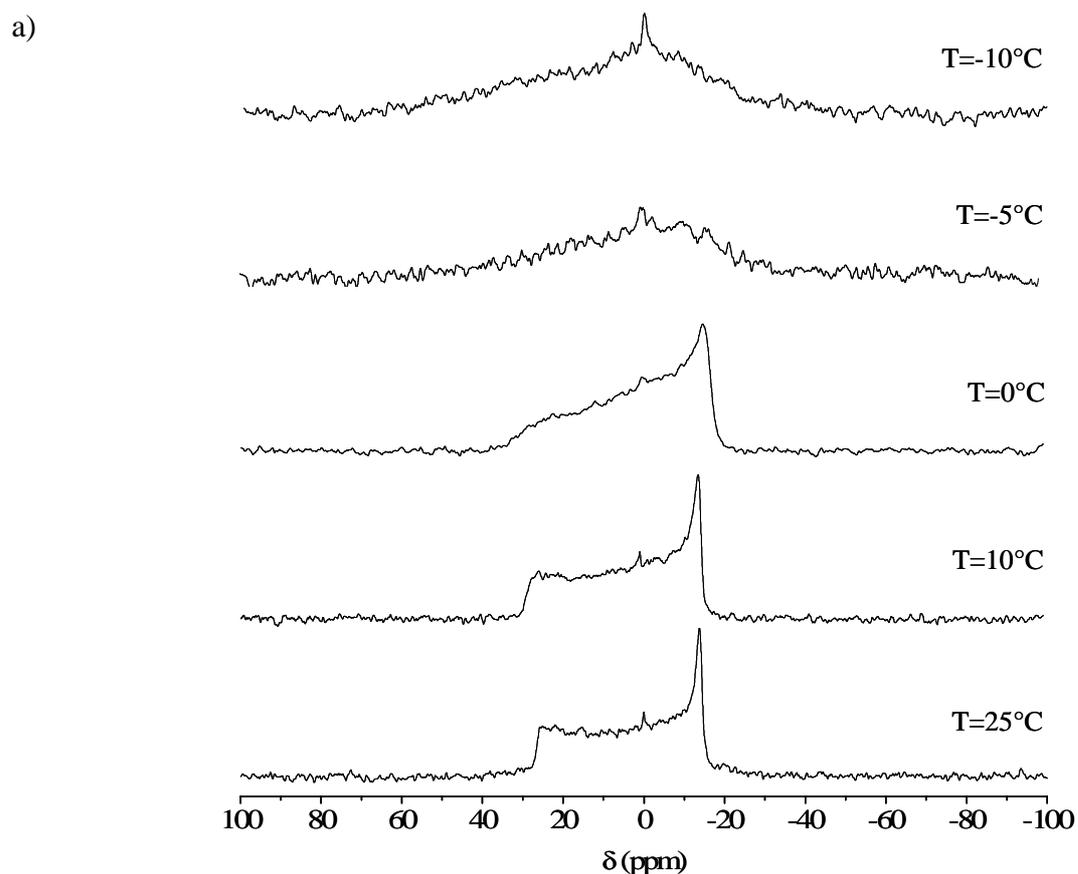


Figure IV.2 : a) Spectres RMN des solides  $^{31}\text{P}$ , (séquence Echo de Hahn avec découplage large-bande des protons), de liposomes MLVs de TBBPC pour une hydratation de 80% dans  $\text{H}_2\text{O}$ . Les températures sont indiquées sur la droite. Chaque spectre est le résultat de 300 scans. b) Graphe reportant les valeurs du moment  $M_2$ , calculées pour chaque spectre RMN- $^{31}\text{P}$  précédent, en fonction de la température. A partir du point d'inflexion de la courbe, on détermine  $T_m(\text{TBBPC}) \approx -4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

Néanmoins, une rupture de pente est visible et permet de déterminer une température de transition de phase associée au lipide TBBPC de  $\approx -4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ .

### *b) RMN des Solides $^2\text{H}$*

Des liposomes MLVs de TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  (h=80% dans  $\text{H}_2\text{O}$  dédeutérée à 98%) ont été analysés par RMN des solides  $^2\text{H}$  en faisant varier la température de  $-10^\circ\text{C}$  à  $30^\circ\text{C}$  par pas de  $2^\circ\text{C}$ . Les différents spectres RMN du deutérium obtenus sont présentés figure IV.3.a) :

- pour des températures inférieures à  $-4^\circ\text{C}$ , le spectre observé est très large et mal résolu ; ce qui caractérise une phase gel (ou solide), où les chaînes aliphatiques adoptent une conformation tout trans,

- au-dessus de  $-4^\circ\text{C}$ , plus la température augmente, plus les spectres quadrupolaires s'affinent, ce qui est associé à une augmentation de fluidité des chaînes aliphatiques dont la conformation majoritaire devient cis. Cette forme spectrale est caractéristique d'une phase lamellaire non orientée, dans un état fluide (phase dite aussi liquide désordonnée). Les épaulements les plus intenses (dont l'éclatement quadrupolaire  $\Delta\nu_Q$ , est égal par exemple à 3,91 kHz à  $10^\circ\text{C}$ ), correspondent aux groupements  $\text{C}-^2\text{H}_3$  en bout de chaîne aliphatique, les plus mobiles.

Ainsi, d'après l'allure générale des spectres RMN- $^2\text{H}$ , un changement de conformation des chaînes, trans vers cis, caractéristique d'une transition de phase solide-liquide désordonnée, est observée dès  $-4^\circ\text{C}$ .

Afin de préciser cette température de transition de phase gel-fluide, les moments  $M_1$  ( $M_1 = \frac{4\pi}{3\sqrt{3}} \overline{\Delta\nu_Q}$ , voir chapitre II.1) sont calculés pour chacun des spectres précédents. Sur le même principe que pour les moments  $M_2$ , on reporte la valeur des moments  $M_1$  en fonction de la température et le point d'inflexion de la courbe correspond à  $T_m$ . Dans notre cas, les moments  $M_1$  varient de 171  $\text{kHz}^2$  pour  $T=-10^\circ\text{C}$  à 55  $\text{kHz}^2$  pour  $T=30^\circ\text{C}$ . La rupture de pente est observée entre  $-10^\circ\text{C}$  et  $2^\circ\text{C}$  et permet de confirmer la valeur de la température  $T_m$  (TBBPC)  $\approx -4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

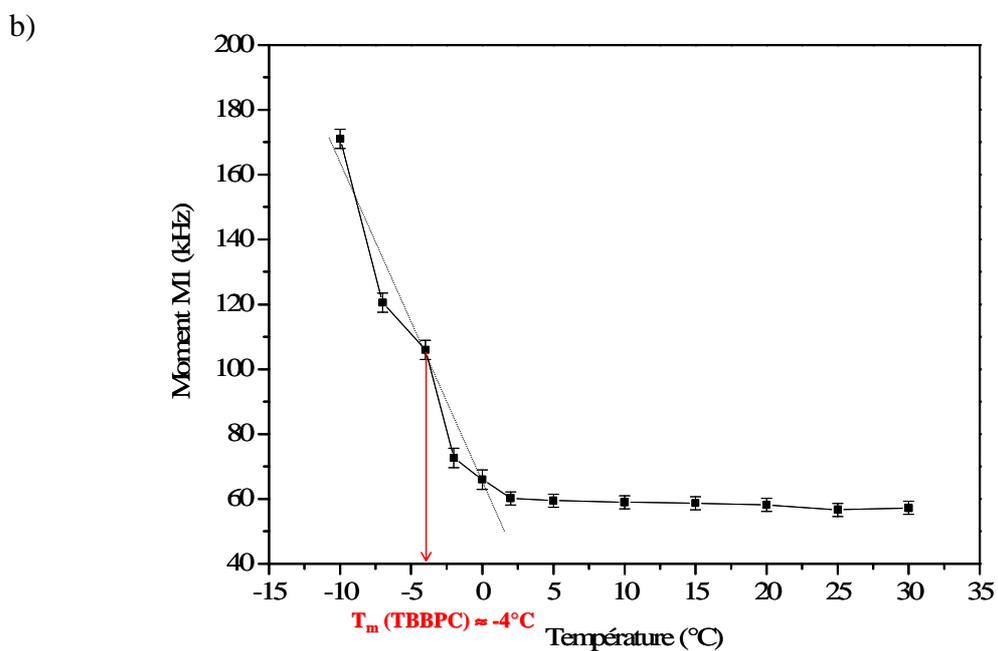
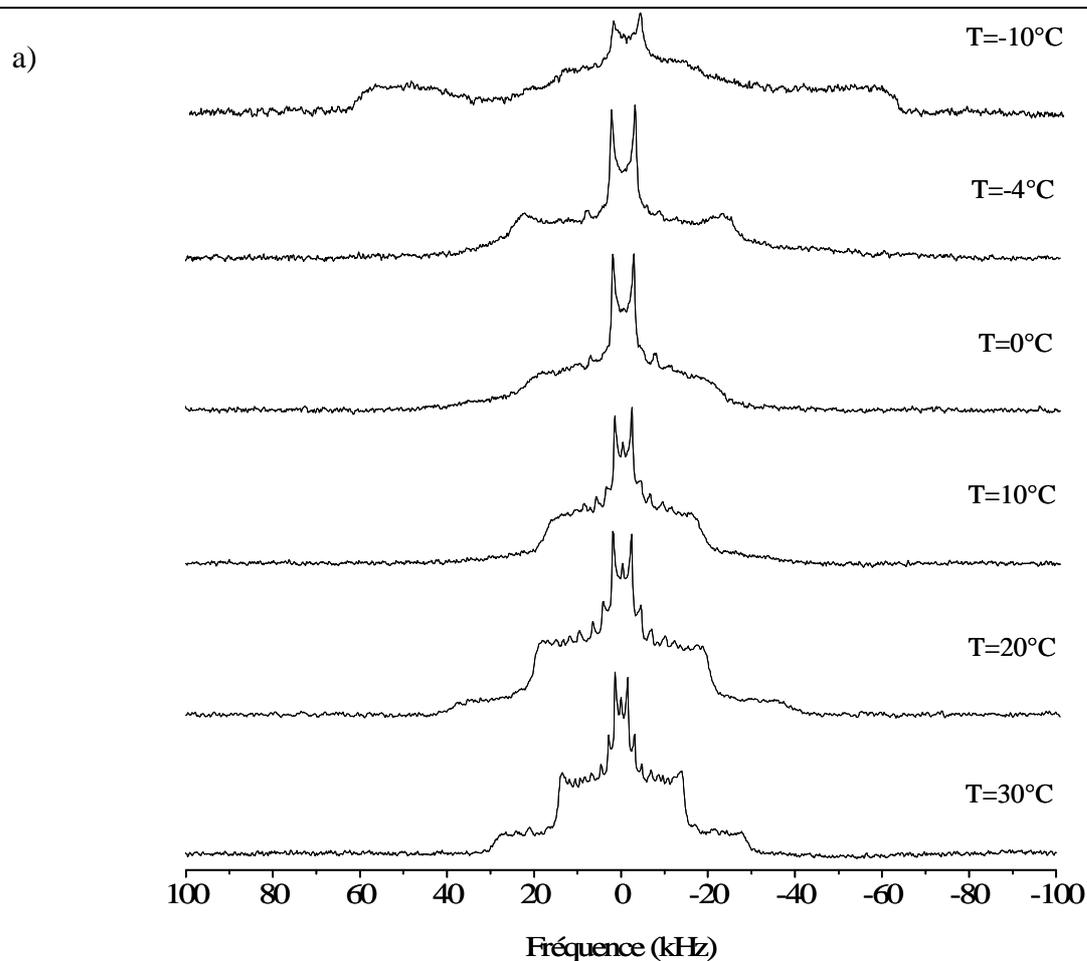


Figure IV.3 : a) Spectres RMN des solides  $^2\text{H}$  (séquence Echo solide) de liposomes MLVs de TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  pour une hydratation de 80% dans  $\text{H}_2\text{O}$  dédeutérée. Les températures sont indiquées sur la droite. Chaque spectre est le résultat de 300 scans. b) Graphe reportant les valeurs du moment  $M_1$ , calculées pour chaque spectre RMN- $^2\text{H}$  précédent, en fonction de la température. A partir du point d'inflexion de la courbe, on détermine  $T_m(\text{TBBPC}) \approx 4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ .

L’Infrarouge nous a donné une première indication sur la valeur de la température de transition de phase gel-fluide du TBBPC, à savoir qu’elle était inférieure à la température ambiante, étant donné la conformation *cis* adoptée majoritairement par les chaînes aliphatiques du lipide à cette température. La RMN-<sup>31</sup>P nous a ensuite permis d’estimer plus précisément la valeur de  $T_m$  autour des  $-4^\circ\text{C}$ , par le calcul des moments  $M_2$  associés aux spectres phosphores du TBBPC en fonction de la température. Enfin, cette valeur a été confirmée par le calcul des moments  $M_1$  relatifs aux spectres RMN-<sup>2</sup>H du TBBPC. La RMN constitue donc un bon outil pour déterminer des températures de transition de phases lipidiques.

On peut noter que la température de transition de phase gel-fluide du TBBPC ( $T_m \approx -4^\circ\text{C}$ ) est bien inférieure à celle du lipide DMPC ( $T_m \approx 23,5^\circ\text{C}$ ), ayant la même longueur de chaîne en  $\text{C}_{14}$  et aucune insaturation. Ceci prouve l’influence des deux cycles phényles sur les mouvements moléculaires du TBBPC en fonction de la température, qui se traduit par une diminution de  $T_m$ . On retrouve ici l’effet bien connu des liaisons insaturées sur les chaînes aliphatiques qui abaissent de la même manière la température de transition de phase gel-fluide  $T_m$  des lipides (par exemple,  $T_m=41,5^\circ\text{C}$  pour le DPPC possédant deux chaînes en  $\text{C}_{16}$  et aucune insaturation, et  $T_m=-35,5^\circ\text{C}$  pour le même lipide possédant une insaturation sur chacune de ses chaînes, (Cevc, 1983)).

## IV.2 Dynamique du TBBPC dans des liposomes

### IV. 2. 1 Déconvolution des spectres RMN-<sup>2</sup>H et profils d’ordre

Afin de différencier et d’attribuer les différents éclatements quadrupolaires sur les spectres RMN-<sup>2</sup>H des liposomes TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> non orientés, la méthode de déconvolution ou « de-Pake-ing » a été appliquée (voir chapitre II.1), permettant de reconstituer les spectres RMN associés à des objets orientés à  $90^\circ$  par rapport au champ magnétique.

#### *a) Spectres RMN-<sup>2</sup>H pour une température d’analyse de $30^\circ\text{C}$*

Le spectre déconvolué des liposomes TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> pour  $T=30^\circ\text{C}$  est présenté figure IV.4.a) (spectre rouge). On constate qu’un nombre important d’éclatements quadrupolaires distincts est obtenu après déconvolution ; il est ainsi possible d’attribuer de manière individuelle les groupements aliphatiques des positions 14 à 5 sur la chaîne  $\text{sn}_1$  du TBBPC ; ceux des positions 4 à 2 sont regroupés sous un même pic.

Une comparaison est faite avec le spectre déconvolué de liposomes de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (spectre noir). Ce dernier lipide est deutéré sur ces deux chaînes  $\text{sn}_1$  et  $\text{sn}_2$  qui sont non équivalentes à la différence du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  qui n'est deutéré que sur sa chaîne  $\text{sn}_1$ . Il est alors possible de distinguer les éclatements quadrupolaires associés aux positions 11, 12 et 13 pour la chaîne  $\text{sn}_1$  et ceux relatifs aux positions 12' et 13' pour celle  $\text{sn}_2$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$ ; les autres signaux regroupent des positions des deux chaînes (voir les attributions sur les spectres, d'après (Davis, 1979); (Seelig, 1977)). Dans le cas de ce lipide, les éclatements quadrupolaires relatifs aux positions 14 à 9 sont observés individuellement; les positions 8 à 2 sont regroupées sous un même pic.

Il est donc possible de distinguer davantage d'éclatements quadrupolaires individuels sur le spectre associé à la chaîne  $\text{sn}_1$  du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  que sur celui relatif à la chaîne  $\text{sn}_1$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (11 dans le premier cas, 8 dans le deuxième). De même, les signaux sont distribués de manière régulière sur toute la largeur spectrale dans le premier cas, ce qui est moins visible pour le deuxième, où l'écart en fréquence entre les positions 14 et 13 est plus important (4,2 kHz contre 1,6 kHz).

*b) Profils d'ordre pour une température d'analyse de 30°C*

La mesure directe des éclatements quadrupolaires sur les spectres RMN- $^2\text{H}$  permet de calculer les paramètres d'ordre  $S^{\text{CD}}$  pour chaque système. La déconvolution considère l'orientation où la normale à la bicouche est perpendiculaire au champ magnétique ( $\beta=90^\circ$ );  $S^{\text{CD}}$  est alors relié à  $\Delta\nu_Q$  par l'équation (II.36):  $S^{\text{CD}} = 4\Delta\nu_Q/3A_Q$  (voir chapitre II.1). Il est ensuite possible de tracer le profil d'ordre associé à la chaîne aliphatique  $\text{sn}_1$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et à la chaîne  $\text{sn}_1$  du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  (voir figure IV.4.b)) pour  $T=30^\circ\text{C}$ .

Dans les deux cas, plus on remonte sur la chaîne aliphatique des lipides de la position 14 à 2, plus le paramètre d'ordre  $S^{\text{CD}}$ , caractéristique de la dynamique du système, augmente. Ainsi, le groupement aliphatique  $\text{C}-^2\text{H}_3$  en bout de chaîne lipidique, associé au paramètre d'ordre le plus faible, présente le plus de mobilité tandis que les positions 7 à 2, plus proches du squelette glycérol et auxquelles correspondent les  $S^{\text{CD}}$  les plus grands, sont les plus rigides.

Le point important ici est que les paramètres d'ordre associés au DMPC- $^2\text{H}_{54}$  sont plus grands que ceux relatifs au TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  pour les positions 13 à 6: par exemple,  $S^{\text{CD}}$  (position 9) et  $S^{\text{CD}}$  (position 12) sont respectivement plus élevés de 0,035 et 0,056 unités pour le lipide saturé par rapport au lipide biphényle. Ces écarts sont les plus importants pour les positions 11, 12 et 13.

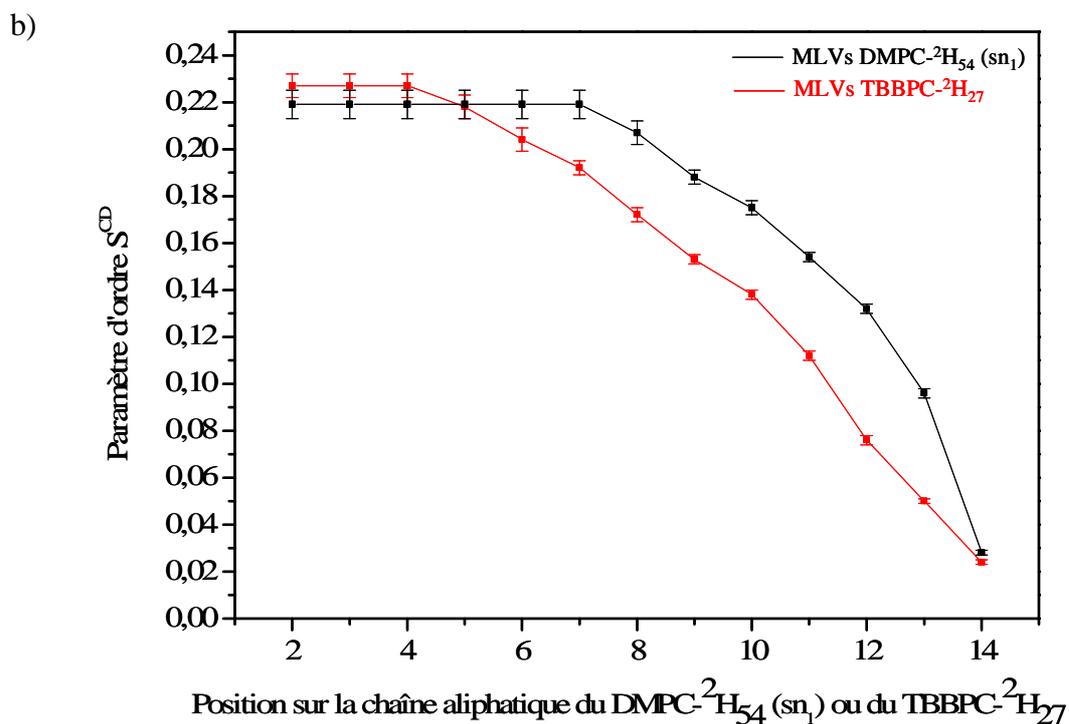
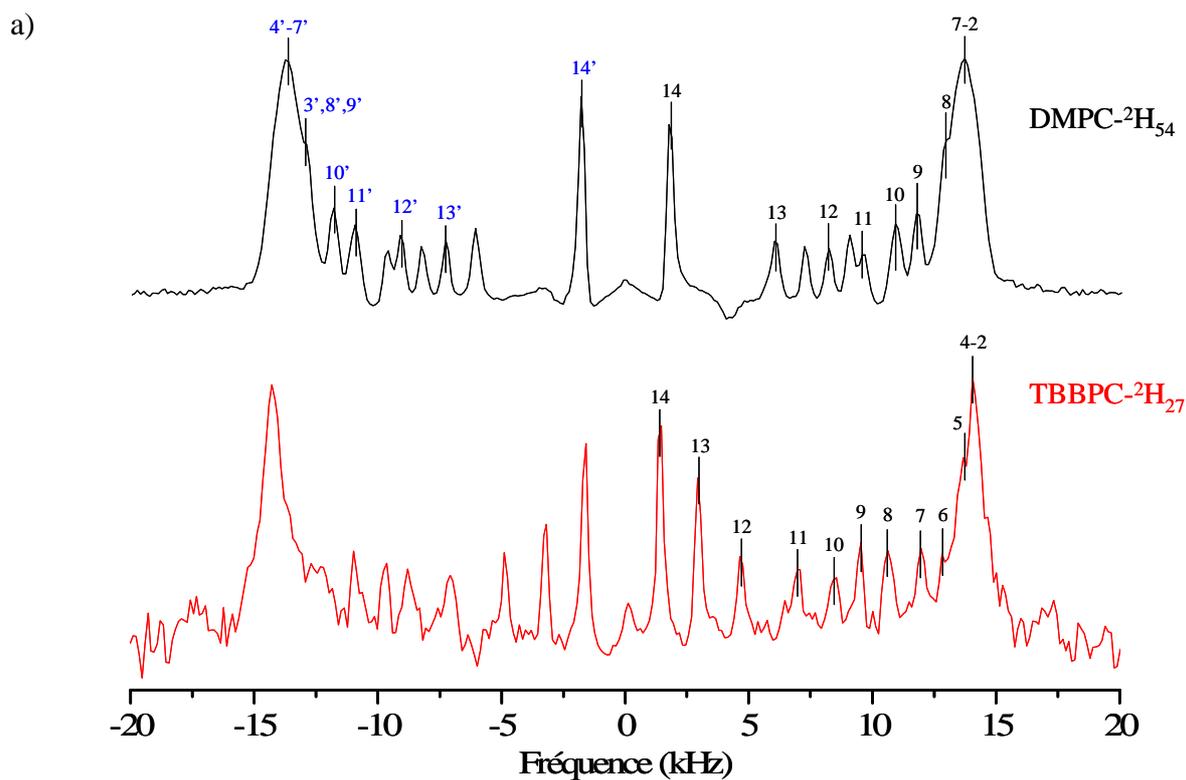


Figure IV.4 : a) Spectres RMN- $^2\text{H}$  (Echo solide) déconvolués associés à des liposomes de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (spectre noir) et TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  (spectre rouge) ( $h=80\%$  dans  $\text{H}_2\text{O}$  dédeutérée) pour une température de  $30^\circ\text{C}$ . Les attributions des pics associés aux positions des  $\text{C}-^2\text{H}_2$  sur les chaînes lipidiques sont indiquées sur les spectres (en noir pour la chaîne  $\text{sn}_1$  et en bleu pour la chaîne  $\text{sn}_2$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$ ), b) Profil d'ordre relatif à la chaîne  $\text{sn}_1$  de chaque système.

Ceci met clairement en évidence une différence de dynamique entre les chaînes aliphatiques des deux lipides, formulés en liposomes à 30°C.

Les groupements C-<sup>2</sup>H<sub>2</sub> des positions 13 à 6 du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> apparaissent plus mobiles que leurs analogues du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>. Les groupes aliphatiques des positions 5 à 2 présentent quant à eux une rigidité équivalente dans les deux systèmes, étant donné les marges d'erreur des mesures. De même, la mobilité du groupement terminal C-<sup>2</sup>H<sub>3</sub> en position 14 est similaire pour les deux lipides.

Il faut noter que les positions 4 à 2 pour TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> et 7 à 2 pour DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> sont qualifiées de positions « plateaux », car on leur attribue la même valeur de S<sup>CD</sup> ; il est en effet impossible de les distinguer sous le pic dont l'éclatement quadrupolaire est le plus grand, ce qui explique des marges d'erreur plus importantes. Ces groupes aliphatiques sont proches du squelette glycérol rigide, ce qui explique qu'ils présentent les S<sup>CD</sup> les plus grands. Le nombre de ces positions « plateaux » est deux fois plus élevé pour le lipide saturé (des positions 2 à 7) que pour celui biphenyle (des positions 2 à 4). Ainsi, pour une température d'analyse commune de 30°C, le caractère rigide du squelette glycérol se fait moins ressentir sur la chaîne lipidique sn<sub>1</sub> du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> que sur celle du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>.

### *c) Résultats pour une température réduite de 30°C*

Nous avons vu au début de ce chapitre que la température de transition de phase du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> était égale à ≈ -4°C ; celle du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> est quant à elle voisine des 20°C. On définit la température réduite comme l'écart (en valeur absolue) entre la température d'analyse et celle de transition de phase du lipide considéré (Cevc, 1983). Dans le cas des expériences précédentes effectuées à 30°C, la température réduite n'est pas la même pour les deux lipides (écart de 30°C pour le TBBPC et de 10°C pour le DMPC). Or il est intéressant de comparer leur dynamique dans les mêmes conditions de températures réduites (par exemple 30°C). Les figures IV.5.a) et b) présentent les spectres RMN-<sup>2</sup>H déconvolués et les profils d'ordre associés à des liposomes de TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> pour T=30°C et de DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> pour T=50°C. On constate tout d'abord que la largeur spectrale est plus petite pour le lipide saturé (≈ 22 600 Hz) que pour celui biphenyle (≈ 28 600 Hz), synonyme d'une dynamique globale du premier lipide plus importante. De même, il est possible de distinguer 8 éclatements quadrupolaires individuels (des positions 14 à 7) à 50°C contre 6 (des positions 14 à 9) à 30°C. Dans ces conditions, la superposition des profils d'ordre des deux systèmes met en évidence un fait intéressant : alors que les paramètres d'ordre associés aux positions 2 à 10 sont plus faibles

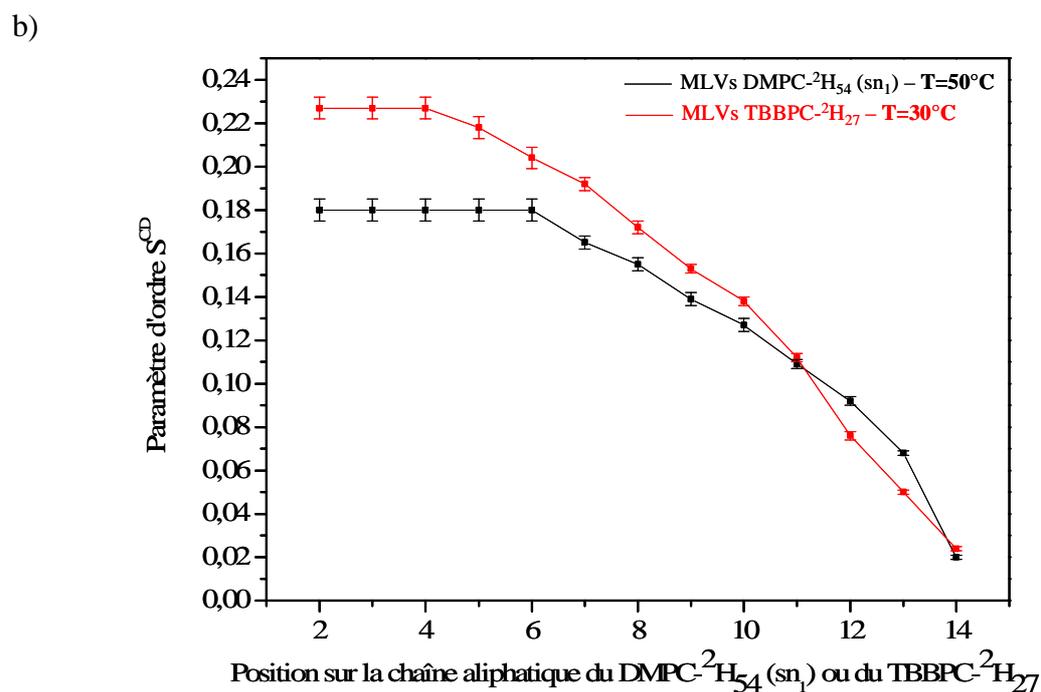
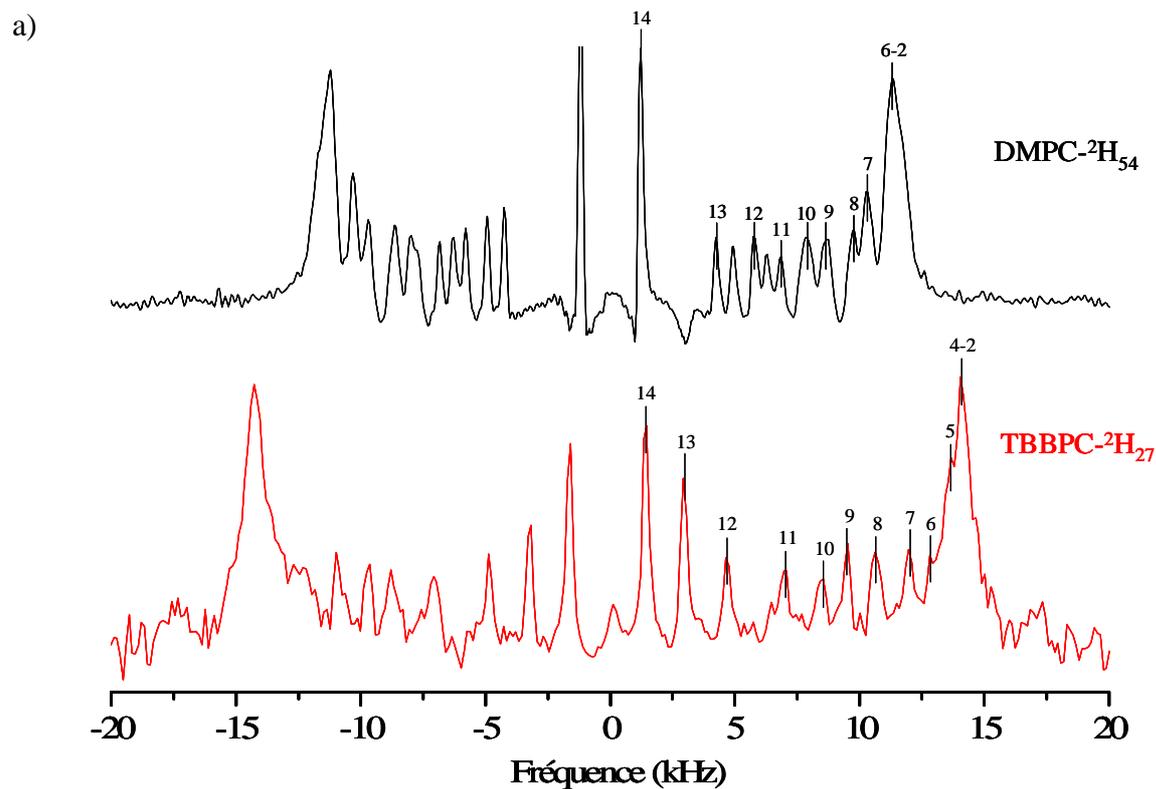


Figure IV.5 : a) Spectres RMN- $^2\text{H}$  (Echo solide) déconvolués associés à des liposomes ( $h=80\%$  dans  $\text{H}_2\text{O}$  dédeutérée) de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (spectre noir) pour  $T=50^\circ\text{C}$  et TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  (spectre rouge) pour  $T=30^\circ\text{C}$ . Les attributions des pics associés aux positions des  $\text{CD}_2$  sur les chaînes lipidiques  $\text{sn}_1$  sont indiquées sur les spectres, b) Profil d'ordre relatif au TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  pour  $T=30^\circ\text{C}$  (courbe rouge) et au DMPC- $^2\text{H}_{54}$  pour  $T=50^\circ\text{C}$  (courbe noire).

pour le DMPC- $^2\text{H}_{54}$  à 50°C (différence de 0,047 unités pour la position 4 et de 0,017 pour la position 8), ceux associés aux positions 12 et 13 sont plus élevées (écart respectifs de 0,016 et 0,018 unités).

Ainsi pour une même température réduite et uniquement pour les C- $^2\text{H}_2$  en position 12 et 13, la mobilité du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  est plus importante que celle du DMPC- $^2\text{H}_{54}$ . Les groupements aliphatiques en positions 11 et 14 présentent quant à eux une dynamique équivalente pour les deux systèmes.

#### IV. 2. 2 Discussion

Nous venons de voir que pour une même température réduite, les groupements aliphatiques des positions 2 à 10 sont plus rigides pour TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  que pour DMPC- $^2\text{H}_{54}$ , formulés en liposomes. Cette augmentation de l'ordre des liaisons C- $^2\text{H}$  de la chaîne  $\text{sn}_1$  du lipide biphényle peut être reliée à la présence des deux cycles phényles sur sa chaîne  $\text{sn}_2$ . Ceux-ci pourraient avoir le même effet d'ordre que le cholestérol, qui est connu pour rigidifier les membranes lipidiques en phase fluide.

L'autre point important est la différence de dynamique significative au niveau des positions 12 et 13 observée entre les deux lipides DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ . En effet, les comparaisons de leurs spectres RMN- $^2\text{H}$  et de leurs profils d'ordre aussi bien pour une température réduite différente qu'identique, montre clairement que ces deux positions sont plus mobiles pour le lipide biphényle que pour le lipide saturé. Ce phénomène est directement relié à la structure même du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  et plus exactement à celle de sa chaîne  $\text{sn}_2$ , qui est formée de trois groupements  $\text{CH}_2$  et des deux cycles phényles.

En se basant sur la structure cristallographique du DMPC (Aussenac et al., 2003), nous avons construit une structure tridimensionnelle possible pour le TBBPC (voir figure IV.6). Il faut préciser qu'il ne s'agit que d'un schéma représentatif et que dans la réalité les chaînes lipidiques sont beaucoup plus flexibles. La structure du squelette glycérol implique que la chaîne  $\text{sn}_2$  des lipides remonte par rapport à celle  $\text{sn}_1$ . Ainsi, le groupement terminal  $\text{CH}_3$  en position 14 sur la chaîne  $\text{sn}_1$  du DMPC est le plus mobile (mouvement supplémentaire de rotation libre), car il subit le moins d'encombrement stérique. Pour le TBBPC, cette configuration montre clairement que la chaîne  $\text{sn}_2$  est plus courte que celle  $\text{sn}_1$ . Comme pour le groupement terminal de la chaîne  $\text{sn}_1$  du DMPC, les groupes aliphatiques en position 12 et 13 sur la chaîne  $\text{sn}_1$  du lipide biphényle n'ont donc pas de voisins à proximité, ce qui explique leur mobilité supplémentaire.

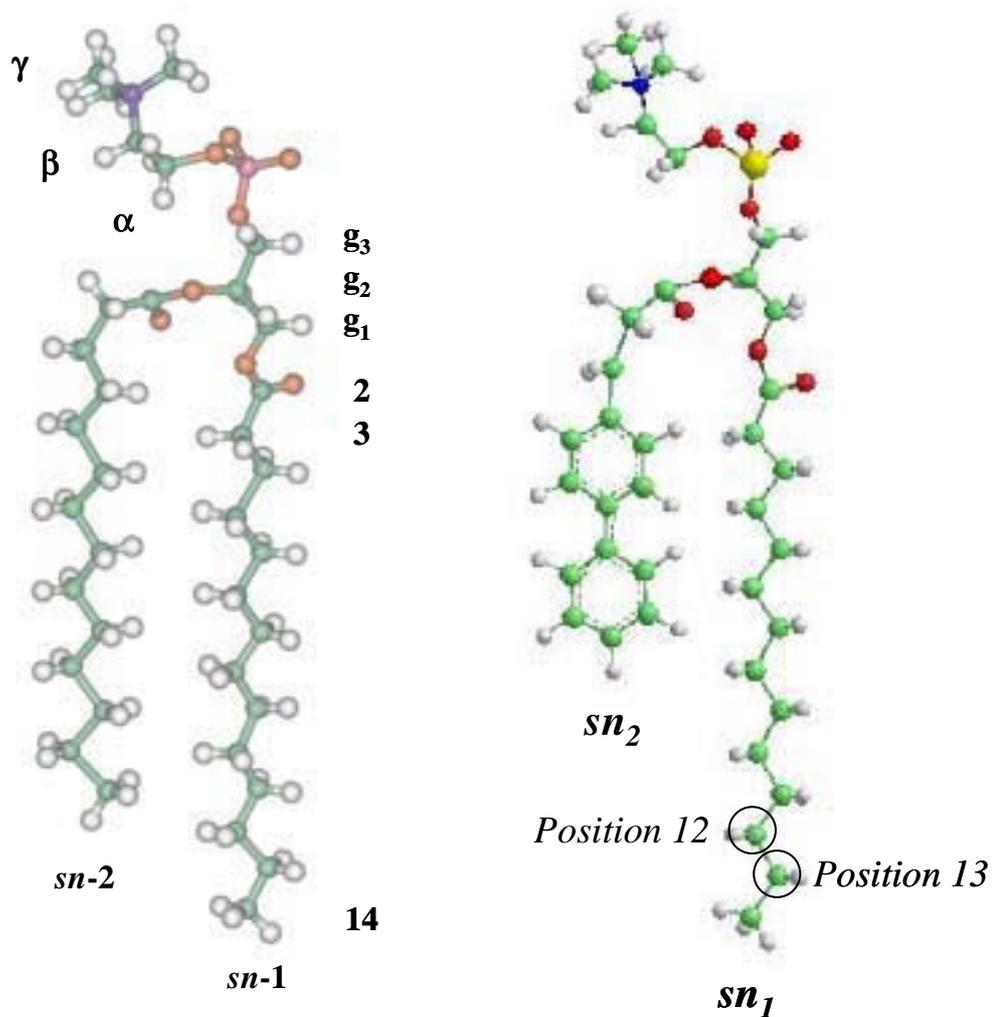


Figure IV.6 : Structure tridimensionnelle des lipides DMPC et TBBPC permettant de comparer les longueurs de chaînes  $sn_1$  et  $sn_2$  de chaque lipide ; les positions 12 et 13 de la chaîne  $sn_1$  du lipide biphényle sont indiquées.

Il serait intéressant d'étudier la molécule de TBBPC en dynamique moléculaire comme ce qui a été fait pour le DMPC dans les bicelles DMPC/DCPC par Aussenac et al. (Aussenac et al., 2003) ; on pourrait ainsi connaître plus exactement la configuration spatiale du TBBPC et confirmer la différence de longueur entre ses chaînes  $sn_1$  et  $sn_2$ .

La structure particulière de la chaîne  $sn_2$  du TBBPC induit donc simultanément deux effets opposés sur la dynamique de la chaîne  $sn_1$  deutérée du même lipide : d'un côté, les cycles phényles jouent le rôle du cholestérol en augmentant la rigidité des groupes aliphatiques sur la chaîne  $sn_1$  en face d'eux (des positions 2 à 10), de l'autre côté, la longueur plus courte de la chaîne  $sn_2$  entraîne une mobilité plus importante des groupes terminaux (12 et 13) de la chaîne  $sn_1$ .

#### IV. 2. 3 Estimation de la longueur des chaînes aliphatiques

A partir de l'idée de Schindler et Seelig (Schindler et Seelig, 1975), Douliez a proposé une méthode permettant de calculer les épaisseurs hydrophobes dans les membranes à partir des paramètres d'ordre  $S^{CD}$  des chaînes lipidiques (Douliez et al., 1995). Le principe est de relier  $S^{CD}$  au paramètre d'ordre des liaisons C-C ( $S^{CC}$ ), et de faire la somme de toutes les longueurs moyennes des liaisons C-C de la chaîne aliphatique, projetées sur la normale à la bicouche.

Ainsi, la longueur moyenne d'une chaîne lipidique ayant un nombre pair de carbone s'exprime :

$$\langle L_{chaîne} \rangle = \frac{1 + \sqrt{1 + 8S_{mol}^{CD}}}{4} \langle l_{C_n-D} \rangle + 1,25 \left( \frac{1}{2} + \frac{S_n^{CC}}{S_{mol}^{CC}} + \sum_{m=1}^{n/2-1} \left( 1 + \frac{S_{2m}^{CD}}{S_{mol}^{CD}} \right) \right) \quad (IV.1)$$

où  $S_{mol}$  est le paramètre d'ordre moléculaire que nous prenons égal à 1 (Douliez et al. ont montré que cette approximation ne conduit qu'à une faible erreur  $\approx 4\%$ ) ;  $\langle l_{C_n-D} \rangle$  représente la contribution de la liaison  $C_n-D$  du méthyle terminal qui est estimée à  $1,09 \cos(35,25^\circ)$  Å. Le paramètre d'ordre  $S_n^{CC}$  peut être calculé en considérant que le groupe méthyle terminal  $C_nD_3$  est animé d'un mouvement de rotation à symétrie axiale autour de la liaison  $C_{n-1}-C_n$  ; une transformation de coordonnées de la liaison  $C_n-D$  à  $C_{n-1}-C_n$  conduit alors à :

$$S_n^{CD} = \frac{3\cos^2(111^\circ) - 1}{2} S_n^{CC} \quad (IV.2)$$

D'après le tableau IV.2, répertoriant les valeurs des paramètres d'ordre  $S^{CD}$  pour les lipides TBBPC- $^2H_{27}$  à 30°C et DMPC- $^2H_{54}$  à 30°C et 50°C, formulés en liposomes, et les équations (IV.1) et (IV.2), on calcule les longueurs des chaînes hydrophobes  $sn_1$  suivantes :

|   | TBBPC- $^2H_{27}$ ,<br>T=30°C | DMPC- $^2H_{54}$ ,<br>T=30°C | DMPC- $^2H_{54}$ ,<br>T=50°C |
|---|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Longueur de la chaîne aliphatique $sn_1$ (en Å) | <b>10,2</b>                   | <b>10,4</b>                  | <b>10,1</b>                  |

Tableau IV.1 : Estimation de la longueur moyenne de la chaîne aliphatique  $sn_1$  (en Å) du TBBPC- $^2H_{27}$  à 30°C et du DMPC- $^2H_{54}$  à 30°C et 50°C, formulés en liposomes. La précision est de  $\pm 0,05$  Å.

On constate que pour une même température réduite (T=30°C pour TBBPC- $^2H_{27}$  et T=50°C pour DMPC- $^2H_{54}$ ), la longueur des chaînes  $sn_1$  en  $C_{14}$  des deux lipides est équivalente, même si celle calculée pour le lipide saturé est légèrement plus courte que celle du lipide biphényle. Par contre, pour une température d'analyse commune de 30°C, la chaîne  $sn_1$  en  $C_{14}$  du TBBPC- $^2H_{27}$  est plus courte que celle  $sn_1$  en  $C_{14}$  du DMPC- $^2H_{54}$  (de 0,2 Å) ; cet écart est significatif sachant que la flexibilité d'une chaîne dépend de sa longueur au carré. Ainsi pour un même nombre de groupements aliphatiques, la chaîne  $sn_1$  du lipide biphényle a tendance à davantage se replier sur elle-même que celle du lipide saturé. Cette plus grande flexibilité est directement reliée à la mobilité supérieure des C- $^2H_2$  en position 12 et 13 du TBBPC- $^2H_{27}$  par rapport à ceux du DMPC- $^2H_{54}$ , mis en évidence précédemment par RMN- $^2H$ . La longueur plus courte de la chaîne  $sn_2$  du lipide biphényle par rapport à celui saturé influe sur la dynamique de la chaîne  $sn_1$  et donc sur sa longueur.

| Positions des CD <sub>2</sub> sur la chaîne aliphatique | S <sup>CD</sup> (TBBPC- <sup>2</sup> H <sub>27</sub> )<br>T=30°C | S <sup>CD</sup> DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub><br>T=30°C | S <sup>CD</sup> DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub><br>T=50°C |
|---|--|--|--|
| <b>2</b>  | 0,227±0,005  | 0,219±0,006  | 0,18±0,005   |
| <b>3</b>  | 0,227±0,005  | 0,219±0,006  | 0,18±0,005   |
| <b>4</b>  | 0,227±0,005  | 0,219±0,006  | 0,18±0,005   |
| <b>5</b>  | 0,218±0,005  | 0,219±0,006  | 0,18±0,005   |
| <b>6</b>  | 0,204±0,005  | 0,219±0,006  | 0,18±0,005   |
| <b>7</b>  | 0,192±0,003  | 0,219±0,006  | 0,165±0,003  |
| <b>8</b>  | 0,172±0,003  | 0,207±0,005  | 0,155±0,003  |
| <b>9</b>  | 0,153±0,002  | 0,188±0,003  | 0,139±0,003  |
| <b>10</b>   | 0,138±0,002  | 0,175±0,003  | 0,127±0,003  |
| <b>11</b>   | 0,112±0,002  | 0,154±0,002  | 0,109±0,002  |
| <b>12</b>   | 0,076±0,002  | 0,132±0,002  | 0,092±0,002  |
| <b>13</b>   | 0,05±0,001   | 0,096±0,002  | 0,068±0,001  |
| <b>14</b>   | 0,024±0,001  | 0,028±0,001  | 0,02±0,001   |

Tableau IV.2 : Valeurs des paramètres d'ordre  $S^{CD}$  associés aux groupements aliphatiques des chaînes lipidiques du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> à 30°C et du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> à 30°C et 50°C, formulés en liposomes.

### IV.3 Déformation des liposomes de TBBPC sous un champ magnétique

#### IV. 3. 1 Caractérisation par RMN $^{31}\text{P}$

##### a) Résultats

Des Vésicules MultiLamellaires (MLVs) du lipide TBBPC ont été préparées avec une hydratation de 90% dans  $\text{H}_2\text{O}$  contenant 100 mM de NaCl, et analysées séparément par RMN- $^{31}\text{P}$  sur trois spectromètres, dont l'intensité du champ magnétique  $B_0$  est respectivement égale à 7,1 T (Tesla), 9,4 T et 11,7 T.

Les spectres en phosphore obtenus sont présentés figure IV.7 :

- pour  $\omega_0^{31P} = 121,4$  MHz, le spectre de poudre observé caractérise une phase lipidique non orientée en phase fluide dont la distribution est sphérique; l'épaulement le plus intense correspond à l'orientation la plus probable  $\beta = 90^\circ$  et celui le plus faible à  $\beta = 0^\circ$  (voir chapitre II.1).

- pour  $\omega_0^{31P} = 161,9$  MHz, le signal relatif à  $\beta = 0^\circ$  devient plus intense et celui associé à  $\beta = 90^\circ$  diminue légèrement. Cet effet est encore plus prononcé lorsque les vésicules sont placées dans un champ magnétique où  $\omega_0^{31P} = 202,3$  MHz.

Il faut préciser que le facteur temps n'influe pas sur la forme spectrale obtenue ; en effet, après une nuit dans le champ magnétique, le spectre phosphore est toujours le même.

Ces expériences ont également été réalisées avec des vésicules unilamellaires (LUV) de TBBPC, de diamètre 400 nm et 800 nm, préparées par extrusion. Dans les deux cas, aucune déformation du spectre RMN- $^{31}\text{P}$  n'est observée, on retrouve le spectre phosphore d'une phase lamellaire non orientée adoptant une distribution sphérique. Seuls les gros objets, dont la dimension est supérieure à 1  $\mu\text{m}$  tels que les MLVs, subissent l'influence du champ magnétique.

Ainsi, à partir  $\approx 9,4$  Tesla, plus la force du champ magnétique augmente, plus le spectre RMN- $^{31}\text{P}$  évolue vers une situation où l'orientation telle que la normale à la bicouche soit parallèle à  $B_0$ , concurrence celle où la normale est perpendiculaire à  $B_0$ . Ce phénomène est attribuable à une déformation ellipsoïdale des vésicules sous le champ magnétique comme l'ont montré Pott et al. (Pott et Dufourc, 1995) ; (Reinl et al., 1992) dans le cas de vésicules de DPPC/Cholestérol contenant 20% en mole de Méliittine.

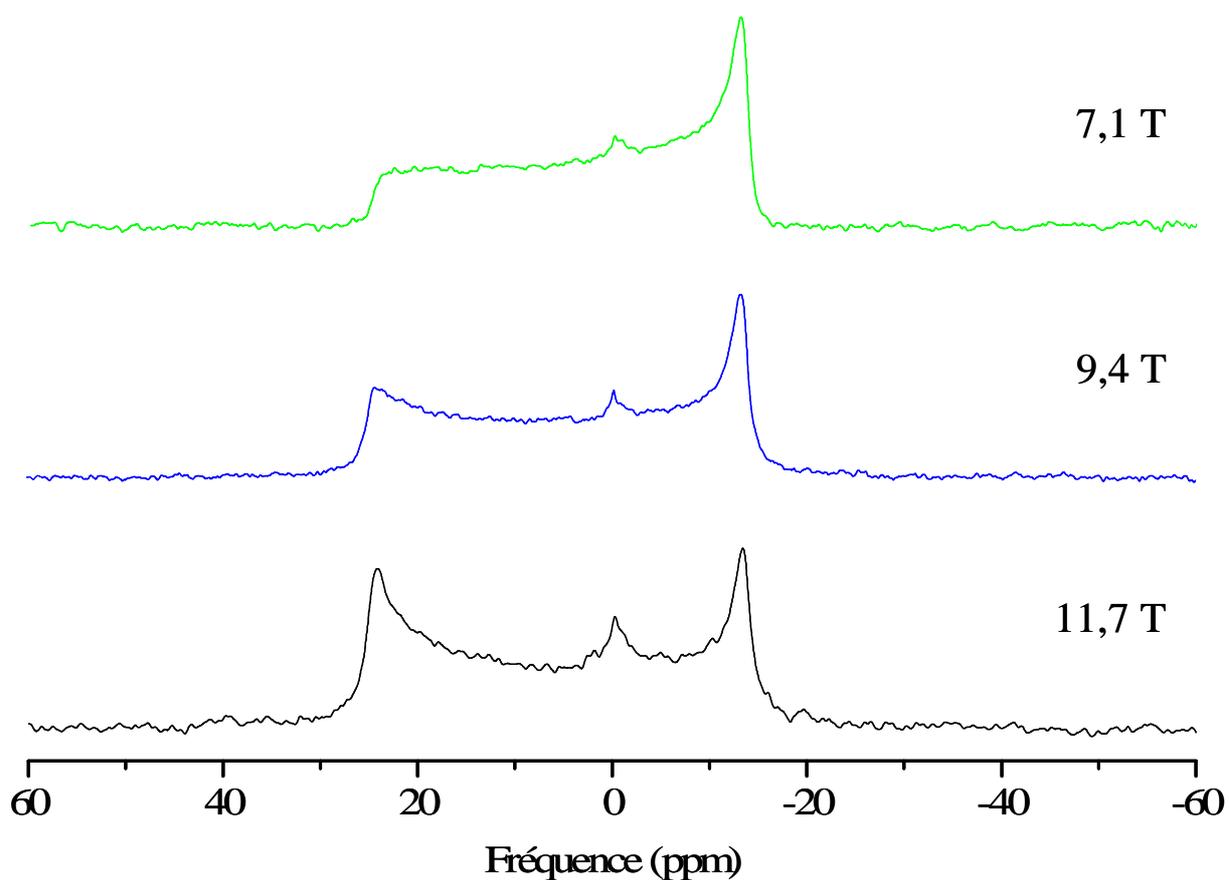


Figure IV.7 : Spectres RMN- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons), de liposomes de TBBPC ( $h=90\%$  dans  $\text{H}_2\text{O}$  avec 100 mM de NaCl,  $T=25^\circ\text{C}$ ) en fonction de la valeur du champ magnétique (indiquée sur la droite en MHz). Chaque spectre est le résultat de 512 scans.

D'après Pott et al., la probabilité d'avoir une organisation des lipides en ellipse peut s'écrire :

$$P(\beta)d\beta \propto \frac{\sin \beta}{[\sin^2 \beta + (c/a)^2 \cos^2 \beta]^2} d\beta$$

où  $\beta$  est l'angle entre la normale à la bicouche des lipides et le champ magnétique, et  $c$  et  $a$  représentent les demi-axes de l'ellipse.

#### *b) Simulations de spectres phosphores*

La figure IV.8.a) présente des simulations de spectres RMN-<sup>31</sup>P (effectuées à l'aide d'un programme en FORTRAN, mis au point par Erick J. Dufourc), pour trois différentes valeurs du rapport  $c/a$  :

- lorsque les deux dimensions  $c$  et  $a$  sont égales, on retrouve le spectre de poudre caractéristique de liposomes non orientés en phase fluide, adoptant une distribution sphérique avec l'orientation privilégiée  $\beta=90^\circ$ ,

- lorsque la dimension verticale  $c$  est supérieure à celle horizontale  $a$  ( $c/a=2$  pour le cas présenté), les vésicules s'allongent verticalement de telle sorte qu'un maximum de molécules est orienté perpendiculairement au champ magnétique ; le signal correspondant à l'orientation  $\beta=90^\circ$  par rapport  $B_0$  est donc largement majoritaire sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P. Les vésicules adoptant ce type de déformation ellipsoïdale sont qualifiées de prolates.

- à l'inverse, lorsque la dimension verticale  $c$ , est inférieure à celle horizontale  $a$  ( $c/a=0,5$  pour le cas présenté) ; les vésicules s'allongent horizontalement de telle sorte qu'un maximum de molécules est orienté parallèlement au champ magnétique ; le signal correspondant à l'orientation  $\beta=0^\circ$  par rapport  $B_0$  est alors le plus intense sur le spectre RMN-<sup>31</sup>P. Cette déformation ellipsoïdale des vésicules est dite en oblate.

La figure IV.8.b) compare le spectre expérimental obtenu pour les liposomes de TBBPC avec un champ magnétique de 11,74 T et un spectre simulé avec le même programme que précédemment. Une adéquation entre l'expérience et la théorie est rencontrée pour un rapport  $c/a \approx 0,6$  et une largeur de raie Lorentzienne de 1000 Hz. Le demi-axe  $c$  étant inférieur au demi-axe  $a$ , la déformation des vésicules de TBBPC observée sous un champ magnétique est de type oblate et cette déformation s'accroît avec l'intensité du champ magnétique.

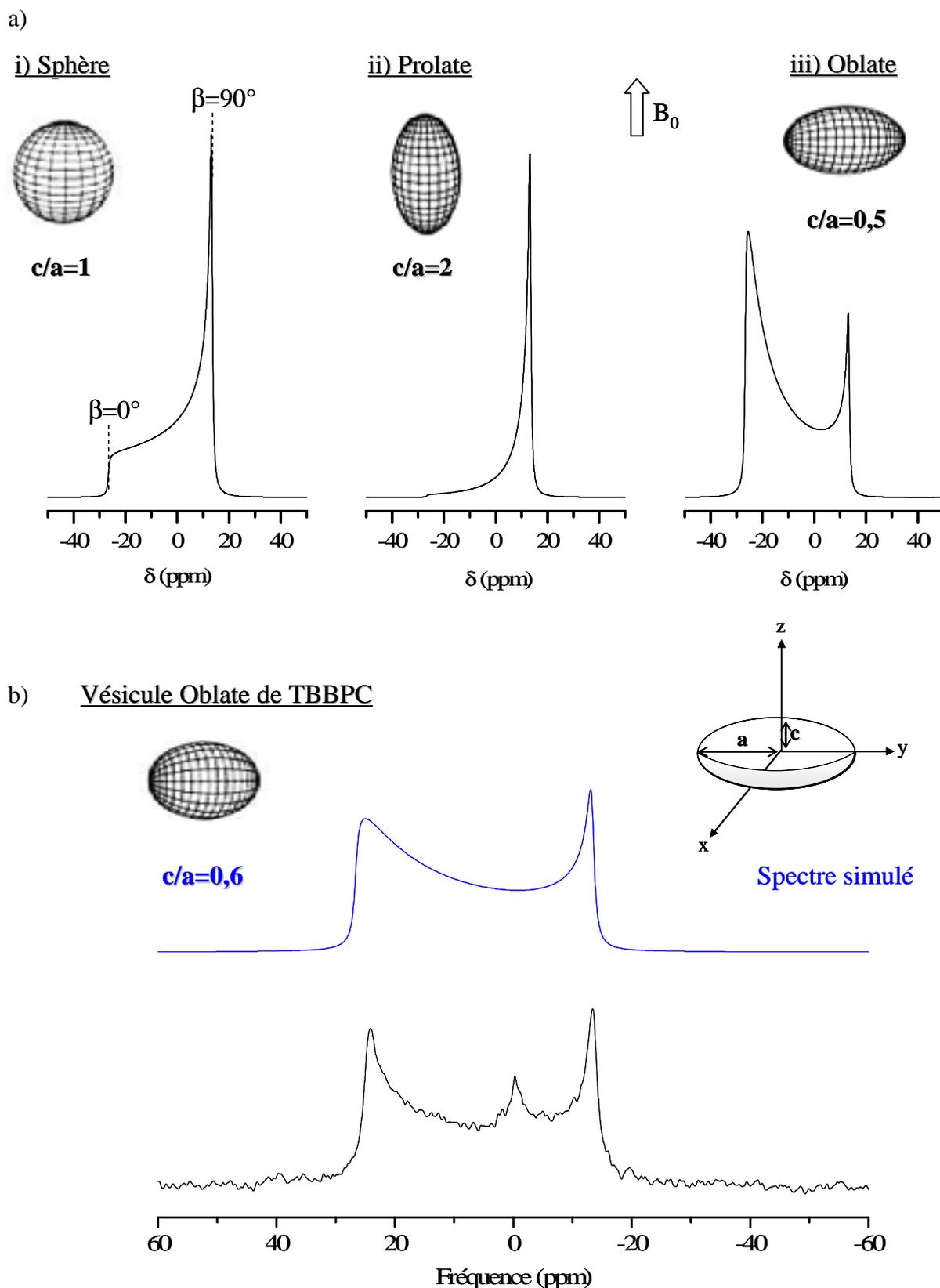


Figure IV.8 : a) Spectres RMN- $^{31}P$  simulés associés à une vésicule de type i) sphérique ( $c/a=1$ ), ii) prolate ( $c/a=2$ ) et iii) oblate ( $c/a=0,5$ ) b) Comparaison entre le spectre RMN- $^{31}P$  expérimental des liposomes MLVs de TBBPC ( $h=90\%$ ) obtenu avec un champ magnétique de 11,74 Tesla et un spectre simulé avec  $c/a=0.6$  et une largeur de raie Lorentzienne de 1000 Hz.

IV. 3. 2 Discussion

Des vésicules MLVs de TBBPC ( $> 1 \mu\text{m}$ ) se déforment donc de manière spontanée et constante en oblates dans un champ magnétique dont l'intensité est supérieure ou égale à 9,4 T. Ce phénomène est directement relié à l'anisotropie de susceptibilité magnétique positive des deux cycles phényles du TBBPC qui induit une orientation privilégiée de la molécule parallèle au champ magnétique. Ainsi, les liposomes de TBBPC vont avoir tendance à s'aplatir pour favoriser un nombre maximal de lipides avec l'orientation  $\beta=0^\circ\text{C}$  (voir figure IV.9). Il est intéressant de noter que cet effet n'est observé que pour des gros objets ayant suffisamment d'excès de surface pour accepter la déformation en oblate ; ce n'est pas le cas des liposomes unilamellaires, dont le diamètre est inférieur ou égal à 800 nm, qui sont soumis à des contraintes de surface trop importantes.

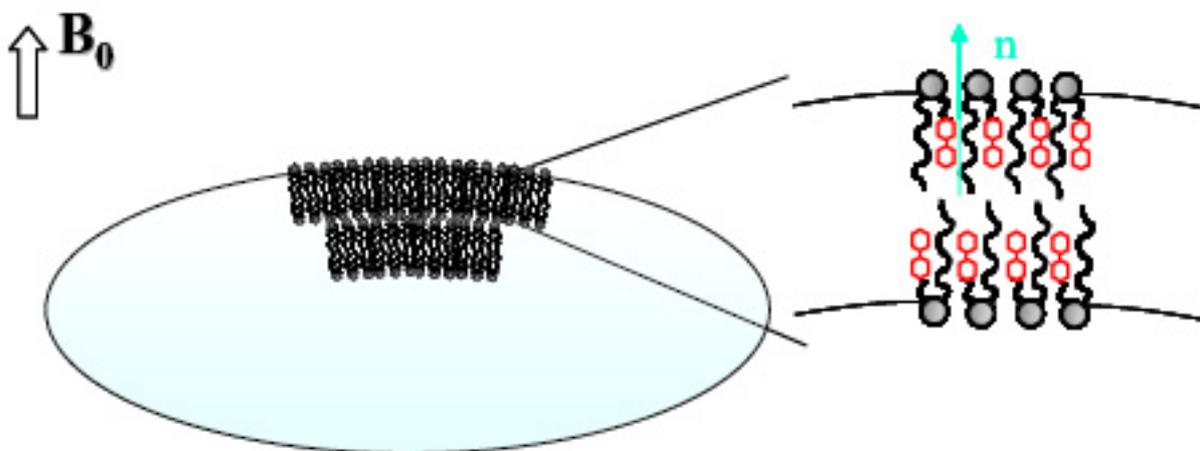


Figure IV.9 : Schéma représentatif des vésicules de TBBPC déformées en oblates sous un champ magnétique supérieur ou égal à 9,4 T.

## Conclusion

La structure du lipide TBBPC, et plus exactement la présence de l'unité biphényle sur sa chaîne sn<sub>2</sub>, influe directement sur ses propriétés physico-chimiques : tout d'abord, le caractère « insaturé » des deux cycles fait diminuer la température de transition de phase du lipide, estimée autour de  $-4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  par RMN des Solides  $^{31}\text{P}$  et  $^2\text{H}$ . Cette même unité biphényle augmente la rigidité des groupements aliphatiques proches du squelette glycérol sur la chaîne sn<sub>1</sub> du TBBPC. A l'inverse, la longueur plus courte de la chaîne sn<sub>2</sub> du lipide biphényle entraîne une mobilité plus importante des groupements aliphatiques terminaux de sa chaîne sn<sub>1</sub>, ce qui a été clairement caractérisé par RMN- $^2\text{H}$ . Enfin, les cycles phényles impliquent une anisotropie de susceptibilité magnétique positive de la molécule, qui est à l'origine de la déformation en oblate des vésicules MLVs de TBBPC, sous un champ magnétique d'au moins 9,4 Tesla.

Nous allons maintenant étudier les applications et implications du lipide TBBPC dans la formation de modèles membranaires de type bicelle.

## CHAPITRE V

# Caractérisation physico-chimique des Bicelles TBBPC/DCPC

Les deux prochains chapitres ont donné lieu a une publication : Loudet, C. ; Manet, S. ; Gineste, S. ; Oda, R. ; Achard, M. F. ; Dufourc, E.J. « Biphenyl Bicelle Membranes : Synthesis,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$  Solid State NMR, Electron Microscopy and SAXS », *accepté au Biophysical Journal en Décembre 2006.*



Ce chapitre est consacré à l'étude physico-chimique du système TBBPC/DCPC, via la combinaison de plusieurs méthodes d'analyse. Cette approche nous permettra de confirmer des résultats ou d'obtenir des informations complémentaires ou spécifiques de la technique employée. Ainsi, la Résonance Magnétique Nucléaire des Solides du phosphore sera largement employée pour caractériser l'orientation spécifique des bicelles TBBPC/DCPC dans un champ magnétique et établir les diagrammes température-composition lipidique et température-hydratation du système binaire. La dynamique de ces nouvelles bicelles et l'organisation de l'eau les entourant, seront estimées par RMN du deutérium. La microscopie électronique à transmission nous permettra quant à elle, de visualiser les objets bicellaires et de déterminer statistiquement leur taille. Enfin, la diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) confirmera la structure et l'orientation spécifique dans  $B_0$  des bicelles TBBPC/DCPC et nous donnera des indications sur les distances inter-particules en solution.

## V.1 Caractérisation des Bicelles TBBPC/DCPC par RMN des Solides $^{31}\text{P}$

### V.1.1 Spectres RMN $^{31}\text{P}$ du mélange binaire TBBPC/DCPC

Dans la suite de ce travail, nous emploierons le terme de « phase » pour qualifier un changement de polymorphisme lipidique détecté par RMN, ce qui ne correspond pas nécessairement à la définition de Gibbs d'une phase thermodynamique.

*a) En fonction de la température  $T$  et de la composition lipidique  $X$ .*

Plusieurs échantillons du mélange binaire TBBPC/DCPC, ont été préparés dans  $\text{D}_2\text{O}$  en présence de 100 mM de NaCl et pour une hydratation ( $h = (\text{masse des lipides}) / (\text{masse des lipides} + \text{eau})$ ) de 80%, en faisant varier la composition lipidique  $X = [\text{TBBPC}] / [\text{TBBPC} + \text{DCPC}]$  de 80% à 95% et la température  $T$  de  $0^\circ\text{C}$  à  $80^\circ\text{C}$ .

Les différents spectres RMN  $^{31}\text{P}$  obtenus sont présentés en figure V.1 ; certains sont caractéristiques d'une seule phase lipidique, d'autres d'un mélange de phases :

- pour des températures  $T \geq 40^\circ\text{C}$  et  $X = 80\%$ , un seul pic fin est détecté à 0,09 ppm, ce qui est proche du déplacement chimique isotrope de la phosphatidylcholine. Ce signal est lié à la présence d'objets de petite taille, considérés comme isotropes (micelles ou très petites bicelles) ; leur cinétique de réorientation est suffisamment rapide pour moyenniser totalement les interactions anisotropes de déplacement chimique du phosphore.

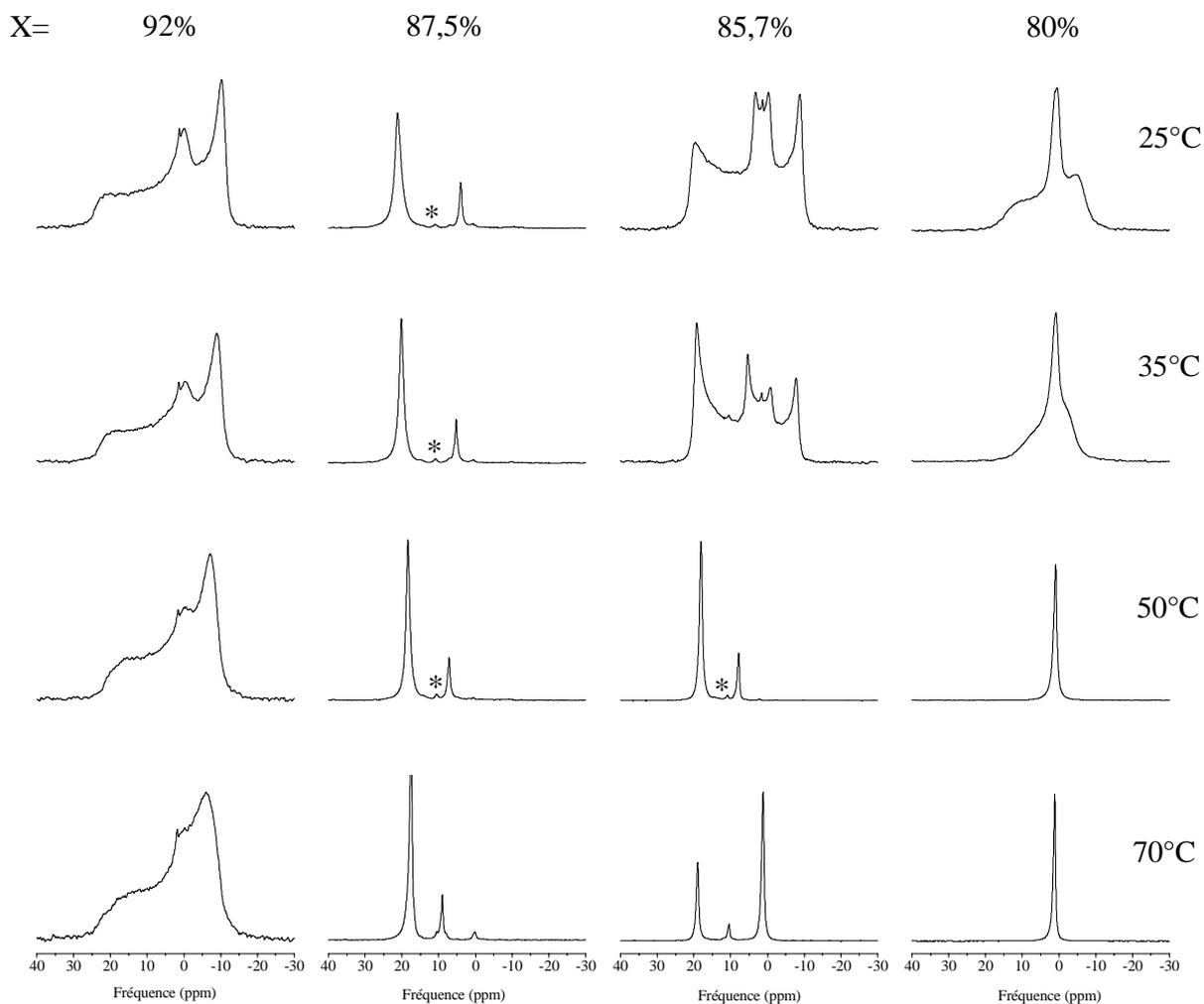


Figure V.1 : Spectres RMN des solides  $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large-bande des protons) du système binaire TBBPC/DCPC pour une hydratation de 80% dans  $\text{D}_2\text{O}$  (contenant 100 mM de NaCl). Les fractions molaires  $X = [\text{TBBPC}]/[\text{TBBPC} + \text{DCPC}]$  sont indiquées au-dessus des spectres et les températures sur la droite. Chaque spectre est le résultat de 350 scans.

- plusieurs spectres présentent un signal constitué de deux pics fins, respectivement à  $\approx 20$  ppm et  $\approx 5$  ppm, à température ambiante (pour  $X=85,7\%$  et  $T=50^\circ\text{C}$ , et pour  $X=87,5\%$  et  $T$  variant de  $25^\circ\text{C}$  à  $70^\circ\text{C}$ ). Ce spectre très spécifique est la signature des bicelles dont la normale  $n$  s'oriente parallèlement au champ magnétique  $B_0$ . Le pic le plus intense est assigné aux phospholipides situés dans la partie plane du disque, dont l'axe directeur est parallèle à  $B_0$ , (en majorité TBBPC) et le pic le moins intense résulte de la diffusion rapide des lipides dans le tore du disque bicellaire (essentiellement DCPC). Il faut souligner que pour  $X=87,5\%$ , plus la température augmente de  $10^\circ\text{C}$  à  $70^\circ\text{C}$ , plus l'écart entre les deux pics est faible et plus les raies sont fines. Cette diminution de la largeur des signaux avec la température est synonyme d'une meilleure orientation du système dans le champ magnétique (Arnold et al., 2002).

- pour  $X=85,7\%$  et  $T=70^\circ\text{C}$ , les bicelles coexistent avec une phase isotrope, centrée sur  $0,09$  ppm.

- pour  $X \geq 92\%$  et  $T$  variant de  $25^\circ\text{C}$  à  $70^\circ\text{C}$  ainsi que pour  $X=80\%$  et  $T=25^\circ\text{C}$  ou  $35^\circ\text{C}$ , un spectre résultant de la superposition d'une phase isotrope et d'un spectre de poudre à symétrie axiale est observé (à  $25^\circ\text{C}$ ,  $\Delta\sigma = 17,5$  ppm pour  $X=80\%$  et  $\Delta\sigma = 33$  ppm pour  $X=92\%$ ). Comme on l'a vu en partie II, ce large spectre est caractéristique d'une phase lipidique lamellaire non orientée.

- pour  $X=85,7\%$  et  $T \leq 35^\circ\text{C}$ , les formes spectrales observées sont complexes car elles peuvent correspondre à plusieurs organisations lipidiques, parmi lesquelles des micelles géantes (tubes orientés à  $90^\circ$  par rapport à  $B_0$ ), associées à une distribution cylindrique des lipides (voir la théorie chapitre II), et des vésicules se déformant en « oblates » sous le champ magnétique (voir chapitre IV). Ces formes spectrales seront explicitées plus en détails au chapitre VII (partie VII.2), à l'aide de simulations de spectres phosphore.

*b) En fonction de la température  $T$  et de l'hydratation  $h$ .*

Sur le même principe que précédemment, plusieurs échantillons du mélange binaire TBBPC/DCPC, ont été préparés dans  $D_2O$  en présence de  $100$  mM de NaCl et pour une composition lipidique  $X=85,7\%$ , en faisant varier cette fois l'hydratation de  $70\%$  à  $95\%$  et la température  $T$  de  $0^\circ\text{C}$  à  $80^\circ\text{C}$ . On retrouve les différents types de spectres évoqués au paragraphe précédent (figure V.2) :

- entre  $10^\circ\text{C}$  et  $50^\circ\text{C}$  et pour des hydratations variant de  $70\%$  à  $90\%$ , le spectre caractéristique des bicelles s'orientant avec leur normale  $n$ , parallèle au champ magnétique  $B_0$ , est observé,

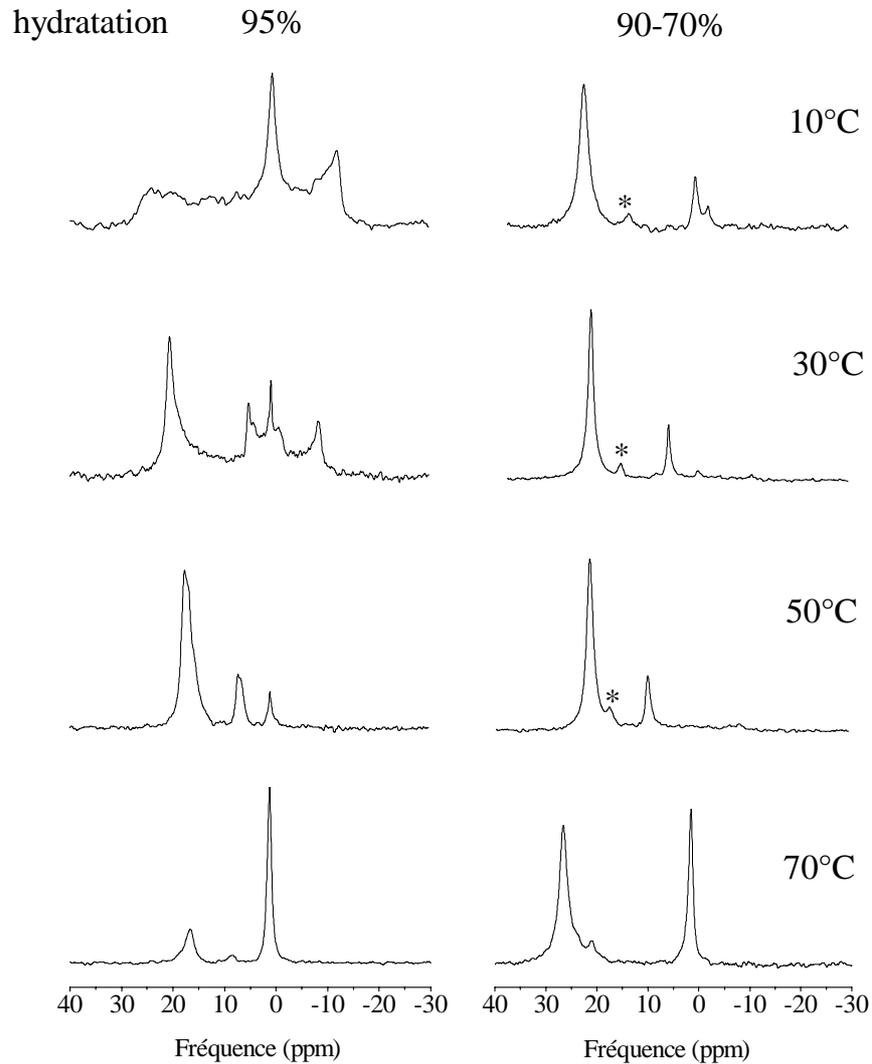


Figure V.2 : Spectres RMN des solides  $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large-bande des protons) du système binaire TBBPC/DCPC dans  $\text{D}_2\text{O}$  (contenant 100 mM de NaCl) pour une composition lipidique  $X=85,7\%$ . Les hydratations  $h$ , sont indiquées au-dessus des spectres et les températures sur la droite. Chaque spectre est le résultat de 350 scans.

- pour une hydratation de 95% et des températures de 50°C à 70°C, ces bicelles coexistent avec une phase isotrope,
- les autres spectres résultent de la combinaison de plusieurs phases (isotrope, lamellaire et bicellaire). Par exemple, pour T=70°C et une hydratation variant de 70% à 90%, une phase isotrope est détectée en même temps qu'une phase lamellaire dont la normale est orientée majoritairement parallèle à B<sub>0</sub>.

Remarque : on note la présence de pics minoritaires sur certains spectres (signalés par une astérisques) que Tan et al. (Tan et al., 2002) avaient également observés et attribués à des impuretés.

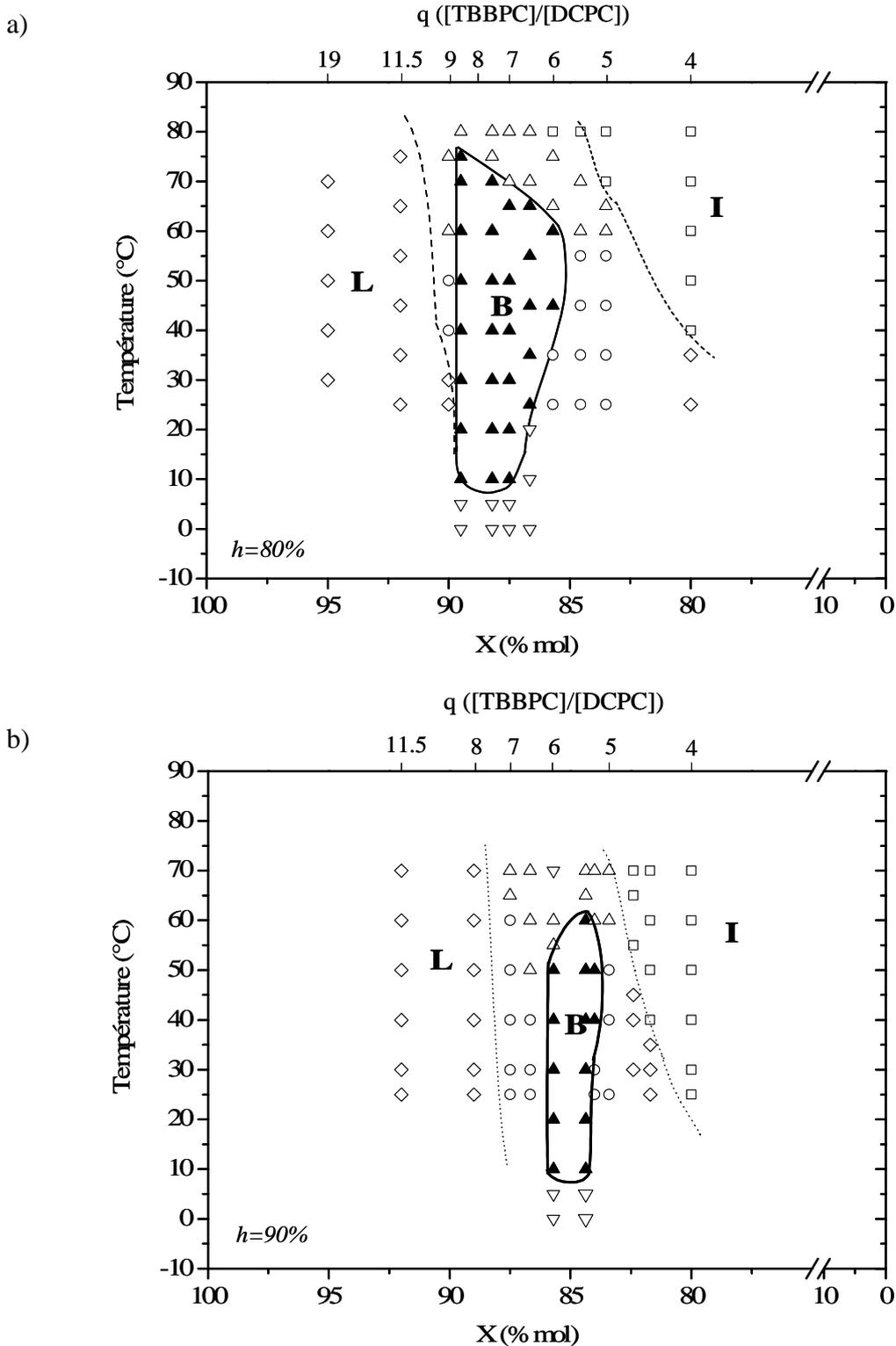
### V.1.2 Diagrammes température-composition-hydratation du système TBBPC/DCPC

Suivant le principe de Raffard et al. (Raffard et al., 2000) et Aussenac et al. (Aussenac et al., 2005), les spectres RMN <sup>31</sup>P précédents ont été utilisés pour construire les diagrammes température-composition lipidique et température-hydratation du système binaire TBBPC/DCPC, afin de déterminer les domaines pour lesquels les bicelles TBBPC/DCPC s'orientent dans le champ magnétique.

#### a) *Diagrammes température-composition lipidique*

Les diagrammes température-composition lipidique ont été établis pour deux conditions différentes d'hydratation, h=80% (figure V.3.a)) et h=90% (figure V.3.b)) :

Les domaines où une seule phase lipidique est détectée sont indiqués par les lettres **I** pour une phase isotrope (micelles mixtes ou petites bicelles, symbolisé sur le graphe par ) , **B** pour les bicelles orientées magnétiquement (symbole ) et **L** pour une phase lamellaire non orientée (symbole ). Le domaine d'existence des bicelles orientées est délimité pour améliorer sa visibilité. On constate que ces bicelles existent sur une large gamme de température (de 10°C à 70°C pour h=80% et de 10°C à 60°C pour h=90%) pour une échelle en composition lipidique petite (entre 85,7% et 88,9% pour h=80% et entre 84% et 86% pour h=90%). En augmentant l'hydratation de l'échantillon, le domaine d'existence des bicelles orientées dans B<sub>0</sub> est légèrement réduit et décalé vers des fractions molaires X, en lipides à chaînes longues, plus faibles.



Figures V.3 : Diagrammes température-composition lipidique du système binaire TBBPC/DCPC pour a) 80% d'hydratation et b) 90% d'hydratation :  $\blacklozenge$  symbolise les bicelles TBBPC/DCPC qui s'orientent dans  $B_0$ ,  $\blacktriangle$  correspond à une phase isotrope,  $\blacktriangle$  à une phase lamellaire ;  $\blacktriangledown$  symbolise la coexistence d'une phase isotrope avec une phase lamellaire orientée et  $\blacklozenge$  celle d'une phase isotrope avec des bicelles ;  $\blacklozenge$  correspond à une phase mixte à symétrie cylindrique.

Pour les deux conditions d'hydratation, le domaine d'existence des bicelles est entouré par un domaine isotrope pour des compositions riches en DCPC et par un domaine lamellaire non orienté pour des compositions riches en TBBPC. En fonction de la température, deux régions bi-phasiques sont observées au-dessus et en dessous du domaine des bicelles : pour des températures faibles une phase isotrope coexiste avec une phase lamellaire orientée (symbole  $\nabla$ ) et pour des températures élevées, il y a coexistence de bicelles ou d'une phase lamellaire orientée avec une phase isotrope (  $\square$  ou  $\nabla$  respectivement). Une phase lipidique complexe, symbolisée par  $\square$  et pouvant correspondre à des micelles géantes ou des vésicules déformées en oblates sous  $B_0$ , est observée adjacente au domaine bicellaire.

Remarque : les diagrammes sont dotés d'une deuxième échelle en composition lipidique, exprimée par le rapport molaire  $q=[\text{TBBPC}]/[\text{DCPC}]$ .

#### *b) Diagramme température-hydratation*

Le diagramme température-hydratation du système TBBPC/DCPC a été établi pour la composition lipidique  $X=86\%$  (figure V.4). Le domaine d'existence des bicelles qui s'orientent dans le champ magnétique, est représenté par la partie rayée et la lettre **B**. Ce domaine est délimité pour plus de visibilité, mais seules les hydratations pour lesquelles des points expérimentaux sont indiqués sur le graphe, ont été analysées. La gamme de température explorée varie entre  $25^\circ\text{C}$  et  $80^\circ\text{C}$  pour  $h \leq 60\%$  et  $h \geq 95\%$  et entre  $0^\circ\text{C}$  et  $80^\circ\text{C}$  pour  $60\% < h < 95\%$ , par pas de 5 ou  $3^\circ\text{C}$ . Les autres phases du diagramme déjà évoquées dans la partie a) précédente ne sont pas indiquées sur le graphe V.4.

Différents comportements du système binaire étudié sont observés en fonction de l'hydratation de l'échantillon :

- pour 40% d'hydratation, les bicelles n'existent pas entre  $25^\circ\text{C}$  et  $80^\circ\text{C}$  ; on observe à la place un spectre de poudre complexe (non montré ici) pouvant correspondre à une ou plusieurs phases lamellaires non orientées ; ce type de spectre sera également rencontré pour le système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC et explicité, via des simulations, dans ce cadre là (voir chapitre VII.2).

- pour  $h=50\%$ , les bicelles s'orientent dans  $B_0$  entre  $25^\circ\text{C}$  et  $62^\circ\text{C}$  et entre  $62^\circ\text{C}$  et  $80^\circ\text{C}$ , elles coexistent avec une phase isotrope.

- pour  $h=60\%$ , le domaine d'existence des bicelles est réduit entre  $43^\circ\text{C}$  et  $57^\circ\text{C}$ . Pour  $25^\circ\text{C} \leq T < 43^\circ\text{C}$ , une phase complexe équivalente à celle mentionnée en partie V.1.1, correspondant à des tubes ou des vésicules oblates, est observée ; pour  $57^\circ\text{C} < T < 75^\circ\text{C}$ , les bicelles coexistent avec une phase isotrope.

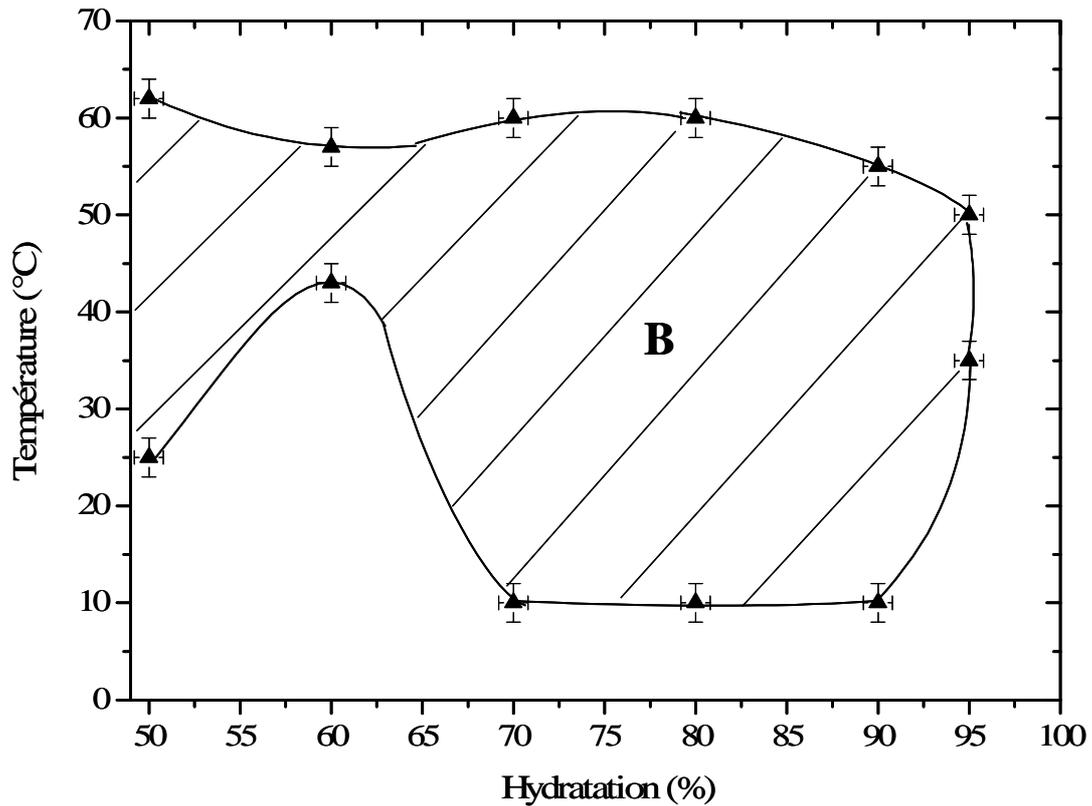


Figure V.4 : Diagramme température-hydratation du système TBBPC/DCPC pour une composition lipidique  $X=86\%$ . Le domaine d'existence des bicelles est repéré par la partie rayée et la lettre B ; ses délimitations sont indiquées pour plus de visibilité mais ne sont pas nécessairement significatives.

- pour des hydratations élevées ( $h > 60\%$ ), on constate une plus grande stabilité des bicelles en température ; elles existent en effet entre  $10^\circ\text{C}$  et  $60^\circ\text{C}$  pour  $h = 70\%$  et  $h = 80\%$ . Pour  $T < 10^\circ\text{C}$ , il y a coexistence d'une phase isotrope et d'une phase lamellaire orientée ; pour  $T > 60^\circ\text{C}$ , les bicelles coexistent avec une phase isotrope. Pour  $h > 80\%$ , plus l'hydratation augmente, plus le domaine des bicelles diminue : celui-ci s'étend de  $10^\circ\text{C}$  à  $55^\circ\text{C}$  pour  $h = 90\%$  et de  $35^\circ\text{C}$  à  $50^\circ\text{C}$  pour  $h = 95\%$ . Au-delà de cette hydratation, les bicelles seules n'existent plus mais coexistent majoritairement avec une phase isotrope ; on retrouve aussi la phase mixte à symétrie cylindrique pour  $T < 30^\circ\text{C}$ .

Il faut également préciser l'aspect visuel de l'échantillon des bicelles en fonction de la concentration lipidique : pour des hydratations faibles ( $50\% < h \leq 80\%$ ) une solution visqueuse et translucide est observée ; pour  $h > 80\%$ , l'échantillon apparaît blanchâtre. Plus l'hydratation augmente, plus l'échantillon devient fluide.

### V.1.3 Discussion

Pour la première fois, la RMN du phosphore a été appliquée sur le système bicellaire TBBPC/DCPC. Le groupe de Cho (Tan et al., 2002) ; (Cho, 2001) avait déjà effectué ce type d'expériences sur des bicelles DBBPC/DCPC, pour lesquelles le lipide à chaîne longue possédait une chaîne aliphatique en  $\text{C}_{12}$  ; dans le cas du TBBPC, sa chaîne en  $\text{C}_{14}$  est plus représentative de celle des lipides présents naturellement dans les biomembranes. On trouve le même type de spectre RMN  $^{31}\text{P}$  pour ces deux systèmes, où l'orientation spécifique  $n//B_0$  est caractérisée par la présence de deux pics fins avec des déplacements chimiques positifs ; le plus grand étant assigné aux lipides situés dans la partie plane du disque et le plus petit aux lipides diffusant rapidement dans le tore du disque. Les auteurs précédents avaient rapporté une stabilité en température des bicelles DBBPC/DCPC orientées dans  $B_0$ , avec  $q = 6$  et  $h = 90\%$ , de  $10^\circ\text{C}$  à  $54^\circ\text{C}$ . Pour les mêmes conditions d'hydratation et de composition lipidique, les bicelles TBBPC/DCPC existent sur une gamme de température équivalente (entre  $10^\circ\text{C}$  et  $55^\circ\text{C}$ ).

La RMN du phosphore a été utilisée de manière « routinière » pour caractériser le système TBBPC/DCPC en fonction des conditions d'hydratation, de composition lipidique et de température ; la grande sensibilité magnétique du noyau phosphore entraîne en effet des temps d'acquisition relativement courts (pour les systèmes bicellaires, de 5 à 20 minutes suivant le rapport signal sur bruit désiré) ; la RMN  $^{31}\text{P}$  constitue donc une technique de choix pour construire les diagrammes température-composition lipidique et température-hydratation

de ce système binaire. Il apparaît que les bicelles TBBPC/DCPC s'orientent dans le champ magnétique entre 85,7% et 88,9% en TBBPC, pour une gamme de température comprise entre 10°C et 75°C et une hydratation de 80%, et entre 84% et 86% en TBBPC, pour des températures de 10°C à 55°C et une hydratation de 90%. Le domaine d'existence des bicelles TBBPC/DCPC en fonction de la température et de la composition lipidique se présente sous une forme elliptique, avec la dimension la plus étendue en température, ce qui met clairement en évidence la grande stabilité en température de ces bicelles et ceci sur une gamme d'hydratation importante ( $65% < h < 95%$ ). Elles peuvent être ainsi facilement manipulées vu qu'elles existent à température ambiante. Par contre, on constate que leur domaine d'existence en composition lipidique est très restreint aussi bien pour  $h=80%$  que  $h=90%$  ; ainsi, si le rapport lipidique entre TBBPC et DCPC n'est pas bien respecté, des difficultés peuvent être rencontrées dans la formation des bicelles. Des erreurs de pesée sont notamment à l'origine de ces problèmes, les poudres lipidiques étant généralement hygroscopiques, même conservées au congélateur. On note toutefois que la proportion de lipides à chaînes courtes nécessaire pour former les bicelles TBBPC/DCPC ( $\approx 14%$ ) est plus faible que pour les bicelles DMPC/DCPC ( $\approx 22%$ ). Ceci peut être relié à la capacité des vésicules de TBBPC seul à privilégier déjà l'orientation  $n//B_0$  (déformation en oblates dans  $B_0$ ) (voir chapitre précédent). Autour des domaines purs des bicelles, on rencontre des systèmes bi-phasiques, comme la coexistence des disques orientés avec une phase isotrope (d'un point de vue de la RMN), et des systèmes complexes comme ceux correspondant à une distribution cylindrique des lipides (micelles géantes) ou à des vésicules déformées en oblates sous  $B_0$  (voir chapitre VII). Il est certain que ces régions sont complexes et qu'elles nécessiteraient davantage d'investigations, notamment par diffraction des rayons X et par microscopie électronique.

#### V.1.4 Organisation de l'eau ( $D_2O$ ) de la solution bicellaire

La structure et la dynamique de l'eau de la solution bicellaire a été analysée par RMN du deutérium en remplaçant  $H_2O$  par de l'eau deutérée  $D_2O$ , dans certaines préparations de bicelles TBBPC/DCPC, caractérisées par RMN du phosphore.

Les spectres RMN- $^2H$  ont été enregistrés pour trois hydratations différentes (70%, 80% et 90%) sur une large variation en température (de 0°C à 80°C) et pour une composition lipidique de  $X=86%$ . La figure V.5 présente les spectres obtenus pour une température de 50°C. Pour les trois hydratations étudiées, un seul et faible éclatement quadrupolaire (entre 10

Hz et 200 Hz) est détecté entre 10°C et  $\approx 70^\circ\text{C}$ , ce qui correspond aux domaines d'existence des bicelles TBBPC/DCPC, établis précédemment par RMN  $^{31}\text{P}$  pour  $h=80\%$  et  $h=90\%$ . Cet éclatement reflète l'organisation moyenne des molécules d'eau autour des objets bicellaires. Plus précisément, un échange rapide a lieu entre deux formes de l'eau, celle liée à la surface des bicelles et celle libre en solution ; on peut ainsi écrire la relation :  $\Delta\nu_{\text{observée}} = p_{\text{liée}}\Delta\nu_{\text{liée}} + p_{\text{libre}}\Delta\nu_{\text{libre}}$ . D'après Faure et al. (Faure et al., 1997), l'éclatement quadrupolaire associé à l'eau liée à des liposomes de DMPC, est égal à 1200 Hz ; on peut considérer que celui de l'eau liée aux têtes cholines des lipides situés dans la partie plane des bicelles est du même ordre de grandeur. L'éclatement quadrupolaire observé dans notre cas est beaucoup plus faible (200 Hz au maximum), ce qui prouve que l'eau est en grande majorité sous forme libre en solution. On constate aussi que pour une même température, plus le milieu est hydraté, plus l'éclatement quadrupolaire diminue : pour  $T=50^\circ\text{C}$ , on passe de  $\Delta\nu_Q = 169,2$  Hz pour  $h=70\%$ , à  $\Delta\nu_Q = 93,7$  Hz pour  $h=80\%$  à  $\Delta\nu_Q = 37,1$  Hz pour  $h=90\%$ . Ainsi, plus la dilution augmente, plus il y a de molécules d'eau à l'état libre (la probabilité  $p_{\text{libre}}$  est plus grande), plus  $\Delta\nu_{\text{observée}}$  diminue ( $\Delta\nu_{\text{libre}}$  étant plus faible que  $\Delta\nu_{\text{liée}}$ ).

Ce phénomène d'organisation et donc d'orientation dans  $B_0$  des molécules d'eau entourant les bicelles avait déjà été observé par Raffard et al. (Raffard et al., 2000) pour le système DMPC/DCPC et par Aussenac et al. pour celui DIOMPC/DIOHPC (Aussenac et al., 2005). Il y a donc une relation directe entre la structure et la dynamique de l'eau dans les systèmes bicellaires et le changement des phases lipidiques.

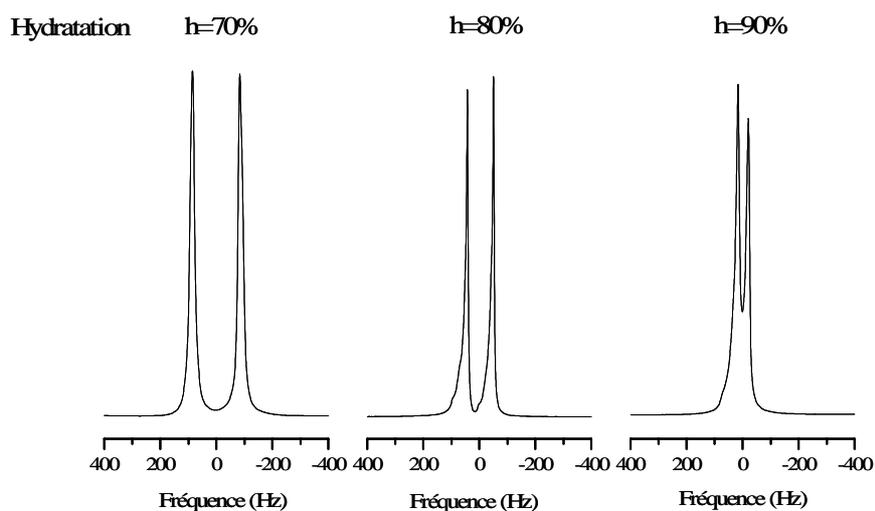


Figure V.5: Spectres RMN- $^2\text{H}$  (séquence simple pulse) de  $\text{D}_2\text{O}$  de la solution bicellaire TBBPC/DCPC pour 70%, 80% et 90% d'hydratation et une température commune de  $50^\circ\text{C}$ . Chaque spectre est la somme de 40 scans.

## V.2 Observation par Microscopie Electronique à Transmission (MET) des Bicelles TBBPC/DCPC et estimation de leur taille.

### V.2.1 Images MET des bicelles TBBPC/DCPC

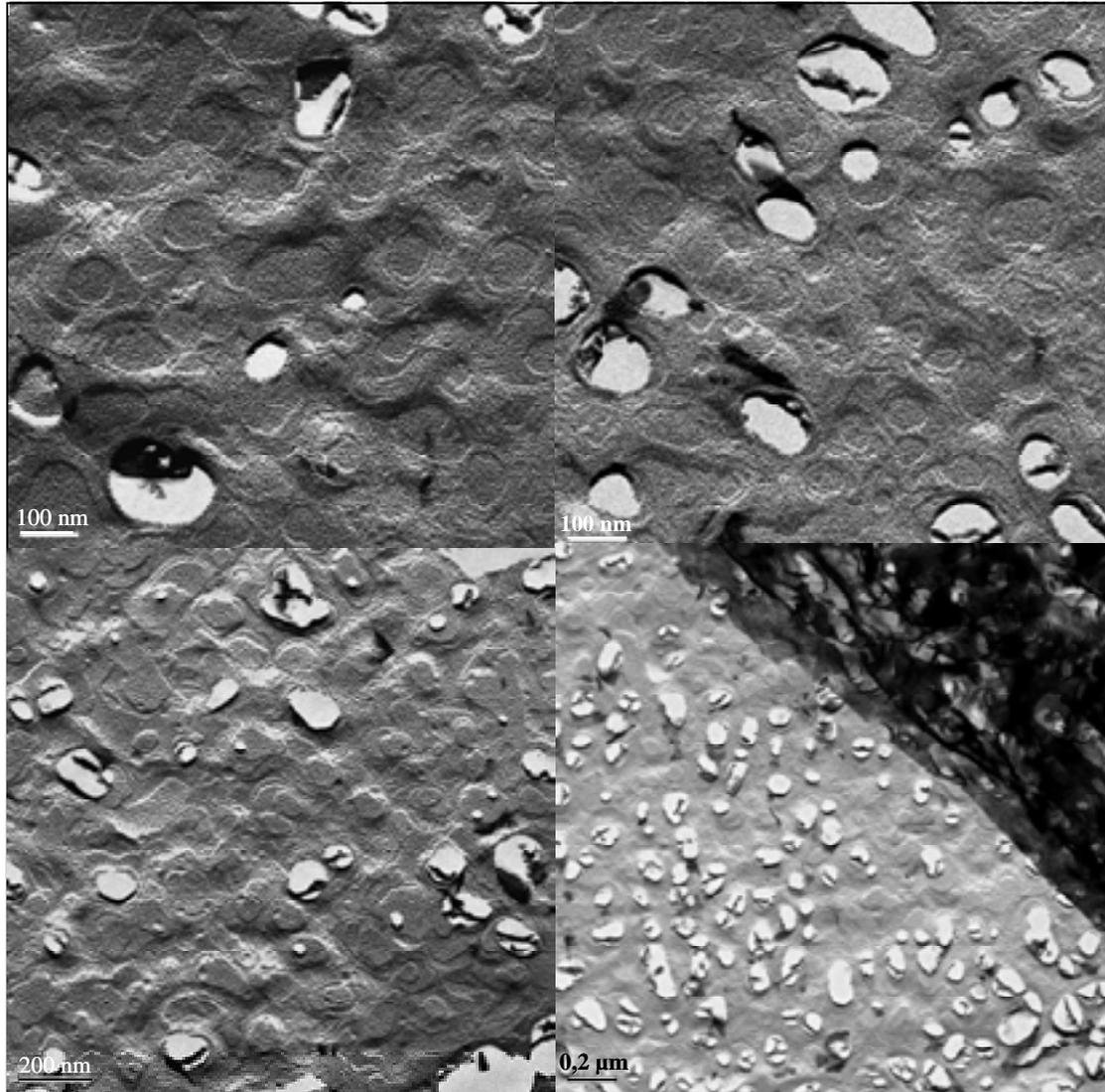
Des répliques de la structure d'un échantillon de bicelles TBBPC/DCPC (avec  $X=85,7\%$  et  $h=90\%$  dans  $D_2O$  contenant  $100\text{ mM}$  de  $NaCl$ ) ont été préparées par cryofracture et observées par microscopie électronique à transmission (MET) ; Quatre des images obtenues sont présentées en figure V.6.a). Un ensemble relativement monodisperse d'objets discoïdaux et de taille nanométrique, est observé. Ces nano-particules apparaissent avec une coloration grise ou blanche, en fonction de leur orientation originale dans l'échantillon par rapport à la direction de métallisation (à  $45^\circ$ ). Des schémas explicatifs en figures V.6.b) montrent qu'un objet initialement parallèle au plan de fracture présente une coloration grise sur les images MET tandis qu'un objet initialement perpendiculaire apparaît avec une couleur blanche. La coloration uniforme des objets confirme leur forme discoïdale avec une partie plane d'une épaisseur fine ; un objet sphérique apparaîtrait avec une graduation de couleur prononcée du noir au gris.

Il faut préciser que la fracture d'une bicelle est sensée se produire au milieu de la bicouche lipidique, zone de moindre résistance (Meyer et Richter, 2001). La mesure de la dimension la plus longue de chaque objet observé, informe donc sur le diamètre des disques. Par contre, il est difficile d'estimer l'épaisseur de la monocouche lipidique due à l'imprécision de la réplification métallique.

### V.2.2 Taille des bicelles TBBPC/DCPC

Une statistique de taille des bicelles TBBPC/DCPC a été réalisée à partir des images MET obtenues précédemment. A l'aide du logiciel Scion Image, le diamètre le plus long de 860 objets a été mesuré sur 10 images MET, issues de l'observation de deux répliques. Un histogramme de taille (figure V.7) a été établi en considérant un pas de  $100\text{ \AA}$  et ajusté avec une fonction Gaussienne (courbe bleue) via le logiciel Origin. Un diamètre moyen de  $790\text{ \AA}$ , avec une mi-largeur à mi-hauteur de  $300\text{ \AA}$ , a ainsi été obtenu.

a)



b)

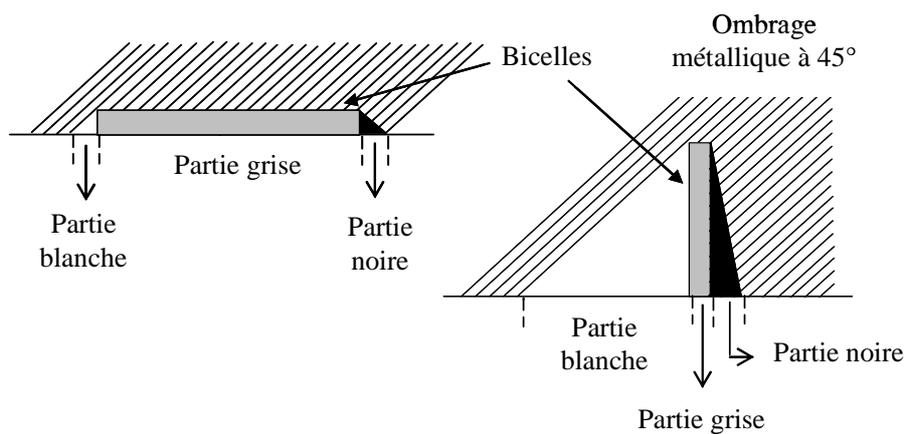


Figure V.6 : a) Images de microscopie électronique à transmission d'un échantillon de bicelles TBBPC/DCPC ( $X=85,7\%$  et  $h=90\%$ ), préparé par cryofracture, b) schémas explicatifs de la coloration des objets sur les images MET, suivant leur orientation dans l'échantillon par rapport à la direction de métallisation ( $45^\circ$ ).

Cette taille moyenne des bicelles TBBPC/DCPC, issue des images MET, peut être comparée à celle calculée à partir des spectres RMN  $^{31}\text{P}$ . Arnold et al. (Arnold et al., 2002) ont en effet proposé un modèle géométrique simplifiée permettant de déterminer le diamètre des bicelles à partir de l'intégration de l'aire sous les deux pics du spectre RMN  $^{31}\text{P}$  qui leur est caractéristique ; ce modèle considère pour cela que les objets bicellaires sont parfaitement orientés dans le champ magnétique et qu'il y a une ségrégation entre les deux types de lipides : ceux à chaînes longues qui occupent le plan du disque et que l'on assigne au signal RMN le plus intense (dans notre cas, TBBPC), et ceux à chaînes courtes qui évoluent dans le tore du disque et que l'on associe au pic RMN le plus petit (DCPC). Le rapport molaire  $q = [\text{lipides chaînes longues}] / [\text{lipides chaînes courtes}]$  utilisé pour la préparation, doit donc être proche du rapport d'intégration entre les deux pics (également noté  $q = (\text{aire du plan}) / (\text{aire du tore})$ ) du spectre RMN  $^{31}\text{P}$ . Ce dernier rapport est relié au diamètre  $\phi$  des bicelles par la relation :

$$\Phi = aq(\pi + (\pi^2 + 8/q)^{1/2}) + 2a$$

où  $a$  représente l'épaisseur d'une monocouche lipidique. Pour une bicouche de phospholipides possédant une chaîne en  $\text{C}_{14}$ ,  $2a \approx 40 \text{ \AA}$ .

Il faut préciser qu'il existe d'autres modèles plus élaborés que ce dernier, notamment celui développé par Triba et al. (Triba et al., 2005), qui tient compte de la diffusion des molécules du tore du disque bicellaire vers sa partie plane et inversement ; ceci entraînerait une distribution ellipsoïdale des lipides dans le tore de la bicelle, plutôt que sphérique. Toutefois, pour les bicelles DMPC/DCPC, un bon accord a été trouvé entre la taille des objets calculée à partir des spectres RMN- $^{31}\text{P}$  d'après le modèle d'Arnold et al. et celle déterminée par microscopie électronique (Arnold et al., 2002). Nous l'avons donc appliqué au cas des bicelles TBBPC/DCPC.

Pour leur observation au microscope électronique, les bicelles biphényles ont été préparées avec un rapport molaire  $q=6$  ( $X=85,7\%$ ). Dans ces conditions, un diamètre théorique de  $818 \text{ \AA}$  est calculé d'après la formule (V.1), ce qui est très similaire à celle trouvée statistiquement à partir des images TEM ( $790 \text{ \AA}$ ). De plus, la ségrégation entre les deux types de lipides n'est pas totale dans la réalité, ce qui diminue cette valeur théorique. Par contre, le rapport d'intégration des aires sous les deux pics du spectre RMN  $^{31}\text{P}$  des bicelles biphényles est en moyenne égal à 5, ce qui est inférieur au rapport molaire  $q=6$  utilisé pour la préparation du système ; la présence de pics minoritaires sur le spectre RMN (déjà signalés par une astérisque en partie V.1.1) empêche en effet une intégration précise des signaux.

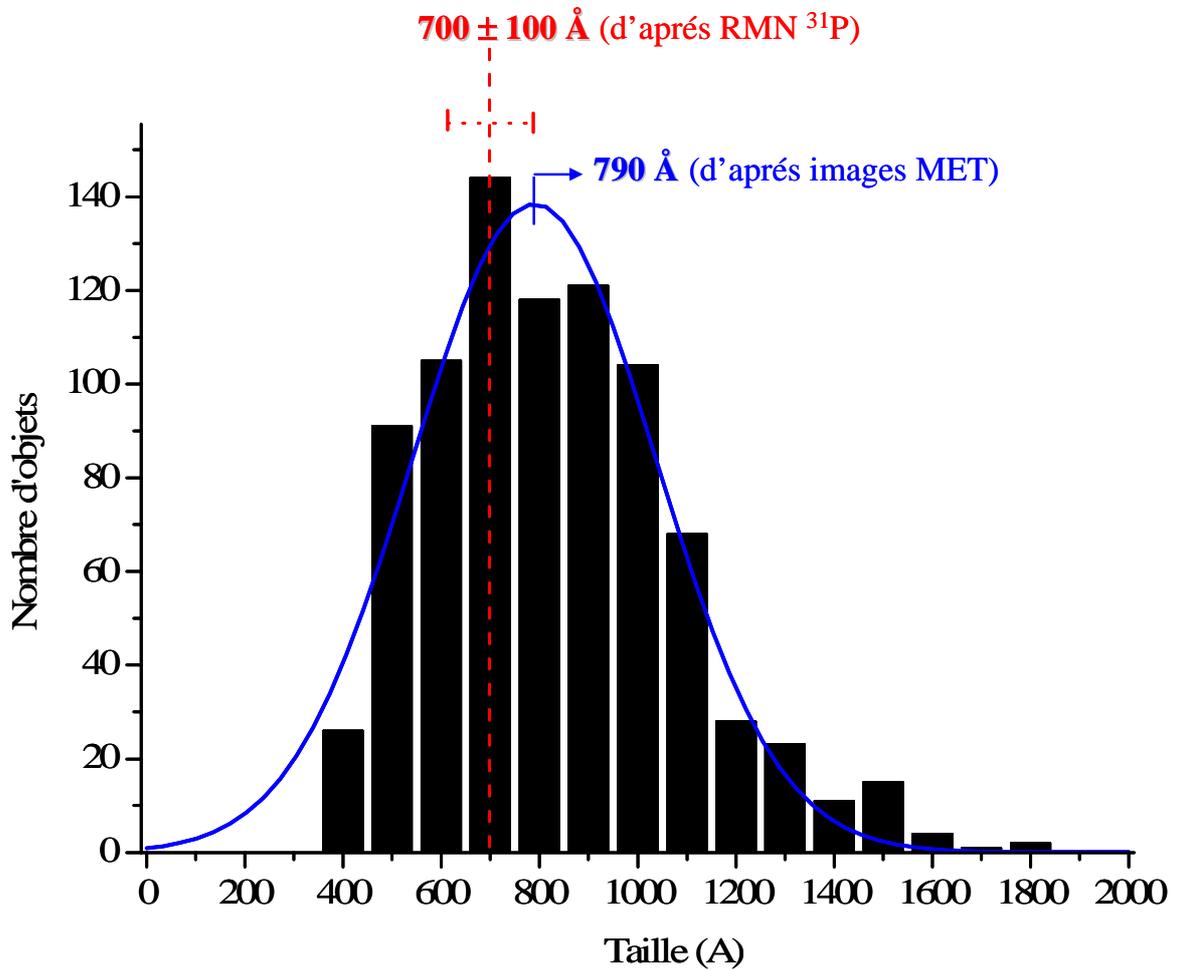


Figure V.7 : Histogramme de taille des bicelles TBBPC/DCPC construit à partir de la mesure du diamètre de 860 objets sur 10 images MET, elle-même issues de deux répliques métalliques. L'ajustement par une fonction Gaussienne (courbe bleue) avec le logiciel Origin permet de déterminer un diamètre moyen des bicelles de 790 Å. Une comparaison est faite avec la taille calculée à partir de l'intégration des pics du spectre RMN  $^{31}\text{P}$  des bicelles TBBPC/DCPC et de l'équation (V.1) ( $700 \pm 100 \text{ \AA}$ ).

Avec  $q=5$ , le diamètre moyen calculé est égal à 700 Å, auquel il est nécessaire d'ajouter une incertitude de  $\pm 100$  Å, due aux erreurs d'intégration. Ce résultat reste néanmoins en accord avec celui trouvé par microscopie électronique.

Il faut préciser qu'aucune variation de taille des bicelles TBBPC/DCPC n'a été constatée en fonction de la composition lipidique, d'après les spectres RMN- $^{31}\text{P}$  ; les diagrammes de phase température-composition ont en effet montré que ces bicelles n'existaient que pour des proportions (lipides chaînes longues)/(lipides chaînes courtes) bien précises.

### V.2.3 Discussion

D'après les images de microscopie électronique à transmission, des objets discoïdaux d'environ 800 Å de diamètre ont clairement été mis en évidence pour le système TBBPC/DCPC avec  $X=85,7\%$ ,  $h=90\%$  et à température ambiante. On peut rapprocher cette étude à celle du système DMPC/DCPC, largement utilisé actuellement, pour lequel les diverses organisations moléculaires adoptées en fonction des conditions d'hydratation, de composition lipidique et de température, sont à l'origine de nombreux débats ces dernières années. En effet, parmi les morphologies associées au système orienté dans le champ magnétique, des objets discoïdaux, des lamelles trouées et des micelles géantes cylindriques ont été proposées par différents groupes de recherche (Raffard et al., 2000) ; (Nieh et al., 2002) ; (Gaemers et Bax, 2001) ; (Harroun et al., 2005). La majorité de ces études ont été effectuées par RMN du phosphore ou par diffraction des neutrons aux petits angles (SANS), dont les signaux obtenus ne permettent pas de différencier entre des disques et des lamelles perforées orientées dans le champ magnétique. C'est la microscopie électronique à transmission qui a permis de visualiser sans ambiguïté des disques de DMPC/DCPC (Arnold et al., 2002). Il faut tout de même préciser que des micelles géantes à symétrie cylindrique ont été observées par microscopie électronique par van Dam et al. (van Dam et al., 2004) pour le système DMPC/DCPC avec  $2,2 < q \leq 3$  et  $h > 95\%$ , donc dans des conditions de composition lipidique et d'hydratation différentes de celles pour lesquelles des disques sont observés.

Pour l'étude des bicelles TBBPC/DCPC, la microscopie électronique à transmission a permis là aussi de caractériser clairement la forme discoïdale des objets et ainsi lever l'ambiguïté sur l'existence potentielle de lamelles trouées. Dans ce dernier cas, les trous apparaîtraient avec une coloration grise et la coexistence d'objets blancs et gris, observées sur nos images MET, serait impossible.

Pour confirmer le choix de la structure en bicelle, un calcul simple peut également être effectué en calculant le rapport molaire lipidique [chaînes longues]/[chaînes courtes] nécessaire pour avoir une structure en lamelles trouées : si l'on considère un carré de 1  $\mu\text{m}$  de côté, un nombre de trous surestimé à 100 dont le rayon est égal à 400  $\text{\AA}$  (déterminés d'après les images MET) et une aire par lipide de 60  $\text{\AA}^2$ , on détermine un nombre de molécules de TBBPC nécessaire égal à  $1,66 \cdot 10^6$  et un nombre de molécules de DCPC de  $1,5 \cdot 10^5$ , ce qui fait un rapport molaire  $q = [\text{TBBPC}]/[\text{DCPC}] = 11,1$  ; à l'inverse, si les trous sont maintenant remplacés par des objets lipidiques discoïdaux, le nombre de molécules de TBBPC nécessaire est de  $8,38 \cdot 10^5$ , ce qui correspond à un rapport  $q$  de 5,6, beaucoup plus proche de nos conditions expérimentales ( $q=6$ ).

A partir des images MET, une taille statistique de 790  $\text{\AA}$  a été déterminée ce qui est pratiquement le double de celle des bicelles DMPC/DCPC ( $\approx 450 \text{\AA}$ ). Ceci est clairement relié au rapport molaire  $q$  considéré, qui est de 3,5 pour les bicelles saturées et de 6 pour les bicelles biphényles. Ainsi, plus le rapport  $q$  est grand, plus le diamètre des disques est important. Il y a donc une relation directe entre la composition lipidique des bicelles et leur taille, ce qui est clairement retrouvé dans la relation (V.1).

### **V.3 Caractérisation de l'orientation des Bicelles TBBPC/DCPC par Diffusion des Rayons X aux petits angles (SAXS).**

#### **V.3.1 Cliché de diffusion X aux petits angles des bicelles TBBPC/DCPC**

Un capillaire en verre de 1,5 mm de diamètre est rempli avec 30  $\mu\text{l}$  d'un échantillon de bicelles TBBPC/DCPC ( $X=87,5\%$  et  $h=80\%$ ), scellé, puis placé dans un rotor RMN ; l'ensemble est mis dans la sonde RMN, réglée à 35°C, de telle sorte que le capillaire soit aligné parallèlement au champ magnétique statique  $B_0$ . Après 20 minutes dans le champ magnétique à 11,74 Tesla, le capillaire est transféré (via un bain thermostaté à 35°C) en  $\approx 2$  min dans l'appareil de diffusion X, lui-même réglé à 35°C. Après 10 minutes d'acquisition, le cliché à deux dimensions obtenu est présenté figure V.8.a) (droite). Quatre spots alignés dans la direction de l'axe  $z$  sont observés. Ce résultat est directement lié à l'orientation spécifique des bicelles biphényles, avec leur normale  $n$  parallèle à  $B_0$ .

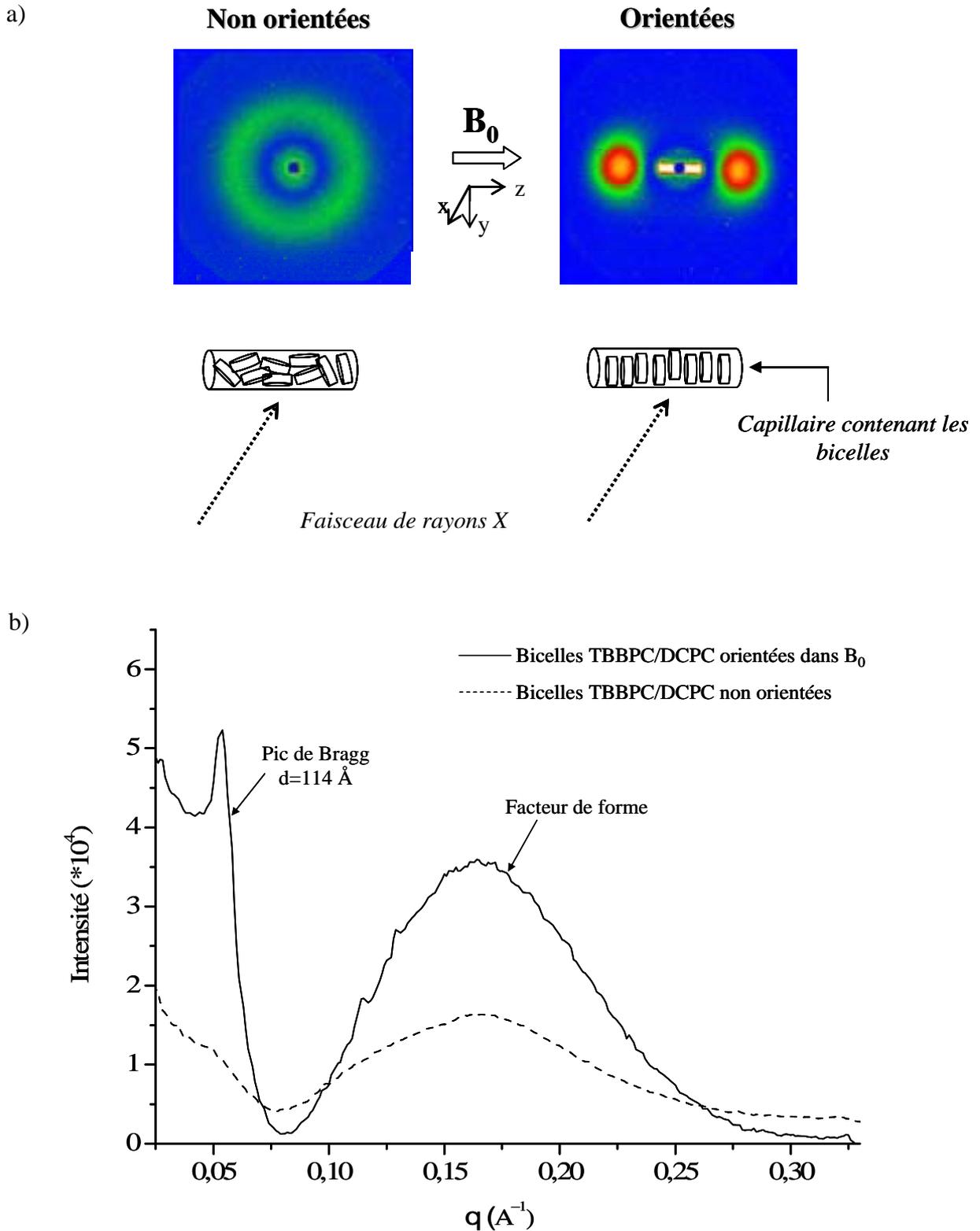


Figure V.8 : a) Cliché 2D de diffusion X aux petits angles des bicelles TBBPC/DCPC non-orientées (gauche) et préalablement orientées dans le champ magnétique pendant 20 minutes (droite), pour une température de 35°C. b) Graphe  $I=f(q)$  après une intégration linéaire selon l'axe z pour le système orienté (courbe continue) et une intégration circulaire pour le système non orienté (courbe en pointillés).

Une expérience contrôle, toujours à 35°C, est réalisée avec le même échantillon sans orientation préalable dans le champ magnétique. Le cliché de diffusion X obtenu est alors constitué d'un cercle, ce qui est caractéristique d'un échantillon sans orientation privilégiée (figure V.8.a) gauche). Les signaux sont ensuite intégrés afin de tracer la graphe  $I=f(q)$ , où  $I$  représente l'intensité diffusée et  $q$  le vecteur d'onde de diffusion (en  $\text{\AA}^{-1}$ ). Pour le système non-orienté, l'intégration est effectuée sur  $360^\circ$  (intégration circulaire) tandis que pour le système préalablement orienté dans le champ magnétique, elle est réalisée uniquement selon l'axe  $z$ , parallèle à  $B_0$  (intégration linéaire). Les courbes  $I=f(q)$  obtenues sont présentées sur la figure V.8.b) : la courbe continue correspond aux bicelles orientées dans  $B_0$  et celle en pointillés est associée aux bicelles non-orientées, pour lesquelles l'intensité diffusée a été multipliée par 40.

Pour les deux systèmes, une large bosse dont le maximum se situe à  $q=0,17 \text{ \AA}^{-1}$ , est observée; cette bosse est associée au facteur de forme du système et est caractéristique d'une structuration de phospholipides en bicouche (Riske et al., 2001).

Pour les bicelles préalablement orientées dans le champ magnétique, un pic de Bragg, représentatif du facteur de structure au 1<sup>er</sup> ordre du système, est observé pour  $q=0,055 \text{ \AA}^{-1}$ . D'après les rappels sur la diffusion X aux petits angles (voir Chapitre II.2), le vecteur d'onde  $q$  est inversement proportionnel à la distance de répétition  $d$ , de la structure en bicouche ( $q = 2\pi/d$ ). Une périodicité de  $114 \text{ \AA}$  est alors déterminée pour les bicelles TBBPC/DCPC orientées dans  $B_0$ . Ce pic de Bragg n'est pas détecté pour les bicelles non orientées, étant donné qu'elles sont dispersées dans toutes les directions dans l'échantillon ; le motif en bicouche des bicelles n'est pas répété dans une direction privilégiée.

On peut aussi noter la différence d'intensité entre les deux systèmes analysés : l'intensité diffusée par les bicelles orientées est beaucoup plus importante (d'un facteur  $\approx 40$ ) que celle diffusée par les bicelles non orientées ; ceci est directement lié à la quantité de matière diffusante : dans le premier cas, toutes les bicelles sont orientées dans la même direction et participent à la diffusion tandis que dans le deuxième cas, les bicelles n'adoptent pas d'orientation privilégiée, ce qui diminue le nombre d'objets participant à la diffusion des rayons X.

Il faut également préciser qu'après 20 minutes dans le champ magnétique  $B_0$ , les bicelles TBBPC/DCPC conservent leur orientation spécifique pendant plusieurs jours, ce qui permet de les transporter facilement et de les étudier par SAXS en-dehors de  $B_0$  (voir chapitre VI).

### V.3.2 Discussion

La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) a permis de confirmer l'orientation caractéristique des bicelles TBBPC/DCPC avec leur normale à la bicouche  $n$  parallèle à  $B_0$ . Le cliché de diffusion présente en effet des tâches dans la direction de l'axe  $z$ , parallèle à  $B_0$ . La diffusion des rayons X peut donc être utilisée en complément de la RMN pour caractériser l'orientation des bicelles.

L'intensité magnétique minimale nécessaire pour orienter les bicelles TBBPC/DCPC n'a pas été encore déterminée. D'après Katsaras et al. (Katsaras et al., 1997), 1 tesla semble suffisant pour orienter le système DMPC/DCPC, dopé avec des ions Lanthanides. Des expériences supplémentaires avec des champs magnétiques inférieurs à 11,7 T pourraient être réalisées pour connaître l'intensité magnétique minimale requise pour orienter les bicelles biphényles et savoir si la présence des deux cycles phényles du TBBPC, améliore les capacités d'orientation du système par rapport à celui DMPC/DCPC.

La large bosse obtenue sur le graphe  $I=f(q)$  pour les bicelles TBBPC/DCPC caractérise une structuration du système en bicouche, comme le suggère Riske et al. (Riske et al., 2001). On analyse en effet la répétition de la tête phosphore, participant le plus à la diffusion des rayons X (voir chapitre II.2), sur les deux monocouches de phospholipides constituant la partie plane des bicelles. Un fit de cette bosse est présenté dans le chapitre VI, lors de la comparaison avec le signal diffusé par les bicelles DMPC/DCPC.

Une distance de répétition de 114 Å entre deux bicelles biphényles orientées a été déterminée par l'analyse du pic de Bragg. On peut noter que Katsaras et al. (Katsaras et al., 1997) ont mis en évidence un arrangement smectique pour le système DMPC/DCPC dopé avec des ions  $Tm^{3+}$  (même orientation  $n/B_0$ ), avec une distance inter-lamelles tout à fait comparable (116 Å pour un système hydraté à 77%). Sachant que la distance de répétition maximale entre deux membranes de DMPC, sans additifs chargés, est de 60 Å (Faure et al., 1997), la périodicité trouvée pour les bicelles biphényles confirme la forte hydratation du système. Ces bicelles constituent donc un modèle membranaire très attractif pour l'étude structurale de protéines hydrosolubles.

## V.4 Dynamique des Bicelles TBBPC/DCPC par RMN du deutérium.

### V.4.1 Système bicellaire TBBPC:DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>(95 :5)/DCPC

#### a) *Présentation du système*

Afin de réaliser des études préliminaires sur la dynamique des bicelles TBBPC/DCPC, le système ternaire suivant a tout d'abord été considéré : TBBPC:DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>(95 :5)/DCPC (figure V.9), avec une hydratation de 90% et un rapport molaire de lipides à chaînes longues X=85,7% dans de l'eau dédeutérée à 98% (contenant 100 mM de NaCl). Dans ces conditions, l'insertion de 5% de DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> ne perturbe pas la formation des bicelles. On retrouve en effet le spectre phosphore qui leur est caractéristique, avec la présence de deux pics bien définis à  $\approx 6,9$  ppm et  $\approx 23$  ppm à 30°C.

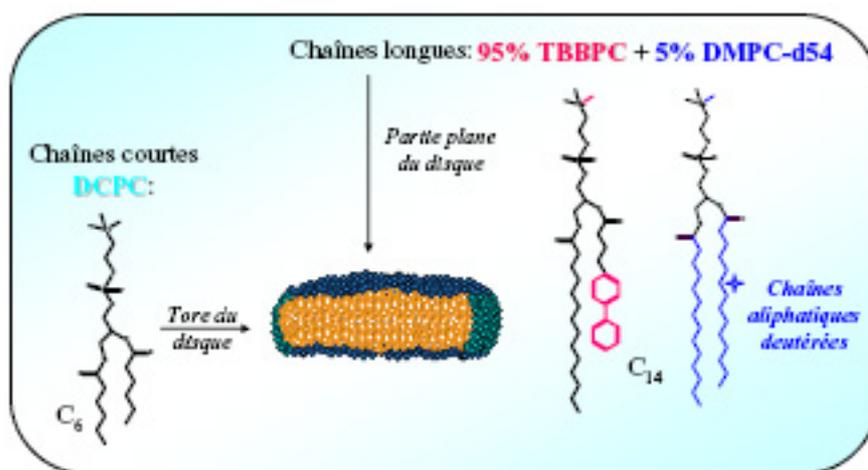


Figure V.9 : Schéma des bicelles TBBPC:DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>(95 :5)/DCPC

#### b) *Analyse par RMN-<sup>2</sup>H et profil d'ordre*

Le spectre RMN-<sup>2</sup>H associé à ces bicelles hybrides est présenté en figure V.10.a) (spectre bleu) et a été obtenu après accumulation de 26 000 scans (soit  $\approx 12$  heures) sur un spectromètre de 11,7 Tesla (500 MHz), muni d'une sonde bas-gamma.

La première constatation est la bonne sensibilité de la sonde qui a permis de détecter le DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> présent en faible quantité dans le mélange (0,75 mg au total).

Une comparaison est effectuée avec le spectre RMN-<sup>2</sup>H (spectre noir) des bicelles DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>/DCPC déterminé par Aussenac et al. (Aussenac et al., 2003) On remarque que la largeur spectrale associée aux bicelles biphényles ( $\approx 50$  kHz) est environ deux fois plus importante que celle relative aux bicelles saturées.

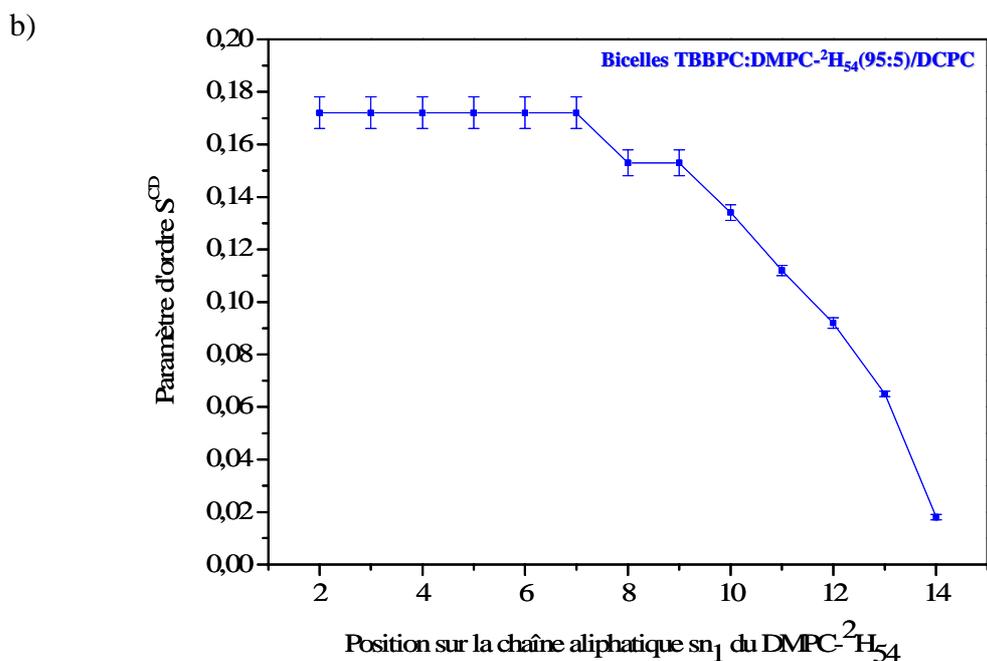
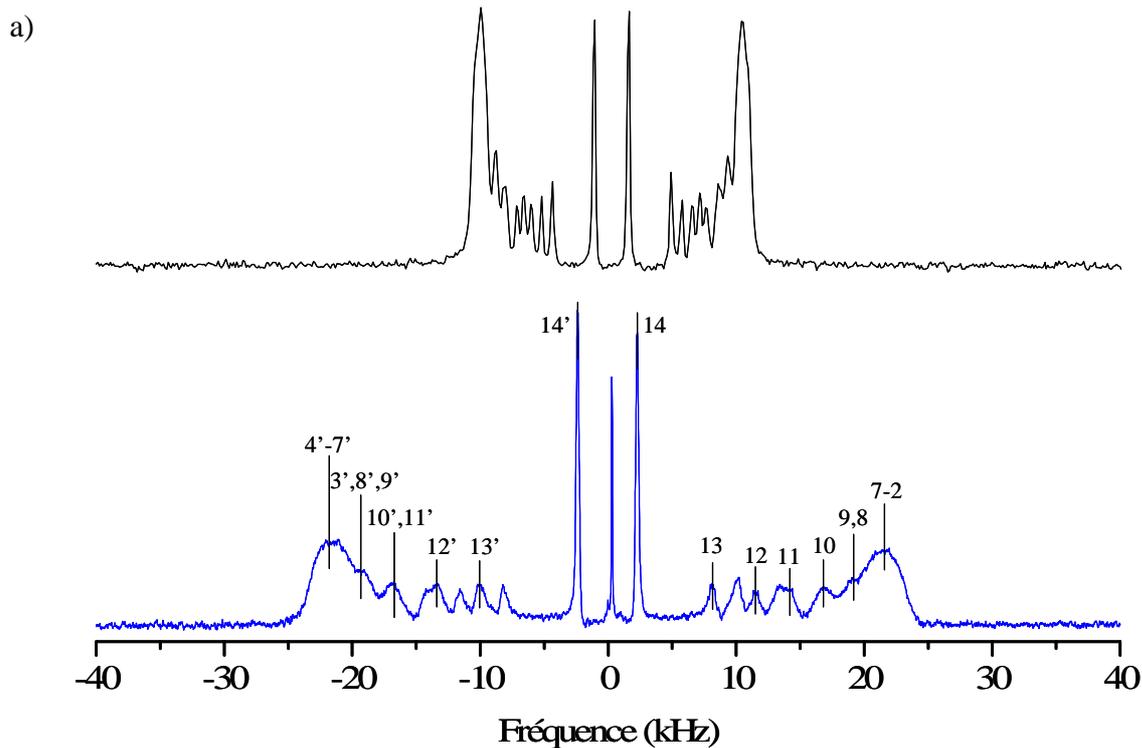


Figure V.10 : a) Spectre RMN- $^2H$  (Echo solide) des bicelles TBBPC:DMPC- $^2H_{54}$ (95 :5)/DCPC ( $h=90\%$ ,  $X=85,7\%$  et  $T=30^\circ C$ , spectre bleu) après 26 000 scans d'acquisition. Les attributions des éclatements quadrupolaires correspondant aux groupes  $C^2H_2$  sur la chaîne aliphatique  $sn_1$  et  $sn_2$  (« ' ») du DMPC- $^2H_{54}$  sont indiquées respectivement sur la droite et la gauche du spectre. Une comparaison avec le spectre RMN- $^2H$  des bicelles DMPC- $^2H_{54}$ /DCPC ( $h=80\%$ ,  $X=78\%$ ,  $T=30^\circ C$ , spectre noir, d'après (Aussenac et al., 2003) est effectuée b) Profil d'ordre  $S^{CD}=f(\text{position sur la chaîne } sn_1 \text{ du DMPC-}^2H_{54} \text{ inséré dans les bicelles biphényles})$ .

La dépendance angulaire en  $(3\cos^2\beta - 1)/2$  du spectre RMN du deutérium (voir chapitre II.1) induit en effet des éclatements quadrupolaires deux fois plus importants pour les bicelles TBBPC/DCPC (où  $\beta = 0^\circ$ ) que pour les bicelles DMPC/DCPC (où  $\beta = 90^\circ$ ). Ainsi le lipide DMPC- $^2\text{H}_{54}$  est bien inséré au milieu des lipides TBBPC dans la partie plane des bicelles biphényles, dont la normale est parallèle au champ magnétique.

Etant donné que l'on considère des objets possédant une orientation privilégiée dans  $B_0$ , les spectres RMN- $^2\text{H}$  obtenus sont bien résolus ; il n'est pas nécessaire de réaliser une étape de déconvolution comme dans le cas des liposomes TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  (voir chapitre précédent) c'est-à-dire des échantillons anisotropes initialement non orientés.

La dynamique des bicelles DMPC/DCPC sera comparée à celle des bicelles TBBPC/DCPC au chapitre suivant. Dans la suite, nous ne considérons donc que le DMPC- $^2\text{H}_{54}$  inséré dans les bicelles biphényles (spectre bleu). Les attributions des éclatements quadrupolaires associés aux groupes  $\text{C}-^2\text{H}_2$  des deux chaînes non équivalentes  $\text{sn}_1$  et  $\text{sn}_2$  (celle-ci étant désignée par « ' ») du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  sont indiquées respectivement sur la droite et la gauche du spectre bleu (Davis, 1979) ; (Aussenac et al., 2003). La mesure directe de ces éclatements quadrupolaires sur le spectre permet de calculer les paramètres d'ordre  $S^{\text{CD}}$ . Dans le cas des bicelles TBBPC/DCPC, la symétrie moléculaire des lipides est considérée comme axiale et  $\beta = 0^\circ$  ;  $S^{\text{CD}}$  est alors relié à  $\Delta\nu_Q$  par la relation :  $S^{\text{CD}} = 2\Delta\nu_Q/3A_Q$  (voir chapitre II.1). Il est ensuite possible de tracer le profil d'ordre de la molécule DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (figure V.10.b)), qui rapporte les valeurs des paramètres d'ordre calculées, en fonction de la position sur la chaîne lipidique deutérée. Dans notre cas, on ne considère que les groupements aliphatiques situés sur la chaîne  $\text{sn}_1$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  dans le but de comparer ultérieurement ces résultats avec ceux du lipide TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ , deutéré sur sa chaîne  $\text{sn}_1$ . Comme pour les liposomes de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (voir chapitre précédent), plus on remonte sur la chaîne aliphatique du lipide de la position 14 à 2, plus le paramètre d'ordre  $S^{\text{CD}}$  augmente, plus la rigidité du système est grande. Ainsi, les groupements aliphatiques en bout de chaîne lipidique, associés aux paramètres d'ordre les plus faibles, présentent le plus de mobilité tandis que les positions « plateau » de 7 à 2, proches du squelette glycérol et auxquelles correspondent les  $S^{\text{CD}}$  les plus grands, sont les plus rigides.

V.4.2 Bicelles TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>/DCPC

Afin de confirmer les résultats préliminaires précédents sur la dynamique des bicelles TBBPC/DCPC, le lipide TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>, totalement deutéré sur sa chaîne aliphatique en C<sub>14</sub>, a été synthétisé chimiquement (voir chapitre III.1), puis mélangé au DCPC afin de former des bicelles TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>/DCPC. L'analyse par RMN-<sup>2</sup>H de ce système permet d'obtenir des informations directes sur la mobilité du lipide TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> au sein des objets bicellaires.

## a) Présentation du système

Les bicelles TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>/DCPC ont été formées avec un rapport molaire en lipide à chaîne longue X=86,7% (q=6,5) et une hydratation de h=86% dans de l'eau dédeutérée à 98% (contenant 100 mM de NaCl). Leur formation n'a pas posé de problème particulier si ce n'est la nécessité d'augmenter légèrement la proportion en lipides à chaînes longues. Les deutérons étant un peu plus volumineux que les protons, les interactions de Van Der Waals sont en effet plus nombreuses, ce qui diminue la stabilité de l'édifice bicellaire ; il faut donc rajouter davantage de lipides TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> pour retrouver la même cohésion entre les lipides bicellaires qu'avec le TBBPC non deutéré.

La figure ci-dessous schématise le système bicellaire TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>/DCPC :

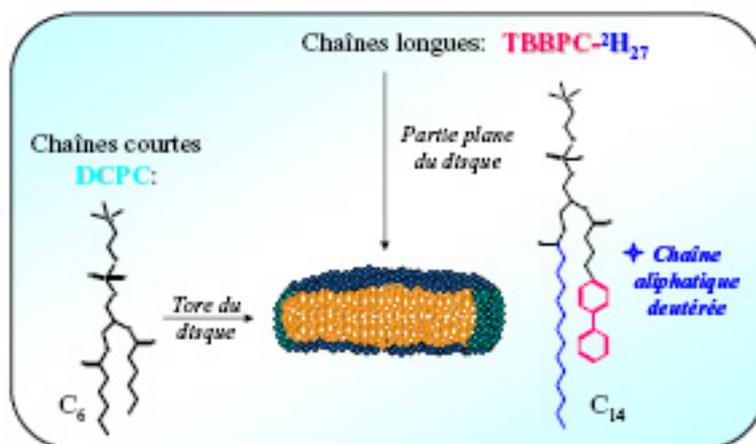


Figure V.11 : Schéma des bicelles TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>/DCPC

b) Analyse par RMN-<sup>31</sup>P

La figure V.12 présente les spectres RMN-<sup>31</sup>P obtenus pour le système TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>/DCPC (X=86,7% et h=86%), en les comparant à ceux du système TBBPC/DCPC (X=85,7% et h=90%), lorsque la température varie de 10°C à 70°C. Peu de modifications sont notables entre les systèmes deutérés et non deutérés.

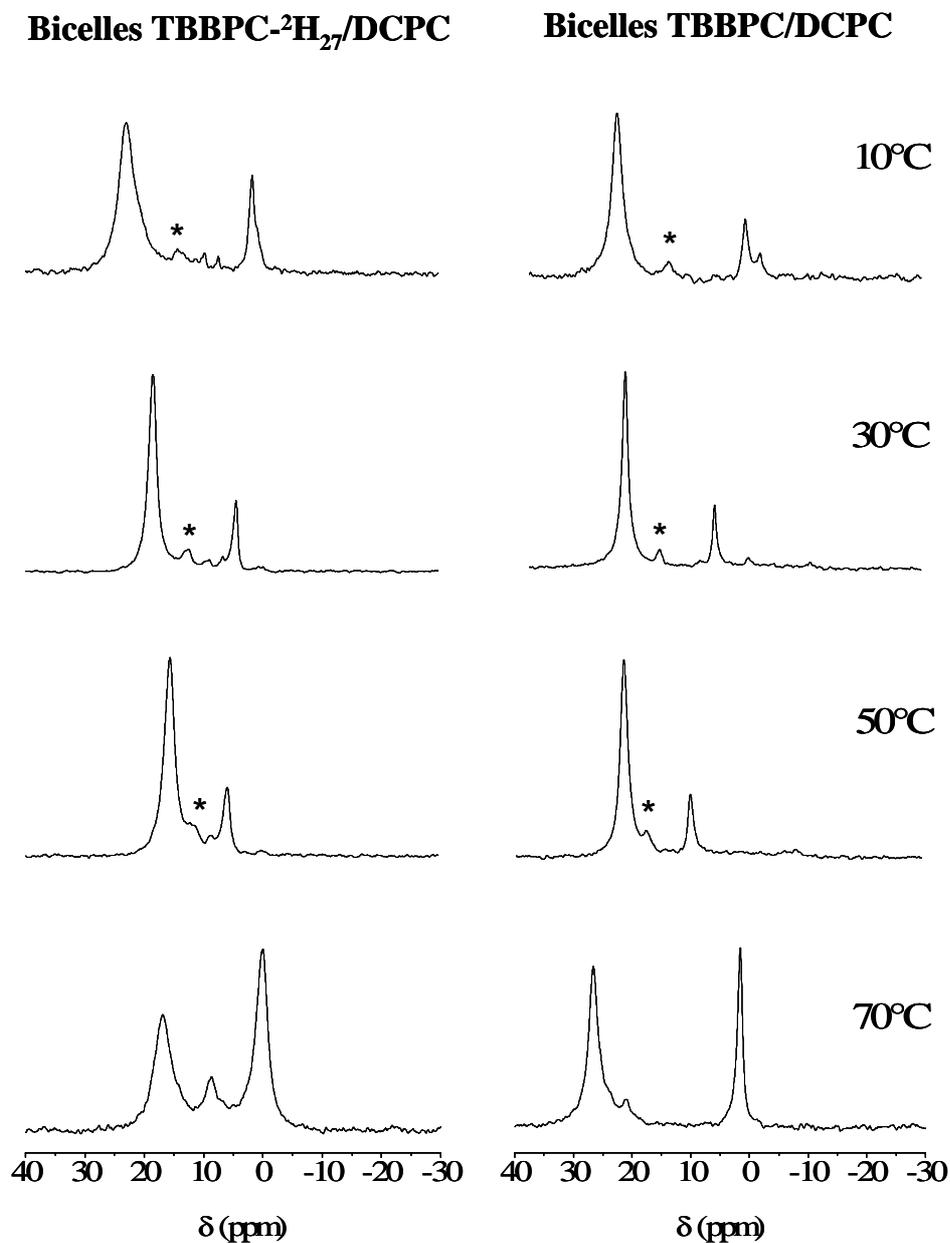


Figure V.12 : Spectres RMN  $^{31}\text{P}$  (Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) des bicelles TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ /DCPC ( $h=86\%$  et  $X=86,7\%$ ) et des bicelles TBBPC/DCPC ( $h=90\%$  et  $X=85,7\%$ ). Les températures sont indiquées sur la partie droite. Chaque spectre est la somme de 350 scans.

Pour des températures comprises entre 10°C et 50°C, on retrouve dans les deux cas le spectre phosphore caractéristique de l'orientation  $n//B_0$ . Ainsi, la deutériation de la chaîne aliphatique du TBBPC n'a pas d'influence sur la direction et les capacités d'orientation du système.

La normale  $n$ , à la bicouche des bicelles est toujours parallèle au champ magnétique et on retrouve la même gamme de stabilité des bicelles en température (entre 10°C et 55°C). Pour  $T > 55^\circ\text{C}$ , les bicelles deutérées coexistent avec une phase isotrope comme celles non deutérées.

On notera aussi que les pics minoritaires mentionnés précédemment pour le système TBBPC/DCPC entre 10°C et 50°C, sont toujours présents pour le système deutéré (astérisques).

#### *c) Analyse par RMN- $^2\text{H}$ et profil d'ordre*

Le spectre RMN- $^2\text{H}$  des bicelles TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ /DCPC ( $X=86,7\%$ ,  $h=86\%$ ) à 30°C est présenté en figure V.13.a) (spectre rouge). La largeur spectrale ( $\approx 50$  kHz) est équivalente à celle du système TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$ (95 :5)/DCPC, ce qui confirme à nouveau l'orientation des objets telle que la normale  $n$  soit parallèle à  $B_0$  ( $\beta=0^\circ$ ). Cette orientation privilégiée explique la bonne résolution du spectre, sur lequel les éclatements quadrupolaires correspondant aux différents groupes aliphatiques de la chaîne  $sn_1$  du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  sont distinguables (voir attribution sur le spectre, (Aussenac et al., 2003)). La mesure directe de ces éclatements quadrupolaires permet de calculer les paramètres d'ordre  $S^{\text{CD}}$  ( $S^{\text{CD}} = 2\Delta\nu_Q/3A_Q$ ) et d'établir le profil d'ordre associé aux bicelles TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ /DCPC (figure V.13.b), courbe rouge). L'allure générale de la courbe  $S^{\text{CD}}=f(\text{position sur la chaîne aliphatique } sn_1 \text{ du TBBPC-}^2\text{H}_{27})$  est similaire à celle obtenue en insérant 5% de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  dans les bicelles TBBPC/DCPC : Plus on remonte des groupements aliphatiques terminaux vers ceux proches du squelette glycérol, plus le paramètre d'ordre  $S^{\text{CD}}$  augmente, plus la mobilité des C- $^2\text{H}_2$  est restreinte. De même, les valeurs des paramètres d'ordre  $S^{\text{CD}}$  calculées pour les deux systèmes sont équivalentes (voir superposition finale V.4.4).

#### *d) Comparaison avec la dynamique de liposomes de TBBPC- $^2\text{H}_{27}$*

La figure V.13. compare également le spectre RMN- $^2\text{H}$  et le profil d'ordre associés aux liposomes de TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  (spectre et courbe noires, voir chapitre précédent) avec ceux des bicelles TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ /DCPC (spectre et courbe rouges). On constate tout d'abord que la largeur spectrale relative aux MLVs est deux fois plus petite que celle associée aux bicelles.

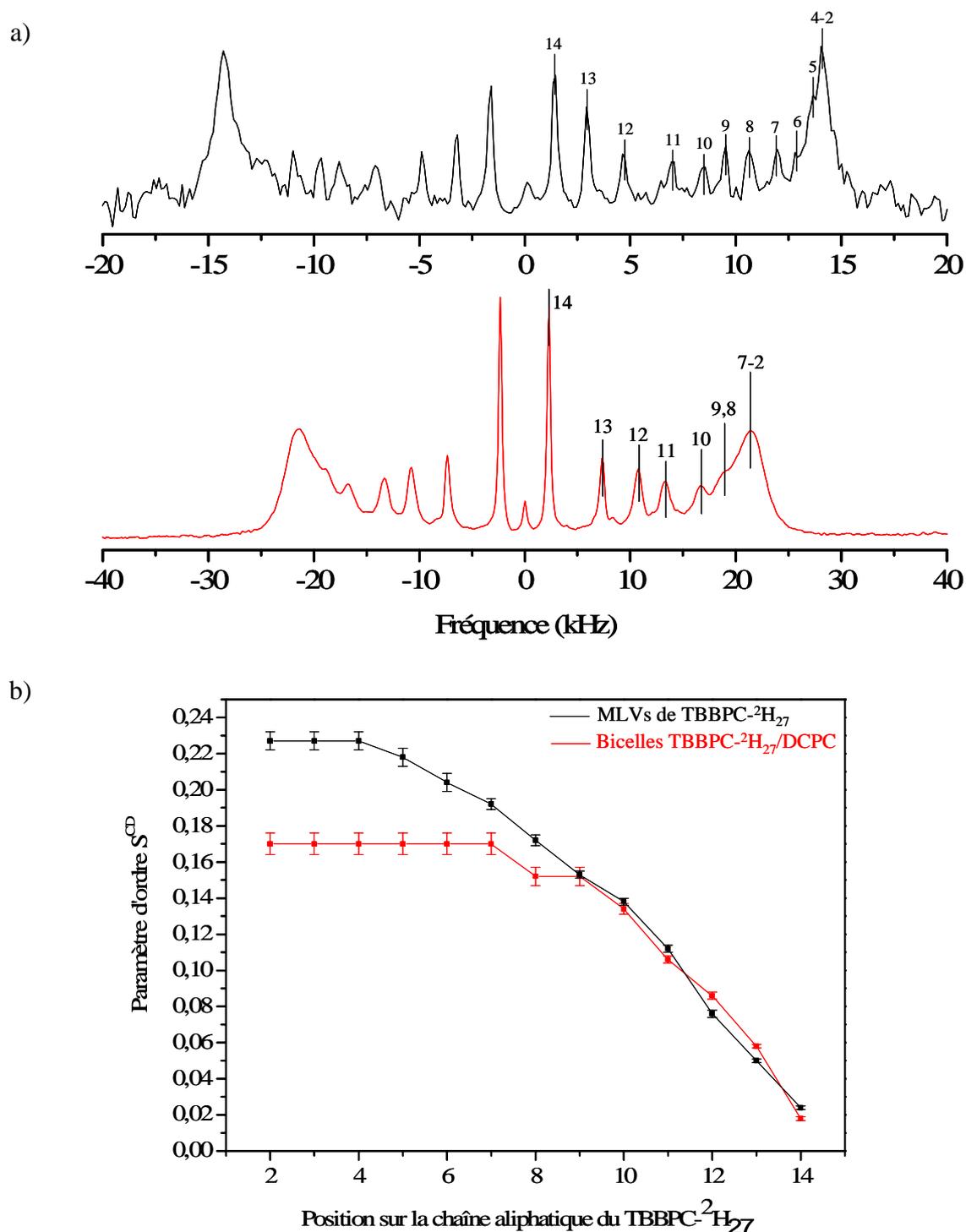


Figure V.13: a) Spectre RMN-<sup>2</sup>H (Echo solide) des bicelles TBBPC<sup>2</sup>H<sub>27</sub>/DCPC ( $h=86\%$ ,  $X=86,7\%$  et  $T=30^{\circ}\text{C}$ , spectre rouge) après 1500 scans d'acquisition ; les attributions des éclatements quadrupolaires aux différents groupes C<sup>2</sup>H<sub>2</sub> sur la chaîne aliphatique  $sn_1$  du TBBPC<sup>2</sup>H<sub>27</sub> sont indiquées sur le spectre. Une comparaison avec le spectre RMN-<sup>2</sup>H attribué des liposomes de TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> ( $h=80\%$ ,  $T=30^{\circ}\text{C}$ , spectre noir, voir chapitre précédent) est effectuée b) Profils d'ordre  $S^{CD}=f(\text{position sur la chaîne } sn_1 \text{ du TBBPC-}^2\text{H}_{27})$  associés aux MLVs de TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> (courbe noire) et aux bicelles TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>/DCPC (courbe rouge).

Dans le premier cas, la déconvolution entraîne en effet l'orientation  $n \perp B_0$  ( $\beta = 90^\circ$ ), alors que dans le deuxième  $n // B_0$  ( $\beta = 0^\circ$ ). D'après la superposition des profils d'ordre des deux systèmes, la dynamique de leurs groupes aliphatiques des positions 9 à 14 est similaire, par contre les  $C-^2H_2$  des positions 8 à 2 sont plus rigides dans les liposomes que dans les bicelles. Celles-ci sont donc des objets plus dynamiques que les vésicules multilamellaires, ce qui avait déjà été mis en évidence par Aussenac et al. (Aussenac et al., 2003) sur le système DMPC/DCPC. La présence du détergeant DCPC dans le système bicellaire en est principalement la cause ; ce lipide très court (chaîne en  $C_6$ ) et très mobile peut en effet diffuser du tore du disque vers la partie plane de la bicelle, où se situent principalement les lipides à chaînes longues ; ces derniers subissent alors moins d'encombrement ce qui augmente leur fluidité.

#### V.4.3 Système TBBPC- $^2H_{27}$ :DMPC(95 :5)/DCPC

Afin de confirmer que la présence de 5% de DMPC dans les bicelles TBBPC/DCPC ne perturbe pas la dynamique de celles-ci, une expérience de contrôle a été réalisée en considérant des bicelles TBBPC- $^2H_{27}$ /DCPC ( $X=86,7\%$ ,  $h=86\%$  dans de l'eau dédeutérée à 98% avec 100 mM de NaCl), dans lesquelles 5% de DMPC a été inséré.

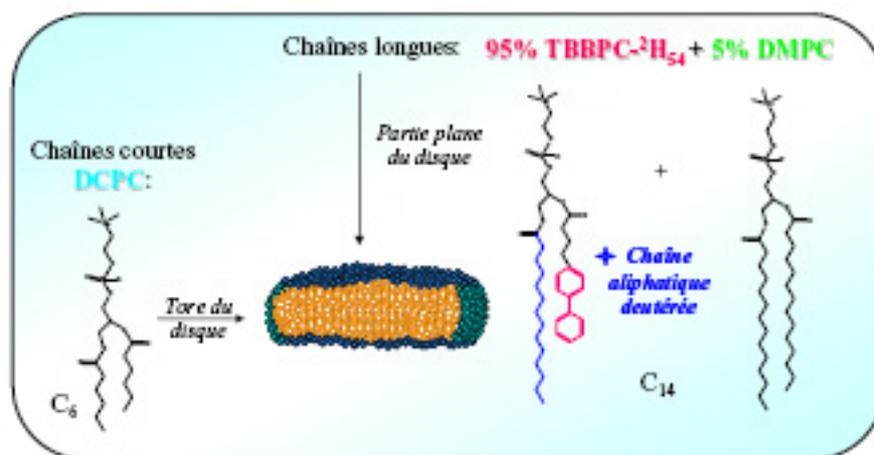


Figure V.14 : Schéma des bicelles TBBPC- $^2H_{27}$ :DMPC(95 :5)/DCPC

Le spectre RMN- $^2H$  ainsi que le profil d'ordre (voir figures V.15 et V.16), obtenus à 30°C pour ce système sont équivalents à ceux des bicelles TBBPC- $^2H_{27}$ /DCPC pures.

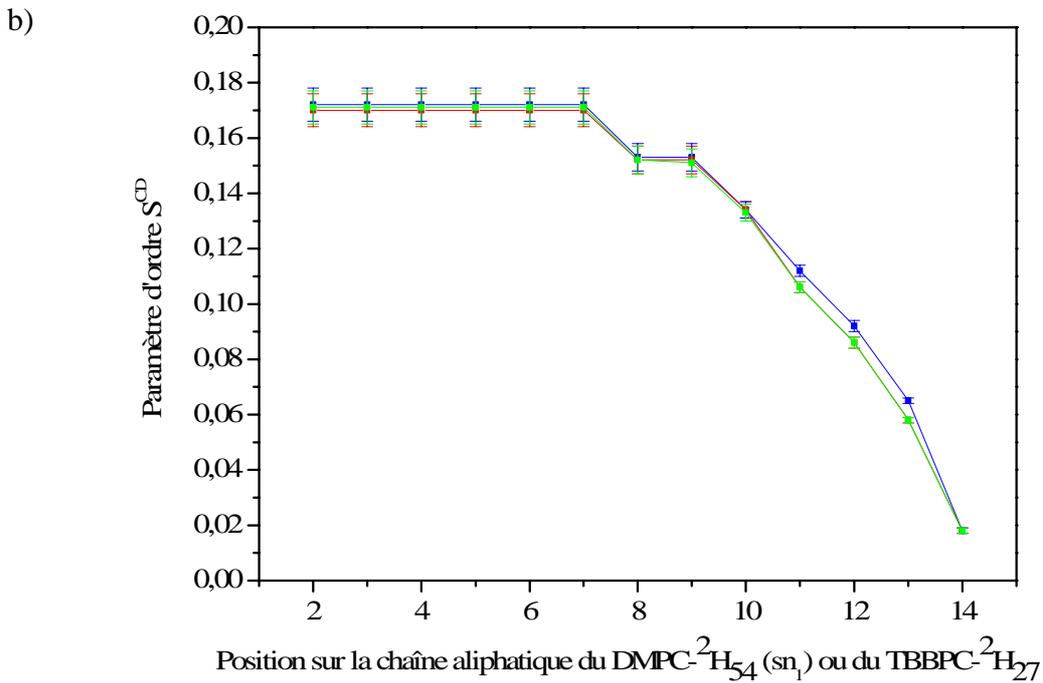
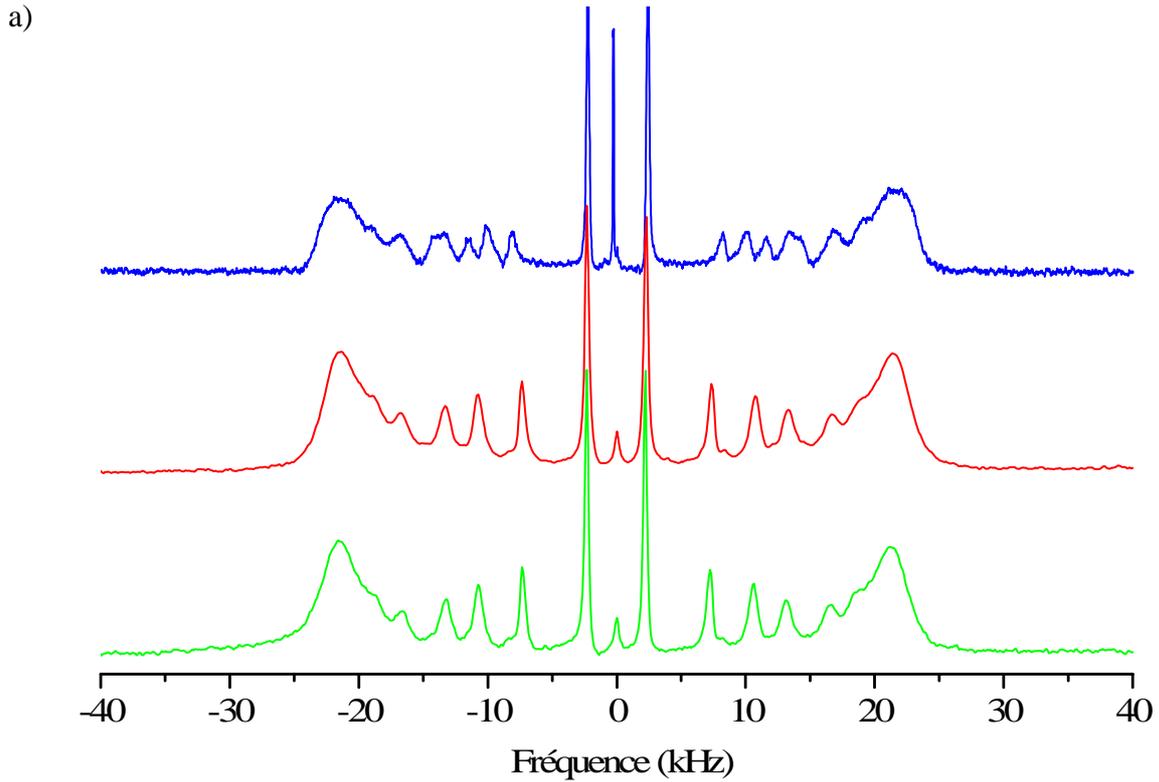


Figure V.15 : Comparaison entre les spectres  $RMN-^1H$  et superposition des profils d'ordre associés aux bicelles  $TBBPC:DMPC-^2H_{54}(95 :5)/DCPC$  (bleu,  $X=85,7\%$  et  $h=90\%$ ), aux bicelles  $TBBPC-^2H_{27}/DCPC$  (rouge,  $X=86,7\%$  et  $h=86\%$ ) et aux bicelles  $TBBPC-^2H_{27}:DMPC(95 :5)/DCPC$  (vert,  $X=86,7\%$  et  $h=86\%$ ) pour une température commune de  $30^\circ C$ .

#### V.4.4 Superposition des trois systèmes bicellaires deutérés

Les figures V.15 et V.16 comparent les spectres RMN- $^2\text{H}$  et les profils d'ordre obtenus pour les trois systèmes bicellaires étudiés précédemment à  $30^\circ\text{C}$ : TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}(95 :5)/\text{DCPC}$ , TBBPC- $^2\text{H}_{27}/\text{DCPC}$  et TBBPC- $^2\text{H}_{27}:\text{DMPC}(95 :5)/\text{DCPC}$ .

On constate que la largeur et la résolution spectrale sont similaires dans les trois cas ce qui confirme l'orientation privilégiée des trois types de bicelles avec la normale à leur bicouche  $n$ , parallèle au champ magnétique  $B_0$ .

Les spectres et donc les profils d'ordre des systèmes TBBPC- $^2\text{H}_{27}/\text{DCPC}$  et TBBPC- $^2\text{H}_{27}:\text{DMPC}(95 :5)/\text{DCPC}$  (courbes rouge et verte) sont identiques. L'insertion de 5% de DMPC dans le système TBBPC/DCPC ne perturbe donc pas la structure et la dynamique de ce dernier. Ainsi, les bicelles biphényles sont capables de s'adapter à la présence en faible quantité d'un troisième lipide de même tête polaire. Nous verrons dans le chapitre VIII la proportion maximale de DMPC que les bicelles TBBPC/DCPC sont prêtes à accepter.

Pour les trois systèmes étudiés à  $30^\circ\text{C}$  TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}(95 :5)/\text{DCPC}$ , TBBPC- $^2\text{H}_{27}/\text{DCPC}$  et TBBPC- $^2\text{H}_{27}:\text{DMPC}(95 :5)/\text{DCPC}$ , les profils d'ordre obtenus sont équivalents, ce qui valide ces résultats vu leur reproductibilité. La dynamique de la chaîne  $sn_1$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  inséré dans les bicelles TBBPC/DCPC est similaire à celle du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  constitutif des bicelles biphényles. Le lipide DMPC- $^2\text{H}_{54}$  constitue donc une sonde adéquate pour retranscrire les mouvements des chaînes lipidiques au sein des bicelles biphényles.

## Conclusion

L'orientation spécifique des bicelles TBBPC/DCPC, telle que leur normale  $n$  soit parallèle au champ magnétique  $B_0$ , a été caractérisée par RMN du phosphore et confirmée par RMN- $^2\text{H}$  et par diffusion des rayons X aux petits angles. Les diagrammes de phase température-composition lipidique et température-hydratation, établis par RMN- $^{31}\text{P}$ , mettent en évidence la grande stabilité en température des bicelles TBBPC/DCPC et leur dépendance à des compositions lipidiques bien précises.

D'après les résultats de RMN en deutérium sur  $\text{D}_2\text{O}$ , l'organisation de l'eau autour des bicelles coïncide avec les domaines d'existence de celles-ci et augmente avec la concentration lipidique, ce qui permet de généraliser ce phénomène à tous les systèmes bicellaires actuellement étudiés.

Des objets discoïdaux, de 790 Å de diamètre moyen, ont été visualisés par microscopie électronique à transmission, issus de la cryofracture d'un échantillon de bicelles TBBPC/DCPC, ce qui écarte l'hypothèse d'une structuration du système en lamelles trouées. La taille de  $700 \pm 100$  Å, déterminée d'après le spectre RMN- $^{31}\text{P}$  caractéristique des bicelles, confirme les résultats de microscopie.

La structuration en bicouche de ces nouvelles bicelles a été validée par SAXS et la distance inter-particules de 114 Å prouve la forte hydratation de l'échantillon.

Enfin, l'étude de la dynamique des bicelles TBBPC/DCPC confirme une mobilité plus importante des groupements aliphatiques en bout de chaîne par rapport à ceux proches du glycérol.

Toutes ces caractéristiques font des bicelles TBBPC/DCPC un bon candidat pour l'étude structurale de protéines hydrosolubles. Nous verrons dans le chapitre VIII qu'elles présentent également des avantages pour l'étude de peptides transmembranaires.

L'objectif est maintenant de comparer ces nouvelles bicelles à celles couramment utilisées actuellement, constituées des lipides DMPC/DCPC.



# CHAPITRE VI

## Comparaison

### Bicelles Biphényles / Bicelles Saturées



Ce chapitre compare les propriétés physico-chimiques des bicelles TBBPC/DCPC, que nous avons caractérisées au chapitre précédent, avec celles des bicelles DMPC/DCPC, modèle membranaire couramment utilisé actuellement. Leurs domaines d'existence, en fonction des conditions de température, d'hydratation et de composition lipidique, seront ainsi superposés ; les différences de dynamique entre les deux systèmes seront étudiées par RMN- $^2\text{H}$  ; enfin, les cinétiques d'orientation dans le champ magnétique et de relaxation en dehors de  $B_0$  de chaque bicelle seront analysées et comparées par Diffusion des rayons X aux petits angles.

## VI.1 Domaines d'existence des bicelles : caractérisation par RMN $^{31}\text{P}$ et $^{14}\text{N}$

### VI.1.1 Comparaison des spectres RMN $^{31}\text{P}$ et $^{14}\text{N}$ entre les deux types de bicelles en fonction de la température.

#### *a) RMN du phosphore*

Des échantillons de DMPC/DCPC ( $X=78\%$  ou  $q=3,5$ ) et TBBPC/DCPC ( $X=87,5\%$  ou  $q=7$ ) ont été préparés avec une hydratation de 80% dans  $\text{D}_2\text{O}$ , contenant respectivement 100 mM de KCl et 100 mM de NaCl. Les spectres RMN- $^{31}\text{P}$  obtenus pour les deux systèmes, entre 10°C et 50°C, sont comparés figure VI.1. Trois caractéristiques spectrales sont observées pour le mélange DMPC/DCPC en fonction de la température :

- en dessous de 20°C, un pic fin centré sur 0 ppm est obtenu, ce qui est représentatif d'une phase isotrope (micelles ou petites bicelles),
- entre 30°C et 40°C, le spectre présente deux pics fins avec des déplacements chimiques négatifs, ce qui est la signature des bicelles s'orientant avec leur normale perpendiculaire au champ magnétique ; le pic le plus intense ( $\approx -10$  ppm) étant assigné aux lipides situés dans la partie plane du disque, dont l'axe directeur est perpendiculaire à  $B_0$  (en majorité DMPC), et le pic le moins intense ( $\approx -3,5$  ppm) étant associé aux lipides diffusant rapidement dans le tore du disque bicellaire (DCPC). On constate que les pics s'affinent avec la température, synonyme d'une meilleure orientation dans le champ magnétique.
- au-dessus de 40°C, il y a coexistence entre une phase isotrope et une phase lamellaire possédant une orientation majoritairement perpendiculaire à  $B_0$ .

Pour toutes les températures étudiées, le système TBBPC/DCPC présente le spectre caractéristique des bicelles dont la normale s'oriente parallèlement au champ magnétique ; on constate à nouveau que l'écart entre les deux pics diminue lorsque la température augmente.

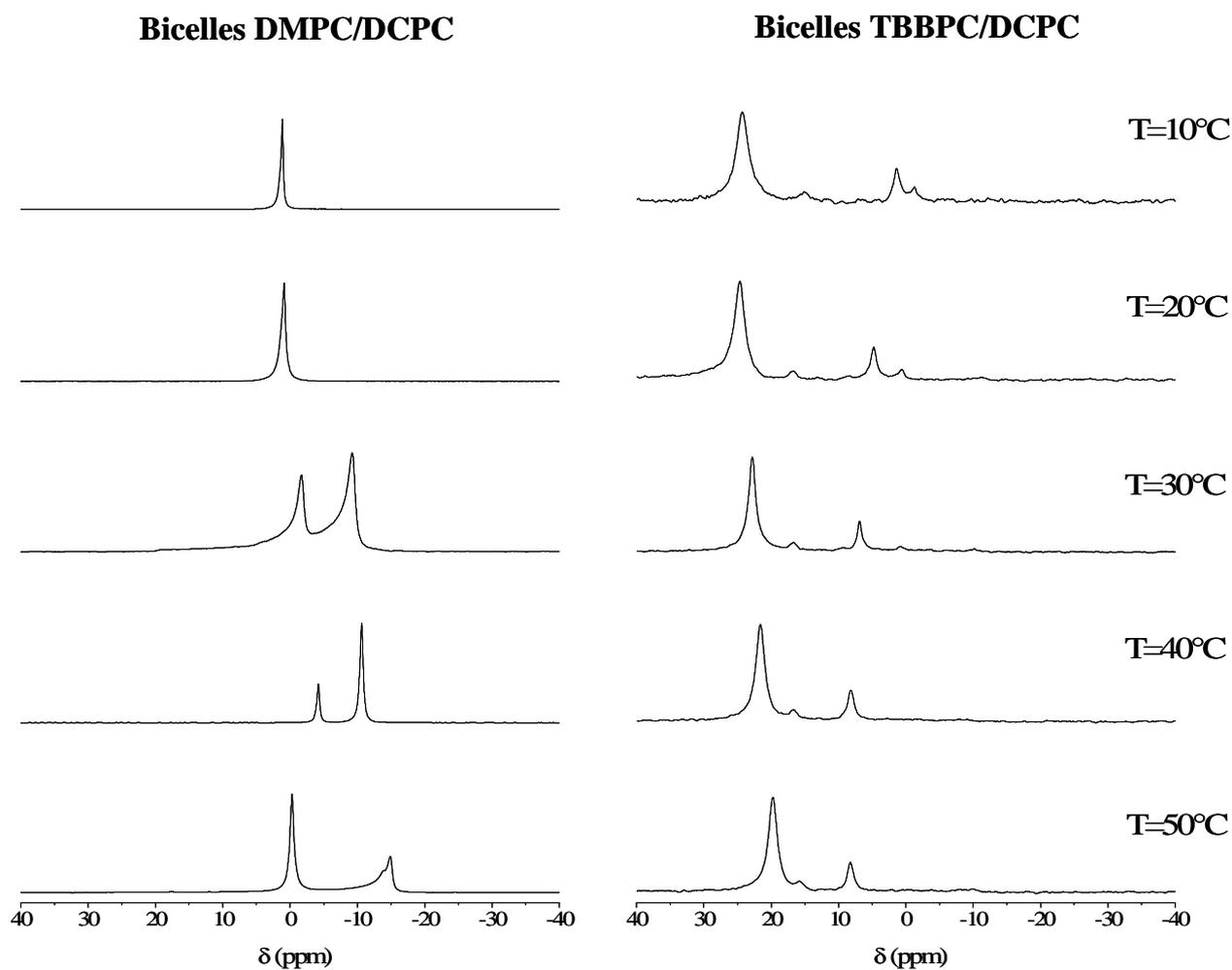


Figure VI.1 : Spectres RMN  $^{31}\text{P}$  (Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) des bicelles DMPC/DCPC ( $h=80\%$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  avec 100 mM de KCl et  $X=78\%$ ) et TBBPC/DCPC ( $h=80\%$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  avec 100 mM de NaCl et  $X=87,5\%$ ). Les températures sont indiquées sur la droite. Chaque spectre est la somme de 350 scans.

Pour  $T=40^{\circ}\text{C}$ , le rapport des intégrations des aires sous les deux pics caractéristiques de chaque bicelle est égal à 3,3 pour celles saturées et à 5,5 pour celles biphényles. Pour les premières, ce rapport est très proche du  $q=(\text{lipides chaînes longues})/(\text{lipides chaînes courtes})$  utilisé pour la préparation ( $q=3,5$ ), tandis que pour les deuxièmes, il y est inférieur ( $q=7$ ). Comme nous l'avons déjà évoqué au chapitre précédent, ceci peut s'expliquer par la présence de pics minoritaires sur le spectre phosphore des bicelles TBBPC/DCPC, qui empêche une intégration précise des signaux. En appliquant le modèle d'Arnold et al. (Arnold et al., 2002) (équation (V.1)) et en tenant compte des rapports d'intégration des pics sur les spectres phosphores, un diamètre de  $\approx 480 \text{ \AA}$  est calculé pour les bicelles DMPC/DCPC et de  $\approx 760 \text{ \AA}$  pour celles biphényles.

Cette comparaison par RMN- $^{31}\text{P}$  entre les deux types de bicelles permet de mettre en évidence l'orientation spécifique de chacune ; en effet le déplacement chimique du pic associé majoritairement au TBBPC ( $\delta \approx 20 \text{ ppm}$  à  $40^{\circ}\text{C}$ ) est deux fois plus grand en valeur absolue que celui relatif en majorité au DMPC ( $\delta \approx -10 \text{ ppm}$  à  $40^{\circ}\text{C}$ ). Ceci est directement lié à la dépendance angulaire en  $(3\cos^2\beta - 1)/2$  ( $\beta$  étant l'angle entre la normale à la bicouche  $n$ , et le champ magnétique) du spectre phosphore. L'axe directeur du TBBPC, colinéaire à la normale à la bicouche, est en effet orienté parallèlement à  $B_0$  ( $\beta=0^{\circ}$ ) tandis que celui du DMPC est orienté perpendiculairement à  $B_0$  ( $\beta=90^{\circ}$ ).

#### *b) RMN de l'azote 14*

Les mêmes échantillons DMPC/DCPC et TBBPC/DCPC que précédemment, ont été étudiés cette fois par RMN de l'azote 14. Les spectres obtenus pour les deux systèmes, entre  $10^{\circ}\text{C}$  et  $50^{\circ}\text{C}$ , sont présentés figure VI.2. Pour le mélange DMPC/DCPC, on constate trois caractéristiques spectrales aux mêmes températures que celles observées par RMN- $^{31}\text{P}$  :

- en dessous de  $20^{\circ}\text{C}$ , un pic fin centré sur 0 ppm est lié à l'existence d'une phase isotrope,
- entre  $30^{\circ}\text{C}$  et  $40^{\circ}\text{C}$ , le spectre RMN présente deux éclatements quadrupolaires distincts, spécifiques aux bicelles s'orientant avec leur normale perpendiculaire au champ magnétique statique : le plus petit ( $\Delta\nu_Q=1,68 \text{ kHz}$  à  $30^{\circ}\text{C}$ ) est associé aux lipides diffusant rapidement dans le tore du disque (DCPC en majorité), et le plus grand ( $\Delta\nu_Q=6,95 \text{ kHz}$  à  $30^{\circ}\text{C}$ ) aux lipides situés dans la bicouche plane (principalement DMPC),

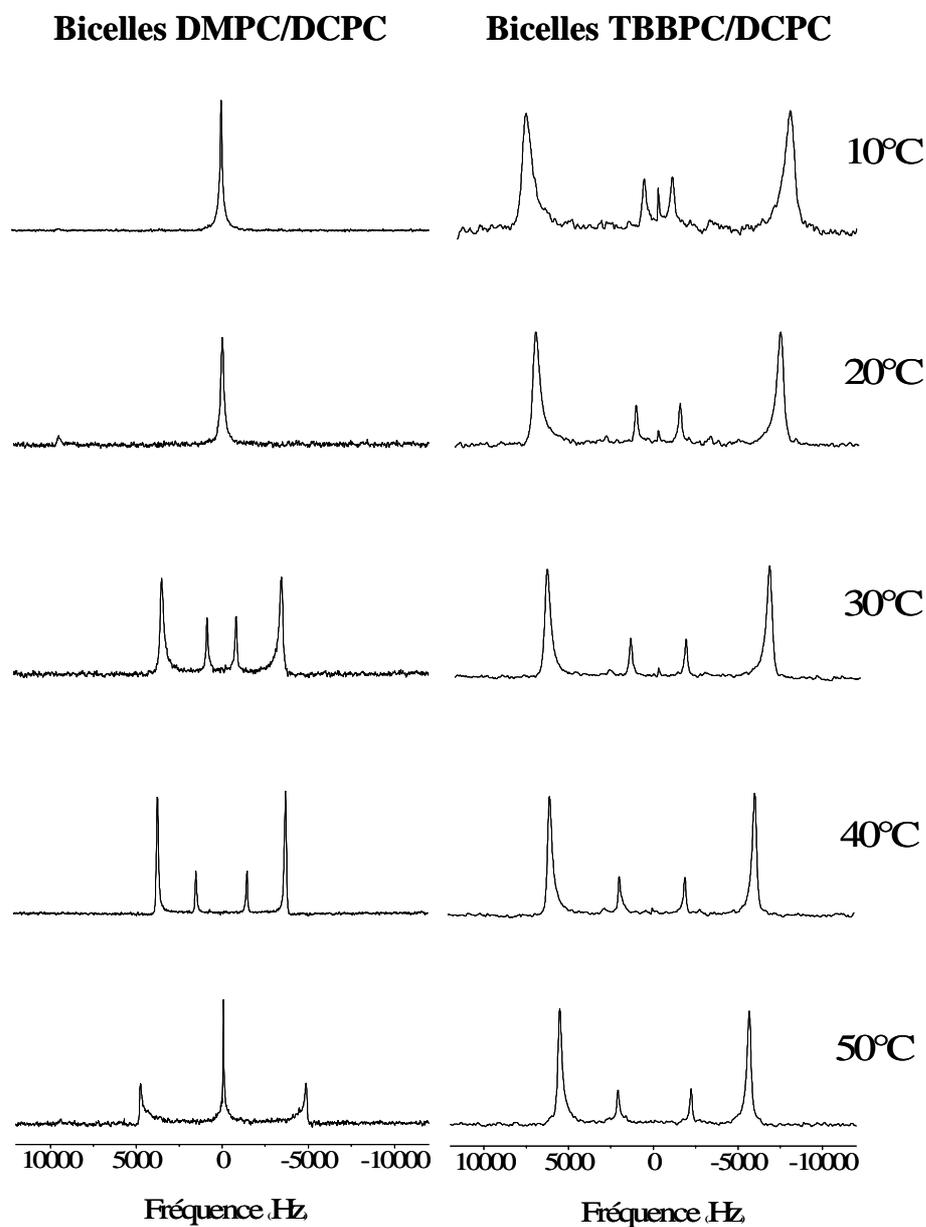


Figure VI.2 : Spectres RMN  $^{14}\text{N}$  (Echo solide) des bicelles DMPC/DCPC ( $h=80\%$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  avec 100 mM de KCl et  $X=78\%$ ) et TBBPC/DCPC ( $h=80\%$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  avec 100 mM de NaCl et  $X=87,5\%$ ). Les températures sont indiquées sur la droite. Chaque spectre est la somme de 40 000 scans.

- au-dessus de 40°C, un pic isotrope coexiste avec un éclatement quadrupolaire large ( $\Delta\nu_Q=9,62$  kHz à 50°C), spécifique d'une phase lamellaire possédant une orientation privilégiée dans le champ magnétique (majoritairement perpendiculaire à  $B_0$ ).

Pour toutes les températures étudiées, le système binaire TBBPC/DCPC présente le spectre RMN  $^{14}\text{N}$  caractéristique des bicelles dont la normale s'oriente parallèlement au champ magnétique ; ceci est en accord avec les résultats de RMN- $^{31}\text{P}$ . Deux éclatements quadrupolaires distincts sont ainsi observés : le plus petit ( $\Delta\nu_Q=3,27$  kHz à 30°C) correspond aux lipides diffusant dans le tore du disque (DCPC) et le plus grand ( $\Delta\nu_Q=13,18$  kHz à 30°C) aux lipides dans la partie plane (TBBPC). On remarque que plus la température augmente, plus l'éclatement quadrupolaire « intérieur » augmente et plus celui « extérieur » diminue.

Une fois encore, on constate que le rapport d'intégration des aires sous les pics est proche du rapport molaire  $q$  pour les bicelles saturées ( $\approx 3,6$ ) et inférieur pour celles biphényles ( $\approx 5,4$ ).

La dépendance angulaire en  $(3\cos^2\beta'-1)/2$  ( $\beta'$  étant l'angle entre la normale à la bicouche et le champ magnétique statique) de l'expression de l'éclatement quadrupolaire  $^{14}\text{N}$  (voir chapitre II.1) entraîne un facteur deux entre les  $\Delta\nu_Q$  des deux types de bicelles. Il est intéressant de noter ici que le rapport entre les éclatements quadrupolaires associés aux lipides des bicelles TBBPC/DCPC et ceux relatifs aux lipides des bicelles DMPC/DCPC est inférieur à deux et que ce facteur diminue quand la température augmente :

$$\frac{\Delta\nu_Q^{TBBPC}}{\Delta\nu_Q^{DMPC}} = \frac{13,22}{6,98} \approx 1,90 \pm 0,01 \text{ à } 30^\circ\text{C} \text{ et } \frac{\Delta\nu_Q^{TBBPC}}{\Delta\nu_Q^{DMPC}} = \frac{12,13}{7,46} \approx 1,63 \pm 0,01 \text{ à } 40^\circ\text{C}. \text{ Ainsi, la}$$

différence entre les  $\Delta\nu_Q(^{14}\text{N})$  des deux types de bicelles n'est pas uniquement liée à l'orientation spécifique de chacune, la dynamique de leur tête choline rentre aussi en jeu.

### c) Discussion

A côté de la RMN du phosphore qui a été utilisée dans notre cas de manière routinière afin d'établir les diagrammes température-composition-hydratation, nous avons montré que la RMN de l'azote 14 permettait aussi de caractériser les systèmes bicellaires. Néanmoins, des temps d'acquisition plus longs (2 heures au lieu de 20 minutes en RMN  $^{31}\text{P}$ ) sont nécessaires afin d'obtenir un bon rapport signal sur bruit, due à la faible sensibilité de l'azote 14. Ainsi, pour vérifier rapidement l'existence ou non de bicelles, la RMN du phosphore sera choisie en premier.

Les domaines d'existence en température de chaque bicelle sont les mêmes, d'après l'observation RMN des noyaux phosphore et azote  $^{14}\text{N}$  des lipides, ce qui valide les résultats. Cette comparaison des spectres RMN- $^{31}\text{P}$  et  $^{14}\text{N}$  des systèmes DMPC/DCPC et TBBPC/DCPC met à nouveau en évidence la grande stabilité en température des bicelles biphényles par rapport à celles saturées ; les premières sont en effet présentes sur la fenêtre des  $40^\circ\text{C}$  étudiée, tandis que les deuxièmes n'existent que sur une gamme de  $\approx 10^\circ\text{C}$ .

Même si les expériences de RMN- $^{14}\text{N}$  nécessitent plus de temps, elles présentent toutefois un intérêt supplémentaire par rapport à celles de RMN- $^{31}\text{P}$ . La mesure des éclatements quadrupolaires renseigne en effet sur la dynamique des têtes cholines. Le rapport entre les éclatements quadrupolaires  $\Delta\nu_Q(^{14}\text{N})$  des deux types de bicelles étant inférieur à deux, on peut penser que la tête du TBBPC dans les bicelles biphényles est soit un peu plus mobile, soit orientée légèrement différemment (soit les deux), par rapport à celle du DMPC dans les bicelles saturées.

#### VI.1.2 Superposition des domaines d'existence des deux types de bicelles

Les diagrammes température-composition et température-hydratation du système TBBPC/DCPC peuvent être directement comparés à ceux du mélange DMPC/DCPC, établis par Raffard et al. (Raffard et al., 2000) ; tous ont été construits à partir de données RMN du phosphore.

##### *a) En fonction de la température et de la composition lipidique*

La figure VI.3 présente la superposition des domaines d'existence des bicelles DMPC/DCPC ( $B_{\perp}$ , symbole  $\square$ ) et TBBPC/DCPC ( $B_{//}$ , symbole  $\circ$ ), pour lesquelles une orientation magnétique est observée, en fonction de la température et de la composition lipidique et pour une hydratation de 80%. Les deux systèmes présentent des différences bien significatives : tandis que les bicelles DMPC/DCPC existent pour des rapports molaires en DMPC compris entre 65% et 87%, les bicelles TBBPC/DCPC ne sont rencontrées que sur une gamme de composition étroite, entre  $X=85,7\%$  et  $X=88,9\%$ . A l'inverse, les bicelles biphényles s'orientent sur une gamme de température très étendue, au maximum de  $10^\circ\text{C}$  à  $75^\circ\text{C}$ , alors que les bicelles saturées ne s'observent qu'entre  $25^\circ\text{C}$  et  $45^\circ\text{C}$ . Cette superposition met clairement en évidence la grande stabilité en température des bicelles TBBPC/DCPC par rapport à celle DMPC/DCPC, et inversement la grande stabilité en composition lipidique des bicelles saturées par rapport à celle biphényles.

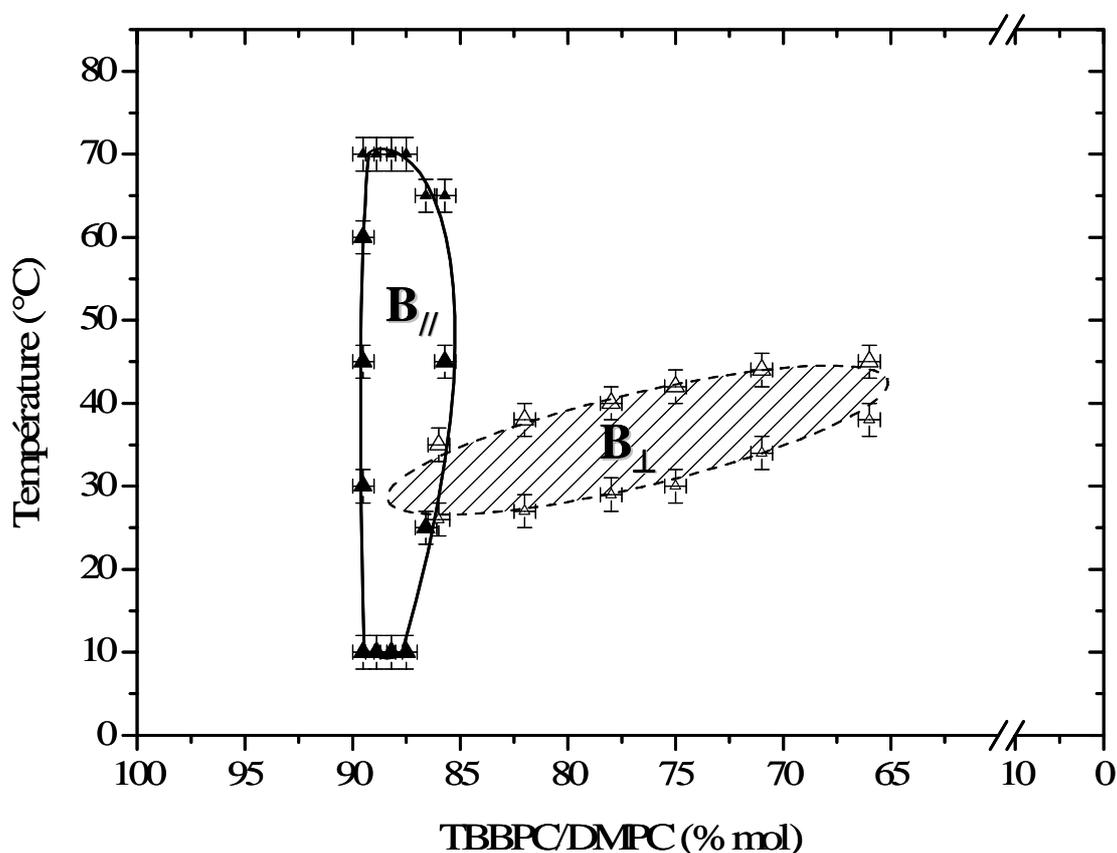


Figure VI.3 : Superposition des diagrammes température-composition lipidique des systèmes DMPC/DCPC (lignes en pointillés, aire hachurée,  $h=80\%$  dans  $D_2O$  avec  $100\text{ mM}$  en  $KCl$ ) et TBBPC/DCPC (lignes solides,  $h=80\%$  dans  $D_2O$  avec  $100\text{ mM}$  en  $NaCl$ ) déterminés par RMN du phosphore. Les domaines respectifs des bicelles orientées dans le champ magnétique sont délimités par ( ) pour le système saturé et par ( ) pour le système biphényle ; les contours de ces domaines sont dessinés arbitrairement pour plus de visibilité.  $B_{||}$  et  $B_{\perp}$  désignent respectivement les bicelles orientées parallèlement et perpendiculairement au champ magnétique. Les données du système DMPC/DCPC sont issues de (Raffard et al., 2000).

*b) En fonction de la température et de l'hydratation*

La figure VI.4 présente la superposition des domaines d'existence des bicelles DMPC/DCPC ( $B_{\perp}$ , symbole  $\square$ ) et TBBPC/DCPC ( $B_{//}$ , symbole  $\circ$ ), en fonction de la température et de l'hydratation, pour des compositions lipidiques respectives de  $X=78\%$  et  $X=86\%$ . Là aussi, la grande stabilité thermique des bicelles biphényles par rapport à celles saturées est mise en valeur : pour 70% d'hydratation, les premières existent entre 10°C et 70°C tandis que les deuxièmes ne sont observées qu'entre 30°C et 44°C. Dans les deux cas, plus l'hydratation augmente, plus le domaine bicellaire est réduit. Néanmoins, pour 90% d'hydratation, les bicelles TBBPC/DCPC s'orientent encore entre 10°C et 55°C tandis que celles DMPC/DCPC ne le sont qu'entre 35°C et 42°C. Pour des hydratations supérieures à 95%, les deux types de bicelles orientées ne sont plus rencontrés.

Remarque : il faut préciser que les bicelles biphényles montrent une stabilité dans le temps beaucoup plus importante que celles saturées. Les premières présentent en effet leur spectre RMN  $^{31}\text{P}$  caractéristique un mois après leur formation (voire plus si elles sont conservées au réfrigérateur à 4°C) tandis que les bicelles DMPC/DCPC perdent leur orientation généralement après deux semaines. L'instabilité des bicelles saturées est principalement due à l'hydrolyse lente des lipides au niveau des liaisons esters, phénomène qui peut être réduit en remplaçant ces dernières par des liaisons éthers (Aussenac et al., 2005). L'origine de la stabilité dans le temps des bicelles biphényles peut être liée aux interactions  $\pi - \pi$  entre les cycles des chaînes  $\text{sn}_1$  des lipides TBBPC, ainsi que leur taille, deux fois plus importante que celle des bicelles saturées.

*c) Discussion*

Nous avons vu qu'à côté de leur grande stabilité thermique, les bicelles TBBPC/DCPC s'alignent avec leur normale parallèle au champ magnétique, pour une gamme de composition très étroite (3%), comparée à celle des bicelles DMPC/DCPC (22%). Ceci peut s'expliquer par la faible flexibilité de l'unité biphényle, qui ne permet pas une grande adaptation du système à la perturbation produite par les lipides à chaînes courtes, assimilables à des détergents (formation de micelles dans un solvant aqueux). Les chaînes saturées hydrocarbonées possèdent davantage de degrés de liberté (isomérisation *gauche-trans* par exemple) pour s'accommoder à la forte courbure engendrée par le lipide DCPC ; les bicelles saturées sont ainsi plus faciles à obtenir que celles biphényles.

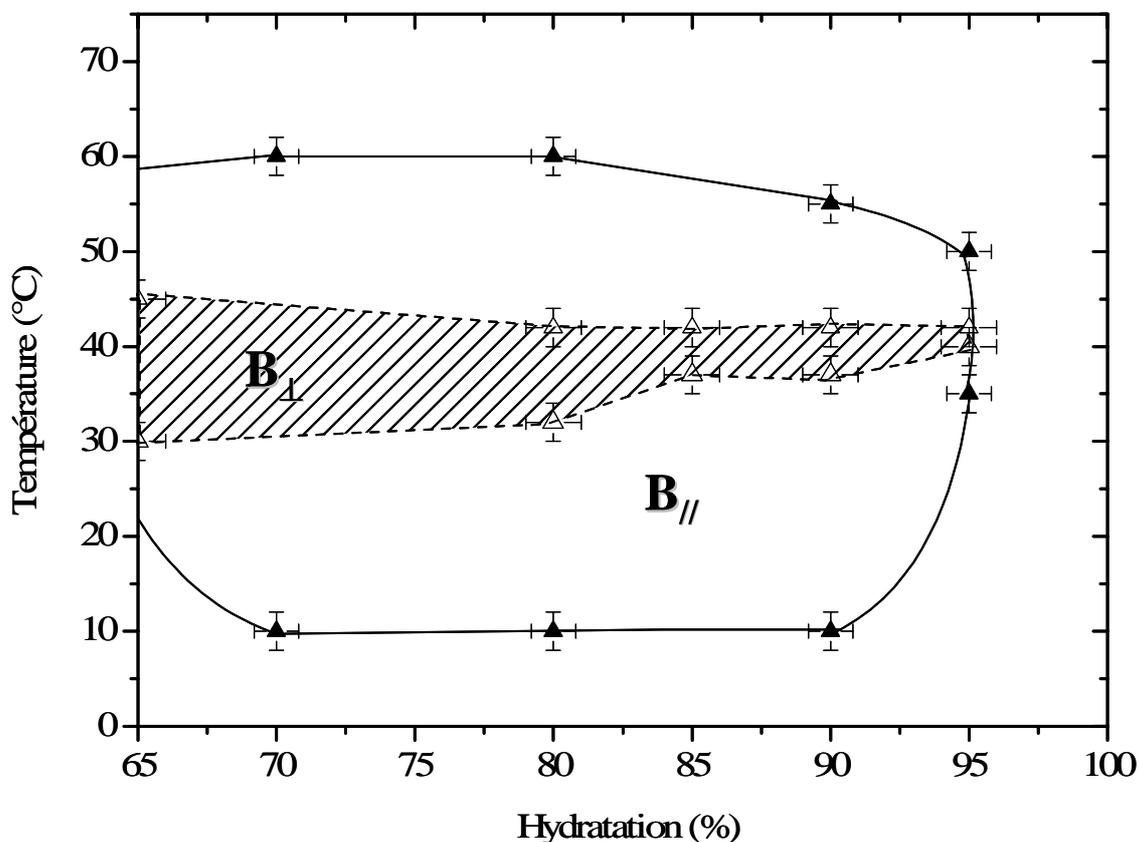


Figure VI.4 : Superposition des diagrammes température-hydratation des systèmes DMPC/DCPC (lignes en pointillés, aire hachurée, X=78%, dans D<sub>2</sub>O avec 100 mM en KCl) et TBBPC/DCPC (lignes solides, X=85,7%, dans D<sub>2</sub>O avec 100 mM en NaCl) déterminés par RMN du phosphore. Les domaines respectifs des bicelles orientées dans le champ magnétique sont délimités par ( ) pour le système saturé et par ( ) pour le système biphényle ; les contours de ces domaines sont dessinés approximativement pour plus de visibilité. B<sub>//</sub> et B<sub>⊥</sub> désignent respectivement les bicelles orientées parallèlement et perpendiculairement au champ magnétique. Les données du système DMPC/DCPC sont issues de (Raffard et al., 2000).

Comme nous l'avons déjà évoqué au chapitre précédent, la formation de ces dernières peut-être remise en cause par de simples erreurs de pesée (dues notamment à l'hygroscopie des poudres) qui modifient légèrement la proportion entre les deux lipides.

Inversement, le domaine d'existence en température des bicelles TBBPC/DCPC est beaucoup plus grand (étendu au maximum sur 65°C) que celui des bicelles DMPC/DCPC (stabilité sur 10-15°C). Cette stabilité thermique peut-être reliée à la forte susceptibilité magnétique  $\Delta\chi$  positive de l'unité biphényle, comme dans le cas des phases cristal-liquides nématiques, dont les molécules en forme de tige s'alignent parallèlement à la direction du champ magnétique.

En variant l'hydratation, le comportement en température des deux systèmes est similaire : plus le milieu est hydraté, plus leur capacité d'orientation diminue ; la limite étant obtenue pour  $\approx 95\%$ . Ainsi, un empilement (packing) minimum de bicelles, à l'origine d'une coopérativité entre elles, semble nécessaire pour conserver l'orientation des objets discoïdaux dans le champ magnétique.

## VI.2 Dynamique des bicelles : caractérisation par RMN $^2\text{H}$

### VI.2.1 Comparaison de la dynamique des deux types de bicelles par l'analyse RMN- $^2\text{H}$ des chaînes lipidiques du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ et DMPC- $^2\text{H}_{54}$

#### a) Spectres RMN- $^2\text{H}$

La figure VI.5.a) présente le spectre RMN- $^2\text{H}$  associé aux bicelles DMPC- $^2\text{H}_{54}$ /DCPC, obtenu par Aussenac et al. (Aussenac et al., 2003) (avec X=78% et h=80%, spectre noir), et celui relatif aux bicelles TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ /DCPC (X=87,5%, h=80%, spectre rouge), pour une température commune de 35°C.

Pour les deux systèmes, les spectres sont bien résolus ce qui prouve que les objets bicellaires adoptent une orientation privilégiée dans le champ magnétique, celle où  $\beta=90^\circ$  ( $\beta$  étant l'angle entre la normale à la bicouche et  $B_0$ ) pour les bicelles saturées et  $\beta=0^\circ$  pour les bicelles biphényles. Ce changement d'orientation de  $90^\circ$  entre les deux systèmes est visible par la différence de largeur spectrale ; celle associée aux bicelles TBBPC/DCPC ( $\Delta\nu_{Q(\max)} = 39,8$  kHz) est en effet quasiment deux fois plus importante que celle des bicelles DMPC/DCPC ( $\Delta\nu_{Q(\max)} = 20,3$  kHz). La théorie RMN qui relie l'éclatement quadrupolaire à la dépendance angulaire en  $(3\cos^2\beta - 1)/2$  est une fois de plus vérifiée expérimentalement.

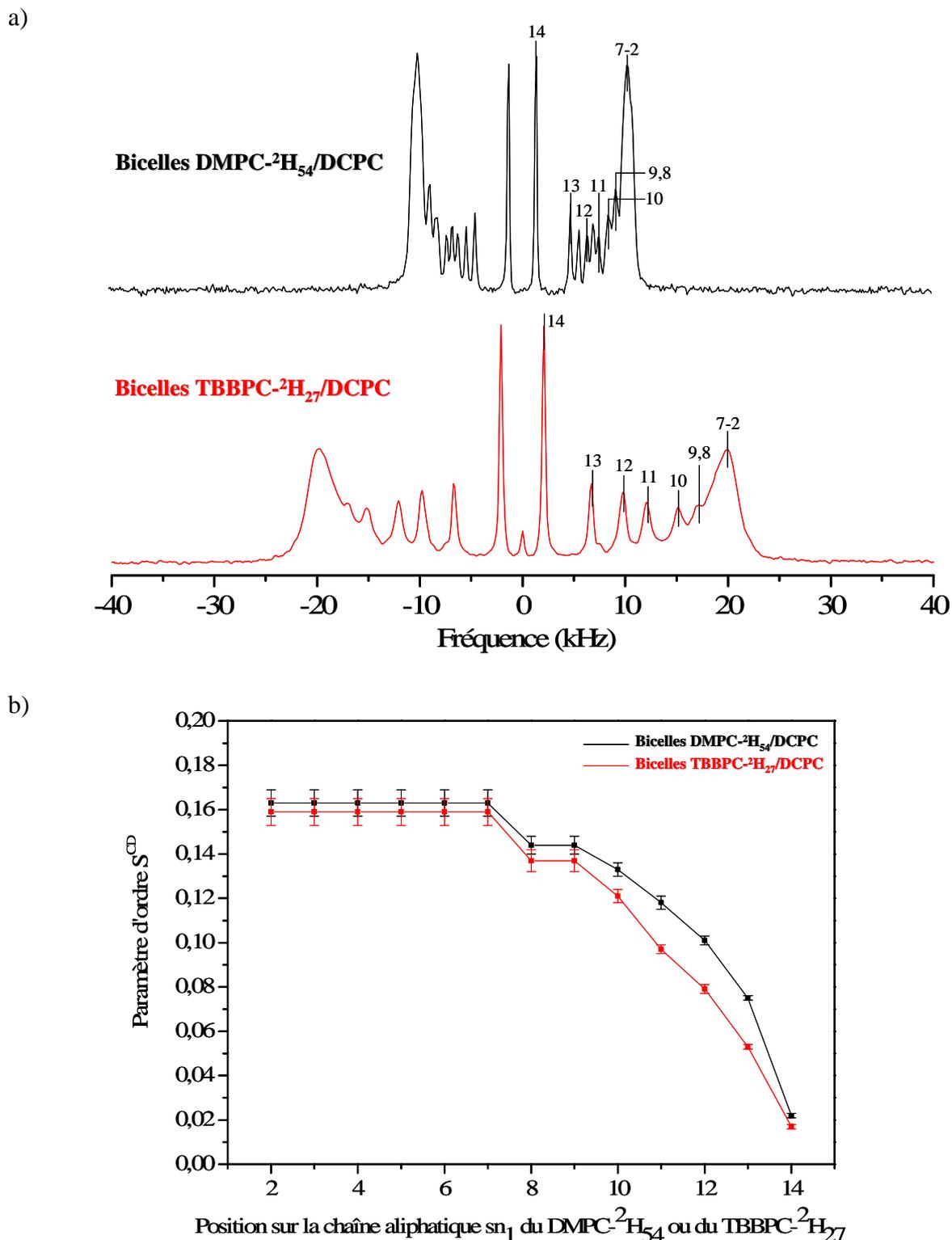


Figure VI.5 : a) Comparaison entre les spectres RMN- $^2\text{H}$  (Echo solide) des bicelles DMPC- $^2\text{H}_{54}$ /DCPC ( $X=78\%$ ,  $h=80\%$ , (Aussenac et al., 2003)) et des bicelles TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ /DCPC ( $X=86,7\%$ ,  $h=86\%$ ) pour une température commune de  $35^\circ\text{C}$ . Les attributions des pics associés aux positions des groupements aliphatiques sur la chaîne  $sn_1$  de chaque lipide deutéré sont présentées. b) Profils d'ordre associés à chaque système bicellaire (chaîne  $sn_1$ ).

Les éclatements quadrupolaires des groupes C-<sup>2</sup>H<sub>2</sub> des deux chaînes sn<sub>1</sub> et sn<sub>2</sub> non équivalentes du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> peuvent être attribués sur son spectre RMN-<sup>2</sup>H ; toutefois, nous ne considérons ici que ceux relatifs à la chaîne sn<sub>1</sub> pour pouvoir comparer avec le TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> (voir attribution sur le spectre figure VI.5.a, (Davis, 1979) ; (Aussenac et al., 2003)). Pour les deux types de bicelles, les éclatements quadrupolaires relatifs aux C-<sup>2</sup>H<sub>2</sub> des positions 14 à 10 peuvent être distingués individuellement ; ceux des positions 9 à 8 et 7 à 2 sont regroupés respectivement sous un même pic.

La mesure des éclatements quadrupolaires sur chacun des spectres RMN du deutérium permet de calculer les paramètres d'ordre S<sup>CD</sup>, associés à chaque position des groupements C-<sup>2</sup>H<sub>2</sub> sur la chaîne deutérée sn<sub>1</sub> du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> ( $S^{CD} = 4\Delta\nu_Q / 3A_Q$ ) et sur celle sn<sub>1</sub> du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> ( $S^{CD} = 2\Delta\nu_Q / 3A_Q$ ) ; les profils d'ordre de chacun de ces lipides insérés dans leurs bicelles respectives sont ensuite tracés (figure VI.5.b)).

#### *b) Profils d'ordre*

La figure VI.5.b) présente la superposition des profils d'ordre associés au DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> des bicelles saturées (courbe noire) et au TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> des bicelles biphényles (courbe rouge), calculés à partir des spectres RMN-<sup>2</sup>H précédents, pour une température de 35°C.

L'allure générale de ces deux profils est tout à fait similaire : plus on remonte du bout de la chaîne aliphatique vers le squelette glycérol, plus le paramètre d'ordre augmente. Ainsi les groupements aliphatiques en positions 14 ou 13 présentent les paramètres d'ordre les plus faibles et sont donc les plus mobiles, tandis que ceux proches du glycérol (positions 2-7) ont des S<sup>CD</sup> plus grands et sont donc plus rigides.

On constate toutefois quelques écarts entre les deux courbes :

- les paramètres d'ordre des positions 2 à 9 du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> sont légèrement supérieurs (de 0,004 et 0,007 unités respectivement pour les positions 2 à 7 et 8 à 9) à ceux du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> ; néanmoins, compte tenu des marges d'erreur de chaque système, liées aux imprécisions des mesures de  $\Delta\nu_Q$  pour ces positions, la dynamique des deux bicelles peut être considérée comme équivalente pour cette partie de chaîne.

- les groupements aliphatiques des positions 10 à 13 du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> présentent une mobilité plus importante que ceux du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>. On relève en effet des différences entre les valeurs des paramètres d'ordre des deux systèmes allant de 0,012 pour la position 10, à 0,021 pour la 11, jusqu'à 0,022 pour les positions 12 et 13. Compte tenu des faibles marges

d'erreurs associées à ces positions, ces écarts sont significatifs d'une dynamique différente entre les deux systèmes.

- les  $C^2H_3$  en position terminale (14) présentent quant à eux une mobilité similaire dans les deux types de bicelles (écart de 0,005 unités entre les valeurs des  $S^{CD}$ ).

### *c) Discussion*

L'orientation spécifique  $n//B_0$  des bicelles TBBPC/DCPC par rapport à celle  $n\perp B_0$  des bicelles DMPC/DCPC, a été une fois de plus prouvée par ces expériences RMN- $^2H$ , étant donné le facteur deux entre les éclatements quadrupolaires de chaque système.

L'allure générale des profils d'ordre obtenus pour les deux types de bicelles étant comparable, on peut considérer que leur dynamique est en moyenne équivalente. Ceci prouve que la présence des deux cycles phényles sur l'une des chaînes aliphatiques du TBBPC ne modifie pas complètement la dynamique de ces nouvelles bicelles, ce qui aurait pu être envisagé initialement. C'est donc un aspect positif pour les applications des bicelles biphényles notamment dans l'étude structurale de biomolécules. On pourra ainsi facilement comparer les résultats entre les deux modèles membranaires.

La différence de dynamique entre les bicelles saturées et biphényles pour les positions 10 à 13 avait déjà été constatée entre des liposomes de DMPC- $^2H_{54}$  et de TBBPC- $^2H_{27}$ , en particulier pour les positions 12 et 13 (voir chapitre IV). A nouveau, la structure de chaque lipide est à l'origine de ce phénomène : la longueur nettement plus courte de la chaîne  $sn_2$  du TBBPC- $^2H_{27}$ , entraîne une mobilité plus importante des  $C^2H_2$  des positions 10 à 13 sur sa chaîne  $sn_1$ . Ces mêmes groupes aliphatiques subissent un encombrement stérique plus important dans la molécule de DMPC- $^2H_{54}$ , la chaîne  $sn_2$  n'ayant qu'une longueur très légèrement inférieure à celle  $sn_1$  ; leur rigidité est donc plus importante.

La dynamique des groupes aliphatiques des positions plateaux est équivalente pour les deux types bicellaires alors qu'elle était différente entre les liposomes de TBBPC- $^2H_{27}$  et DMPC- $^2H_{54}$  (voir chapitre IV). La structure discoïdale des bicelles impose donc une rigidité particulière aux groupes  $C^2H_2$ , proches du squelette glycérol, auxquelles se soumettent de la même façon les deux lipides.

## d) Estimation de la longueur des chaînes lipidiques dans les bicelles

Comme pour les liposomes de DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> et TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>, il est possible de calculer les longueurs des chaînes aliphatiques des lipides saturé et biphényle insérés dans leurs bicelles respectives, à partir des valeurs de leurs paramètres d'ordre (voir chapitre IV, équation (IV.1)).

|  | TBBPC- <sup>2</sup> H <sub>27</sub> dans bicelles<br>TBBPC- <sup>2</sup> H <sub>27</sub> /DCPC | DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> dans bicelles<br>DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> /DCPC |
|--|--|--|
| Longueur de la chaîne aliphatique $s_{n_1}$ (en Å) | <b>9,96</b>  | <b>10,01</b>   |

Tableau VI.1 : Estimation de la longueur moyenne de la chaîne aliphatique  $s_{n_1}$  (en Å) du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> dans les bicelles biphényles et du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> dans les bicelles saturées pour une température de 35°C. La précision est de  $\pm 0,05$  Å.

D'après le tableau VI.1, les longueurs des chaînes  $s_{n_1}$  des lipides TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> et DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>, insérés dans leurs bicelles respectives, sont semblables ( $\approx 10$  Å). Dans le cas des liposomes de TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> et DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>, la différence de longueur de chaîne entre ces deux lipides était plus marquée (écart de 0,15 unités). La géométrie de l'édifice bicellaire impose donc une certaine longueur hydrophobe aux lipides.

Ainsi, les bicelles biphényles suivent le même comportement que celles saturées, tant au niveau de la longueur des chaînes aliphatiques qu'au niveau de leur mobilité, deux caractéristiques spécifiques au modèle de bicelle. La présence des deux cycles phényles sur la chaîne  $s_{n_2}$  du TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> contribue donc à orienter les bicelles biphényles tel que  $n//B_0$ , c'est-à-dire à 90° par rapport aux bicelles saturées, sans perturber la structure et la dynamique des objets, ce qui est un point très positif. En effet, c'est également l'objectif des bicelles DMPC/DCPC dopées avec des ions lanthanides, qui s'orientent aussi avec leur normale à la bicouche parallèle à  $B_0$ . Toutefois, l'effet paramagnétique des ions lanthanides est problématique ; de plus, des hésitations demeurent sur la structure adoptée par ce système smectique, notamment entre objets bicellaires et lamelles trouées.

### VI.2.2 Comparaison de l'organisation de D<sub>2</sub>O entre les deux solutions bicellaires

Le graphe figure VI.6 présente les éclatements quadrupolaires (en Hz) associés à l'eau deutérée des solutions de bicelles TBBPC/DCPC (100 mM de NaCl, X= 86%), en fonction de la température (de 10°C à 70°C), pour 70%, 80% et 90% d'hydratation. On constate que pour une composition lipidique définie, les éclatements quadrupolaires augmentent avec la température et la déshydratation du milieu. On passe ainsi d'un éclatement  $\Delta\nu_Q \approx 13$  Hz pour h=90% et T=10°C à  $\Delta\nu_Q \approx 186$  Hz pour h=70% et T=70°C.

Une comparaison est faite avec les éclatements quadrupolaires associés à l'eau deutérée des solutions de bicelles DMPC/DCPC (100 mM de KCl, X=78%), pour h=80%, obtenus par Arnold et al. (Arnold et al., 2002). Pour ce dernier système,  $\Delta\nu_Q$  varie de 24 Hz pour T=30°C à 46 Hz pour T=39°C, tandis que pour les bicelles biphényles,  $\Delta\nu_Q$  varie de 74 Hz pour T=30°C à 85 Hz pour T=40°C. Les éclatements quadrupolaires associés aux bicelles TBBPC/DCPC sont en moyenne deux fois plus grands que ceux associés aux bicelles saturées, même si quelques variations sont notables. Une fois de plus, ce facteur deux est directement relié à l'orientation spécifique de chaque bicelle. Les conditions d'échange entre la forme de l'eau liée à la membrane et celle libre en solution sont donc équivalentes pour les deux types de bicelles ; un même nombre de molécules d'eau ( $\approx 12$ , (Faure et al., 1997)) se lie à la tête choline de chaque lipide.

Ces résultats sont particulièrement intéressants pour des études structurales de biomolécules hydrosolubles que l'on dilue dans la solution bicellaire TBBPC/DCPC ; l'organisation de l'eau autour des bicelles confère en effet aux biomolécules une certaine orientation dans le champ magnétique. On pourra alors mesurer des couplages dipolaires résiduels plus importants et sur une gamme de température beaucoup plus élevée (10°C-70°C), qu'avec le système DMPC/DCPC actuellement utilisé.

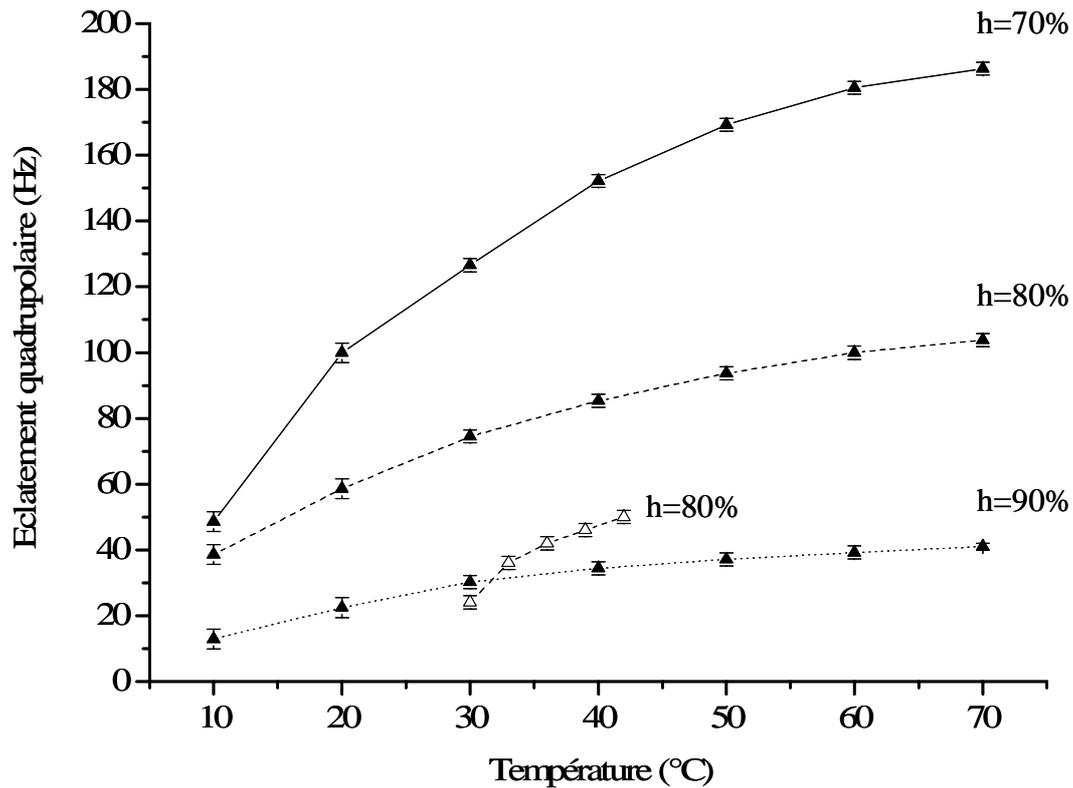


Figure VI.6 : Eclatements quadrupolaires associés à l'eau deutérée des solutions bicellaires TBBPC/DCPC ( ) (contenant 100 mM de NaCl, avec X=86%) en fonction de la température (°C), pour trois hydratations : 70% (ligne solide), 80% (ligne hachurée) et 90% (ligne en pointillée). Ces résultats sont comparés à ceux obtenus par Arnold et al. (Arnold et al., 2002) pour le système DMPC/DCPC ( ) (100 mM KCl, X=78%) pour h=80%.

### VI.3 Cinétique d'orientation dans un champ magnétique et de relaxation en dehors de $B_0$ des bicelles : caractérisation par SAXS.

#### VI.3.1 Clichés de diffusion X aux petits angles des bicelles.

##### a) *Bicelles DMPC/DCPC*

Sur le même principe que les bicelles biphényles (voir chapitre V.3), les bicelles DMPC/DCPC ( $X=78\%$  et  $h=80\%$ ) ont été analysées par Diffusion des Rayons X aux petits angles à  $35^\circ\text{C}$  (pour respecter les conditions d'existence des bicelles). Un capillaire scellé (1,5 mm), contenant 30  $\mu\text{l}$  d'échantillon, est placé dans la sonde RMN, réglée à  $35^\circ\text{C}$ , de telle sorte qu'il soit aligné parallèlement à  $B_0$ . Après 20 minutes dans le champ magnétique de 11,74 Tesla, le capillaire est transféré (via un bain thermostaté à  $35^\circ\text{C}$ ) en  $\approx 2$  min dans l'appareil de diffusion X, lui-même réglé à  $35^\circ\text{C}$ . Le cliché à deux dimensions obtenu après 2 min d'acquisition est présenté figure VI.7.a) (droite). Deux spots alignés dans la direction de l'axe  $y$  sont observés. Ce résultat est directement lié à l'orientation spécifique des bicelles saturées, avec leur normale  $n$  perpendiculaire à  $B_0$ . Une expérience contrôle est réalisée à  $35^\circ\text{C}$  avec le même échantillon sans orientation préalable dans le champ magnétique. Le cliché de diffusion X obtenu après 2 min d'acquisition est alors constitué d'un cercle, ce qui est caractéristique d'un échantillon sans orientation privilégiée (figure VI.7.a) gauche).

Les signaux sont ensuite intégrés afin de tracer le graphe  $I=f(q)$ , où  $I$  représente l'intensité diffusée et  $q$  le vecteur d'onde de diffusion (en  $\text{\AA}^{-1}$ ). Pour le système non-orienté, l'intégration est effectuée sur  $360^\circ$  (intégration circulaire) tandis que pour le système préalablement orienté dans le champ magnétique, elle est réalisée uniquement selon l'axe  $y$ , perpendiculaire à  $B_0$  (intégration linéaire). Les courbes  $I=f(q)$  obtenues sont présentées sur la figure VI.7.b) : la courbe continue correspond aux bicelles orientées dans  $B_0$  et celle en pointillés est associée aux bicelles non-orientées. Pour les deux systèmes, une large bosse est observée dont le maximum se situe à  $q \approx 0,13 \text{ \AA}^{-1}$ ; comme pour les bicelles TBBPC/DCPC, cette bosse est associée au facteur de forme du système et est caractéristique d'une structuration de phospholipides en bicouche (Riske et al., 2001). Dans le cas des bicelles saturées, cette bicouche est constituée en majorité du lipide DMPC, pour les bicelles biphényles, c'est le TBBPC qui est majoritaire.

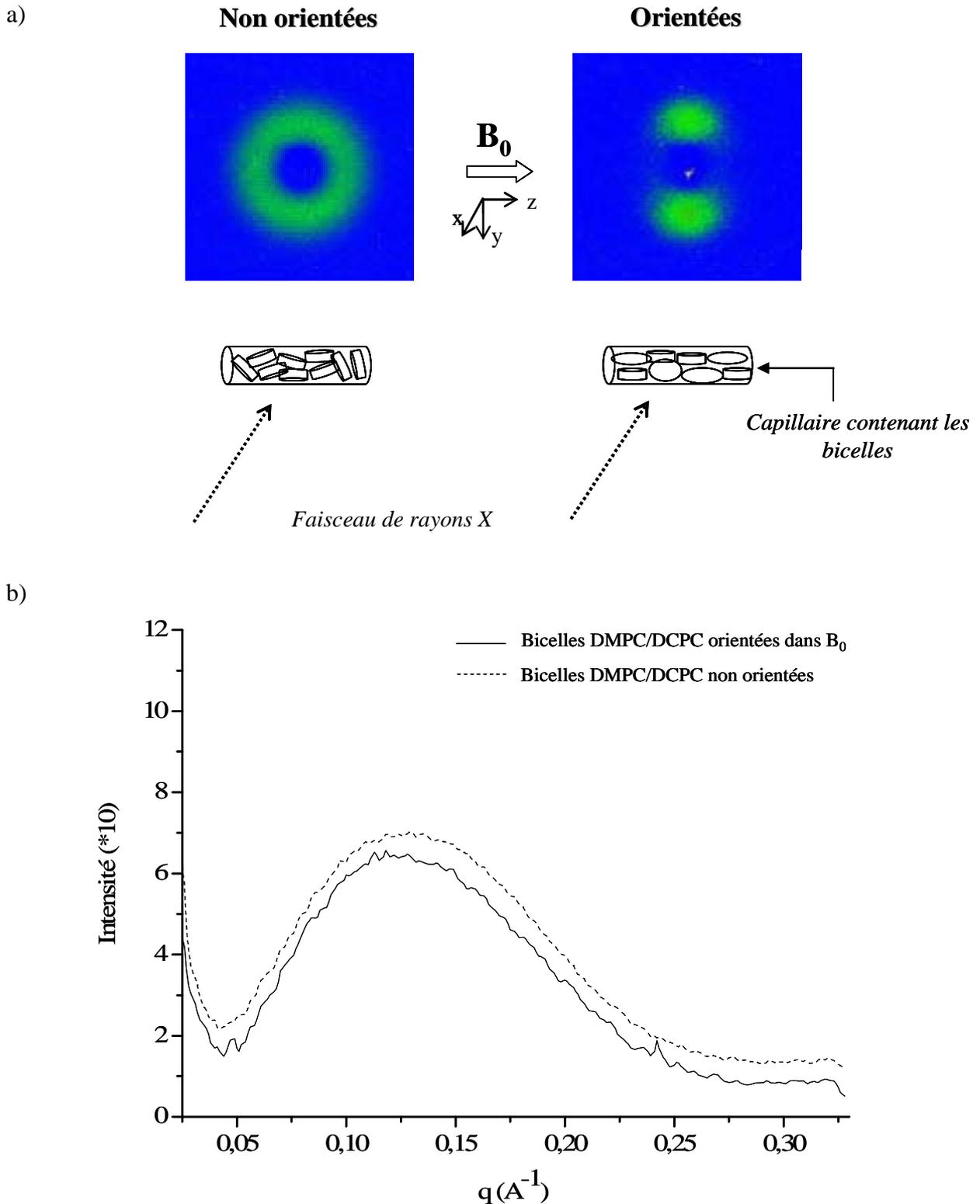


Figure VI.7 : a) Cliché 2D de diffusion X aux petits angles des bicelles DMPC/DCPC non-orientées (gauche) et préalablement orientées dans le champ magnétique pendant 20 minutes (droite), pour une température de 35°C. b) Graphe  $I=f(q)$  après une intégration linéaire selon l'axe y pour le système orienté (courbe continue) et une intégration circulaire pour le système non orienté (courbe en pointillés).

Aucun pic de Bragg n'est observé pour les bicelles saturées orientées et non orientées, ou du moins son intensité est trop faible par rapport au facteur de forme pour être visible. Les libertés de mouvements dans les plans (xz) et (yz) des bicelles saturées orientées et la distribution totalement aléatoire des bicelles non orientées, empêchent la répétition du motif en bicouche des bicelles dans une direction privilégiée. Les intensités des signaux diffusés sont similaires entre les deux systèmes car la probabilité de rencontre entre les rayons X et la matière diffusante est équivalente.

### *b) Comparaison bicelles saturées / bicelles biphényles*

D'après les analyses précédentes, une comparaison peut être effectuée entre les signaux diffusés respectivement par les bicelles biphényles et celles saturées.

Les clichés de diffusion X (figure VI.8.a) des bicelles saturées (gauche) et biphényles (droite), obtenus après 20 minutes d'orientation dans le champ magnétique et 2 min d'acquisition, mettent clairement en évidence la différence d'orientation de  $90^\circ$  entre les deux systèmes : les spots observés dans la direction de l'axe y pour les bicelles DMPC/DCPC caractérisent l'orientation  $n \perp B_0$  et ceux observés dans la direction de l'axe z pour les bicelles TBBPC/DCPC sont spécifiques de l'orientation  $n // B_0$ .

La superposition des graphes  $I=f(q)$  (figure VI.8.b) des bicelles saturées (courbe noire, intensité \*300) et biphényles (courbe rouge), après orientation dans  $B_0$ , révèle des différences significatives entre les deux systèmes :

- un pic de Bragg ( $q=0,055 \text{ \AA}^{-1}$ ), associé à une distance inter-particules de  $\approx 114 \text{ \AA}$ , est observé pour les bicelles TBBPC/DCPC, ce qui n'est pas le cas des bicelles DMPC/DCPC,
- l'intensité diffusée par les bicelles biphényles orientées est bien plus importante (d'un facteur de 300) par rapport à celle des bicelles saturées orientées,
- le facteur de forme de chaque système est représenté dans les deux cas par une large bosse, dont le maximum est situé à  $q=0,13 \text{ \AA}^{-1}$  pour les bicelles DMPC/DCPC et à  $q=0,17 \text{ \AA}^{-1}$  pour les bicelles TBBPC/DCPC. Ce signal est caractéristique d'une structure en bicouche.

### *c) Discussion*

La Diffusion des rayons X a permis une fois de plus de mettre en évidence l'orientation spécifique des bicelles DMPC/DCPC ( $n \perp B_0$ ) et TBBPC/DCPC ( $n // B_0$ ) dans un champ magnétique.

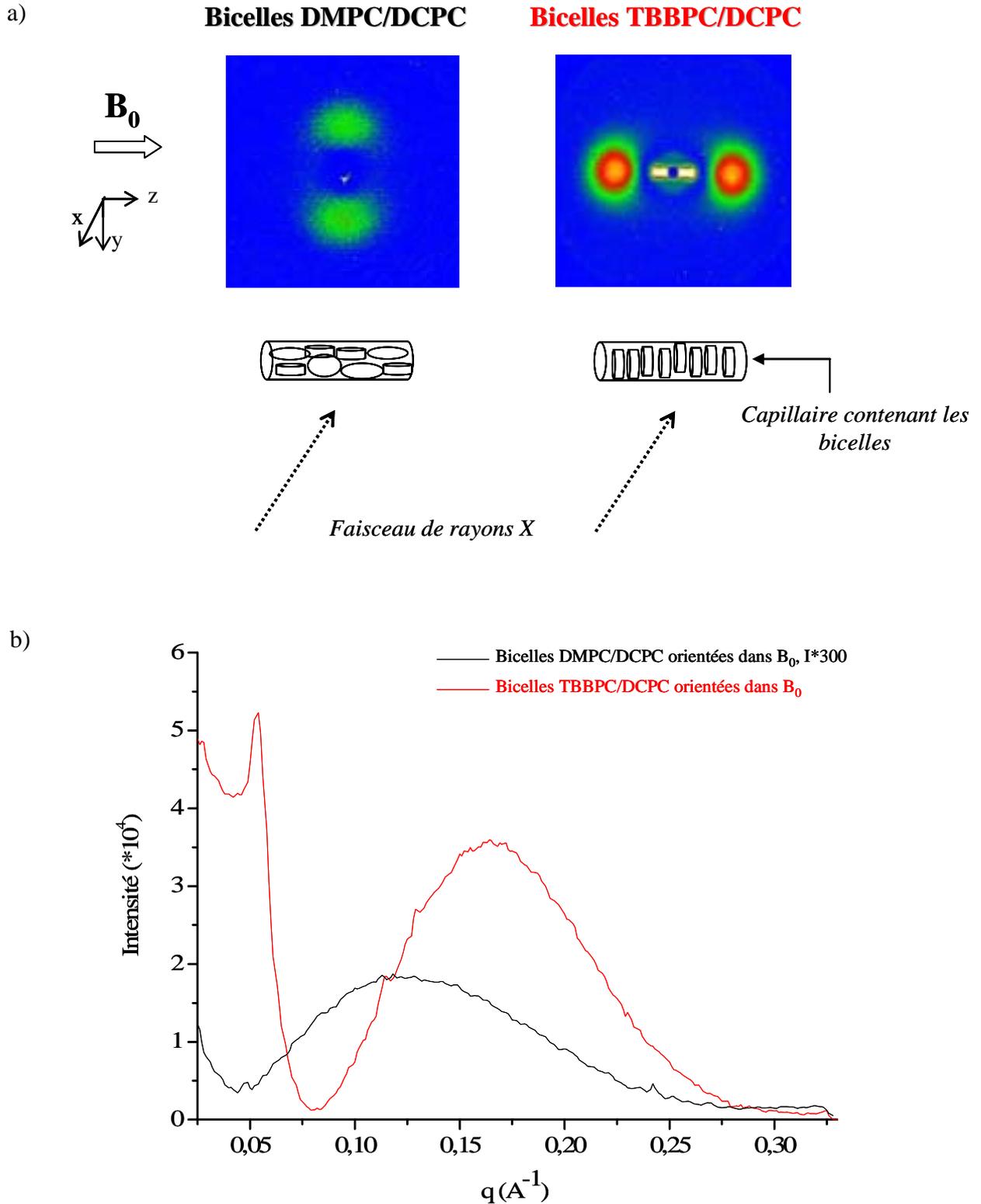


Figure VI.8: a) Cliché 2D de diffusion X aux petits angles des bicelles DMPC/DCPC (gauche) et TBBPC/DCPC (droite), préalablement orientées dans le champ magnétique pendant 20 minutes, pour une température de 35°C. b) Graphe  $I=f(q)$  après une intégration linéaire selon l'axe y pour le système saturé (courbe noire, intensité \* 300) et selon l'axe z pour le système biphényle (courbe rouge).

C'est donc une bonne technique, complémentaire à la RMN, pour caractériser l'orientation de modèles membranaires.

Les bicelles biphényles orientées dans  $B_0$  adoptent une organisation « suprabicellaire » en solution, avec une distance inter-particules de  $\approx 114 \text{ \AA}$ . Ce phénomène peut être relié à l'orientation  $n//B_0$  des bicelles, qui ne laisse aux objets qu'un seul degré de liberté de mouvement, celui de rotation autour de l'axe z. Les bicelles sont toutes empilées les unes au-dessus des autres ce qui crée une coopérativité entre les objets. On peut également penser que la taille deux fois plus importantes des bicelles biphényles par rapport à celles saturées favorise cette organisation qui diminue les interactions d'encombrements stériques.

Dans les cas des bicelles DMPC/DCPC, les objets possèdent deux degrés de liberté de mouvements, dans le plan (yz) et (xz) ; ils ne sont donc pas contraints de s'empiler dans une direction privilégiée, ce qui explique qu'aucune répétition bien définie de la structure en bicouche des bicelles saturées ne soit observée.

Ces différences de libertés de mouvements sont aussi à l'origine des écarts d'intensité entre les signaux diffusés par les deux systèmes. L'empilement des bicelles biphényles orientées implique que tous les objets participent à la diffusion, ce qui se traduit par un signal très intense. L'orientation plus aléatoire des bicelles saturées orientées ou non, et celles TBBPC/DCPC non orientées, entraîne une probabilité de rencontre entre les rayons X et la matière diffusante plus faible, d'où un signal moins intense.

#### Simulations des facteurs de forme des bicelles biphényles et saturées :

Nous avons constaté un écart de  $0,04 \text{ \AA}^{-1}$  entre le maximum des bosses caractérisant le facteur de forme de chaque système bicellaire. Afin de mieux comprendre l'origine de ce décalage, nous avons repris le modèle développé par Riske et al. (Riske et al., 2001), qui simule les courbes SAXS expérimentales obtenues pour des vésicules de DMPG. Ce dernier se structure en effet en bicouche unique dans certaines conditions de températures (10-45°C). Le facteur de forme, associé à cette organisation moléculaire du DMPG, est alors représenté par un pic très large, similaire à celui que l'on observe pour les bicelles.

D'après Riske et al, l'intensité diffusée  $I_1(q)$  par une particule plane unique dans toutes les directions de l'espace, est reliée au vecteur de diffusion  $q$  par l'expression :

$$I_1(q) = A \frac{2\pi}{q^2} F_i^2(q) \quad (\text{VI.1})$$

A est l'aire de la particule plane, le facteur  $q^{-2}$  est la signature d'une symétrie plane (une symétrie cylindrique serait associée à un facteur  $q^{-1}$ ) et  $F_t(q)$  est le facteur de forme transversal de la bicouche, qui s'écrit :

$$F_t(q) = \int_{-t/2}^{+t/2} \rho(x) \cos(qx) dx \quad (\text{VI.2})$$

$\rho(x)$  est le profil de densité électronique dans la direction perpendiculaire à la bicouche et  $t$  est l'épaisseur de celle-ci.

La densité électronique totale d'une monocouche lipidique peut être divisée en trois parties correspondant respectivement à trois zones de la molécule de lipide : la tête (contenant le squelette glycérol), les chaînes aliphatiques et les groupes méthyles en bout de chaîne, comme le montre la figure ci-dessous; mais il faut préciser que cette représentation en créneaux est très approximative.

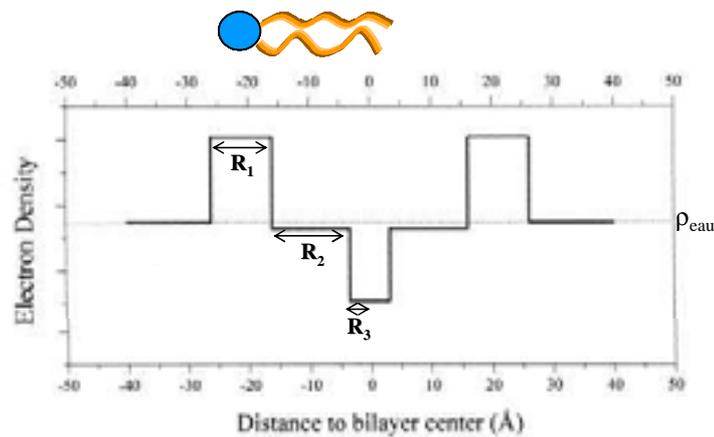


Figure VI.9 : Représentation en créneaux du profil de densité électronique associé à une molécule de phospholipide, divisée en trois zones : la tête  $R_1$ , les chaînes aliphatiques  $R_2$  et les groupements méthyles terminaux  $R_3$ , d'après (Riske et al., 2001).

L'expression du facteur de forme dépend alors de trois contributions et devient (équation VI.3) :

$$F_t(q) = \frac{2}{q} [2\Delta\rho_1 \sin\left(\frac{qR_1}{2}\right) \cos q\left(\frac{R_1}{2} + R_2 + R_3\right) + 2\Delta\rho_2 \sin\left(\frac{qR_2}{2}\right) \cos q\left(\frac{R_2}{2} + R_3\right) + \Delta\rho_3 \sin(qR_3)]$$

où  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  sont respectivement les épaisseurs de la tête, des chaînes et des groupes méthyles terminaux (en Å) et  $\Delta\rho_1$ ,  $\Delta\rho_2$  et  $\Delta\rho_3$  sont les différences entre la densité électronique de chaque région du lipide et celle de l'eau environnante ( $\Delta\rho_i = \rho_i - \rho_{eau}$ , avec  $\rho_{eau} = 0,33 \text{ e}/\text{Å}^3$ ).

Comme nous l'avons déjà vu au chapitre II.2, l'intensité diffusée par un ensemble de  $N$  particules est le produit de deux termes, l'un relié au facteur de structure  $S(q)$ , l'autre au facteur de forme  $F(q)$  (relié à  $I_1(q)$  par l'équation (VI.1)) :

$$I(q) = NI_1(q)S(q) \quad (\text{VI.4})$$

En première approximation, on considère ici qu'il n'y a aucune corrélation entre les bicelles ( $S(q)=1$ ) ; pour les bicelles biphényles, on fait la séparation entre le facteur de structure, à l'origine du pic de Bragg observé, et le facteur de forme pour ne tenir compte que de ce dernier.

En se basant sur les données de Riske et al. pour le DMPG et sur les données expérimentales que l'on dispose pour le DMPC et le TBBPC (lipides constituant majoritairement la bicouche des bicelles saturées et biphényles respectivement), nous avons fait varier les différents paramètres ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $\rho_1$ ,  $\rho_2$  et  $\rho_3$ ) intervenant dans l'équation (VI.3), jusqu'à simuler au mieux les courbes de diffusion expérimentales obtenues pour les bicelles DMPC/DCPC et TBBPC/DCPC, préalablement orientées pendant 20 min dans  $B_0$  (figure VI.8). Le tableau ci-dessous récapitule les valeurs des 6 paramètres optimisées dans le cas des bicelles saturées, biphényles et ceux associés au DMPG (d'après Riske et al.).

|              | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $\rho_1$ | $\rho_2$ | $\rho_3$ |
|--------------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|
| <b>DMPG</b>  | 10    | 8,9   | 3,5   | 0,45     | 0,29     | 0,19     |
| <b>DMPC</b>  | 11,7  | 7,7   | 2,3   | 0,385    | 0,29     | 0,19     |
| <b>TBBPC</b> | 11,7  | 7,7   | 2,3   | 0,385    | 0,352    | 0,19     |

Tableau VI.2 : Valeurs optimisées des 6 paramètres utilisées dans l'expression (VI.3) du facteur de forme pour des vésicules de DMPG (d'après Riske et al.), pour le DMPC des bicelles saturées et le TBBPC des bicelles biphényles.  $R_1$ ,  $R_2$  et  $R_3$  représente respectivement les épaisseurs de la tête, des chaînes aliphatiques et des groupes méthyles terminaux des lipides (en Å) et  $\rho_1$ ,  $\rho_2$  et  $\rho_3$  sont les densités électroniques associées respectivement à ces trois zones des lipides (en  $e/\text{Å}^3$ ).

D'après l'étude par RMN- $^2\text{H}$  de la dynamique des bicelles DMPC- $^2\text{H}_{54}$ /DCPC et TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ /DCPC, les longueurs des chaînes  $sn_1$  des lipides deutérés sont égales à  $\approx 10$  Å au sein des bicelles. Nous avons donc diminué d'1,2 Å les épaisseurs  $R_2$  et  $R_3$  des lipides bicellaires par rapport au DMPG. Nous avons considéré que la tête phosphatidylcholine était plus grande

d'1,7 Å par rapport à la tête phosphatidylglycérol ; l'encombrement stérique de la choline, possédant trois groupements méthyles, est en effet plus important que celui de la PG ; celle-ci peut davantage se replier sur elle-même. Inversement, la densité électronique  $\rho_1$  de la PC est diminuée de  $0,065 \text{ e}/\text{Å}^3$  par rapport à la PG ; la choline est en effet zwitterionique alors que la PG possède deux groupements OH. Pour les densités électroniques des chaînes  $\rho_2$  et  $\rho_3$ , on conserve les mêmes valeurs du DMPC pour le DMPC car la nature chimique de leurs chaînes est équivalente. Par contre, la densité électronique  $\rho_2$  associée aux chaînes du TBBPC est augmentée de  $0,062 \text{ e}/\text{Å}^3$  car deux cycles phényles sont présents sur sa chaîne  $\text{sn}_2$ .

Dans ces conditions, une adéquation correcte entre les courbes SAXS expérimentales (courbes noires) et celles simulées (courbe bleue pour les bicelles saturées et verte pour celles biphényles), est observée (voir figure VI.9).

D'après cette étude, le décalage en  $q$ , entre les facteurs de forme des deux types de bicelles, est donc uniquement lié à la différence de densité électronique entre les chaînes aliphatiques du DMPC et celles du TBBPC. Ainsi, la signature des deux cycles phényles du TBBPC est également visible sur les graphes  $I=f(q)$  de diffusion X.

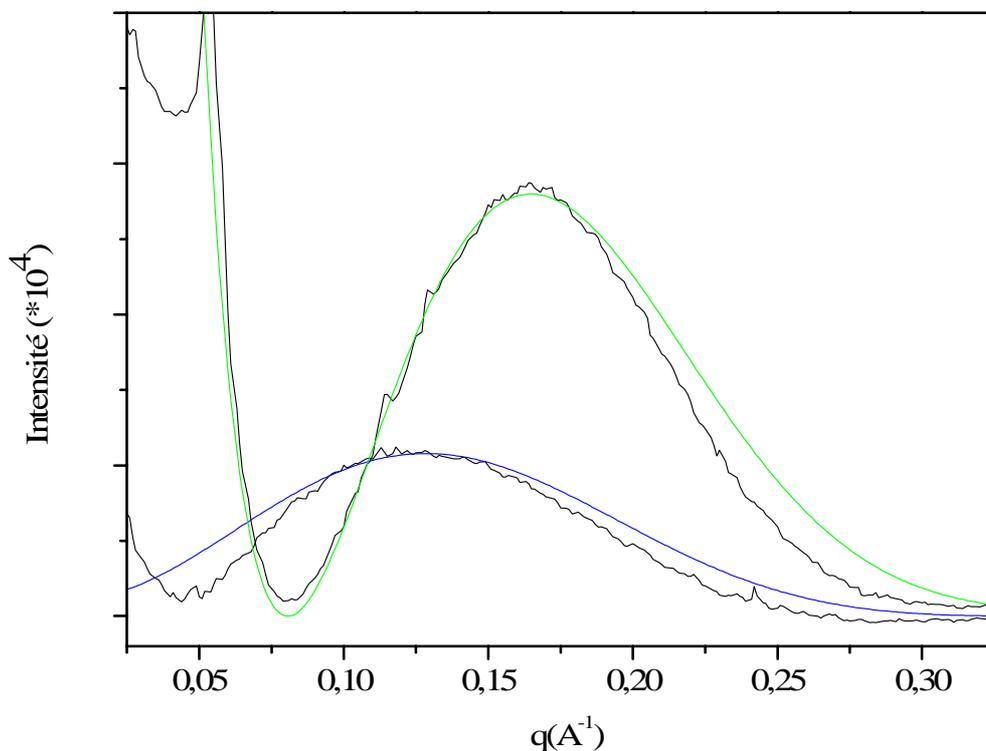


Figure VI.10 : Superposition des courbes SAXS expérimentales (courbes noires) et simulées pour les bicelles DMPC/DCPC (courbe bleue) et les bicelles TBBPC/DCPC (courbe verte) d'après le modèle de Riske et al. (ref).

### VI.3.2 Cinétique d'orientation des bicelles dans un champ magnétique

Après avoir caractérisé l'orientation et l'organisation spécifique de chaque bicelle, il est intéressant de connaître le temps minimal nécessaire pour orienter chaque système dans un champ magnétique de 11,4 Tesla. Pour cela, la même procédure que précédemment a été appliquée (orientation des objets dans le champ magnétique à 35°C, puis analyse par diffusion X à la même température), en faisant varier le temps d'orientation dans  $B_0$  de 5 à 15 min.

#### *a) Bicelles DMPC/DCPC*

Après 5, 10 ou 15 min d'orientation dans le champ magnétique, le cliché de diffusion X des bicelles saturées est identique à celui obtenu après 20 min d'orientation dans  $B_0$  (voir figure VI.11 clichés du haut). Deux spots parallèles à l'axe y, spécifiques de l'orientation  $n \perp B_0$ , sont observés ; de plus l'intensité du signal diffusé est la même pour tous les temps. Ainsi, la cinétique d'orientation des bicelles DMPC/DCPC dans un champ magnétique de 11,4 T est très rapide et la durée dans le champ magnétique n'influe pas sur l'intensité du signal obtenu ; celle-ci dépend uniquement de la quantité de matière diffusante que rencontre le faisceau de rayons X sur son passage.

Il serait intéressant de renouveler ces expériences avec des temps d'orientation dans le champ magnétique inférieurs à 5 min.

#### *b) Bicelles TBBPC/DCPC*

Les clichés de diffusion X des bicelles biphényles obtenus après 5, 10 et 15 min d'orientation dans le champ magnétique sont présentés figure VI.11 (clichés du bas). Dans les deux premiers cas, deux spots très diffus sont distinguables dans le plan (yz), correspondant à une orientation intermédiaire entre celle où la normale à la bicouche est parallèle à  $B_0$  et celle où elle est perpendiculaire à  $B_0$ . Un temps de 10 min n'est donc pas suffisant pour que les bicelles TBBPC/DCPC adoptent leur orientation spécifique  $n // B_0$ . Ce n'est qu'au bout de 15 min d'orientation dans le champ magnétique que l'on retrouve le cliché de diffusion X obtenu après 20 min dans  $B_0$ , sur lequel quatre spots très intenses, parallèles à l'axe z, caractérisent l'orientation  $n // B_0$  des bicelles TBBPC/DCPC.

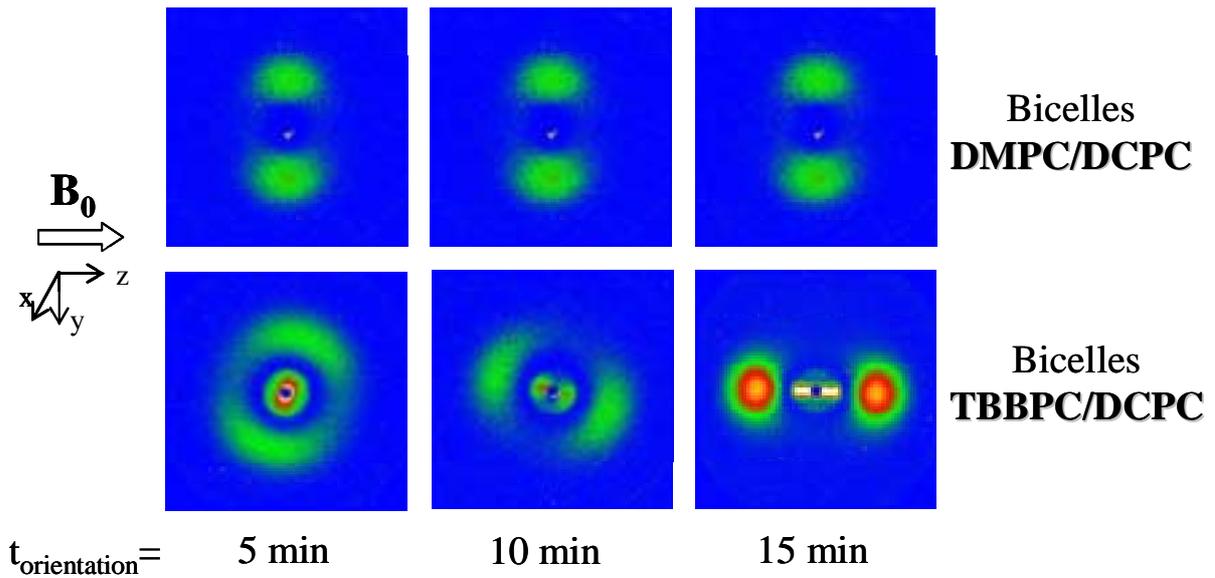


Figure VI.11 : Clichés de diffusion X obtenus pour les bicelles DMPC/DCPC (clichés du haut) et les bicelles TBBPC/DCPC (clichés du bas) en fonction du temps d'orientation dans le champ magnétique (5 min, 10 min et 15 min).

Ainsi, la cinétique d'orientation dans un champ magnétique des bicelles biphényles ( $\approx 15$  min) est plus lente que celle des bicelles saturées ( $\approx 5$  min). Ceci peut-être lié à la taille des objets ; le diamètre des bicelles TBBPC/DCPC ( $\approx 800 \text{ \AA}$ ) est en effet deux fois plus important que celui des bicelles DMPC/DCPC ( $\approx 450 \text{ \AA}$ ). Il faut donc plus de temps pour que tous les objets bicellaires s'organisent telle que la normale à leur bicouche soit parallèle à  $B_0$ .

### VI.3.3 Relaxation en dehors de $B_0$ des bicelles après orientation dans un champ magnétique

Il est intéressant d'étudier maintenant la cinétique de relaxation (retour à un état d'équilibre non orienté) de chaque système en dehors du champ magnétique. Pour cela, après orientation des bicelles dans  $B_0$  à  $35^\circ\text{C}$  et transfert dans l'appareil de SAXS, les clichés de diffusion X sont enregistrés au cours du temps (toujours à  $35^\circ\text{C}$ ) jusqu'à retrouver celui constitué d'un cercle, caractéristique d'un système non orienté.

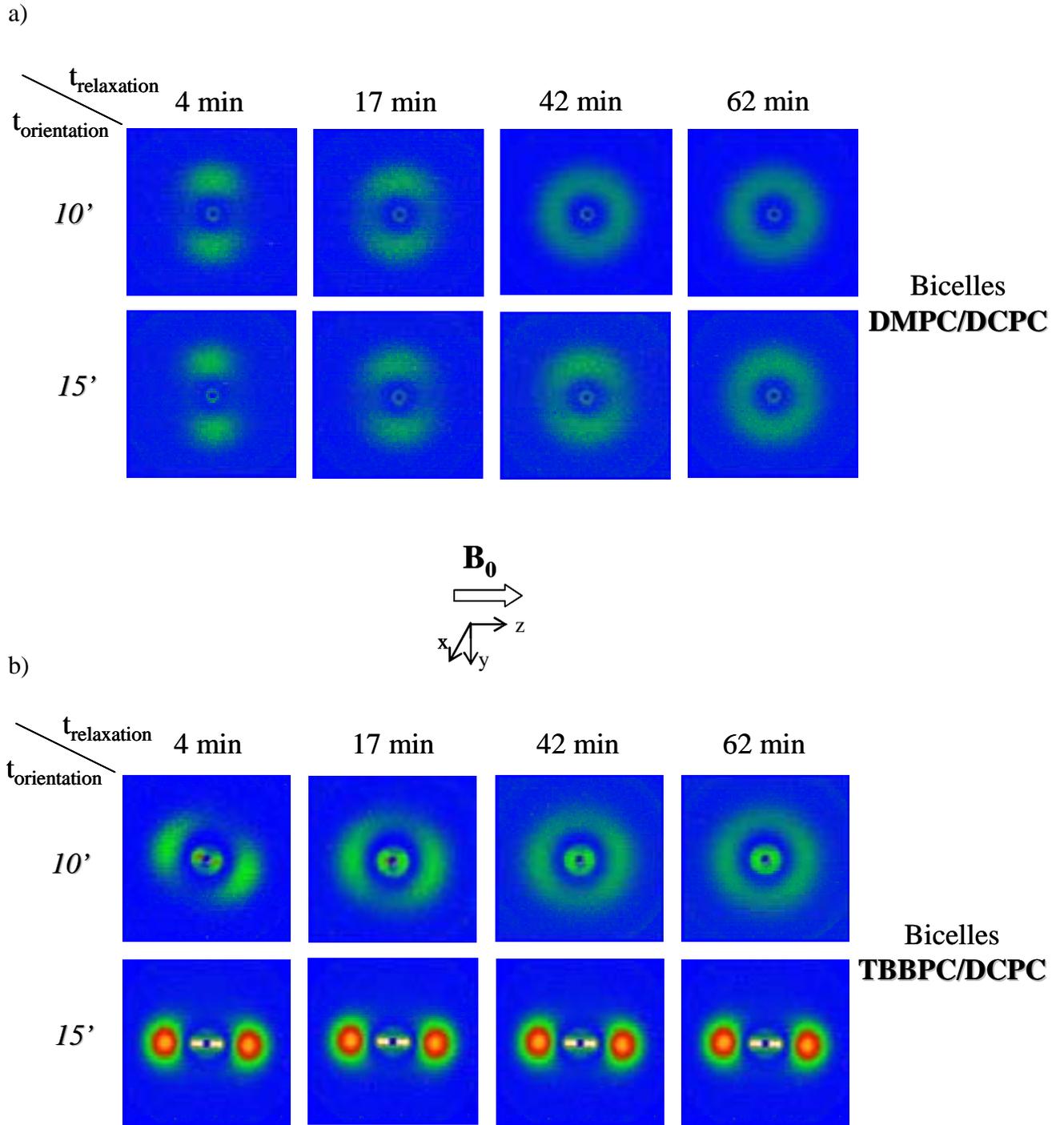


Figure VI.12 : Clichés de diffusion X montrant la relaxation dans le temps des bicelles DMPC/DCPC (clichés du haut) et des bicelles TBBPC/DCPC (clichés du bas) après 10 min et 15 min d'orientation dans le champ magnétique.

*a) Bicelles DMPC/DCPC*

Les clichés de diffusion X associés à la relaxation des bicelles DMPC/DCPC en dehors de  $B_0$ , après des temps d'orientation dans le champ magnétique ( $t_{\text{orientation}}$ ) de 10 min et 15 min, sont présentés en figure VI.12.a). Les temps de relaxation indiqués ( $t_{\text{relaxation}}$ ) tiennent compte des 2 min de transport du spectromètre RMN à l'appareil de SAXS. On constate qu'après 42 min en dehors de  $B_0$ , les bicelles DMPC/DCPC orientées pendant 10 min dans  $B_0$ , ont totalement relaxé (on retrouve un cercle d'intensité diffusée, associé à un état non orienté), alors que celles orientées pendant 15 min dans  $B_0$  conservent une orientation privilégiée telle que  $n \perp B_0$  (deux spots parallèles à l'axe y sont toujours distinguables, même s'ils sont plus diffus). Ce dernier système revient dans son état d'équilibre non orienté, après une heure passée en dehors de  $B_0$ . Ainsi, plus les bicelles saturées restent orientées dans le champ magnétique, plus elles relaxent lentement en dehors de  $B_0$ .

*b) Bicelles TBBPC/DCPC*

Les mêmes expériences que précédemment ont été réalisées pour les bicelles biphényles (voir les clichés de diffusion X obtenus figure VI.12.b)). Comme on l'a déjà vu, 10 min dans  $B_0$  ne sont pas suffisantes pour orienter le système TBBPC/DCPC telle que  $n // B_0$  (deux spots diffus sont observés dans le plan (yz) après 4 min de relaxation). Dans ces conditions, le système biphényle relaxe complètement en dehors de  $B_0$  en  $\approx 1$  heure. Par contre, après 15 min d'orientation dans le champ magnétique, le cliché de diffusion X obtenu après 4 min de relaxation, montre clairement que le système adopte l'orientation  $n // B_0$  (quatre spots bien définis sont observés parallèles à l'axe z). Après 62 min, ce cliché de diffusion X est toujours observé, ce qui prouve que les bicelles TBBPC/DCPC conservent leur orientation  $n // B_0$  au moins pendant une heure.

*c) Cinétique de relaxation des deux types de bicelles*

Afin d'analyser plus précisément la cinétique de relaxation de chaque type de bicelle, les intensités diffusées en fonction du temps sont intégrées avec le logiciel Nanoviewer de l'appareil de diffusion X et normalisées à 1 sur Origin.

La figure VI.13 présente les courbes de cinétique de relaxation associées aux bicelles DMPC/DCPC, après des temps d'orientation des objets dans le champ magnétique variant de 5 à 80 min.

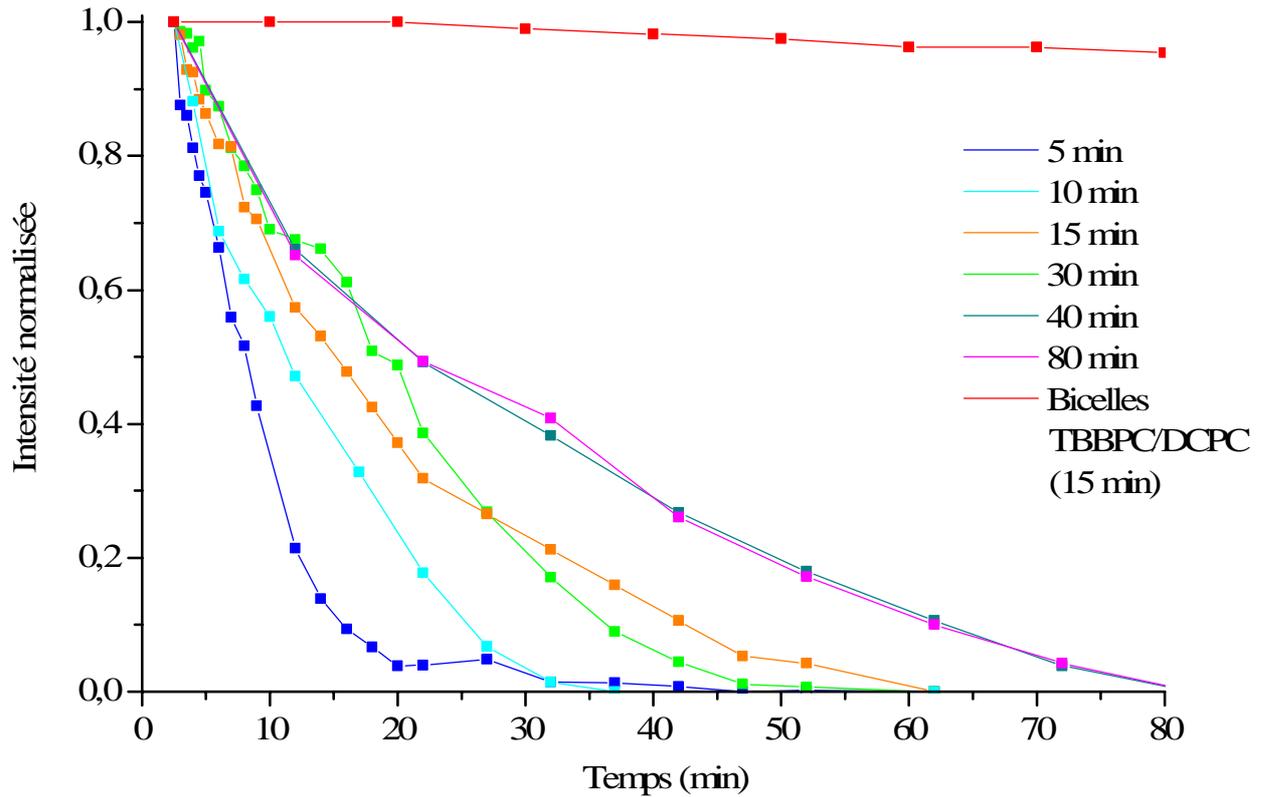


Figure VI.9 : Courbes de cinétique de relaxation en dehors de  $B_0$  (intensités diffusées normalisées à 1) sur 80 min (à  $35^\circ\text{C}$ ) des bicelles DMPC/DCPC, après des durées d'orientation dans  $B_0$  allant de 5 à 80 min, et des bicelles TBBPC/DCPC après 15 min d'orientation dans  $B_0$  (courbe rouge).

On constate que plus les bicelles saturées restent orientées initialement dans  $B_0$ , plus leur cinétique de relaxation en dehors de  $B_0$  est lente. Ainsi les bicelles orientées pendant 5 min dans  $B_0$  (courbe bleu foncée) relaxent complètement en  $\approx 30$  min, celles orientées pendant 10 min (courbe bleu clair) relaxent en  $\approx 40$  min. Les bicelles orientées pendant 15 min (courbe orange) relaxent plus rapidement au départ que celles orientées pendant 30 min (courbe verte), ce qui n'est plus le cas après 30 min en dehors de  $B_0$ , où c'est la situation inverse ; cet écart ne semble toutefois pas réellement significatif (artefact d'expérience). Pour 40 et 80 min d'orientation dans  $B_0$ , les bicelles reviennent à leur état d'équilibre non orienté avec la même vitesse, comme si un « palier » de cinétique de relaxation était atteint. Il serait néanmoins nécessaire d'effectuer des expériences supplémentaires avec des temps d'orientation dans  $B_0$  supérieurs à 80 min, pour confirmer cette hypothèse.

La figure VI.13 présente également la cinétique de relaxation sur 80 min des bicelles TBBPC/DCPC après 15 min d'orientation dans  $B_0$  (courbe rouge), à savoir le temps minimal requis pour les orienter telle que  $n//B_0$ . On constate que la pente de la courbe rouge est très faible par rapport à celles des courbes associées aux bicelles DMPC/DCPC. Une fois orientées, les bicelles biphényles relaxent donc très lentement. Plus précisément, le retour à l'équilibre non orienté des bicelles TBBPC/DCPC n'a été observé qu'au bout d'une semaine ; il faudrait néanmoins renouveler cette expérience pour confirmer plus précisément ce résultat. On pourrait également augmenter le temps d'orientation des bicelles biphényles dans  $B_0$  à 30 min (voire plus) et analyser l'influence sur le temps de relaxation (si celui-ci est plus long ou s'il est toujours d'une semaine). Néanmoins, on peut affirmer que le temps d'orientation des bicelles TBBPC/DCPC dans  $B_0$  reste très faible par rapport à celui de relaxation.

### c) Discussion

Les bicelles DMPC/DCPC s'orientent dans  $B_0$  (5 min suffisent) et se désorientent en dehors de  $B_0$  (en 80 min maximum pour 40 et 80 min d'orientation dans  $B_0$ ) très rapidement par rapport à celles TBBPC/DCPC ; celles-ci nécessitent de rester au minimum 15 min dans le champ magnétique pour adopter l'orientation  $n//B_0$  et relaxent environ en une semaine en dehors de  $B_0$ . Ces différences notables de cinétique d'orientation dans  $B_0$  et de relaxation en dehors de  $B_0$  entre les deux types de bicelles sont en partie liées à la taille des objets. Les bicelles biphényles ayant un diamètre deux fois plus important que celui des bicelles saturées, elles mettent plus de temps à se déplacer en solution (probabilité de collisions plus importante). Comme nous l'avons déjà évoqué pour justifier les différences d'intensités diffusées entre les deux types de bicelles, l'orientation  $n//B_0$  des bicelles biphényles induit

également un empilement (« stacking ») très régulier des objets. Ce dernier, une fois formé semble très stable et met du temps à se désorganiser, ce qui explique la cinétique de relaxation très lente des bicelles TBBPC/DCPC.

Il faut également noter la capacité de mémoire des objets bicellaires ; plus les bicelles saturées restent dans le champ magnétique, plus elles relaxent lentement ; on peut ainsi moduler leur cinétique de désorientation jusqu'à un certain palier (pour des temps d'orientation dans  $B_0$  supérieurs à 40 min, les bicelles relaxeraient toujours en  $\approx 80$  min). Toutefois, le rapport (temps d'orientation)/(temps de relaxation) des bicelles DMPC/DCPC est beaucoup plus grand que celui des bicelles TBBPC/DCPC (pour 15 min d'orientation dans  $B_0$ , ce rapport est de 0,25 pour les premières et de 0,0015 pour les deuxièmes). Cette capacité des bicelles biphényles à rester orientées pendant plusieurs jours en dehors du champ magnétique, permet de les utiliser très facilement pour d'autres études, notamment celles relatives à la structure de biomolécules, comme les peptides ou les protéines (études par Dichroïsme Circulaire Vibrationnel ou pour des montages d'ATR (Réflexion Totale Atténuée)). Cette étude par diffusion des rayons X nous a donc permis de mettre en évidence une propriété très intéressante des bicelles TBBPC/DCPC, qui peut trouver de nombreuses applications dans le domaine de la biophysique.

#### VI.3.4 Etudes préliminaires sur les bicelles saturées dopées avec des ions lanthanides

Des analyses préliminaires sur le système DMPC/DCPC (h=80%, X=78%) dopés avec des ions Europium,  $\text{Eu}^{3+}$  (tel que le rapport molaire DMPC/ $\text{Eu}^{3+}$ =1/0,09,  $[\text{Eu}^{3+}]$ =28 mM), ont été effectuées sur le même principe que précédemment par Diffusion des Rayons X aux petits angles. La figure VI.11 présente les clichés à deux dimensions obtenus à 50°C (après 2 min d'acquisition) pour le système non orienté dans le champ magnétique (cliché de gauche), et après 20 min d'orientation dans  $B_0$  (cliché de droite). Dans le premier cas, un cercle d'intensité caractérise un état non orienté, dans le deuxième, deux spots dans la direction de l'axe z sont observés. Ce dernier résultat est lié à l'orientation des objets avec leur normale n parallèle à  $B_0$ . Ainsi, l'anisotropie de susceptibilité magnétique positive des ions lanthanides entraîne bien un basculement de l'orientation du système DMPC/DCPC de 90°, déjà mis en évidence par RMN- $^2\text{H}$ , (Prosser et al., 1998) ; (Crowell et Macdonald, 2001).

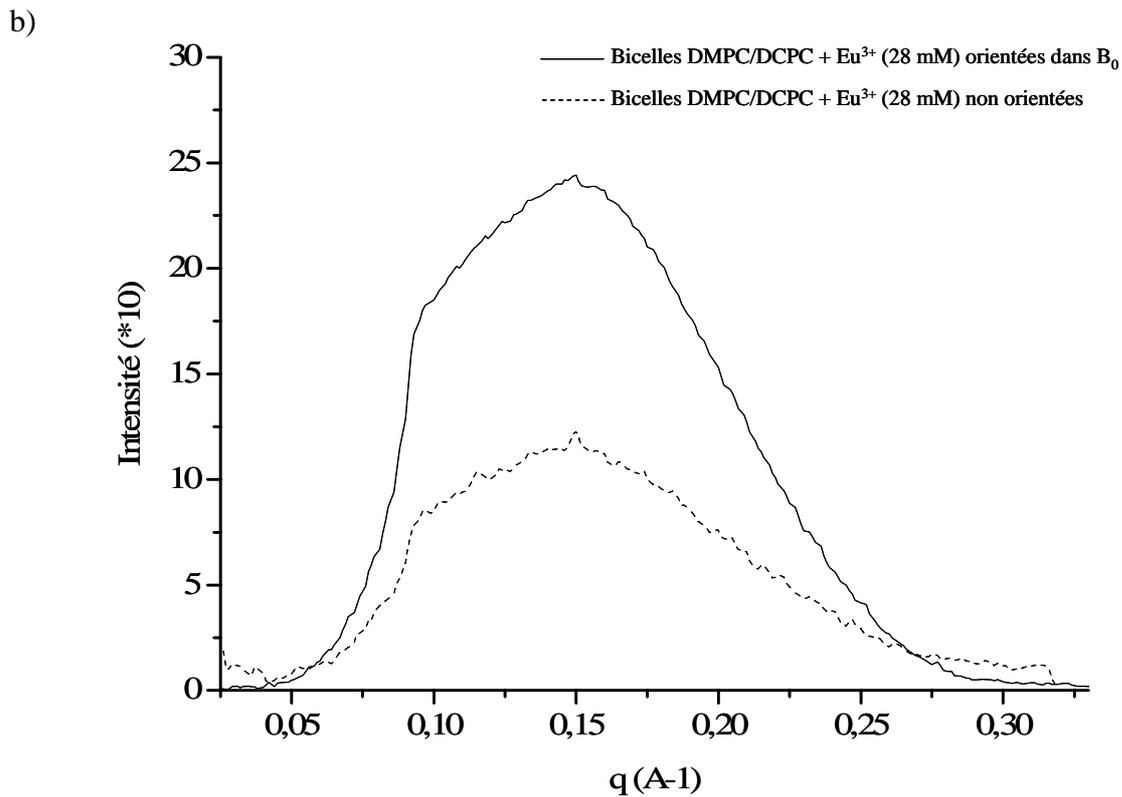
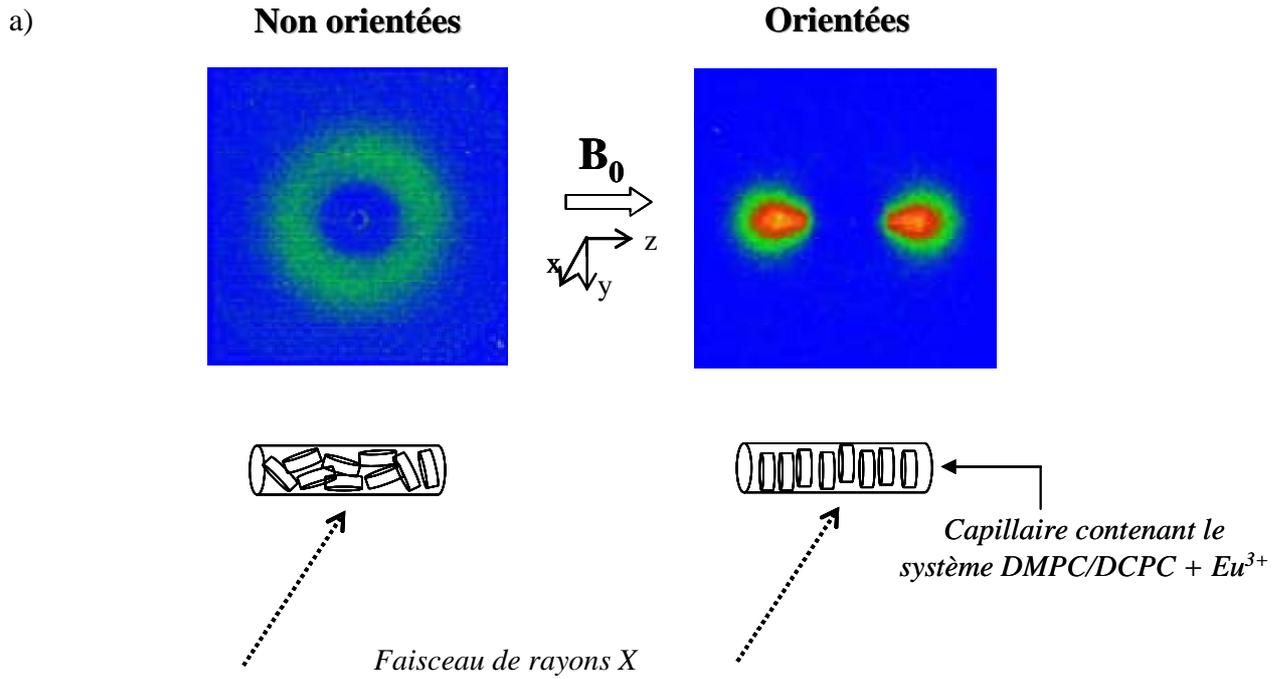


Figure VI.11 : a) Cliché 2D de diffusion X aux petits angles des bicelles DMPC/DCPC ( $h=80\%$ ,  $X=78\%$ ) dopées avec des ions  $\text{Eu}^{3+}$  (28 mM), préalablement orientées dans le champ magnétique pendant 20 minutes, pour une température de  $50^\circ\text{C}$ . b) Graphe  $I=f(q)$  après une intégration linéaire selon l'axe  $z$  pour le système orienté (courbe continue) et une intégration circulaire pour le système non orienté (courbe en pointillés).

Il faut préciser que nous avons également analysé ce système par RMN-<sup>31</sup>P mais les spectres obtenus sont difficilement interprétables. L'effet paramagnétique des ions europiums entraîne en effet un changement d'orientation de la tête du phospholipide qui se traduit sur le spectre phosphore par un élargissement des raies de résonance et un shift des déplacements chimiques. C'est pourquoi la majorité des études du système DMPC/DCPC dopé avec des ions lanthanides s'effectue par RMN-<sup>2</sup>H (observation de la dynamique des chaînes lipidiques).

Après intégration (circulaire pour le système non orienté et linéaire selon l'axe z pour le système orienté) des signaux diffusés, le graphe  $I=f(q)$  est tracé (figure VI.11.b) ; la courbe continue correspond au système orienté dans  $B_0$  et celle en pointillés à celui non orienté. Dans ces deux cas, une large bosse est observée dont le maximum se situe à  $q \approx 0,15 \text{ \AA}^{-1}$  ; cette bosse est associée au facteur de forme du système et caractérise une structuration en bicouche du système, comme pour les bicelles saturées et biphényles. Toutefois, nous n'irons pas plus loin dans l'interprétation des tâches de diffusion X du système DMPC/DCPC dopé avec des ions  $\text{Eu}^{3+}$ , car cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois et nécessite d'être renouvelée pour être complètement validée.

Nous avons également débuté une étude sur la cinétique de relaxation de ce système. Après 20 min d'orientation dans  $B_0$ , il conserve son orientation  $n//B_0$  au moins pendant deux jours. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu suivre la désorientation de ce système plus longtemps ; il faudrait donc renouveler l'expérience afin de déterminer le temps total nécessaire pour qu'il retrouve son état d'équilibre non orienté. Toutefois, d'après ces résultats préliminaires, le système DMPC/DCPC dopé avec des ions  $\text{Eu}^{3+}$  aurait la capacité, comme les bicelles TBBPC/DCPC, de rester orientée longtemps en dehors de  $B_0$  pour une température d'analyse de 50°C. L'organisation smectique pourrait donc être à l'origine de ce phénomène, hypothèse qui nécessite d'être confirmée par des expériences supplémentaires.

## Conclusion

Plusieurs résultats ont été mis en évidence d'après cette étude comparative entre les bicelles TBBPC/DCPC et celles DMPC/DCPC.

Tout d'abord, la RMN des solides en phosphore ainsi qu'en azote 14, permettent de facilement caractériser l'orientation spécifique de chacune, respectivement  $n\perp B_0$  pour les bicelles saturées et  $n//B_0$  pour les bicelles biphényles. D'un côté, la grande sensibilité du noyau phosphore a permis une identification rapide des bicelles ; de l'autre, l'observation de l'azote 14 a révélé de légères différences de dynamique ou d'orientation entre les têtes cholines des deux systèmes.

La comparaison des diagrammes de « phase » de chaque système, établis par RMN- $^{31}\text{P}$ , a confirmé la grande stabilité en température (au maximum de 10°C à 70°C) des bicelles biphényles par rapport à celles saturées et ceci pour une gamme d'hydratation importante (de  $h=50\%$  à  $95\%$ ).

D'après une étude par RMN- $^2\text{H}$ , la dynamique des chaînes lipidiques du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  et du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  respectivement associés aux bicelles biphényles et saturées, est comparable, même si la structure du lipide TBBPC entraîne une mobilité plus importante des groupements aliphatiques terminaux sur sa chaîne  $sn_1$ . De même, l'épaisseur de la bicouche de TBBPC des bicelles biphényles, calculée à partir des paramètres d'ordre, est similaire à celle de DMPC des bicelles saturées ; l'édifice bicellaire imposerait aux lipides des contraintes structurales (ou d'agencement) particulières.

L'organisation de l'eau entourant les bicelles biphényles orientées dans  $B_0$  se traduit sur le spectre deutérium par des couplages quadrupolaires deux fois plus importants par rapport à ceux des bicelles saturées, ce qui offre des propriétés intéressantes pour les études structurales de biomolécules hydrosolubles (mesures de couplages dipolaires résiduels).

Enfin, la Diffusion des rayons X aux petits angles a permis de mettre en évidence l'organisation suprabicellaire des bicelles TBBPC/DCPC, non rencontrée pour les bicelles DMPC/DCPC. L'empilement très régulier des bicelles biphényles, orientées dans le champ magnétique, confère à ce système la capacité de garder son orientation pendant plusieurs jours en dehors de  $B_0$ , ce qui présente un grand intérêt pour de nombreuses études biophysiques.

Nous avons comparé les bicelles biphényles, qui s'orientent telle que  $n//B_0$ , avec les bicelles saturées, pour lesquelles  $n\perp B_0$ . Que devient maintenant l'orientation de systèmes ternaires constitués des lipides TBBPC, DMPC et DCPC ?

# CHAPITRE VII

Systemes Ternaires  
(TBBPC:DMPC)/DCPC



Ce chapitre présente l'analyse par RMN du phosphore de systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC dont la proportion (en moles) des deux lipides à chaînes longues varie. L'un des objectifs est de déterminer la quantité maximale de DMPC que l'on peut insérer dans les bicelles biphényles et inversement la quantité maximale de TBBPC que peuvent accepter les bicelles saturées, sans déstructurer les objets bicellaires. L'idée est également d'étudier l'évolution de leur orientation dans un champ magnétique. Il est en effet intéressant de connaître l'orientation dans  $B_0$  adoptée par ces systèmes ternaires, lorsqu'ils sont constitués des deux lipides à chaînes longues en proportion égale.

Pour plus de clarté, on notera les systèmes bicellaires s'orientant avec la normale à leur bicouche perpendiculaire au champ magnétique, les bicelles  $\perp$ , et ceux s'orientant avec la normale à leur bicouche parallèle à  $B_0$ , les bicelles  $//$ .

On rappelle que le terme de phase sera employé ici dès lors qu'un changement d'organisation lipidique est observé par RMN du phosphore, ce qui ne correspond pas nécessairement à une phase thermodynamique au sens de Gibbs.

## VII.1 Caractérisation par RMN des Solides $^{31}\text{P}$ des systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC

### VII.1.1 Système DMPC/DCPC + TBBPC

Nous allons tout d'abord étudier le comportement du système DMPC/DCPC en présence d'un troisième lipide, le TBBPC. Afin d'optimiser nos chances d'obtenir des bicelles qui s'orientent telle que la normale à leur bicouche soit perpendiculaire à  $B_0$ , les conditions expérimentales d'hydratation et de composition lipidique utilisées, sont celles associées au milieu du domaine d'existence des bicelles DMPC/DCPC déterminé par RMN- $^{31}\text{P}$  (Raffard et al., 2000). Ainsi, plusieurs échantillons du mélange ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC ont été préparés dans  $\text{D}_2\text{O}$  en présence de 100 mM de KCl, pour une hydratation de 80% et un rapport molaire  $q=(\text{lipides chaînes longues})/(\text{lipides chaînes courtes})$  de 3,5 (ou  $X=78\%$  en lipides à chaînes longues). La proportion entre les lipides à chaînes longues (TBBPC:DMPC) varie ici de (1:9) à (3:7), et la température de 25°C à 65°C, par pas de 5°C. Les différents spectres obtenus sont présentés en figure VII.1.

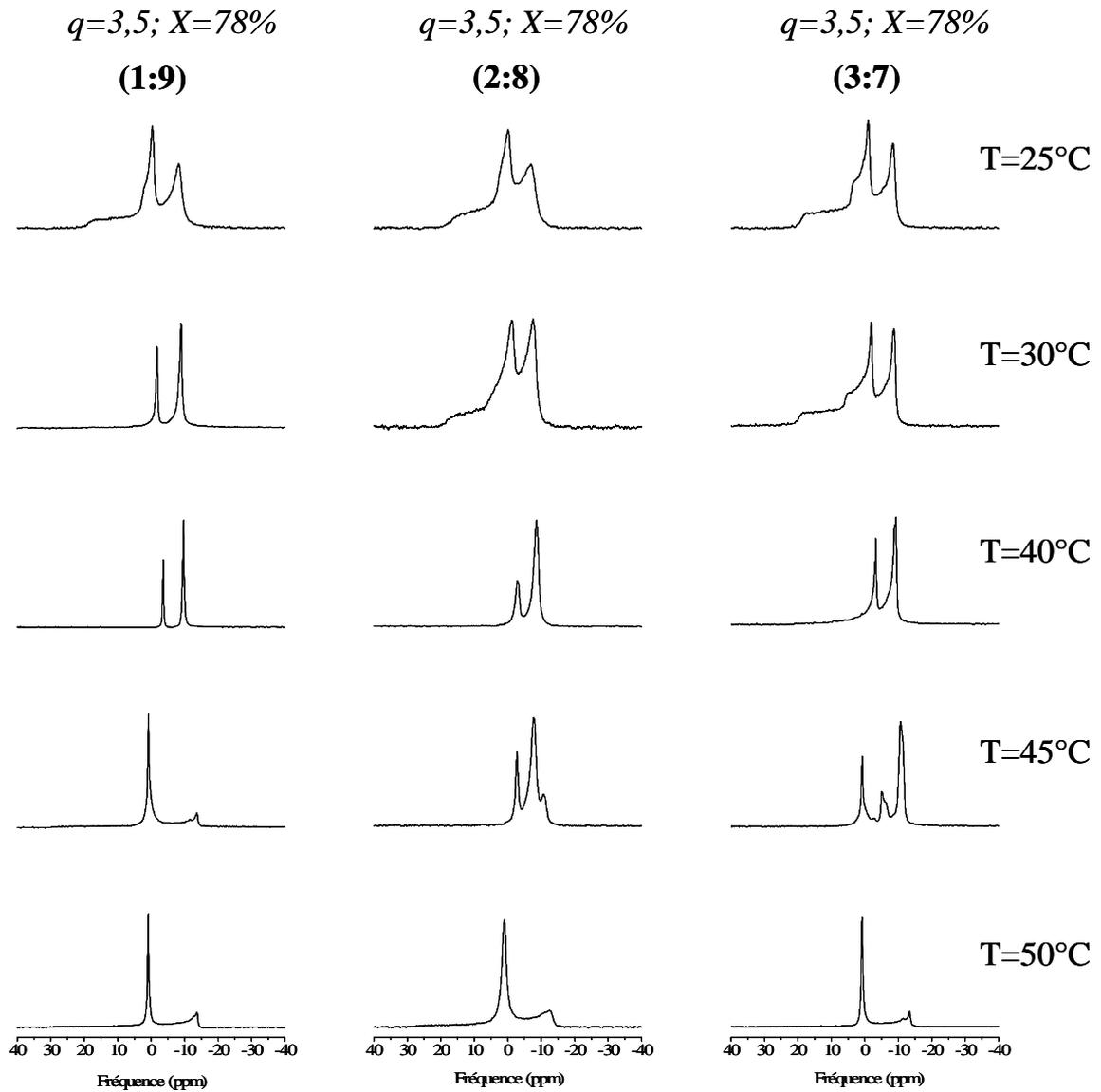


Figure VII.1 : Spectres RMN des Solides  $^{31}\text{P}$ , avec découplage large-bande des protons, du système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC pour une hydratation de 80% dans  $\text{D}_2\text{O}$  (avec 100 mM de KCl), un rapport molaire  $q=3,5$  ( $X=78\%$ ) et des proportions en moles des lipides à chaînes longues (TBBPC:DMPC) de (1:9) à (3:7) ; ces proportions sont indiquées au-dessus des spectres et les températures sur la droite. Chaque spectre est le résultat de 350 scans.

Pour la proportion (1:9), on retrouve l'évolution en température spécifique aux bicelles DMPC/DCPC : pour 25°C, on observe la coexistence entre une phase isotrope et une phase lamellaire non orientée, entre 30°C et 40°C, on reconnaît le spectre caractéristique des bicelles s'orientant avec la normale à leur bicouche perpendiculaire au champ magnétique, et pour des températures supérieures à 40°C, une phase isotrope coexiste avec une phase lamellaire orientée majoritairement à 90° par rapport à  $B_0$ . Ainsi l'insertion de 10% (en moles) du lipide TBBPC parmi les lipides à chaînes longues dans le système DMPC/DCPC, n'empêche pas la formation des bicelles  $\perp$  et ne modifie pas leur domaine d'existence en température par rapport à celui des bicelles saturées seules. La signature RMN- $^{31}\text{P}$  de ces bicelles  $\perp$ , constituées de trois lipides, est toujours associée à deux pics (à -3,44 ppm et -9,84 ppm à 40°C). Le rapport d'intégration des aires de ceux-ci à 40°C est égal à 2,5 ce qui est inférieur au rapport lipidique molaire  $q=(\text{chaîne longues})/(\text{chaînes courtes})=3,5$  utilisé pour préparer le système. Il n'y a donc pas de ségrégation entre les lipides à chaînes longues, situés en majorité dans la partie plane du disque et ceux à chaînes courtes, essentiellement dans le tore du disque ; certaines molécules diffusent d'une partie à l'autre. Dans ces conditions, un diamètre de  $\approx 378 \text{ \AA}$  est calculé pour les bicelles  $\perp$ , en appliquant le modèle d'Arnold et al. (Arnold et al., 2002).

Pour la proportion (2:8), le spectre RMN- $^{31}\text{P}$  spécifique des bicelles  $\perp$  est observé entre 35°C et  $\approx 42^\circ\text{C}$  ; leur domaine d'existence est donc plus restreint que pour la proportion (1:9) et légèrement décalé vers des températures plus élevées ; pour 45°C, les bicelles  $\perp$  sont en effet toujours présentes mais le spectre présente un troisième pic, minoritaire, vers 10,9 ppm. Pour des températures inférieures et supérieures au domaine bicellaire, on retrouve les mêmes types de spectres (coexistence entre une phase isotrope et une phase lamellaire orientée ou non) que pour les bicelles DMPC/DCPC « pures » ou contenant 10% de TBBPC. On constate que la largeur des deux pics, caractéristiques des bicelles  $\perp$  contenant 20% de TBBPC parmi les lipides à chaînes longues, est plus importante que celle des signaux associés aux bicelles (TBBPC:DMPC, 9 :1)/DCPC ou aux bicelles pures DMPC/DCPC. Ce type de spectre prouve que les objets bicellaires ne sont pas tous bien orientés dans le champ magnétique et qu'il y a une distribution de leur orientation autour de celle où  $n \perp B_0$  (Arnold et al., 2002). De même, un rapport d'intégration des aires sous les pics de 4,7 est mesuré sur les spectres, ce qui est supérieur au rapport molaire  $q$  utilisé et correspond à un diamètre des objets de 655 Å, d'après le modèle d'Arnold et al. La présence du troisième lipide TBBPC en

quantité plus importante perturbe donc l'orientation des bicelles  $\perp$  dans le champ magnétique ainsi que leur taille.

Pour la proportion (3:7), le spectre caractéristique des bicelles  $\perp$  n'est pas clairement observé pour les températures analysées ; toutefois, le spectre à 40°C en est très proche, même si la base des deux pics observés n'est pas bien définie, et à 45°C, les bicelles  $\perp$  coexistent avec une phase isotrope. Dans ces deux cas, la largeur importante des raies caractérise comme précédemment une mauvaise orientation des objets bicellaires dans le champ magnétique. Pour  $T > 45^\circ\text{C}$ , on retrouve une coexistence entre une phase isotrope et une phase lamellaire majoritairement orientée à 90°C. Pour des températures inférieures à 30°C, on observe un spectre phosphore relativement complexe, correspondant à une ou plusieurs phases lamellaires non orientées dans  $B_0$ . Nous essayerons d'expliquer plus en détails ce type de phase dans la partie VII.2 de ce chapitre, en ayant recours notamment à des simulations de spectres RMN- $^{31}\text{P}$ .

Ainsi, on constate que plus la proportion en moles du lipide TBBPC augmente dans le système DMPC/DCPC, plus le domaine d'existence en température des bicelles  $\perp$  est restreint (stabilité des objets bicellaires sur une gamme de 10°C pour la proportion (1:9), de  $\approx 7^\circ\text{C}$  pour (2:8) et de  $\approx 3^\circ\text{C}$  pour (3:7)) ; les bicelles s'orientent également plus difficilement dans le champ magnétique et leur taille augmente. A partir de 20% de TBBPC, les bicelles  $\perp$  existent pour des températures ( $>40^\circ\text{C}$ ) supérieures à celles associées aux bicelles saturées (au maximum 40°C) ; la présence du TBBPC peut être à l'origine de cette stabilité des bicelles  $\perp$  à des températures plus élevées, comme pour les bicelles biphényles qui existent jusqu'à 70°C.

### VII.1.2 Système TBBPC/DCPC + DMPC

Nous allons maintenant analyser le comportement du système TBBPC/DCPC, lorsqu'on lui ajoute du DMPC. Là aussi, les conditions expérimentales d'hydratation et de composition lipidique initiales sont telles que l'on considère le milieu du domaine d'existence des bicelles TBBPC/DCPC, déterminé par RMN- $^{31}\text{P}$  (voir chapitre V). Plusieurs échantillons du mélange ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC ont été préparés dans  $\text{D}_2\text{O}$  en présence de 100 mM de NaCl, pour une hydratation de 80%, en faisant varier la proportion entre les lipides à chaînes longues (TBBPC:DMPC) de (9:1) à (7:3), et la température de 25°C à 65°C par pas de 5°C.

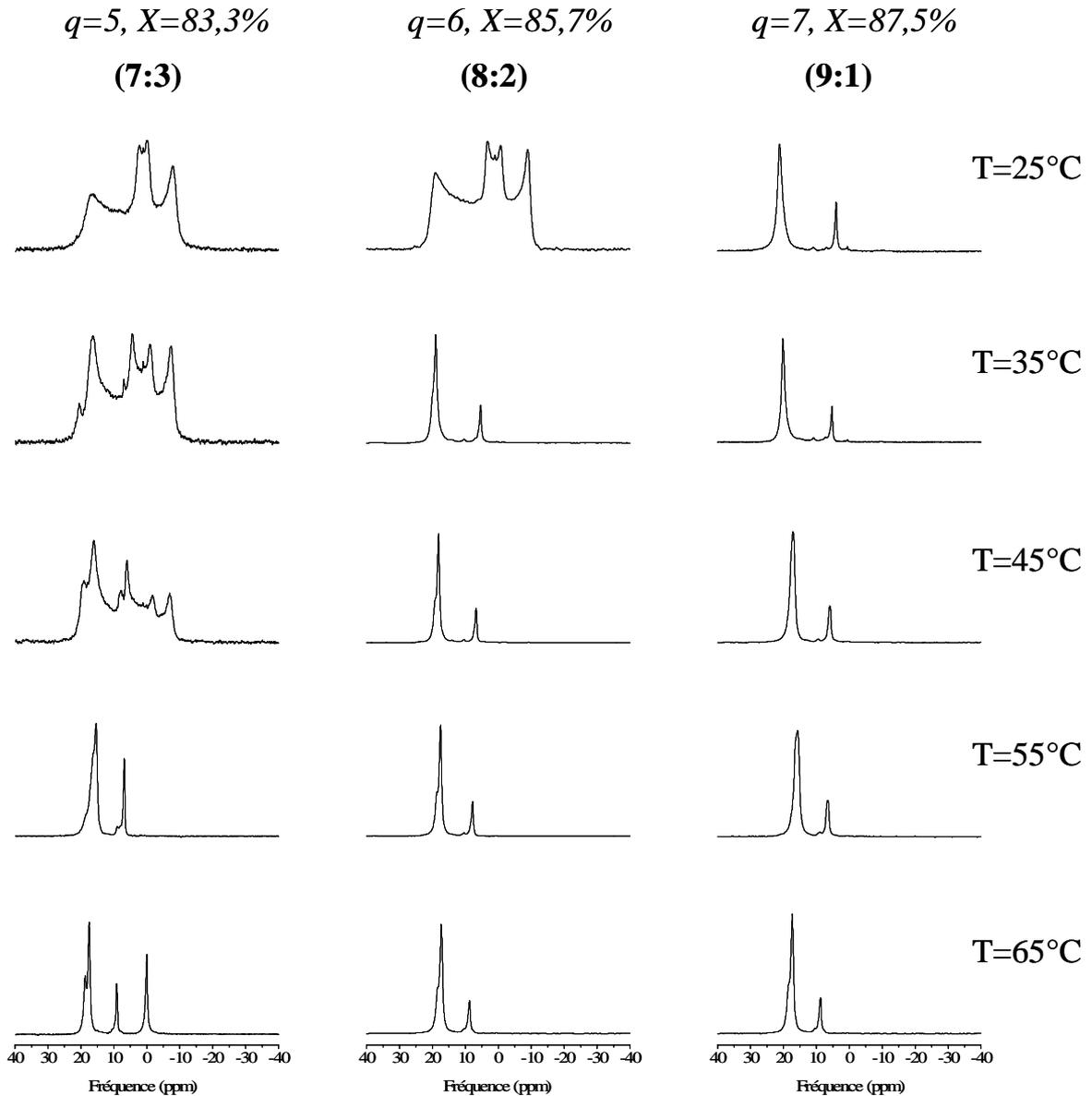


Figure VII.2 : Spectres RMN des Solides  $^{31}\text{P}$ , avec découplage large-bande des protons, du système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC pour une hydratation de 80% dans  $\text{D}_2\text{O}$  (avec 100 mM de NaCl). Les proportions en moles des lipides à chaînes longues (TBBPC:DMPC) de (7:3) à (9:1), ainsi que les rapports molaires  $q$  (ou  $X$ ) associés, sont indiqués au-dessus des spectres et les températures sur la droite. Chaque spectre est le résultat de 350 scans.

Le rapport molaire  $q=(\text{lipides chaînes longues})/(\text{lipides chaînes courtes})$  évolue lui aussi au fur et à mesure que la proportion de DMPC augmente dans le milieu ; plus exactement,  $q=7$  pour la proportion (9:1),  $q=6$  pour celle (8:2) et  $q=5$  pour celle (7:3). Expérimentalement, il a été en effet constaté que ce rapport  $q$  avait une influence importante sur la formation des bicelles // ; cet effet n'a pas été remarqué dans le cas des bicelles  $\perp$  précédentes. La figure VII.2 présente les différents spectres RMN- $^{31}\text{P}$  obtenus lorsque la fraction molaire du DMPC, par rapport aux lipides à chaînes longues, varie de 10% à 30% dans le système (TBBPC:DMPC)/DCPC.

Pour la proportion (9:1), on retrouve le spectre RMN en phosphore caractéristique des bicelles s'orientant avec leur normale parallèle à  $B_0$  entre 25°C et 65°C. Le domaine d'existence des bicelles // dans ces conditions est donc équivalent à celui des bicelles biphényles seules (25°C-70°C). De plus, la largeur des raies ainsi que le rapport d'intégration des aires sous les pics ( $\approx 5,5$ , correspondant à un diamètre des disques de  $\approx 760 \text{ \AA}$ , d'après le modèle d'Arnold et al.) sont équivalents à ceux observés pour les bicelles TBBPC/DCPC pures (voir chapitre IV) ; les objets bicellaires s'alignent donc bien dans le champ magnétique. Les bicelles biphényles sont donc capables d'accepter 10% (en moles) du lipide saturé parmi les lipides à chaînes longues, sans modifier leur structure et leur stabilité thermique.

Pour la proportion (8:2), le domaine d'existence des bicelles // est rencontré entre 35°C et 65°C. La largeur des raies n'est pas réellement modifiée par rapport à la proportion (9:1), prouvant une bonne orientation des objets bicellaires dans  $B_0$ . Le rapport d'intégration des pics est quant à lui plus faible ( $\approx 5$ , équivalent à un diamètre des objets de  $\approx 693 \text{ \AA}$ ) que pour la proportion (9:1), ce qui est directement lié à un rapport molaire  $q$  utilisé pour la préparation du système plus petit. Pour 25°C, la forme du spectre RMN- $^{31}\text{P}$  obtenu est relativement complexe à interpréter, car elle peut correspondre à plusieurs organisations lipidiques différentes. Nous essayerons d'explicitier plus en détails ce type de spectre phosphore à l'aide de simulations, dans la partie VII.2. Il en est de même pour les spectres obtenus entre 25°C et 45°C pour la proportion (7:3). Dans ce dernier cas, les deux pics caractéristiques des bicelles // ne sont observés que pour des températures voisines de 55°C et leur largeur est importante ; celle-ci prouve que les objets bicellaires contenant 30% de DMPC parmi leurs lipides à chaînes longues, ne sont pas tous bien orientés dans le champ magnétique. Le rapport d'intégration des pics est égal à  $\approx 4$ , ce qui correspond à un diamètre des objets de  $\approx 600 \text{ \AA}$ . Pour  $T=65^\circ\text{C}$ , ces objets bicellaires coexistent avec une phase isotrope.

Ainsi, plus la proportion du DMPC augmente dans le système TBBPC/DCPC, plus le domaine d'existence en température des bicelles // diminue (stabilité sur 40°C pour la proportion (9:1), sur 30°C pour (8:2) et sur  $\approx$  10°C pour (7:3)) ; les objets bicellaires s'alignent également moins correctement dans le champ magnétique et leur taille diminue.

Les bicelles // suivent donc le même comportement que celles  $\perp$ , à savoir que leur capacité à accepter un deuxième lipide parmi ceux à chaînes longues est limitée à 30%.

### VII.1.3 Systèmes intermédiaires DMPC/TBBPC/DCPC

Il nous reste à étudier le type de phase et l'orientation dans le champ magnétique, adoptés par des systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC, pour lesquels les lipides à chaînes longues sont dans des proportions similaires. Pour cela, plusieurs échantillons du mélange ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC ont été préparés dans D<sub>2</sub>O en présence de 100 mM de KCl ou NaCl, pour une hydratation de 80%, en faisant varier la proportion entre les lipides à chaînes longues (TBBPC:DMPC) de (4:6) à (6:4), et la température de 25°C à 65°C, par pas de 5°C. Le rapport molaire  $q=(\text{lipides chaînes longues})/(\text{lipides chaînes courtes})$  est égal à 3,5 pour la proportion (4:6),  $q=4$  pour (5:5) et  $q=4,5$  pour (6:4). Les différents spectres RMN en phosphore obtenus sont présentés en figure VII.3.

Pour les trois proportions (TBBPC:DMPC) considérées ici, aucun spectre spécifique aux bicelles  $\perp$  ou // n'est observé sur la gamme de température étudiée. On observe dans l'ensemble des formes de spectres très complexes et difficilement interprétables, associées à des phases lipidiques mixtes. C'est notamment le cas pour les proportions (5 :5) et (6 :4) pour des températures comprises respectivement entre 30°C et 60°C, et 40°C et 60°C. Pour certains de ces spectres, des pics plus intenses que d'autres sont observés ; ceux-ci peuvent être associés à des phases lamellaires adoptant une orientation privilégiée dans  $B_0$  ; pour la proportion (5 :5) à 50°C, on distingue en particulier deux pics majoritaires à 19,6 ppm et 9 ppm, qui pourraient correspondre à la signature de bicelles //. Pour des températures plus basses (25°C pour (5 :5) et  $T < 30^\circ\text{C}$  pour (6 :4)), une phase isotrope coexiste avec une phase lamellaire non orientée. Pour la proportion (4:6), on retrouve entre 25°C et 50°C, le type de spectre phosphore que nous essayerons d'explicitier dans la partie VII.2 ; pour 60°C, le pic majoritaire à  $\approx$  0,9 ppm est associé à une phase isotrope.

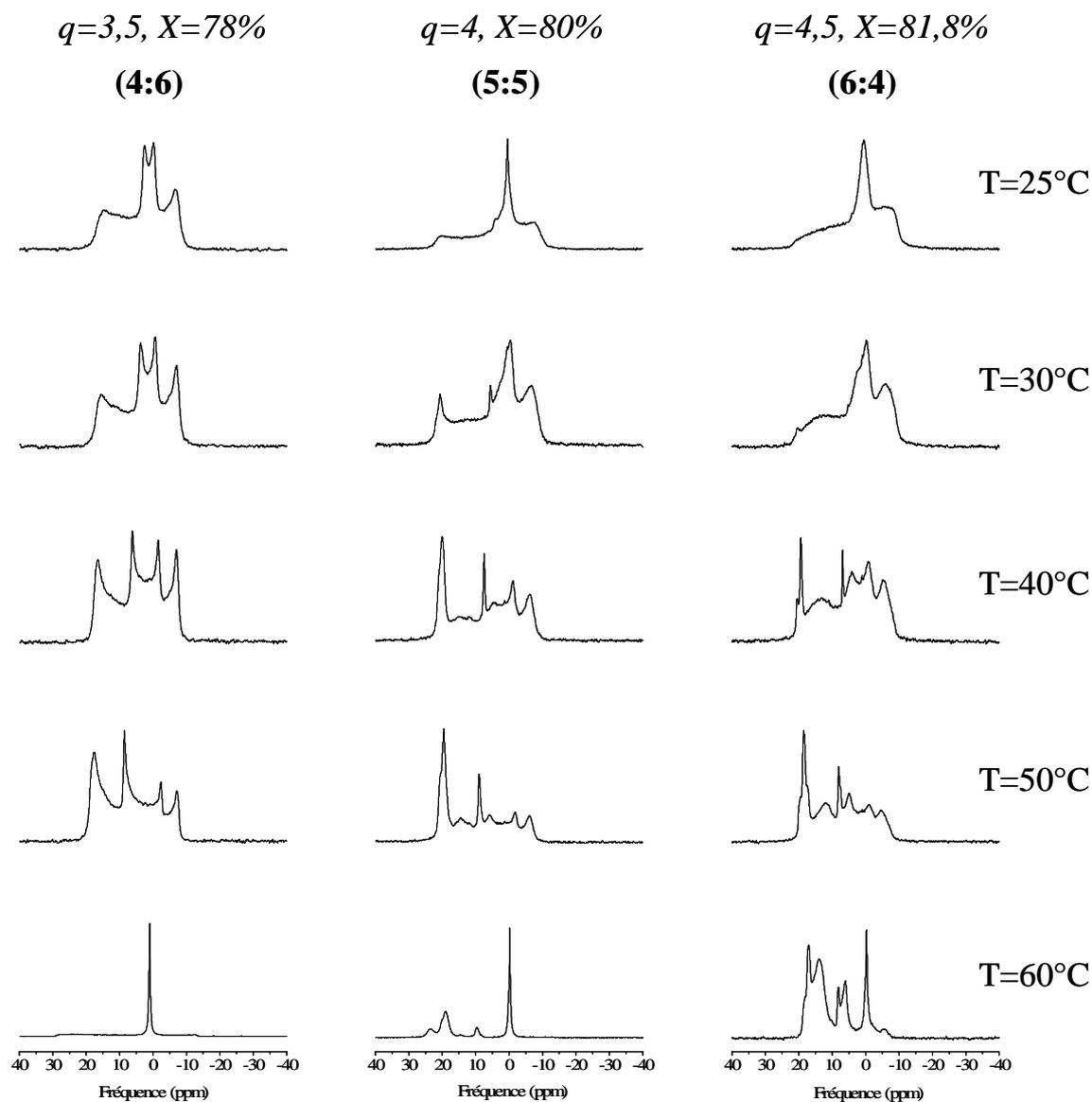


Figure VII.3 : Spectres RMN des Solides  $^{31}\text{P}$ , avec découplage large-bande des protons, du système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC pour une hydratation de 80% dans  $\text{D}_2\text{O}$  (avec 100 mM de KCl ou NaCl). Les proportions en moles des lipides à chaînes longues (TBBPC:DMPC) de (4:6) à (6:4), ainsi que les rapports molaires  $q$  (ou  $X$ ) associés, sont indiqués au-dessus des spectres et les températures sur la droite. Chaque spectre est le résultat de 350 scans.

## VII.2 Simulations de spectres RMN-<sup>31</sup>P associés aux systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC

D'après les analyses RMN-<sup>31</sup>P que nous venons de voir, le polymorphisme lipidique du système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC est très riche. En effet, suivant les conditions de composition lipidique et de température, plusieurs organisations moléculaires peuvent être adoptées. Parmi elles, on retrouve celle bien connue des bicelles  $\perp$  et  $//$  et celle associée à la coexistence d'une phase isotrope avec une phase lamellaire orientée ou non. D'autres types de phases plus complexes ont également été observés ; nous allons essayer de les expliciter dans cette partie à l'aide de simulations de spectres phosphores.

### VII.2.1 Spectre de poudre du système (TBBPC:DMPC, 3:7)/DCPC

Pour le système (TBBPC:DMPC, 3:7)/DCPC (avec  $q=3,5$  ou  $X=78\%$ , et  $h=80\%$  dans  $D_2O$  contenant 100 mM de KCl) et des températures comprises entre 25°C et 30°C, un spectre de poudre, correspondant à une ou plusieurs phases lamellaires non orientées est observé. La figure VII.4 compare le spectre expérimental obtenu à 30°C et un spectre simulé avec un programme FORTRAN mis au point par Erick J. Dufourc. Une adéquation entre les deux est trouvée en combinant deux spectres de poudres phosphores : l'un avec une anisotropie de déplacement chimique  $\Delta\sigma=8$  ppm (contribution de 30%) et l'autre avec  $\Delta\sigma=29$  ppm (contribution de 70%). Les contributions de chacun de ces spectres respectent approximativement les proportions de lipides à chaînes courtes (22% de DCPC) et de lipides à chaînes longues (78%) utilisées pour préparer ce système. Ainsi, le spectre dont l'anisotropie magnétique  $\Delta\sigma$  est la plus faible pourrait être associé à une phase lamellaire non orientée, riche en détergeant DCPC (petite molécule très mobile) et donc très dynamique (ce qui explique un  $\Delta\sigma$  petit) ; à l'inverse le spectre dont  $\Delta\sigma$  est le plus grand correspondrait à une phase lamellaire non orientée pauvre en DCPC et donc plus rigide (ce qui entraîne un  $\Delta\sigma$  plus grand). Ce spectre phosphore pourrait également correspondre non pas à deux phases lamellaires comme nous venons de l'envisager, mais à une seule dans laquelle le DCPC conserve une mobilité très importante.

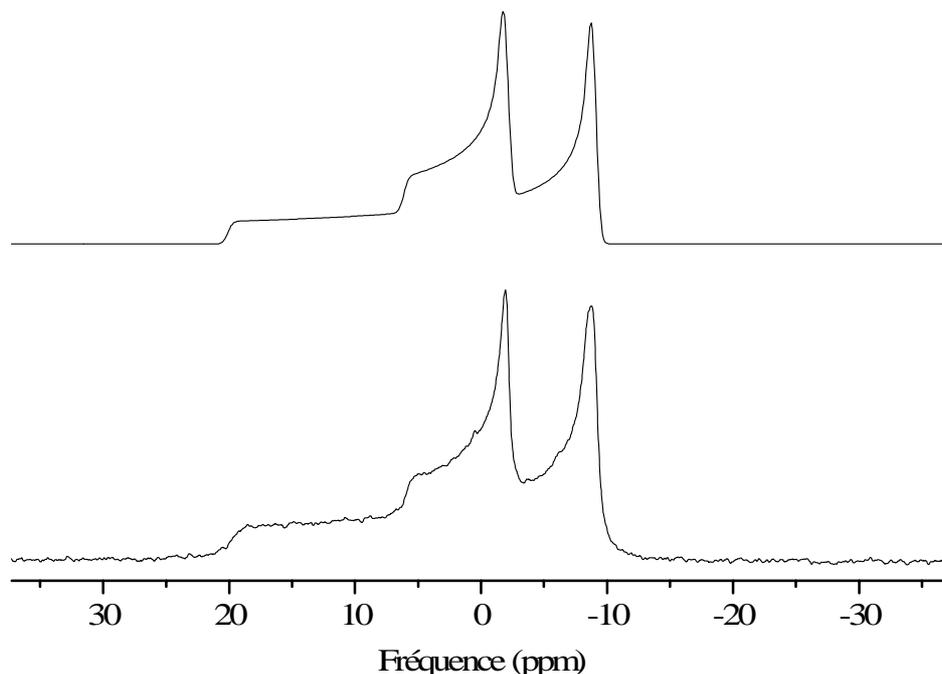


Figure VII.4 : Comparaison entre le spectre RMN- $^{31}\text{P}$  expérimental (spectre du bas), associé au système ternaire (TBBPC:DMPC, 3 :7)/DCPC à 30°C (avec  $q=3,5$  et  $h=80\%$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  contenant 100 mM de KCl), et un spectre simulé (spectre du haut). Ce dernier a été obtenu en combinant deux spectres de poudres, l'un avec  $\Delta\sigma=8$  ppm (contribution de 30%) et l'autre avec  $\Delta\sigma=29$  ppm (contribution de 70%).

#### VII.2.2 Spectres « complexes » des systèmes ternaires où (TBBPC:DMPC)=(4:6), (7:3) et (8:2).

Les systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC ayant des proportions (TBBPC:DMPC) égales à (4:6), (7:3) et (8:2) présentent, pour certaines températures, un même type de spectre phosphore relativement complexe mais bien défini. C'est aussi le cas du système TBBPC/DCPC pour  $h=80\%$ ,  $X=85,7\%$  et  $25^\circ\text{C}<T<35^\circ\text{C}$ , et pour  $h=60\%$ ,  $X=85,7\%$  et  $25^\circ\text{C}<T<43^\circ\text{C}$  (voir chapitre V). Ces formes spectrales ne sont pas facilement interprétables car elles peuvent correspondre à plusieurs organisations lipidiques, plus particulièrement à une distribution cylindrique des lipides (voir la théorie chapitre II) ou à des phases lamellaires qui subissent une déformation dans un champ magnétique (Pott et Dufourc, 1995). Van Dam et al (van Dam et al., 2004) ont déjà observé des tubes (encore appelés micelles géantes cylindriques) par microscopie électronique pour le système DMPC/DCPC

avec  $2,2 < q \leq 3$  et dans des conditions d'hydratation très élevées ( $h > 95\%$ ) ; nous savons par ailleurs que des vésicules MLVs de TBBPC se déforment en oblates dans un champ magnétique d'au moins 9,4 Tesla (voir chapitre IV).

Nous avons donc essayé de simuler, à l'aide de programmes en FORTRAN, certains de ces spectres relatifs aux systèmes ternaires, afin de pouvoir déterminer plus précisément l'organisation lipidique qu'il leur est associée.

La figure VII.5 compare le spectre RMN- $^{31}\text{P}$  expérimental (spectre c)) du système ternaire (TBBPC:DMPC, 4:6)/DCPC ( $q=3,5$  et  $h=80\%$ ) à  $40^\circ\text{C}$ , avec un spectre simulé soit par une distribution cylindrique (spectre a)) soit par une déformation des vésicules en oblates (spectre b)).

Dans le cas a), on considère des tubes orientés dans le champ magnétique tel que l'axe principal du cylindre soit perpendiculaire à  $B_0$  ( $\alpha=90^\circ$ ) ; une combinaison entre deux spectres à symétrie cylindrique (avec  $\alpha=90^\circ$ ) est ensuite effectuée : l'un avec une anisotropie de déplacement chimique  $\Delta\sigma$  petit ( $\approx 7$  ppm, mesuré sur le spectre expérimental), l'autre avec un  $\Delta\sigma$  grand ( $\approx 23,5$  ppm). La contribution du spectre avec le  $\Delta\sigma$  petit suit la proportion du lipide à chaînes courtes dans le milieu ( $\approx 22\%$ ) et celle du spectre avec le  $\Delta\sigma$  grand suit celle des lipides à chaînes longues ( $\approx 78\%$ ). Le premier serait associé à une phase lipidique riche en DCPC, donc dynamique et le second correspondrait à l'inverse à une phase lipidique pauvre en DCPC, donc peu mobile. Là aussi, le spectre phosphore observé expérimentalement pourrait correspondre non pas à deux types de tubes de compositions lipidiques et donc de dynamique différentes, mais à une seule phase à symétrie cylindrique comportant des domaines plus ou moins riches en DCPC.

Dans le cas b), une combinaison entre deux spectres correspondant à des vésicules en oblates est effectuée : l'un avec un  $\Delta\sigma \approx 7$  ppm et un rapport des deux demi-axes de l'ellipse  $c/a=0,65$ , l'autre avec un  $\Delta\sigma \approx 23,5$  ppm et un rapport  $c/a=0,6$ . La contribution du premier suit la proportion du DCPC ( $\approx 22\%$ ) et celle du deuxième suit la proportion des lipides à chaînes longues ( $\approx 78\%$ ). Le spectre expérimental pourrait donc correspondre à des deux types de vésicules lipidiques déformées en oblates sous  $B_0$  (les unes riches en DCPC très mobiles, les autres pauvres en DCPC plus rigides) ou à une seule vésicule oblate dans laquelle le DCPC conserve une mobilité très importante.

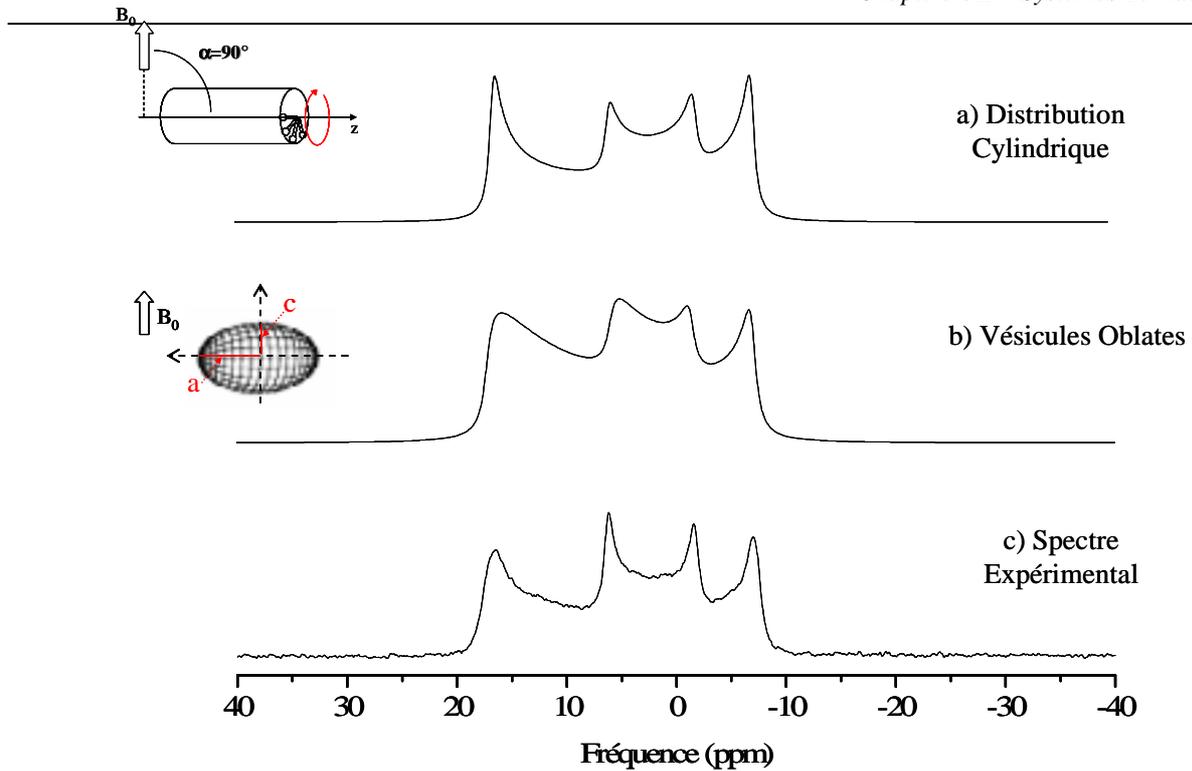


Figure VII.5 : Comparaison entre le spectre RMN- $^{31}\text{P}$  expérimental (spectre c)), associé au système ternaire (TBBPC:DMPC, 4:6)/DCPC à 40°C (avec  $q=3,5$  et  $h=80\%$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  contenant 100 mM de KCl) et un spectre simulé soit avec une distribution cylindrique (spectre a)) soit avec une déformation des vésicules en oblates ( $c/a=0,65$  pour  $\Delta\sigma\approx 7$  ppm et  $c/a=0,6$  pour  $\Delta\sigma\approx 23,5$  ppm, spectre b)).

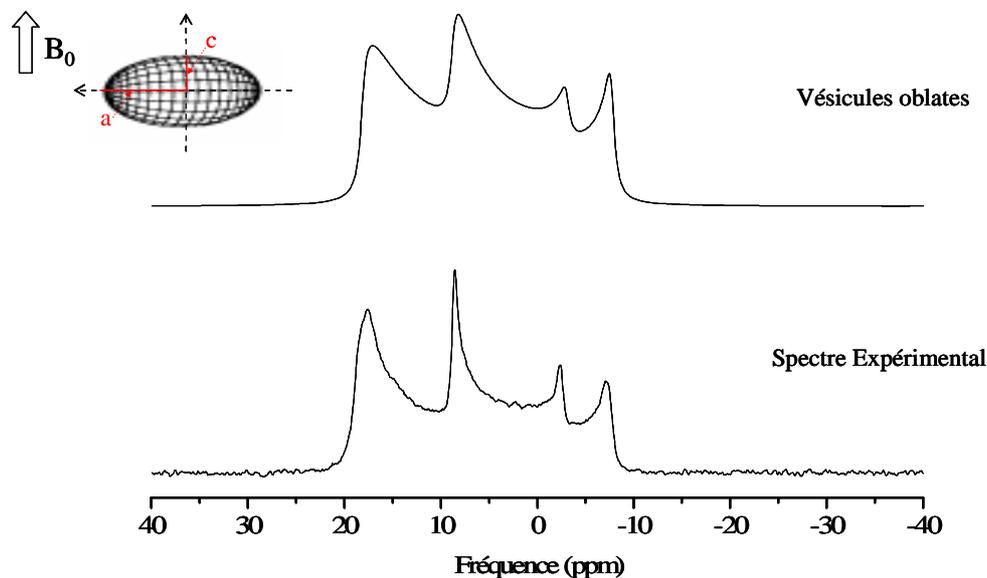


Figure VII.6 : Comparaison entre le spectre RMN- $^{31}\text{P}$  expérimental associé au système ternaire (TBBPC:DMPC, 4:6)/DCPC à 50°C (avec  $q=3,5$  et  $h=80\%$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  contenant 100 mM de KCl) et un spectre simulé en considérant des vésicules en oblates ( $c/a=0,52$  pour  $\Delta\sigma\approx 11$  ppm et  $c/a=0,55$  pour  $\Delta\sigma\approx 24,8$  ppm, spectre b)).

On constate que dans le cas du système ternaire (TBBPC:DMPC, 4:6)/DCPC à 40°C, une meilleure adéquation entre l'expérience et la simulation est rencontrée pour une distribution cylindrique des lipides plutôt qu'une déformation des vésicules en oblates, surtout au niveau de la largeur des raies du spectre. Toutefois, le programme de simulation utilisé est relativement simple ; il considère notamment une largeur de raie constante quelque soit l'orientation ; il pourrait donc être amélioré afin de tenir compte davantage de ce paramètre.

Ainsi, même après ces simulations, il est toujours difficile de déterminer l'organisation moléculaire adoptée par le système ternaire (TBBPC:DMPC, 4:6)/DCPC à 40°C. Ce dernier peut soit former des tubes associés à une distribution cylindrique des lipides, soit former des vésicules qui se déforment en oblates sous le champ magnétique, soit adopter ces deux organisations en même temps.

Pour le système ternaire (TBBPC:DMPC, 4:6)/DCPC ( $q=3,5$  et  $h=80\%$ ) à 50°C, la tendance semble favoriser une déformation des vésicules en oblates. La figure VII.6 compare le spectre expérimental de ce système avec un spectre simulé en combinant toujours deux types de spectres : l'un avec un  $\Delta\sigma \approx 11$  ppm et un rapport des deux demi-axes de l'ellipse  $c/a=0,52$  (contribution de 22%), l'autre avec un  $\Delta\sigma \approx 24,8$  ppm et un rapport  $c/a=0,55$  (contribution de 78%). Là aussi, deux types de vésicules lipidiques déformées en oblates sous  $B_0$  pourraient être rencontrées (les unes riches en DCPC très mobiles, les autres pauvres en DCPC plus rigides) ou une seule vésicule oblate comportant des domaines plus ou moins riches en DCPC. Ce type de spectre phosphore, où le signal correspondant à l'orientation  $n//B_0$  est majoritaire par rapport à celui associé à l'orientation  $n \perp B_0$ , ne peut pas être simulé en considérant une distribution cylindrique des lipides (voir théorie chapitre II.1). Ainsi, le système ternaire (TBBPC:DMPC, 4:6)/DCPC ( $q=3,5$  et  $h=80\%$ ) à 50°C adopterait plutôt une organisation en vésicules oblates à 50°C.

Il faut rester très prudent quant à l'interprétation de ces spectres ; en effet, le système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC n'a été analysé que par RMN des Solides  $^{31}\text{P}$ . Il faudrait faire appel à d'autres techniques physico-chimiques, comme la diffusion des rayons X et la microscopie électronique, pour réellement conclure sur le type de phase lipidique que ce système adopte.

### VII.3 Ebauche du diagramme Température-Composition lipidique du système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC

A partir de l'étude RMN en phosphore précédente, il est possible de construire une ébauche du diagramme Température-Composition en lipides à chaînes longues du système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC pour une hydratation de 80% (voir figure VII.7). Le domaine d'existence des bicelles s'orientant avec la normale à leur bicouche perpendiculaire au champ magnétique est noté  $B_{\perp}$  (contours verts) et celui des bicelles s'orientant avec la normale à leur bicouche parallèle à  $B_0$  est noté  $B_{//}$  (contours rouges).

Comme nous venons de le voir, les bicelles  $\perp$  et  $//$  n'existent que pour des proportions (TBBPC:DMPC) comprises pour les premières entre (1:9) et (3:7) et pour les deuxièmes entre (7:3) et (9:1). Plus la proportion du deuxième lipide à chaînes longues augmente, plus les objets bicellaires s'orientent difficilement dans le champ magnétique, et plus le domaine d'existence en température des bicelles  $\perp$  et  $//$  est restreint : ainsi les premières sont stables sur une gamme de 10°C pour la proportion (1:9) et sur 3°C pour (3:7), et les deuxièmes sur une gamme de 40°C pour (9:1) et sur 10°C pour (7:3). Les bicelles  $\perp$  et  $//$  gardent respectivement les caractéristiques des bicelles saturées et biphényles. Les premières n'existent que sur une gamme de température faible tandis que les deuxièmes conservent une stabilité en température relativement importante. De même, les phases avoisinant les domaines d'existence des bicelles  $\perp$  et  $//$  sont similaires à celles relatives aux systèmes DMPC/DCPC et TBBPC/DCPC respectivement. Ainsi, on retrouve une coexistence entre une phase isotrope et lamellaire (notée I+L) pour des températures inférieures et supérieures au domaine des bicelles  $\perp$  ; pour des températures supérieures au domaine des bicelles  $//$ , celles-ci coexistent avec une phase isotrope (notée  $B_{//}$ +I). Pour 30% de TBBPC, une ou plusieurs phases lamellaires non orientées (notées L) sont observées entre 25°C et 30°C. Pour des proportions (TBBPC:DMPC) comprises entre (5:5) et (6:4), des phases mixtes difficilement interprétables sont observées (zone en pointillés). Enfin, d'après les simulations des spectres phosphore effectuées précédemment, les parties grises sont associées soit à des tubes, soit à des vésicules qui se déforment en oblates sous un champ magnétique.

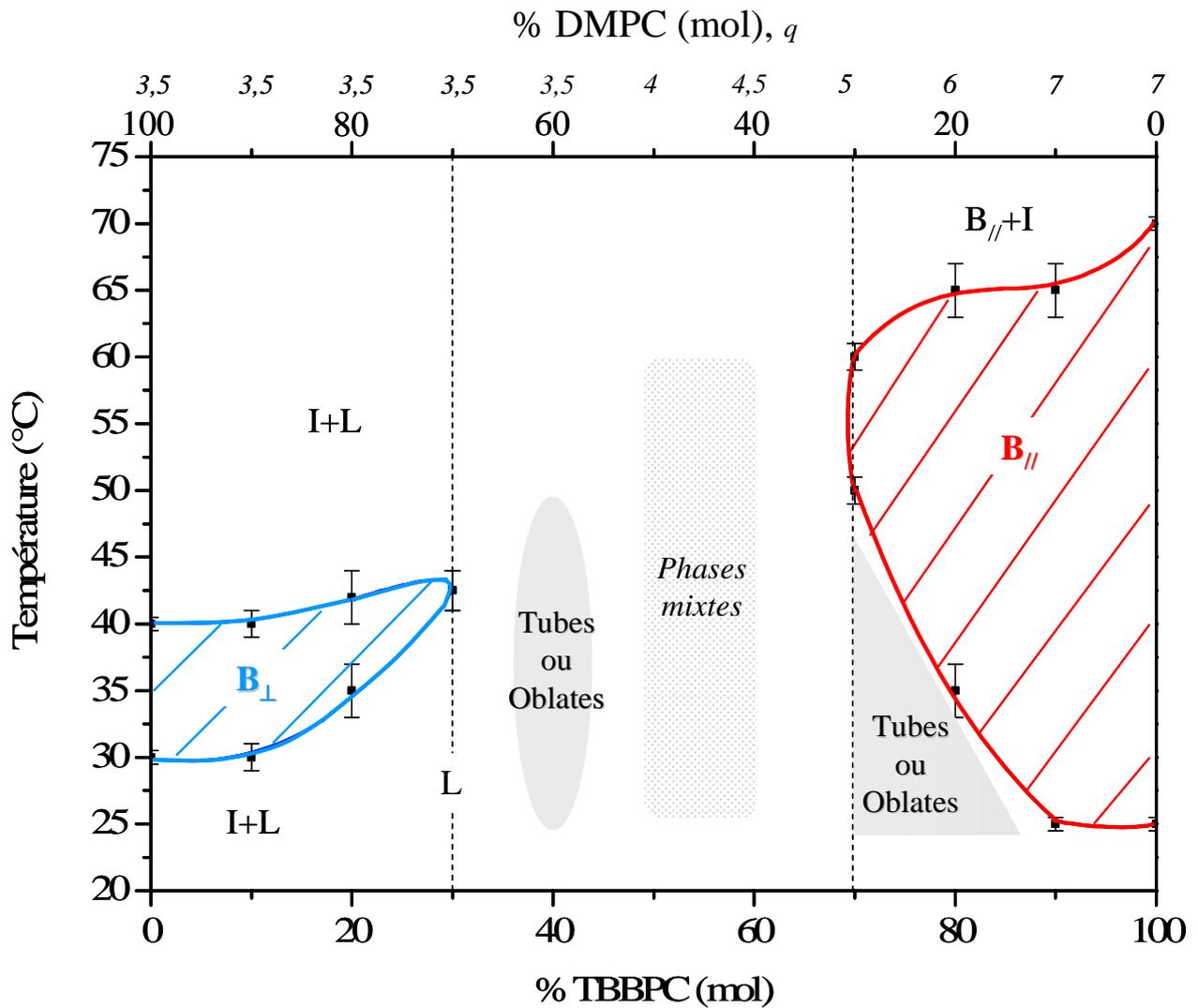


Figure VII.7 : Diagramme température en fonction de la composition lipidique en TBBPC ou en DMPC (% molaire par rapport aux lipides à chaînes longues) du système ternaire (TBBPC:DMPC)/DCPC pour une hydratation de 80%. Le rapport molaire  $q=(\text{lipides chaînes longues})/(\text{lipides chaînes courtes})$  est indiquée en italique pour chaque composition lipidique. Le domaine d'existence des bicelles  $\perp$  est noté  $B_{\perp}$  et est délimité par des contours verts foncés, celui des bicelles  $//$  est noté  $B_{//}$  et est délimité par des contours rouges. La notation  $I+L$  correspond à une coexistence de phases Isotrope et Lamellaire, celle  $B_{//}+I$ , à la coexistence de bicelles  $//$  et d'une phase Isotrope, et celle  $L$  à une phase Lamellaire non orientée. Les parties grises sont associées à des tubes ou des vésicules oblates. Entre 50% et 60% en moles de TBBPC, des phases « mixtes » sont observées (zone en pointillés).

Nous avons constaté que pour conserver l'existence des bicelles //, il fallait diminuer le rapport molaire  $q=(\text{lipides chaînes longues})/(\text{lipides chaînes courtes})$  au fur et à mesure que la proportion en DMPC augmentait dans le milieu, ce qui n'est pas le cas pour les bicelles  $\perp$ . D'après les diagrammes de « phase » des bicelles biphényles (voir chapitre V et VI), celles-ci n'existent que pour des compositions lipidiques bien définies ( $6 < q < 8,5$  ou  $85,7\% < X < 88,9\%$  à 80% d'hydratation) alors que les bicelles saturées présentent une grande stabilité en composition lipidique ( $1,8 < q < 6,5$  ou  $65\% < X < 87\%$  pour  $h=80\%$ ). Il est donc compréhensible que les bicelles // soient plus sensibles à la composition lipidique que celles  $\perp$ .

D'un point de vue orientation des objets bicellaires ternaires dans le champ magnétique, l'anisotropie de susceptibilité magnétique  $\Delta\chi$ , du lipide à chaînes longues majoritaire l'emporte à chaque fois ; ainsi les bicelles ternaires riches en DMPC ( $\Delta\chi < 0$ ) adoptent l'orientation  $n \perp B_0$  et celles riches en TBBPC ( $\Delta\chi > 0$ ) sont orientées telles que  $n // B_0$ . Le  $\Delta\chi$  du TBBPC inséré dans les bicelles saturées n'est pas suffisant pour faire basculer l'orientation de celles-ci de  $90^\circ$  ; il ne joue donc pas le même rôle que celui des ions lanthanides. Par ailleurs, aucune orientation intermédiaire entre  $0^\circ$  et  $90^\circ$  par rapport au champ magnétique n'est observée pour ces systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC.

Le comportement des bicelles  $\perp$  et // face à l'insertion d'un deuxième lipide à chaîne longue de même nature (même tête choline) est similaire ; les deux sont capables d'en accepter au mieux 30% en moles par rapport aux lipides à chaînes longues. Ceci équivaut respectivement à 23,3% de TBBPC et 25% de DMPC par rapport au nombre de moles total de lipides dans les bicelles  $\perp$  et //. Les stabilités respectives des bicelles saturées en composition lipidique et des bicelles biphényles en température ne leur confèrent donc pas une capacité d'adaptation plus importante à un troisième lipide. De même, comme le rapport  $q$  et donc la taille des bicelles // diminue quand la proportion de DMPC augmente, le diamètre initial plus important des bicelles biphényles par rapport à celles saturées, ne les aide pas à intégrer davantage de DMPC.

Les bicelles sont donc des modèles membranaires pouvant s'adapter à la présence d'une molécule extérieure mais dans des proportions limitées. Dans le cas d'une molécule lipidique de même nature (même tête polaire et même longueur de chaînes aliphatiques), l'insertion maximale est donc de  $\approx 25\%$  en moles par rapport à la quantité totale de lipides ; pour un composé de type cholestérol, des expériences préliminaires ont montré que les

bicelles DMPC/DCPC pouvaient en accepter  $\approx 15\%$  (en moles). Ces résultats donnent des indications pour l'intégration de biomolécules au sein des bicelles ; il est actuellement difficile d'y insérer des biomolécules transmembranaires en grande quantité, ce que nous confirmerons au chapitre suivant par l'étude du peptide amphipatique Neu\* $^{15}\text{N}_4$ .

Il faut préciser que les phases lipidiques et l'orientation adoptées par ces systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC n'ont été caractérisées ici que du point de vue de la RMN -  $^{31}\text{P}$  ; des études complémentaires par d'autres techniques physico-chimiques, notamment par Diffusion des rayons X (SAXS) et par microscopie électronique, seraient nécessaires pour valider ces résultats. On pourrait ainsi déterminer si le système, pour certaines conditions de composition lipidique et de température vues précédemment, s'organise préférentiellement sous forme de tubes ou de vésicules déformées en oblates dans  $B_0$ . Toutefois, lorsque les deux lipides à chaînes longues TBBPC et DMPC sont en proportion équivalente, le système ternaire évolue vers la formation d'objets de forme et d'orientation différente des disques. L'idée de former spontanément des bicelles ternaires (TBBPC:DMPC, 5:5)/DCPC qui s'orienteraient avec leur normale à  $45^\circ\text{C}$  par rapport à  $B_0$  (l'anisotropie de susceptibilité magnétique négative du DMPC compenserait celle positive du TBBPC) s'avère donc pour l'instant difficilement réalisable.



## CHAPITRE VIII

Applications des bicelles à l'étude de  
peptides membranaires



Ce chapitre aborde les applications potentielles des bicelles biphényles, comparées à celles saturées, pour l'étude de biomolécules comme des peptides, par Dichroïsme Circulaire et par RMN- $^{15}\text{N}$ . Deux exemples de peptides marqués  $^{15}\text{N}$  seront abordés : une forme mutée du fragment transmembranaire d'un peptide de la famille des tyrosines kinases, noté Neu\* $^{15}\text{N}_4$ , et la Méthionine Enképhaline, notée Menk $^{15}\text{N}_3$ . Le premier présente un caractère très hydrophobe et traverse la membrane lipidique en formant une hélice ; le deuxième est un pentapeptide neuronal, connu pour se localiser à l'interface entre les parties polaires et apolaires de la membrane.

## VIII.1 Comparaison entre les bicelles biphényles et saturées pour l'étude de biomolécules par Dichroïsme Circulaire à UltraViolets (DC-UV) et RMN- $^{15}\text{N}$ .

### VIII.1.1 Signal dichroïque (UV) de chaque type de bicelles

Les bicelles saturées sont actuellement régulièrement utilisées comme modèle membranaire pour étudier par Dichroïsme Circulaire à UltraViolets, la structure secondaire adoptée par des peptides en interaction avec une membrane lipidique (Goetz et al., 2001) ; (Khemtemourian et al., 2006). Nous voulons savoir si les bicelles biphényles peuvent elles aussi jouer ce rôle. Pour cela, des bicelles TBBPC/DCPC avec X=85,7% et h=90% dans H<sub>2</sub>O avec 100 mM de NaCl, ont été préparées et analysées par DC-UV. Pour comparer avec d'autres modèles de membranes lipidiques, le signal dichroïque de bicelles DMPC/DCPC (X=78%, h=90% dans H<sub>2</sub>O avec 100 mM de KCl), ainsi que celui de vésicules de DMPC de type LUV (diamètre de 200 nm, h=90% dans H<sub>2</sub>O) et SUV (diamètre 50 nm, h=90% dans H<sub>2</sub>O) ont également été enregistrés. Il faut préciser que les échantillons de bicelles saturées et de vésicules de DMPC sont translucides alors que l'aspect de celui des bicelles biphényles est plutôt blanchâtre.

La figure VIII.1 présente les différents spectres  $\Delta\varepsilon=f(\lambda)$  obtenus ;  $\Delta\varepsilon$  représente l'ellipticité du système (voir chapitre II.3) et  $\lambda$  la longueur d'onde (comprise entre 180 et 270 nm, gamme régulièrement utilisée pour l'analyse de la structure secondaire des peptides).

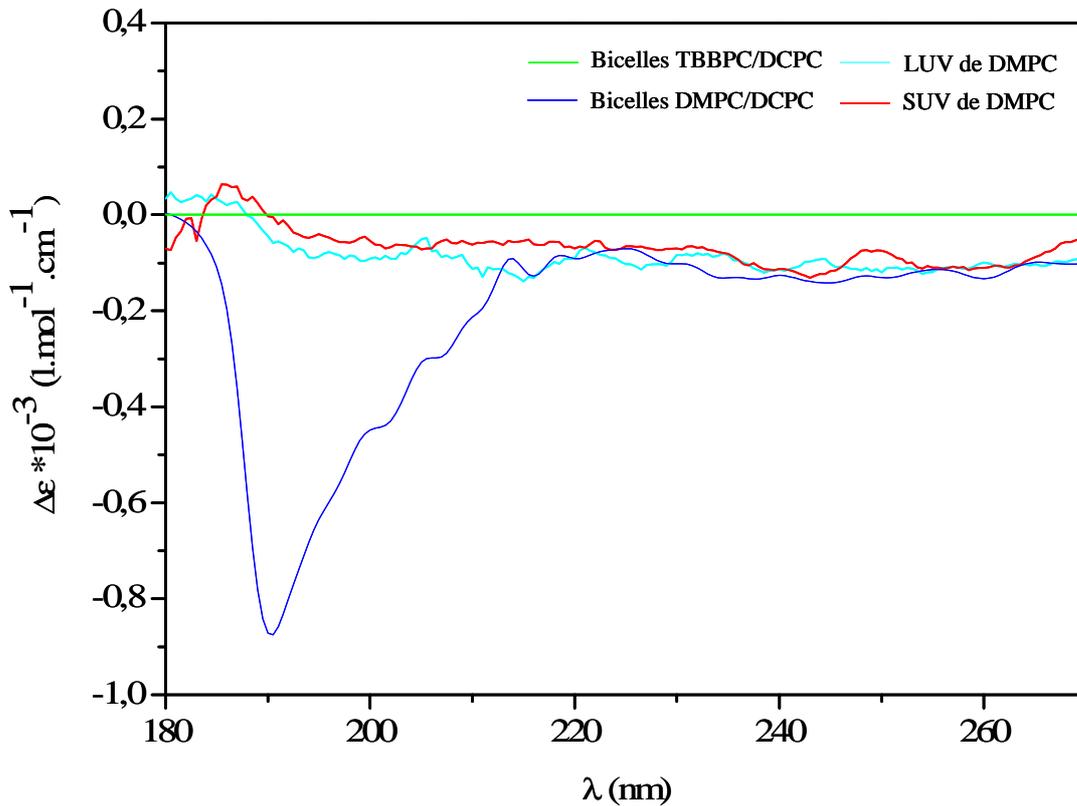


Figure VIII.1: Spectres dichroïques  $\Delta\epsilon=f(\lambda)$  de bicelles DMPC/DCPC (en bleu,  $h=80\%$ ,  $X=78\%$  dans  $D_2O$  avec  $100 \text{ mM}$  de  $KCl$ ), de bicelles TBBPC/DCPC (en vert,  $h=90\%$ ,  $X=85,7\%$  dans  $D_2O$  avec  $100 \text{ mM}$  de  $NaCl$ ), de vésicules unilamellaires de DMPC de type LUV ( $200 \text{ nm}$  de diamètre,  $h=80\%$  dans  $D_2O$ ) et de vésicules unilamellaires de type SUV ( $50 \text{ nm}$  de diamètre,  $h=80\%$  dans  $D_2O$ ) pour une température commune de  $40^\circ\text{C}$ . Le diamètre des cuves dichroïques utilisées est de  $0,1 \text{ mm}$ .

On constate que le signal dichroïque des bicelles saturées, des LUV (200 nm) et des SUV (50 nm) est très faible (entre  $-0,9.10^{-3}$  et  $0,1.10^{-3}$   $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) pour la gamme de longueurs d'onde étudiée. En comparaison, l'ellipticité d'un peptide à 190 nm est comprise entre 300 et 500  $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Ces trois modèles membranaires sont donc des bons candidats pour déterminer la structure secondaire de peptides hydrophobes, car leur signal dichroïque ne masque pas celui de la biomolécule étudiée.

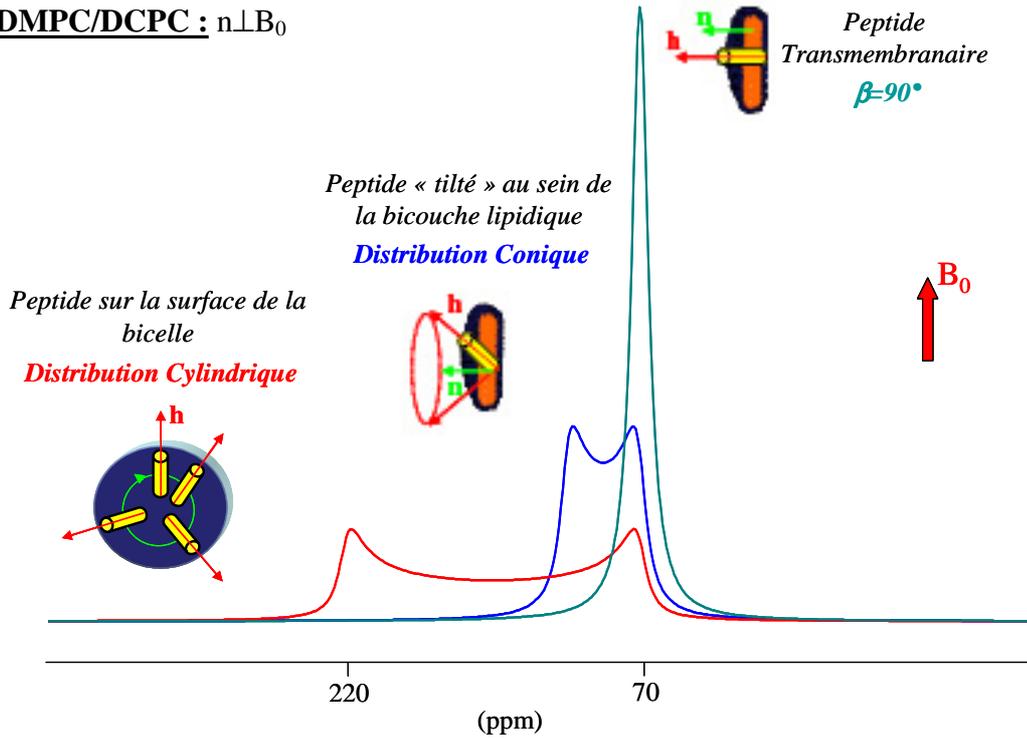
Le spectre dichroïque des bicelles TBBPC/DCPC est quant à lui représenté par une ligne droite dont l'ellipticité est nulle, ce qui est caractéristique d'un signal saturé. Les bicelles biphenyles ne peuvent donc pas être utilisées à 90% d'hydratation en tant que modèle membranaire pour étudier la structure secondaire de peptides par DC-UV, car leur signal dichroïque masquerait totalement celui de la biomolécule étudiée. En plus de l'aspect blanchâtre de l'échantillon, les deux cycles phényles, présent sur la chaîne  $\text{sn}_2$  du TBBPC, sont à l'origine de cette saturation ; ils absorbent en effet la lumière UV entre 200 nm et 270 nm (transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Le diamètre deux fois plus important des bicelles biphenyles ( $\approx 800$  Å) par rapport à celles saturées ( $\approx 450$  Å) n'est pas impliquée dans cette saturation du signal DC-UV car des LUV de DMPC de 200 nm de diamètre ont un signal dichroïque beaucoup plus faible ; c'est donc bien la nature chimique du lipide TBBPC qui est en cause et précisément la présence des deux cycles phényles.

On pourrait envisager d'analyser les bicelles TBBPC/DCPC par Dichroïsme Circulaire Vibrational (VDC), qui permet d'obtenir des informations sur la structure des peptides plus précises qu'en DC-UV. D'après le spectre IR du TBBPC (voir chapitre IV), le signal IR des bicelles biphenyles ne devrait pas masquer celui du peptide, ce qui permettrait d'analyser la structure de ce dernier au sein de ce modèle membranaire.

### VIII.1.2 Applications des bicelles biphenyles et saturées pour l'étude orientationnelle de peptides membranaires hélicoïdaux par RMN- $^{15}\text{N}$ .

Cette partie purement théorique présente les implications des orientations  $n \perp B_0$ , spécifique aux bicelles saturées, et  $n // B_0$ , associée aux bicelles biphenyles, dans l'étude orientationnelle de peptides membranaires hélicoïdaux par RMN- $^{15}\text{N}$ . Pour cela, des simulations de spectres RMN- $^{15}\text{N}$  ont été effectuées (à l'aide d'un programme mis au point par Erick J. Dufourc) en considérant des peptides marqués  $^{15}\text{N}$ , insérés dans les bicelles DMPC/DCPC et TBBPC/DCPC selon trois configurations différentes (voir figure VIII.2) :

**Bicelles DMPC/DCPC :  $n \perp B_0$**



**Bicelles TBBPC/DCPC :  $n // B_0$**

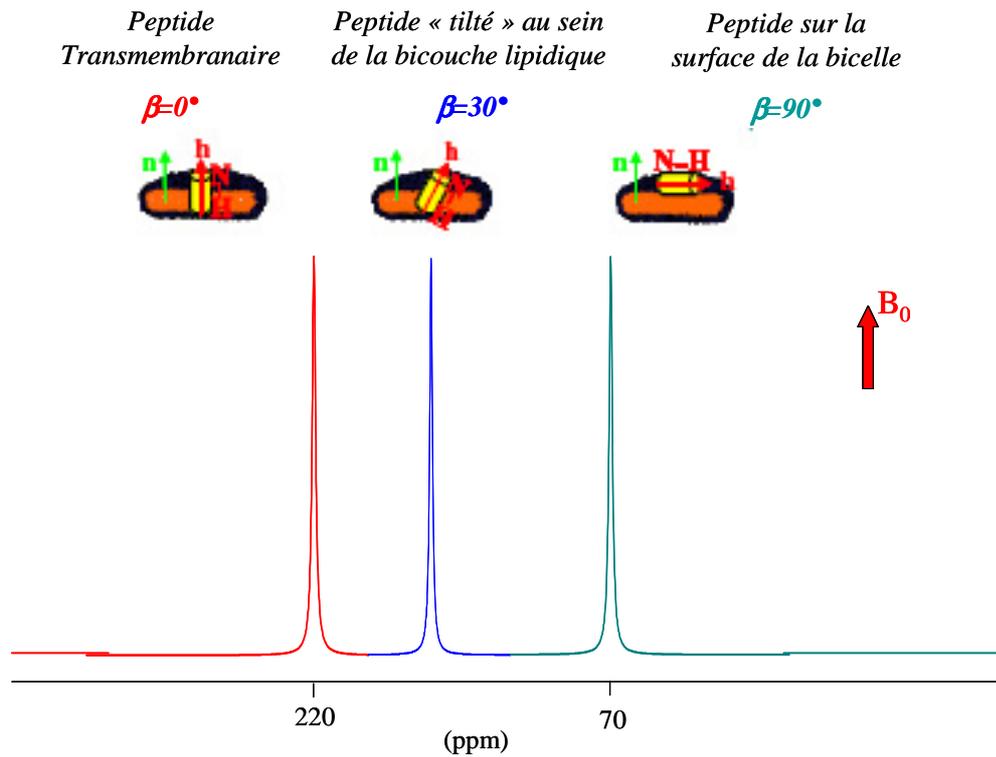


Figure VIII.2 : Simulations de spectres RMN- $^{15}\text{N}$  de peptides hélicoïdaux marqués  $^{15}\text{N}$  associées à des bicelles DMPC/DCPC (spectres du haut) et des bicelles TBBPC/DCPC (spectres du bas) selon trois configurations : soit les peptides sont transmembranaires, soit ils sont tiltés dans la bicouche lipidique soit ils se positionnent sur la surface des bicelles (les  $\delta$  limites ont été déterminés d'après (Bechinger, 2001) ; (Marassi et al., 1999)).

- soit les peptides traversent la membrane de telle sorte que l'axe principal de l'hélice  $h$  soit parallèle à la normale  $n$  à la bicouche des bicelles (on les nommera par la suite peptides transmembranaires)

- soit ils sont « tiltés » dans la bicouche lipidique des objets bicellaires (l'angle entre  $h$  et  $n$  est compris entre  $0^\circ$  et  $90^\circ$ ),

- soit ils se positionnent sur la surface des modèles membranaires (l'angle entre  $h$  et  $n$  est égal à  $90^\circ$ ).

D'après la théorie (voir chapitre II.1), le spectre RMN- $^{15}\text{N}$  dépend de l'angle  $\beta$  entre le vecteur reliant les atomes  $^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}$  et le champ magnétique statique  $B_0$ . Pour simplifier le système, on considère ici que la rotation du peptide hélicoïdal autour de son axe principal  $h$ , entraîne une colinéarité des liaisons  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  avec cet axe.

Dans le cas des bicelles saturées, qui s'orientent telles que la normale  $n$  à leur bicouche soit perpendiculaire à  $B_0$  (voir figure VIII.2, spectres du haut) :

- si le peptide est transmembranaire, l'angle  $\beta$  entre les liaisons  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  et  $B_0$  est égal à  $90^\circ$  ; cette orientation privilégiée dans le champ magnétique va se traduire sur le spectre RMN- $^{15}\text{N}$  par un pic fin, dont le déplacement chimique est spécifique de  $\beta=90^\circ$ .

- si le peptide est tilté dans la bicouche lipidique, l'angle  $\beta$  peut alors prendre toutes les valeurs comprises entre  $0^\circ$  et  $180^\circ$ . Le spectre RMN- $^{15}\text{N}$  obtenu est alors caractéristique d'une distribution dite conique des orientations ; celle-ci est équivalente à la distribution cylindrique sauf que la gamme de variation de l'angle  $\beta$  est diminuée de moitié ( $180^\circ$  pour la symétrie conique et  $360^\circ$  pour celle cylindrique). La distribution en fréquences, dépendant du facteur angulaire  $\beta$ , est donc elle aussi divisée par deux.

- si le peptide est positionné sur la surface des bicelle,  $\beta$  peut prendre toutes les valeurs entre  $0^\circ$  et  $360^\circ$  ; on retrouve alors le spectre type d'une distribution cylindrique des orientations (que nous avons déjà vu au chapitre II pour la théorie et aux chapitres V et VII). On constate que plus le spectre est distribué en fréquences, plus son intensité est faible, ce qui peut être à l'origine d'un mauvais rapport signal sur bruit.

Dans le cas des bicelles TBBPC/DCPC, s'orientant avec la normale  $n$  à leur bicouche parallèle au champ magnétique (voir figure VIII.2, spectres du haut), les spectres RMN- $^{15}\text{N}$  obtenus sont plus simples que pour les bicelles saturées et ceci pour les trois configurations considérées. En effet que le peptide soit transmembranaire, qu'il soit tilté par exemple d'un

angle de  $30^\circ$  dans la bicouche lipidique ou qu'il se positionne sur la surface de la bicelle, l'angle  $\beta$ , entre l'axe principal du peptide hélicoïdal et  $B_0$ , prend une valeur définie dans les trois cas ( $\beta=0^\circ$ ,  $\beta=30^\circ$  et  $\beta=90^\circ$  respectivement). Pour chaque angle  $\beta$ , le spectre RMN- $^{15}\text{N}$  est alors constitué d'un seul pic fin, dont le déplacement chimique est caractéristique de l'orientation adoptée par le peptide au sein de la bicelle.

Ainsi, il sera beaucoup plus facile de déterminer l'orientation par RMN- $^{15}\text{N}$  d'un peptide hélicoïdal marqué  $^{15}\text{N}$  inséré dans les bicelles biphényles que dans celles saturées ; pour les premières, la simple lecture de la position du déplacement chimique donnera l'orientation du peptide par rapport au plan de la membrane tandis que pour les deuxièmes des simulations de spectres seront nécessaires afin d'interpréter plus précisément les résultats. Les bicelles TBBPC/DCPC, de part leur orientation  $n//B_0$ , présentent donc un avantage non négligeable par rapport à celles DMPC/DCPC pour l'étude RMN de peptides hélicoïdaux (Loudet et al., 2005). Actuellement, de nombreuses études RMN de peptides ou protéines membranaires privilégient ainsi des modèles membranaires (bicouches orientées ou bicelles saturées dopées avec des ions lanthanides) possédant l'orientation  $n//B_0$  (Marassi et al., 1999) ; (Park et al., 2005) ; (Triba et al., 2006).

D'après ces premières études par DC-UV et RMN- $^{15}\text{N}$ , les bicelles DMPC/DCPC seront donc choisies pour déterminer par Dichroïsme Circulaire-UV la structure secondaire de peptides ou protéines hydrophobes, tandis que les bicelles biphényles seront privilégiées pour analyser l'orientation par RMN- $^{15}\text{N}$  de peptides membranaires hélicoïdaux marqués  $^{15}\text{N}$ .

## VIII.2 Etude du peptide membranaire Neu\* $^{15}\text{N}_4$

L'objectif est de déterminer l'orientation du peptide membranaire hélicoïdal Neu\* $^{15}\text{N}_4$  (Khemtemourian et al., 2006) par rapport au plan de la membrane lipidique. On sait qu'il se positionne en moyenne perpendiculairement à la bicouche lipidique (Jones et al., 1998) ; (Sizun et al., 2004), mais on souhaiterait avoir des informations orientationnelles plus précises, permettant entre autre d'expliquer son processus de dimérisation (voir chapitre I). Le modèle membranaire choisi ici est de type bicelle ; comme nous venons de le voir, l'orientation spécifique des bicelles biphényles comme celle des bicelles saturées devrait donner lieu à un spectre RMN- $^{15}\text{N}$  bien résolu pour ce type de peptide. Pour des raisons pratiques (quantités

limitées du lipide TBBPC synthétisé), nous avons tout d'abord testé l'insertion de Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> au sein des bicelles DMPC/DCPC. Pour cela, le spectre RMN-<sup>31</sup>P des bicelles saturées est analysé après intégration du peptide ; le signal RMN-<sup>15</sup>N en statique de ce dernier, inséré dans le modèle membranaire, est ensuite enregistré.

#### VIII.2.1 Analyse par RMN-<sup>31</sup>P des bicelles saturées contenant le peptide Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub>

Un échantillon de bicelles DMPC/DCPC (X=78%, h=90% dans D<sub>2</sub>O avec 100 mM de KCl et 20 mM d'un tampon Bis Tris) contenant le peptide Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub>, avec un rapport peptide/lipides = 1/110 (ce qui correspond à 0,7 mg ou une concentration de 1,8 mM de peptide dans 100 µl de solution), a été préparé suivant la procédure décrite au chapitre III.3. Le spectre RMN-<sup>31</sup>P obtenu à 38°C, après 3 cycles de formation des bicelles saturées, est présenté figure VIII.3. On retrouve les deux pics caractéristiques de l'orientation nLB<sub>0</sub> des bicelles DMPC/DCPC, à -5,1 ppm et -11,4 ppm. La largeur de ces raies est beaucoup plus importante que celle observée habituellement (≈ 4 ppm au lieu de ≈ 0,5 ppm) ; ceci prouve que les bicelles saturées ne sont pas toutes bien orientés dans le champ magnétique et qu'il y a une distribution des orientations des objets bicellaires autour de celle nLB<sub>0</sub> (Arnold et al., 2002). De plus, ces bicelles coexistent avec une phase isotrope (pic à ≈ 0 ppm, très large lui aussi). Ainsi, la présence du peptide Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> perturbe la formation des bicelles DMPC/DCPC pour un rapport peptide/lipides=1/110. On pourrait diminuer ce rapport (par exemple 1/600) afin d'améliorer l'orientation des bicelles dans le champ magnétique ; toutefois, l'objectif est d'insérer suffisamment de peptide marqué <sup>15</sup>N dans les bicelles pour pouvoir détecter ensuite son signal par RMN-<sup>15</sup>N. On considère ici que malgré l'existence d'une phase isotrope, des bicelles saturées sont présentes dans le milieu ; celles-ci vont orienter le peptide qu'elles contiennent dans le champ magnétique tel que l'axe principal de son hélice (h) soit perpendiculaire à B<sub>0</sub>, ce qui devrait se traduire sur le spectre RMN-<sup>15</sup>N par un pic fin à un déplacement chimique spécifique de β=90°.

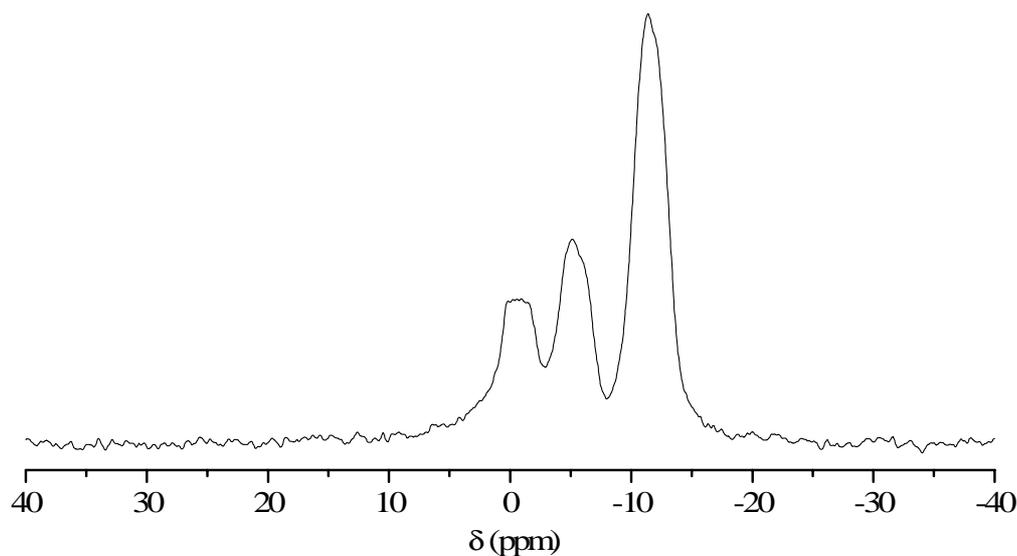


Figure VIII.3 : Spectre RMN- $^{31}\text{P}$  des bicelles DMPC/DCPC ( $X=78\%$ ,  $h=90\%$  dans  $D_2O$  avec 100 mM de KCl et 20 mM de tampon BisTris) contenant le peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$  (rapport peptide/lipides = 1/110, équivalent à 0,7 mg de peptide en solution dans un rotor de 100  $\mu\text{l}$ ) pour une température de 38°C (pH=6,5). Le spectre est le résultat de 350 scans.

### VIII.2.2 Analyse par RMN- $^{15}\text{N}$ en statique du peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$ inséré dans les bicelles saturées

#### a) Conditions d'acquisition utilisées

L'échantillon précédent de bicelles DMPC/DCPC contenant Neu\* $^{15}\text{N}_4$ , a été analysé par RMN- $^{15}\text{N}$  à 38°C en statique sur un spectromètre RMN de 11,74 Tesla, équipé d'une sonde dite Bas-Gamma (car elle permet de détecter des noyaux dont la fréquence de résonance est basse comme celle de l'azote 15,  $\omega_0^{15\text{N}} = 50,68$  MHz).

Plusieurs séquences d'acquisition, spécifiques aux échantillons solides, ont été testées : celle d'écho de Hahn (spécifique aux noyaux de spin  $\frac{1}{2}$ , (Rance, 1983 #124)), celle de Cross Polarisation CP, (Hartmann et Hahn, 1962) et une séquence combinant ces deux dernières (CP-Hahn, refocalisation de 180° de tous les spins avant l'acquisition). Comme nous l'avons vu au chapitre II.1, le principe de la séquence CP repose sur un transfert de polarisation des noyaux  $^1\text{H}$ , dont la susceptibilité magnétique  $\chi_H$  est importante, vers les noyaux  $^{15}\text{N}$ , dont  $\chi_N$  est plus faible ; ces deux noyaux interagissant via un couplage dipolaire. Avant de lancer l'acquisition, il est nécessaire de régler, sur un échantillon référence (dans

notre cas, la Glycine marquée  $^{15}\text{N}$  en poudre ou en solution dans  $\text{H}_2\text{O}$ ), certains paramètres de la séquence CP pour que ces derniers vérifient les conditions d'Hartmann-Hahn ; en particulier, il est important d'optimiser le temps de contact pendant lequel se fait le transfert de polarisation. Dans notre cas, nous avons considéré un temps de contact de 2 ms.

Un découplage des protons est également effectué pendant l'acquisition. En RMN des solides, les puissances associées à ce découplage sont généralement très importantes ; avant de faire l'acquisition, il faut donc vérifier que ces puissances appliquées pendant une certaine durée respectent les spécificités de la sonde RMN, sans quoi celle-ci pourrait être endommagée. Dans le cas de la sonde Bas-gamma, un temps d'acquisition de 50 ms avec une puissance de découplage de 125 Watts, ne doit pas être dépassé.

Le délai de relaxation, noté  $D_1$ , est également un des paramètres importants à régler. Ce délai dépend de la dynamique du noyau considéré, qui est liée à la nature chimique de ce dernier et à son environnement. Ainsi, le  $D_1$  associée à l'azote 15 de la Glycine de référence dans l'eau est différent de celui des azotes 15 du peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$  solubilisé dans un solvant organique comme le TFE, qui est lui-même différent de celui des azotes 15 du peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$  inséré dans les bicelles saturées. Or ce délai influe directement sur le rapport signal sur bruit enregistré. Dans le cas de la Glycine  $^{15}\text{N}$  dans l'eau et pour une séquence de type simple pulse, un  $D_1$  de 20 s améliore le rapport signal sur bruit RMN- $^{15}\text{N}$  de  $\approx 40\%$  par rapport à un  $D_1$  de 5 s ; toutefois plus le  $D_1$  augmente, plus le temps d'acquisition est grand, il faut donc trouver le bon compromis. Pour la séquence de type CP, le délai  $D_1$  dépend de la relaxation des protons et non de l'azote 15. Pour étudier Neu\* $^{15}\text{N}_4$  dans les bicelles saturées, nous avons considéré un  $D_1=5$  s mais ce délai n'est qu'estimé, car faute de sensibilité, une variation de la valeur de  $D_1$  ne peut pas être effectuée dans des temps d'acquisitions raisonnables avec ce type d'échantillon.

### *b) Résultats et discussion*

Pour les trois séquences d'acquisition testées, aucun signal RMN- $^{15}\text{N}$ , associé au peptide Neu\* $^{15}\text{N}_4$  inséré dans les bicelles DMPC/DCPC, n'est détecté même avec des temps d'acquisition très longs ( $\approx 33000$  scans, soit plus de 50 heures).

Le délai de relaxation  $D_1$  choisi n'est peut-être pas adapté à la dynamique du peptide dans les bicelles saturées. Toutefois, même avec des conditions d'acquisition non optimales, un signal faible aurait du être détecté, ce qui n'est pas le cas. Un problème de sensibilité serait plutôt à l'origine de cette absence de signal. Avec un spectromètre RMN de 500 MHz, équipé d'une sonde Bas-gamma, il semble difficile de pouvoir détecter dans de bonnes conditions 0,7

mg de Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> (soit  $4,3 \cdot 10^{17}$  atomes d'azote <sup>15</sup>N) inséré dans 100 µl de solution bicellaire DMPC/DCPC.

Il faudrait augmenter la sensibilité du champ magnétique (spectromètre de 800 MHz par exemple) ou accroître la quantité de Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> inséré dans les bicelles. Toutefois, nous avons vu au paragraphe précédent, que la formation de celles-ci était déjà perturbée pour un rapport peptide/lipides de 1/110 ; il semble donc difficile de considérer une proportion peptidique plus grande tout en conservant la structure des bicelles.

Nous avons essayé de diminuer l'hydratation des modèles membranaires (jusqu'à h=60%) en conservant un rapport peptide/lipides de 1/110, afin d'augmenter la quantité totale de peptide dans le milieu, mais les objets bicellaires obtenus étaient plus déstructurés qu'avec h=90%, voire inexistantes ; nous n'avons donc pas privilégiée cette voie.

Nous disposons au laboratoire d'une autre sonde solide, moins sensible que la Bas-gamma, dont on peut adapter le diamètre de la bobine de détection. On pourrait essayer d'augmenter le volume d'échantillon analysé et donc la quantité de Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> détectable, en utilisant des rotors de 7 mm ou 10 mm. Cette expérience nécessiterait toutefois une quantité importante de lipides et de peptide marqué <sup>15</sup>N. On pourrait également marquer davantage d'acides aminés <sup>15</sup>N de Neu\* par synthèse peptidique (le coût n'étant pas négligeable) ou marqué complètement le peptide <sup>15</sup>N par voie biologique. Triba et al. (Triba et al., 2006) ont en effet réussi à obtenir un signal RMN-<sup>15</sup>N associé à la protéine transmembranaire tOmpA (adoptant une structure en feuillet β), de 180 acides aminée et uniformément marqué <sup>15</sup>N, dans des bicelles orientées négativement et positivement (avec l'ajout d'ions thuliums Tm<sup>3+</sup>), pour une hydratation de 60% (190 mg de lipides et 1,2 mg de peptide <sup>15</sup>N dans un volume total d'échantillon de 320 µl).

Le modèle membranaire de type bicelle présente donc des limitations pour l'étude orientationnelle par RMN-<sup>15</sup>N de peptides transmembranaires marqués <sup>15</sup>N de manière sélective. Il faut en effet trouver le bon compromis entre insérer suffisamment de peptide marqué <sup>15</sup>N pour pouvoir détecter un signal RMN-<sup>15</sup>N, sans toutefois déstructurer les objets bicellaires. Il faut préciser qu'avec les bicelles, les conditions d'hydratation sont très élevées (ici h≈90%, proches des conditions physiologiques), ce qui n'est pas le cas des bicouches lipidiques orientées entre lames et lamelles (Bechinger, 2001) ; ces modèles membranaires sont en effet très peu hydratés, ce qui permet d'y insérer des quantités importantes de peptides marqués <sup>15</sup>N (de 10 mg à 20 mg), plus facilement détectés par RMN-<sup>15</sup>N.

Devant ces multiples difficultés, nous n'avons pas poursuivi l'étude orientationnelle du peptide transmembranaire hélicoïdal Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub> au sein des bicelles saturées et biphényles. Nous avons préféré tester un autre peptide étudié au laboratoire, la Méthionine Enképhaline, dont trois acides aminés sur cinq ont été marqués <sup>15</sup>N (voir la synthèse peptidique chapitre III.2).

### VIII.3 Etude du pentapeptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>

#### VIII.3.1 Propriétés spécifiques au peptide Menk

Avant d'analyser par RMN-<sup>15</sup>N l'orientation du pentapeptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> associé aux deux modèles membranaires de type bicelle, nous avons voulu confirmer certaines propriétés de ce peptide, connu pour se localiser à l'interface entre les parties polaires et apolaires de la bicouche lipidique et pouvant adopter deux formes, l'une liée à la membrane, l'autre libre en solution (Marcotte et al., 2003) ; (Marcotte et al., 2004). Nous essayerons de qualifier la nature de l'échange entre ces deux formes peptidiques et d'estimer leur coefficient de partage.

##### *a) Nature de l'échange entre la Menk liée à la membrane et celle libre en solution*

Afin de déterminer la nature de cet échange, un échantillon du pentapeptide (non marqué) en contact avec des liposomes de DMPC de type LUV (diamètre 400 nm, 90% d'hydratation dans 100 µl d'H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90 :10)) a été préparé en respectant une proportion peptide/lipides de 1/25. Les spectres RMN-<sup>1</sup>H obtenus à température ambiante en statique et en faisant tourner l'échantillon à l'angle magique à 7,5 kHz, sont présentés respectivement figure VIII.4.a) (spectre noir) et b) (spectre vert). Dans ces deux cas, les signaux de la Menk se confondent avec ceux des lipides DMPC ; seule la zone entre 6,6 ppm et 7,6 ppm (dont un agrandissement est effectué) correspond uniquement aux protons (NH) du pentapeptide. Une comparaison avec le spectre proton de la Menk en solution dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90 :10) est effectuée (spectre c) bleu). Les séquences d'acquisition utilisées sont de type présaturation (appelées séquences « zgpr »), qui permettent de supprimer sélectivement le signal de l'eau à ≈ 4,6 ppm.

En condition statique, les pics spécifiques de la Menk observés sur le spectre proton sont très larges et mal définis ; avec la rotation de l'échantillon à l'angle magique à 7,5 kHz, ces mêmes pics s'affinent.

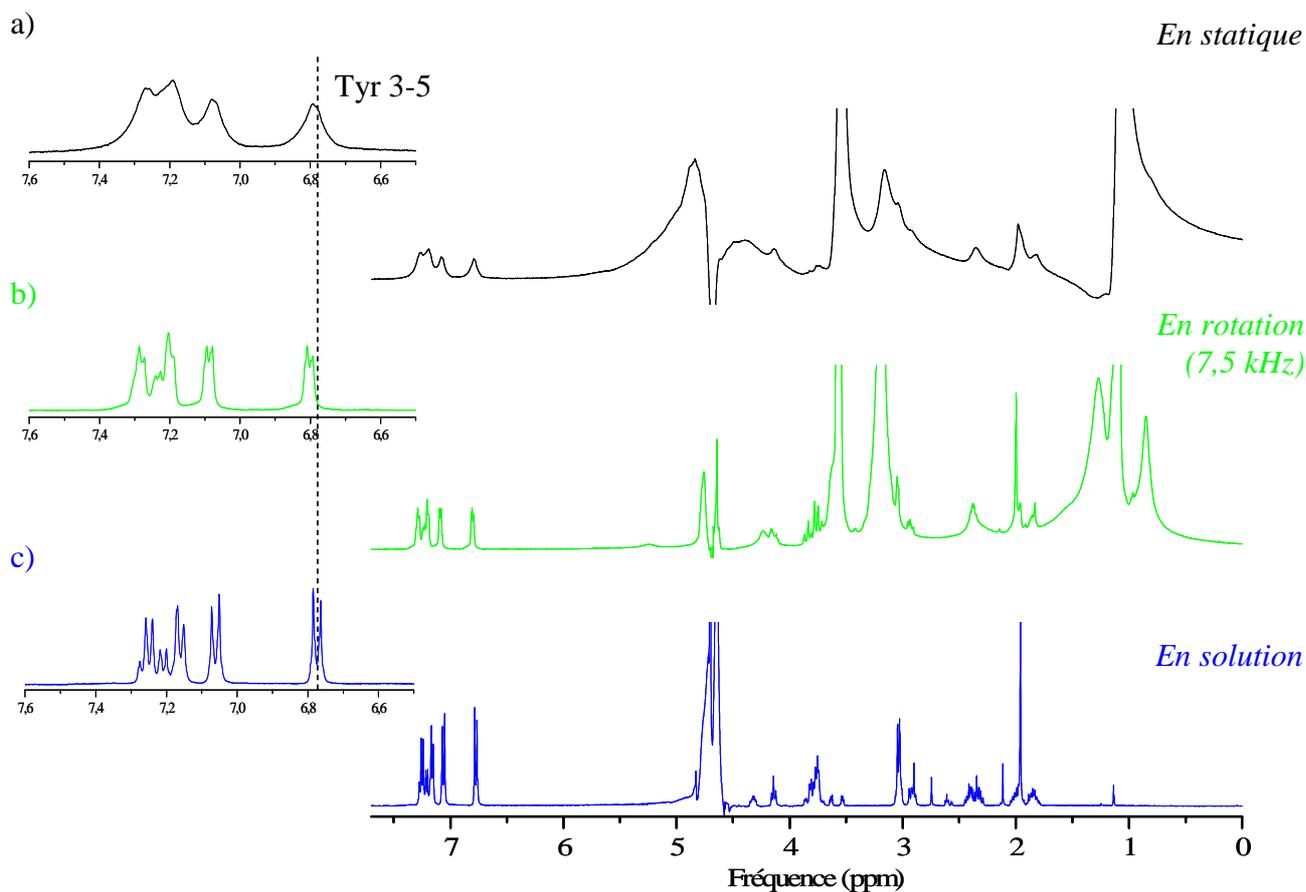


Figure VIII.4 : a) et b) Spectres RMN- $^1\text{H}$  (séquence « zgpr ») du peptide Menk en solution dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (90 :10) avec des liposomes de type LUV de DMPC (diamètre 400 nm,  $h=90\%$ ), pour un rapport peptide/lipides de 1/25, en statique (spectre noir) et en rotation à l'angle magique à 7,5 kHz (spectre vert). Les spectres sont le résultat de 512 scans. c) Spectre RMN- $^1\text{H}$  (séquence « zgpr ») du peptide Menk en solution dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (90 :10) (spectre bleu). Pour chaque cas, un agrandissement des signaux est effectué entre 6,5 ppm et 7,6 ppm.

Les déplacements chimiques des signaux de la Menk en contact avec une membrane de DMPC sont également légèrement différents de ceux observés pour la Menk en solution (6,8 ppm dans le premier cas et 6,77 ppm dans le deuxième pour les signaux des protons 3 et 5 de la Tyrosine, voir attribution chapitre III).

Si l'échange entre la forme de la Menk liée à la bicouche lipidique et celle libre en solution était lent, une superposition de deux types de signaux devrait être observée sur le spectre en statique : ceux correspondant à la forme liée du peptide à la membrane, dont la largeur des raies est importante (liée à l'anisotropie de l'échantillon), et ceux associés à la Menk libre en solution, dont la largeur est très fine (conditions isotropes) et dont les déplacements chimiques devraient être identiques à ceux observés sur le spectre du peptide seul en solution aqueuse. De même, les déplacements chimiques des pics obtenus avec la technique de rotation de l'échantillon à l'angle magique, qui moyenne les interactions anisotropes, devraient être équivalents à ceux de la Menk en solution.

Dans notre cas, aucune superposition de deux types de signaux n'est observée sur le spectre en statique et les déplacements chimiques des pics en rotation à l'angle magique sont différents de ceux du peptide seul en solution. L'échange entre les deux formes du peptide est alors qualifié de rapide. Les signaux observés résultent d'une moyenne entre ceux associés à la forme du peptide liée à la membrane et ceux relatifs à la forme du peptide libre en solution. Il faut noter que pour la plupart des peptides en interaction avec des liposomes, les signaux résultant de l'échange rapide entre les deux formes peptidiques (liée à une membrane et libre en solution), ne sont pas visibles sur le spectre proton ; la contribution anisotrope est en effet beaucoup trop importante. Le fait que ces signaux soient observés pour la Menk suggère que la dynamique de la forme peptidique liée à la membrane est très importante.

L'échange rapide entre les deux formes de la Menk peut-être décrit par la relation suivante :

$$\omega_{observée} = p_{liée}\omega_{liée} + p_{libre}\omega_{libre} = p_{liée}\omega_{liée} + (1 - p_{liée})\omega_{libre} \quad (\text{VIII.1})$$

où  $\omega_{liée}$  et  $\omega_{libre}$  correspondent respectivement aux fréquences de résonance des formes liée et libre de la Menk et  $p_{liée}$  et  $p_{libre}$  à leurs probabilités d'existence, que nous allons maintenant essayer d'estimer par RMN-<sup>1</sup>H.

#### b) Coefficient de partage de la Menk

Afin de déterminer la proportion de Menk liée à la membrane par rapport à celle libre en solution, 600 µl d'une suspension de LUV de DMPC (diamètre 800 nm) sont préparés par extrusion avec une hydratation de 96% dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O contenant 0,75% en poids de TSP-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>

(référence pour les spectres RMN-<sup>1</sup>H comme le TMS). Une solution de Menk à 28 mM est ensuite ajoutée aux vésicules de telle sorte que la proportion peptide/lipides soit de 1/25. Après un temps d'incubation de deux heures, la solution de LUV en contact avec la Menk est centrifugée à 5000 rpm jusqu'à ce qu'un culot, contenant la Menk associée aux vésicules de DMPC, se forme ; le surnageant (solution transparente) est alors récupéré puis filtré sur un système Centricon (dont le « cut off » est de 3000 g.mol<sup>-1</sup>) pendant ≈ 6 heures à 3000 rpm, afin d'éliminer tout résidu éventuel de membranes. Le filtrat est alors analysé par RMN-<sup>1</sup>H avec une séquence de présaturation du signal de l'eau (voir spectre figure VIII.5). On retrouve la majorité des pics caractéristiques de la Menk, en particulier ceux associés aux cycles de la Phénylalanine et de la Tyrosine entre 6,7 ppm et 7,4 ppm. L'intensité des signaux peptidiques est très faible comparé aux autres pics, qui seraient associés à des restes de molécules lipidiques. Le rapport d'intégration entre le singulet à 0 ppm, correspondant à la référence TSP-<sup>2</sup>H<sub>4</sub> (9 protons), et le doublet à 6,7 ppm, relatif aux deux protons en position 3 et 5 sur la tyrosine de la Menk, est égal à ≈ 6,5. Connaissant la quantité de moles de TSP-<sup>2</sup>H<sub>4</sub> dans le milieu (référence), on détermine celle de la Menk présente en solution. D'après le nombre de moles de peptide rajouté initialement à la suspension de vésicules de DMPC, on calcule un coefficient de partage (Menk liée à la membrane)/(Menk libre en solution) ≈ 1. Ainsi, pour une proportion peptide/lipides=1/25, la probabilité d'avoir la Menk associée à la membrane des LUV de DMPC et celle d'avoir la Menk libre en solution est équivalente ; un équilibre entre ces deux formes, qui s'échangent rapidement (d'après le paragraphe précédent), est donc atteint. Ce résultat est proche de celui trouvé par Marcotte et al. (Marcotte et al., 2004), où environ 60% de la Menk s'associe avec la bicouche de bicelles DMPC/DCPC (avec h≈90% et q=0,5) ou de bicelles DMPC/DCPC chargées négativement (contenant 10% de DMPG par rapport aux lipides à chaînes longues), pour un même rapport peptide/lipides (1/25).

Sachant que les deux formes, liée et libre, de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> sont équiprobables et qu'elles s'échangent rapidement, il serait maintenant intéressant de quantifier plus précisément la cinétique de cet échange ; pour cela, des expériences RMN de diffusion pourraient être effectuées à une température d'analyse pour laquelle les deux formes peptidiques sont observées séparément (généralement des basses températures).

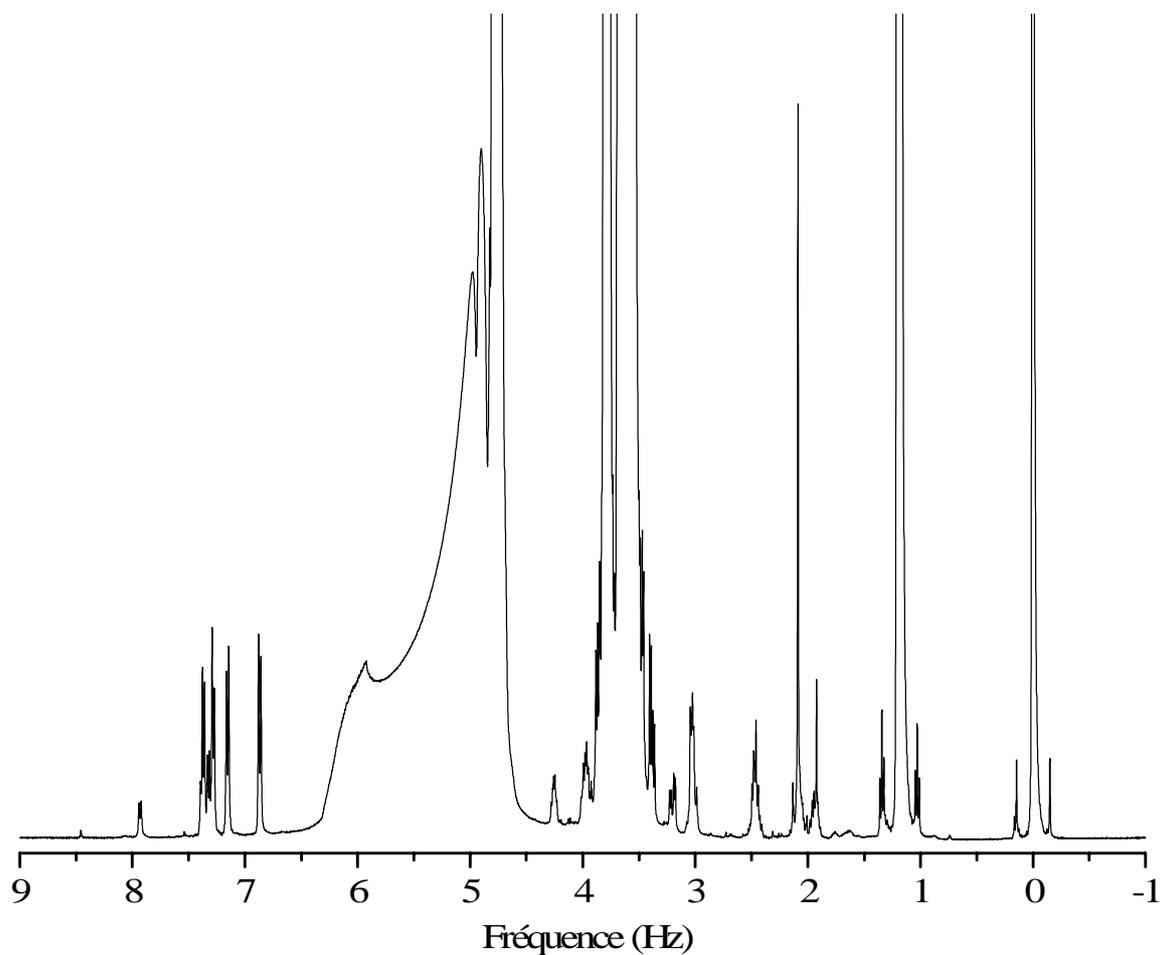


Figure VIII.5 : Spectre RMN-<sup>1</sup>H de la solution de Menk en contact avec des LUV de DMPC (diamètre de 800 nm, h=96%) pour un rapport peptide/lipides de 1/25, après centrifugation et filtration sur un système centri-con. Le spectre est référencé par rapport au TSP-<sup>2</sup>H<sub>4</sub> à 0 ppm et résulte de 1500 scans.

VIII.3.2 Etude de l'orientation de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> dans les bicelles saturées et biphényles*a) Spectre HSQC de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> en solution aqueuse*

Afin d'attribuer les pics en RMN du proton et de l'azote 15 correspondant aux trois acides aminés marqués <sup>15</sup>N de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, une expérience RMN à deux dimensions de type HSQC <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N a été effectuée avec une solution du pentapeptide à 70 mM dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90 :10) (voir figure VIII.6). Les spectres 1D du proton (non découplé) et de l'azote 15 (avec découplage des protons) sont représentés respectivement en haut et sur la gauche du spectre 2D. Les tâches de corrélation observées permettent d'associer une raie <sup>15</sup>N à deux signaux protons (voir traits en pointillés sur le spectre 2D). Parmi ceux-ci, les doublets de triplets correspondent à des Glycines <sup>15</sup>N car les protons des groupes HN sont couplés avec les deux protons des CH<sub>2</sub> voisins (couplage J<sup>3</sup>) ; la Glycine en position 2 (Gly<sub>2</sub>) est plus déblindée que celle en position 3 (Gly<sub>3</sub>) car elle est voisine de la Tyrosine, dont le caractère électro-négatif est un peu plus important (un groupement OH en plus) que celui de la Phénylalanine, voisine de la Glycine 3 (voir structure développée de la Menk au-dessus du spectre 2D). Le doublet de doublet est quant à lui relatif au proton HN de la Phénylalanine (Phe) qui n'est couplé qu'avec un seul proton voisin de trois liaisons chimiques. Le doublet du proton HN (couplage J<sup>3</sup> avec un seul proton) de la Méthionine (Met) n'a pas de signal RMN-<sup>15</sup>N associé, car il n'est pas marqué <sup>15</sup>N. Les trois protons liés à l'azote zwitterionique de la Tyrosine ne donnent pas de signal <sup>1</sup>H car ils sont trop labiles.

*b) Analyses par RMN-<sup>31</sup>P des bicelles saturées et biphényles contenant le peptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>*

Deux échantillons de bicelles contenant le pentapeptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> avec un rapport peptide/lipides de 1/25 ont été préparés : l'un constitué de bicelles DMPC/DCPC (avec X=78% (ou q=3,5) et h=80% dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90 :10) avec 100 mM de KCl) et l'autre de bicelles TBBPC/DCPC (X=88% (ou q=7,4) et h=80% dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90 :10) avec 100 mM de NaCl). Dans ces conditions, 0,94 mg (soit 16,3 mM ou encore 2,9 .10<sup>18</sup> atomes d'azote 15 dans 100 µl de solution) et 0,89 mg (soit 15,4 mM ou encore 2,8 10<sup>18</sup> atomes d'azote 15 dans 100 µl de solution) de Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> sont présents respectivement dans le milieu des bicelles saturées et dans celui des bicelles biphényles. Le mode de préparation de ces échantillons est développé au chapitre III.3.

Les spectres RMN-<sup>31</sup>P des bicelles saturées et biphényles contenant la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, obtenus pour une température commune de 38°C, sont présentés en figure VIII.7.

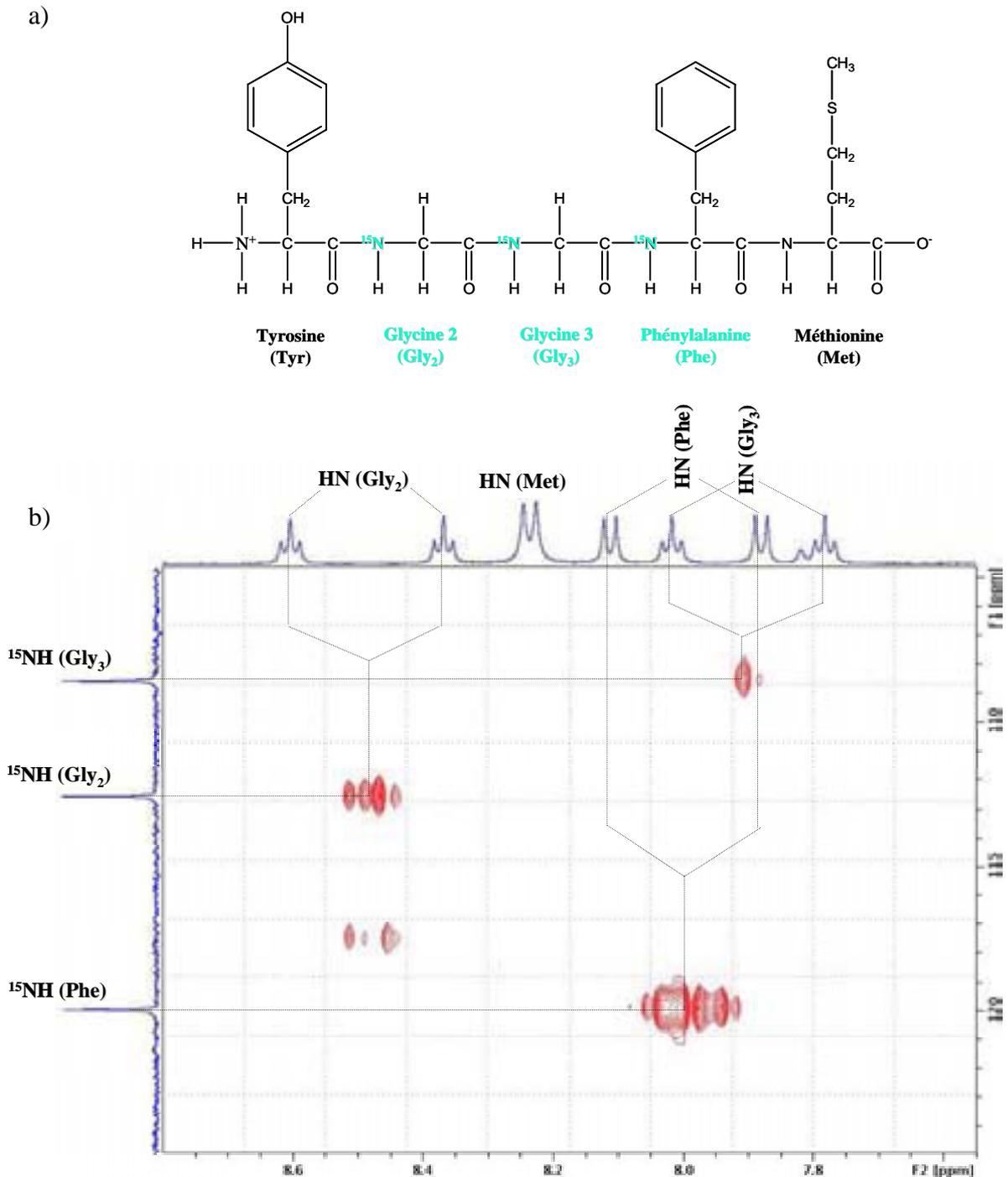


Figure VIII.6 : a) Structure développée de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, les acides aminés marqués <sup>15</sup>N sont de couleur verte. b) Spectre RMN à deux dimensions de type HSQC <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N du peptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> à 70 mM dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (90 :10). Les spectres RMN à une dimension <sup>1</sup>H (non découplé) et <sup>15</sup>N (avec découplage des protons) sont représentés respectivement en haut et sur la gauche du spectre 2D. Les corrélations <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N sont désignées par des traits en pointillés et les attributions sont indiquées au-dessus des pics. Les conditions d'acquisition utilisées sont les suivantes : TD<sub>1</sub>=256 et TD<sub>2</sub>=2048 (nombre de points dans les dimensions 1 et 2), 84 scans, D<sub>1</sub>=2s.

Pour les bicelles DMPC/DCPC (spectre du haut), on retrouve les deux pics (à -3 ppm et -9 ppm) caractéristique de l'orientation  $n \perp B_0$ , et pour les bicelles TBBPC/DCPC (spectre du bas), les deux pics à 6,8 ppm et 19,8 ppm sont spécifiques de l'orientation  $n // B_0$ . Dans les deux cas, la largeur des raies observées est très fine, ce qui prouve que les objets bicellaires sont bien orientés dans le champ magnétique. Ainsi, la présence du pentapeptide ne perturbe pas la formation des deux types de bicelles et ceci pour un rapport peptide/lipides non négligeable (1/25, donc bien plus grand que celui utilisé pour Neu\* $^{15}\text{N}_4$  qui était de 1/110). La petite taille de Menk $^{15}\text{N}_3$  (5 acides aminés au lieu de 35 pour Neu\* $^{15}\text{N}_4$ ) mais aussi sa nature chimique explique que les bicelles soient moins sensibles à la présence de ce pentapeptide. En effet, le caractère majoritairement hydrophile de Menk $^{15}\text{N}_3$  fait qu'il se positionne au niveau des têtes lipidiques des bicelles alors que Neu\* $^{15}\text{N}_4$ , très hydrophobe, traverse la bicouche des bicelles, ce qui les déstructure davantage.

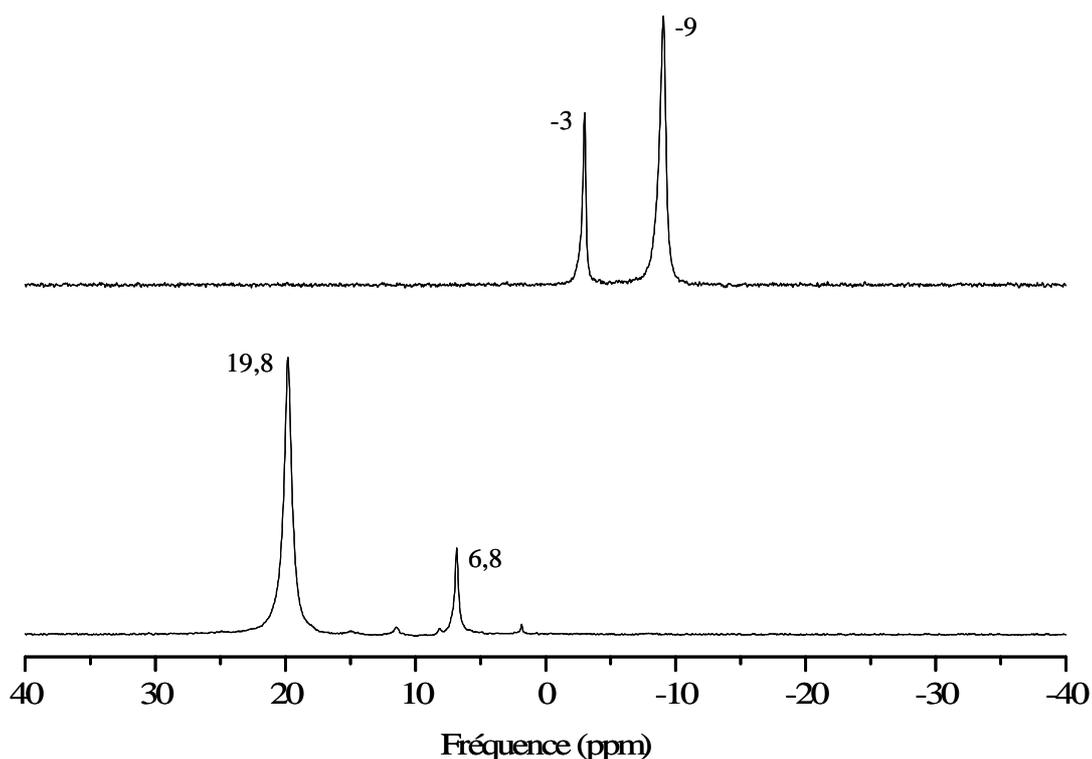


Figure VIII.7 : Spectres RMN des Solides  $^{31}\text{P}$ , avec découplage large bande des protons, des Bicelles DMPC/DCPC (spectre du haut,  $h=80\%$ ,  $X=78\%$ ) et des Bicelles TBBPC/DCPC (spectre du bas,  $h=80\%$ ,  $X=88\%$ ), contenant chacune le peptide Menk $^{15}\text{N}_3$  (avec un rapport peptide/lipides=1/25, équivalent à 0,94 mg dans les bicelles saturées et 0,89 mg dans les bicelles biphényles) pour une température de 38°C. Chaque spectre est le résultat de 350 scans.

c) Analyse par RMN- $^{15}\text{N}$  en statique du peptide Menk\* $^{15}\text{N}_3$  inséré dans les bicelles saturées et biphényles.

#### Séquences d'acquisition utilisées :

Les échantillons précédents des bicelles saturées et biphényles contenant le pentapeptide Menk $^{15}\text{N}_3$  ont été analysés successivement par RMN- $^{15}\text{N}$  en statique. Plusieurs séquences d'acquisition solides (comme l'écho de Hahn ou la Cross Polarisation), et liquides (INEPT, (Morris et Freeman, 1979)) ont été testées. La seule ayant donné un signal RMN- $^{15}\text{N}$  satisfaisant est la plus simple possible (appelée ici séquence « zg ») ; elle est en effet constituée d'un simple pulse de  $90^\circ$  sur le canal  $^{15}\text{N}$ . Ce type de séquence est très régulièrement employé pour l'analyse d'échantillons liquides, dont la dynamique est importante. Il faut préciser, que du à des problèmes techniques, un découplage des protons n'a pu être effectué pour ces expériences, ce qui explique un dédoublement des raies du aux couplages scalaires et dipolaires entre  $^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}$ .

#### Résultats :

Les spectres obtenus après 66500 scans (soit  $\approx 112$  heures, ce qui est un temps d'acquisition très long), pour une température commune de  $38^\circ\text{C}$ , sont présentés en figure VIII.8. Le spectre vert foncé correspond à la Menk $^{15}\text{N}_3$  associée aux bicelles DMPC/DCPC et celui de couleur rouge est relatif au pentapeptide associé aux bicelles TBBPC/DCPC. Il faut rappeler que ces signaux RMN- $^{15}\text{N}$  résulte de l'échange rapide entre la forme du peptide liée à la membrane et celle libre en solution. Dans les deux cas, une superposition avec le spectre de la Menk $^{15}\text{N}_3$  en solution à 70 mM dans 100  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (90 :10) est effectuée (spectre noir en pointillés). Ces spectres sont tous référencés par rapport à un échantillon de Glycine marquée  $^{15}\text{N}$ , dont le singulet est calibré à 38 ppm.

Des différences, tant au niveau des déplacements chimiques des pics, qu'au niveau de la valeur des constantes de couplage, sont visibles entre les trois systèmes étudiés. Le tableau VIII.1 récapitule la valeur des déplacements chimiques, correspondant aux trois acides aminés marqués  $^{15}\text{N}$  (Phe, Gly $_2$  et Gly $_3$ ), pour chaque configuration de la Menk $^{15}\text{N}_3$ , à savoir, en solution dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  ( $\delta_{\text{eau}}$ , traits noirs sur le spectre), associée aux bicelles saturées ( $\delta_{\perp}$ , traits verts foncés) et en interaction avec celles biphényles ( $\delta_{//}$ , traits rouges). Les écarts entre les déplacements chimiques de la Menk $^{15}\text{N}_3$  associée aux deux types de bicelles et ceux relatifs au peptide seul en solution sont également présentés ( $\Delta_{\perp}$  et  $\Delta_{//}$ ). On constate que ces écarts sont faibles (de 0,04 ppm au minimum à 1,12 ppm au maximum).

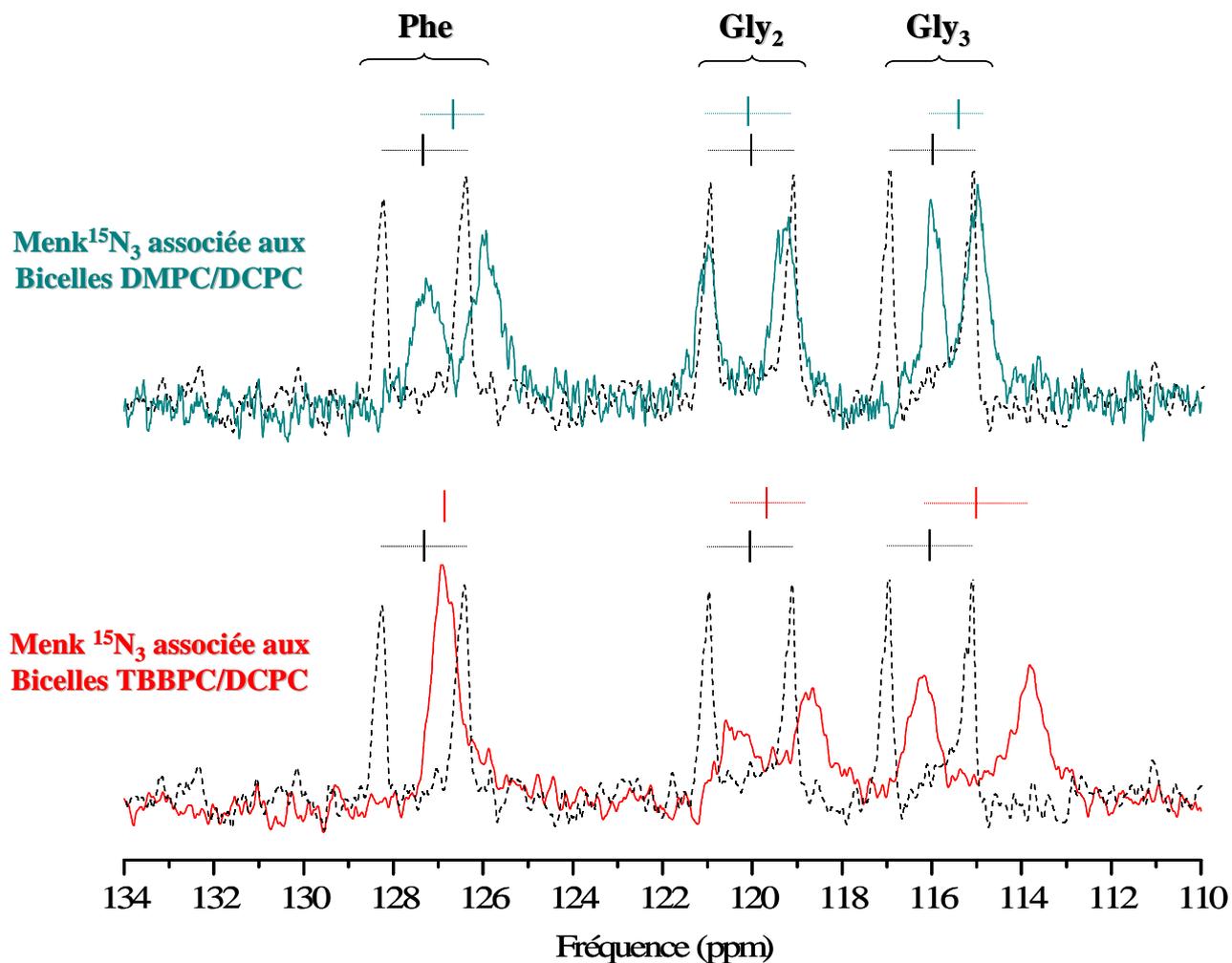


Figure VIII.8 : Spectres RMN- $^{15}\text{N}$  (séquence «zg») du peptide  $\text{Menk}^{15}\text{N}_3$  inséré dans les bicelles DMPC/DCPC ( $h=80\%$ ,  $X=78\%$ , spectre d'en haut vert foncé) et dans les bicelles TBBPC/DCPC ( $h=80\%$ ,  $X=88\%$ , spectre d'en bas rouge) pour un ratio peptide/lipides=1/25 et une température de  $38^\circ\text{C}$ . Chaque spectre est le résultat de 66500 scans. Une superposition avec le spectre RMN- $^{15}\text{N}$  (séquence «zg», spectre noir en pointillés, 4500 scans) du peptide  $\text{Menk}^{15}\text{N}_3$  en solution à 70 mM dans 100  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (90 :10) est présentée dans les deux cas. Les traits fins noir correspondent aux déplacements chimiques  $\delta$  de la  $\text{Menk}^{15}\text{N}_3$  en solution dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ , ceux de couleur vert foncé assignent les  $\delta$  de la  $\text{Menk}^{15}\text{N}_3$  associée aux bicelles saturées et ceux de couleur rouge indiquent les  $\delta$  de la  $\text{Menk}^{15}\text{N}_3$  en interaction avec les bicelles biphényles.

|                                       | Phe    | Gly <sub>2</sub> | Gly <sub>3</sub> |
|---------------------------------------|--------|------------------|------------------|
| eau                                   | 127,4  | 120,11           | 116,11           |
| ⊥                                     | 126,63 | 120,15           | 115,47           |
| //                                    | 126,90 | 119,53           | 114,99           |
| $\Delta_{\perp} = \perp - \text{eau}$ | -0,77  | 0,04             | -0,64            |
| $\Delta_{//} = // - \text{eau}$       | -0,5   | -0,58            | -1,12            |

Tableau VIII.1 : Valeurs des déplacements chimiques  $\delta$  (en ppm) des raies de résonance de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> en solution dans H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (eau), associées aux bicelles DMPC/DCPC (⊥), et en interaction avec celles TBBPC/DCPC (//). Les écarts  $\Delta_{\perp}$  et  $\Delta_{//}$ , entre les déplacements chimiques de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> associée à chaque type de bicelles et ceux du peptide seul dans l'eau sont également présentés. Ces déplacements chimiques sont tous référencés par rapport à un échantillon de Glycine marquée <sup>15</sup>N, dont le pic est calibré à 38 ppm.

D'après ces expériences RMN-<sup>15</sup>N, deux résultats importants sont à noter :

- la dynamique des deux types de bicelles étant similaires (voir chapitre VI), l'orientation spécifique de chacune devrait entraîner un facteur deux entre les déplacements chimiques  $\Delta_{\perp}$  et  $\Delta_{//}$  du peptide. Or, d'après les valeurs du tableau VIII.1 (écarts entre  $\Delta_{\perp}$  et  $\Delta_{//}$  de 0,27 ppm, 0,62 ppm et 0,48 ppm pour Phe, Gly<sub>2</sub> et Gly<sub>3</sub> respectivement), ce n'est manifestement pas le cas.

- les fréquences observées lorsque le peptide est inséré dans les bicelles sont peu différentes de celles obtenues lorsqu'il est seul en solution. Nous avons vu précédemment que lorsque la Menk est associée à une bicouche lipidique, un échange rapide a lieu entre la forme du peptide liée à la membrane et celle libre en solution; on peut alors écrire la relation :  $\omega_{\text{observée}}^{15N} = \omega_{\text{liée}} p_{\text{liée}} + \omega_{\text{libre}} (1 - p_{\text{liée}})$ . La fréquence  $\omega_{\text{observée}}^{15N}$  étant peu différente de  $\omega_{\text{libre}}$ , il est raisonnable de penser que la valeur de la fréquence  $\omega_{\text{liée}}$  est également proche de celle  $\omega_{\text{libre}}$  et ceci pour les deux systèmes bicellaires.

Nous allons essayer dans la suite d'expliquer ces résultats, qui sont plus ou moins liés.

### Interprétation

Tout d'abord, on peut penser que le coefficient de partage de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, entre la membrane et le milieu aqueux ( $\omega_{observée}^{15N} = \omega_{liée} p_{liée} + \omega_{libre} (1 - p_{liée})$ ), est différent entre les bicelles saturées et biphényles. Nous avons vu précédemment que ce coefficient de partage est égal à  $\approx 1$  lorsque la Menk est associée à des vésicules de type LUV de DMPC (voir paragraphe VIII.4.1.b)). Il devrait être similaire pour les bicelles DMPC/DCPC, la bicouche lipidique étant identique. Pour les bicelles TBBPC/DCPC, nous avons montré par RMN-<sup>14</sup>N et RMN-<sup>2</sup>H que, même si le TBBPC et le DMPC ont la même tête polaire, la choline du lipide biphényle pouvait être un peu plus mobile ou orientée différemment par rapport à celle du lipide saturé (voir chapitre VI). Ces deux effets, même faibles, pourraient donc modifier la valeur de la probabilité  $p_{liée}$  associée aux bicelles TBBPC/DCPC par rapport à celle associée aux bicelles DMPC/DCPC, ce qui influencerait directement sur la position des raies de résonance observées.

Afin d'explicitier plus en détails les fréquences RMN-<sup>15</sup>N observées, reprenons les expressions théoriques qui leur sont associées (voir chapitre II).

#### *Expression de la fréquence de résonance <sup>15</sup>N :*

En plus de l'effet Zeeman, les interactions magnétiques mises en jeu ici sont au nombre de trois, pour le noyau azote 15:

- l'Anisotropie de Déplacement Chimique (ADC)
- l'interaction spin-spin indirect (couplage scalaire <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H en J<sup>1</sup>)
- l'interaction dipolaire <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H

L'hamiltonien total associé aux noyaux <sup>15</sup>N de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, placés dans un champ magnétique, s'écrit donc :

$$\hat{H}_{total}^{15N} = \hat{H}_Z + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_{ADC} \quad (\text{VIII.2})$$

Ces interactions peuvent être considérées individuellement ; nous avons choisi d'analyser plus en détails dans la suite l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique.

Pour simplifier le système, on considère que le nuage électronique de l'azote <sup>15</sup>N est colinéaire avec la liaison <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H et que l'axe principal du mouvement de la molécule dans la membrane est parallèle à la normale à la bicouche des bicelles.

Le spectre de poudre RMN- $^{15}\text{N}$  de la Menk $^{15}\text{N}_3$  ( $\Delta\sigma=165$  ppm, spectre non montré) indique que les différentes orientations adoptées par les liaisons  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$  en statique suivent une distribution à symétrie axiale (donc  $\eta=0$ ). La fréquence de résonance  $\omega_{ADC}^{15\text{N}}$  de la Menk $^{15}\text{N}_3$  seule, sous forme de poudre, s'exprime alors dans le référentiel du laboratoire (voir chapitre II.1) :

$$\omega_{ADC}^{15\text{N}}(\beta) \approx \omega_{iso} + \frac{2}{3} \Delta\sigma \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \quad (\text{VIII.3})$$

où  $\beta$  est l'angle entre les liaisons  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$  et le champ magnétique, et  $\Delta\sigma$  est le tenseur d'anisotropie magnétique statique à symétrie axiale.

Lorsque la Menk $^{15}\text{N}_3$  est associée aux bicelles, il faut tenir compte de la dynamique du peptide au sein de la membrane ( $\Delta\sigma$  et l'angle  $\beta$  varient dans l'espace et dans le temps). L'expression de la fréquence de résonance  $\omega_{ADC}^{15\text{N}}$  devient alors :

$$\omega_{ADC}^{15\text{N}}(\beta') \approx \omega_{iso} + \frac{2}{3} \Delta\sigma \frac{3 \cos^2 \beta' - 1}{2} S^{\text{NH}} \quad (\text{VIII.4})$$

où  $\beta'$  est l'angle entre l'axe principal du mouvement du peptide et le champ magnétique et  $S^{\text{NH}}$  est le paramètre d'ordre associé à la liaison  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ , prenant en compte la dynamique de celle-ci dans les bicelles.

Considérons tout d'abord que l'orientation moyenne et la dynamique des liaisons  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$  de la Menk est la même dans les deux types de bicelles. Dans ce cas, le paramètre d'ordre  $S^{\text{NH}}$  est identique pour les deux modèles membranaires ; on peut donc le négliger pour comparer les deux systèmes.

Dans le cas des bicelles DMPC/DCPC, s'orientant dans un champ magnétique telle que  $n \perp B_0$  ( $\beta'=90^\circ$ ), la fréquence de résonance du peptide, notée  $\omega_{\perp}$ , s'écrit alors :

$$\omega_{\perp} - \omega_{iso} = -\frac{\Delta\sigma}{3} \quad (\text{VIII.5})$$

Dans le cas des bicelles TBBPC/DCPC, s'orientant dans un champ magnétique telle que  $n // B_0$  ( $\beta'=0^\circ$ ), la fréquence de résonance du peptide, notée  $\omega_{//}$ , s'exprime :

$$\omega_{//} - \omega_{iso} = \frac{2\Delta\sigma}{3} \quad (\text{VIII.6})$$

On a donc l'équation :

$$\omega_{\parallel} - \omega_{iso} = -2(\omega_{\perp} - \omega_{iso}) \quad (\text{VIII.7})$$

or comme nous l'avons déjà remarqué (figure VIII.8), cette relation n'est pas vérifiée expérimentalement. Le paramètre d'ordre  $S^{NH}$ , qui caractérise la dynamique orientationnelle de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, est donc différent pour les deux types de bicelles.

Afin d'approfondir notre raisonnement, nous allons essayer de décomposer ce paramètre d'ordre  $S^{NH}$  en mouvements élémentaires, comme cela a été fait par Aussenac et al. (Aussenac et al., 2003) ou Léonard et al. (Léonard et Dufourc, 1991) dans le cas du cholestérol inséré dans des membranes lipidiques. Pour cela, le peptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> est considéré comme un corps rigide dans la membrane, ce qui est une approximation très importante dans notre cas.

#### Décomposition de $S^{NH}$

Le terme  $S^{NH}$  peut être décomposé en mouvements élémentaires (voir chapitre II.1) :

$$S^{NH} = \langle S_{coll} \rangle * \langle S_{intra} \rangle * \langle S_{mol} \rangle \quad (\text{VIII.8})$$

où  $S_{coll}$  décrit les mouvements collectifs de déformation de la membrane,  $S_{intra}$  est associé aux mouvements des liaisons <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H (vibrations, changements conformationnels), et  $S_{mol}$  tient compte des mouvements moléculaires, comme la réorientation de l'axe de rotation du peptide autour de la normale à la bicouche dans un cône de précession (« wobbling in a cone »).

Les bicelles étant de petits objets, les fluctuations collectives des membranes peuvent être négligées ( $S_{coll}=1$ ). La Menk étant assimilée à un corps rigide, les liaisons <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H sont toutes fixées les unes par rapport aux autres ;  $S_{intra}$  peut alors être considéré comme un terme géométrique en  $(3\cos^2 \gamma_i - 1)/2$ , où  $\gamma_i$  est l'angle entre les liaisons <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H et l'axe principal du mouvement du peptide (parallèle à la normale à la bicouche lipidique).

Dans ces conditions, le paramètre d'ordre  $S^{NH}$  s'écrit :

$$S^{NH} = \langle S_{mol} \rangle \frac{3 \cos^2 \gamma_i - 1}{2} \quad (\text{VIII.9})$$

A ce stade, trois paramètres peuvent varier pour distinguer le  $S^{NH}$  des deux types de bicelles :

- le terme  $\langle S_{mol} \rangle$
- la valeur des angles  $\gamma_i$
- ou une combinaison entre ces deux paramètres

N'ayant pas de données supplémentaires sur la valeur de  $\langle S_{mol} \rangle$  ou des angles  $\gamma_i$  pour chaque type de bicelles, nous ne pouvons pas conclure sur l'origine de leur différence de dynamique.

Ainsi, il est difficile de déduire des informations sur l'orientation de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> dans les bicelles DMPC/DCPC et TBBPC/DCPC d'après ces expériences RMN-<sup>15</sup>N. Il faudrait connaître d'autres paramètres comme par exemple  $\langle S_{mol} \rangle$  ou la probabilité  $p_{liée}$  pour chaque type de bicelles. Le pentapeptide Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, très dynamique, n'est donc pas un bon exemple pour tirer profit de la différence d'orientation entre les bicelles saturées et biphényles. Il faudrait considérer au contraire un peptide très peu mobile dans la membrane, pour s'affranchir des différences de dynamique de la biomolécule entre les deux modèles membranaires.

#### *d) Comparaison avec des résultats de Modélisation Moléculaire*

L'interaction de la Menk avec une bicouche lipidique de DMPC a été simulée pendant 12 ns au laboratoire par l'équipe de Michel Laguerre (IECB, UMR 5144). Nous avons ainsi repris leurs résultats (uniquement sur les 8 dernières nanosecondes) afin d'avoir une estimation de la valeur des angles entre les trois liaisons <sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H et la normale à la bicouche lorsque la Menk est associée à la membrane.

#### Conditions de Simulation

La dynamique moléculaire a été effectuée grâce au logiciel NAMD version 2.5 en utilisant le champ de forces CHARMM 27b.

La situation initiale correspond à une bicouche lipidique préformée de DMPC et à une molécule du pentapeptide Menk insérée au milieu de la monocouche supérieure, avec la conformation déterminée par RMN en solution. L'ensemble est entouré de molécules d'eau. Dans ces conditions la boîte de départ a pour dimensions : 41.46 x 39.39 x 73.64 Å<sup>3</sup>. Elle contient en plus de la molécule de Menk, 59 lipides de DMPC et 1859 molécules d'eau pour un total de 12614 atomes. L'eau est modélisée sous forme d'un triangle (modèle TIP3P) et ses liaisons sont maintenues rigides. Le calcul est effectué à tension de surface constante dont la

valeur est réglée à 25 mN. La pression est maintenue constante à 1 bar par la méthode du piston de Langevin avec les paramètres suivants : période du piston 200 fs, amortissement du piston 100 fs, température du piston 300K. La simulation a été effectuée à 311K avec un intégrateur à double fréquence : 1 fs pour les forces "bonded" et 4 fs pour l'électrostatique. Un cut-off de 10 Å avec une distance de switch de 8 Å a été utilisé pour les forces de VdW et l'électrostatique a été calculée avec le protocole Particule Mesh Ewald (PME) sur une grille de 45 x 45 x 64 points. Une image a été stockée toutes les picosecondes et un fichier "restart" toutes les 10 ps.

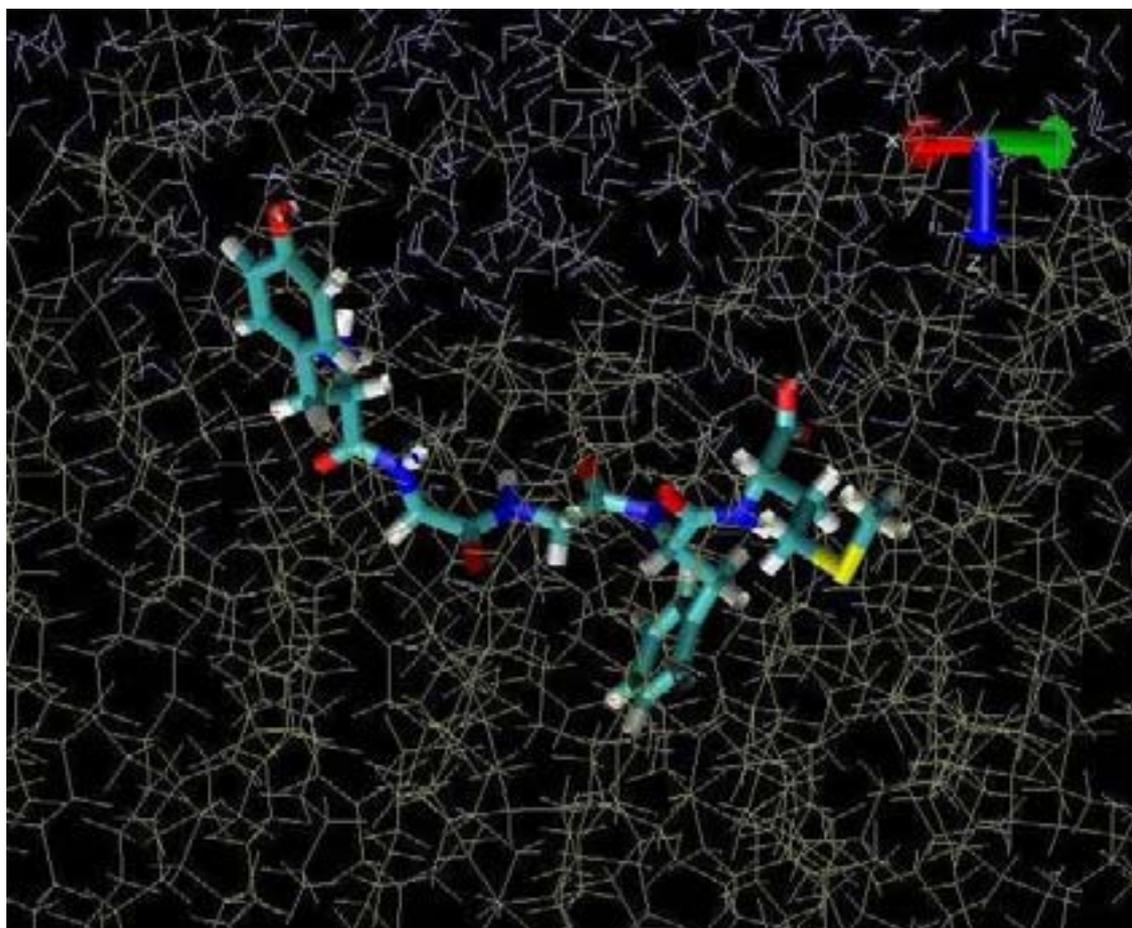
Les calculs sont effectués sur un Cluster IBM 32 processeurs Xeon 2.8 GHz en utilisant 8 processeurs. Dans ces conditions 1 ns de simulation nécessite 30 heures de calcul et la simulation a été effectuée pendant une durée totale de 12 ns.

#### Image 3D de la Menk résultant des 8 ns de simulations

L'image à trois dimensions obtenue après 8 ns est présentée figure VIII.9. On constate que la Menk se positionne bien à l'interface entre les parties polaires et apolaires de la membrane, ce que justifie son caractère à la fois hydrophobe et hydrophile. Le groupement -OH terminal de la Tyrosine ainsi que celui -COO<sup>-</sup> de la Méthionine pointent en effet vers le milieu aqueux extérieur tandis que le cycle de la Phénylalanine et la chaîne carbonée, possédant un atome de soufre, de la Méthionine, s'enfoncent à l'intérieur de la bicouche lipidique. Les deux Glycines (Gly<sub>2</sub>) et (Gly<sub>3</sub>), relativement neutres, se positionnent à l'interface entre les parties polaires et apolaires de la membrane. Ces Glycines sont plutôt orientées perpendiculairement à la normale (n) à la bicouche lipidique, tandis que les chaînes latérales des autres acides aminés sont plutôt parallèles à n. Cette double orientation des résidus par rapport à la membrane entraîne une structuration courbée du pentapeptide, comme le suggéraient les études précédentes (Deber et Behnam, 1984) ; (Graham et al., 1992) ; (Marcotte et al., 2003).

#### Calcul des angles

A partir de cette simulation, la variation des angles entre les liaisons NH(Phe), NH(Gly<sub>2</sub>), NH(Gly<sub>3</sub>), et la normale à la bicouche lipidique (n) a été analysée sur les 8 ns considérés ; la fluctuation des trois angles étant moins importante sur les quatre dernières nanosecondes, nous n'avons considéré que celles-ci.



*Figure VIII.9 : Image 3D de la Menk en interaction avec une monocouche lipidique de DMPC après 8 ns de simulation. Le squelette carboné du peptide est de couleur bleu-vert, les atomes d'oxygène sont en rouge, les azotes en bleu, le soufre en jaune et les hydrogènes en blanc. Les lipides sont de couleur jaune foncé et les molécules d'eau au-dessus d'eux sont de couleur bleu-gris.*

Trois angles  $\theta$  moyens ont ainsi pu être déterminés :

- $\theta$  (Phe) =  $54^\circ \pm 9^\circ$
- $\theta$  (Gly<sub>2</sub>) =  $67^\circ \pm 10^\circ$
- $\theta$  (Gly<sub>3</sub>) =  $46^\circ \pm 14^\circ$

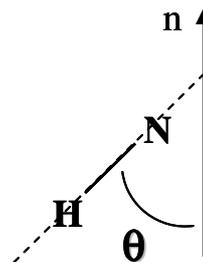


Figure VIII.10 : Représentation de l'angle  $\theta$  entre la liaison N-H de Gly<sub>2</sub>, Gly<sub>3</sub> ou Phe de la Menk et la normale à la bicouche lipidique  $n$ .

Il faut préciser que ces angles issus de la modélisation moléculaire ne décrivent que l'orientation de la Menk en contact avec la membrane. Les signaux obtenus en RMN-<sup>15</sup>N résultent quant à eux de la moyenne entre la forme du peptide lié à la bicouche lipidique et celle libre en solution, deux états qui s'échangent rapidement. Il est donc délicat de comparer les résultats obtenus par ces deux techniques.

Toutefois, en considérant les fréquences  $\omega_{\perp}$  et  $\omega_{//}$  obtenus expérimentalement par RMN-<sup>15</sup>N pour les bicelles saturées et biphényles, et les angles  $\theta$  (assimilables à  $\gamma_i$ ) obtenus par simulation, il est possible de calculer le terme  $S_{mol}$  pour chaque type de bicelles :

- dans le cas des bicelles DMPC/DCPC, l'expression de la fréquence de résonance s'écrit :

$$\omega_{\perp} = \omega_{iso} - \frac{\Delta\sigma}{3} \langle S_{mol} \rangle \frac{3\cos^2 \gamma_i - 1}{2}$$

- et dans le cas des bicelles TBBPC/DCPC, elle s'exprime :

$$\omega_{//} = \omega_{iso} + \frac{2\Delta\sigma}{3} \langle S_{mol} \rangle \frac{3\cos^2 \gamma_i - 1}{2}$$

Dans ces conditions, on calcule un  $S_{mol \text{ moyen}} \approx 0,03 \pm 0,02$  pour les bicelles saturées et un  $S_{mol \text{ moyen}} \approx 0,07 \pm 0,02$  pour les bicelles biphényles (nous n'avons pas tenu compte de  $\theta(\text{Phe})=54^\circ$ , car étant très proche de l'angle magique, il apporte trop d'imprécisions).

Le terme  $S_{mol}$  est donc relativement similaire pour les deux types de bicelles ; il faudrait toutefois confirmer ces valeurs par d'autres techniques. La différence de dynamique du peptide entre les deux bicelles proviendrait alors du terme  $S_{intra}$  ; il faut néanmoins rappeler que l'approximation du corps rigide que nous avons faites précédemment n'est pas réellement justifiée pour la Menk. En effet, les valeurs calculées ici de  $S_{mol}$  sont très faibles, ce qui

confirme une dynamique très importante de la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub> au sein de la membrane et explique que la fréquence  $\omega_{\text{liée}}$  soit peu différente de celle  $\omega_{\text{libre}}$ .

### Conclusion

Les bicelles sont des modèles membranaires permettant d'étudier, notamment par Dichroïsme Circulaire (DC-UV ou VDC) et par RMN, les propriétés structurales et orientationnelles de biomolécules comme les peptides, en contact avec un environnement lipidique. Plus précisément, les bicelles saturées sont adaptées pour déterminer la structure secondaire par DC de peptides, tandis que l'orientation  $n//B_0$  des bicelles biphényles offrent des propriétés intéressantes pour analyser par RMN-<sup>15</sup>N l'orientation de peptides membranaires hélicoïdaux marqués <sup>15</sup>N.

Toutefois, nous avons vu au cours de ce chapitre que l'étude orientationnelle par RMN-<sup>15</sup>N de peptides marqués <sup>15</sup>N associés à des bicelles, est encore difficile à appliquer. Pour les deux exemples de peptides choisis ici, aucun résultat concret n'a pu être déduit des expériences : pour le peptide transmembranaire hélicoïdal Neu\*<sup>15</sup>N<sub>4</sub>, le challenge est d'insérer suffisamment de peptide dans les bicelles pour pouvoir l'observer par RMN-<sup>15</sup>N sans destructurer les objets bicellaires ; pour la Menk<sup>15</sup>N<sub>3</sub>, la présence ne perturbe pas la formation des bicelles saturées et biphényles; par contre, l'existence de deux formes peptidiques, l'une liée à la membrane, l'autre libre en solution, s'échangeant rapidement et pouvant interagir différemment avec les deux modèles membranaires, empêche de tirer profit de l'orientation spécifique de chaque bicelle dans B<sub>0</sub>.



## CHAPITRE IX

### Conclusion et Perspectives



L'objectif de ce travail était de concevoir un nouveau modèle de membrane lipidique de type bicelle, qui s'oriente dans le champ magnétique telle que la normale à sa bicouche soit parallèle au champ magnétique statique, sans ajout de paramagnétiques. Cette orientation présente en effet de nombreux avantages pour l'étude structurale, dynamique et orientationnelle de biomolécules telles que les peptides ou protéines.

L'intérêt de notre approche est d'avoir développé les différentes étapes de la conception de ce modèle, constitué d'un lipide innovant le TBBPC. Ainsi, après la synthèse et la caractérisation de ce dernier, sa formulation avec le DCPC a été effectuée et l'analyse complète des bicelles TBBPC/DCPC ainsi formées a été menée ; enfin les applications de ces objets membranaires dans l'étude orientationnelle de biomolécules ont été abordées.

Cette approche multidisciplinaire a été réalisée en combinant plusieurs techniques d'analyses complémentaires (RMN, Diffusion des rayons X, Microscopie électronique). La RMN des Solides a permis en particulier de décrire à l'échelle moléculaire la structure et la dynamique locale de nos modèles via des sondes moléculaires lipidiques ou protéiques non invasives (observations des noyaux  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$ ).

Sur la base de Tan et al. (Tan et al., 2002), nous avons donc réussi à synthétiser le lipide TBBPC (1-tétradecanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine), possédant deux cycles phényles sur sa chaîne sn<sub>2</sub>, ainsi que son analogue deutéré sur la chaîne aliphatique sn<sub>1</sub>, le TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ .

Nous avons vu que l'influence de cette unité biphenyle se faisait ressentir à plusieurs niveaux. Elle abaisse tout d'abord la température de transition de phase du TBBPC. A l'image du cholestérol, elle produit un effet d'ordre sur les CH<sub>2</sub> de la chaîne sn<sub>1</sub>, proches du squelette glycérol. Enfin, l'anisotropie  $\Delta\chi$  positive des deux cycles phényles est à l'origine de la déformation des vésicules MLVs de TBBPC en oblates et de l'orientation spécifique n//B<sub>0</sub> des bicelles TBBPC/DCPC.

Formulé avec une faible proportion de DCPC, le lipide biphenyle se structure en effet en objets bicellaires que nous avons observés au microscope électronique, écartant ainsi l'hypothèse d'une structuration du système en lamelles trouées et permettant de déterminer statistiquement un diamètre des disques de 800 Å, proche de celui calculé par RMN- $^{31}\text{P}$ . Cette dernière technique a permis de caractériser facilement l'orientation spécifique n//B<sub>0</sub> de ces nouvelles bicelles permettant d'établir leurs domaines d'existence en compositions lipidiques, en hydratation et en température. On a pu ainsi mettre en évidence la grande stabilité en température des bicelles biphenyles et à l'inverse leur gamme en composition lipidique très

étroite par rapport aux bicelles DMPC/DCPC qui s'orientent telle que  $n \perp B_0$  (Raffard et al., 2000). Par ailleurs, nous avons montré, par RMN du deutérium, que la présence des deux cycles ne perturbait pas significativement la dynamique des chaînes aliphatiques des bicelles biphényles par rapport à celle des bicelles saturées, ce qui est un point très positif pour pouvoir comparer les deux systèmes. Il serait néanmoins intéressant d'étudier plus précisément la mobilité de la chaîne  $sn_2$  du TBBPC, en deutérant notamment les deux cycles phényles.

Une étude en dynamique moléculaire pourrait également être menée afin de confirmer la différence de longueur entre les chaînes  $sn_1$  et  $sn_2$  du TBBPC et d'étudier plus précisément la configuration spatiale que cette molécule adopte au sein de la bicouche lipidique par rapport à celle du DMPC.

Les études par diffusion des rayons X, en plus de confirmer l'orientation de chaque système bicellaire et leur structuration en bicouche, ont permis de mettre en évidence une propriété très intéressante des bicelles TBBPC/DCPC, à savoir qu'elles conservent leur orientation en dehors de  $B_0$  pendant plusieurs jours. Cette caractéristique trouve des applications dans de nombreuses études biophysiques ; on pourrait ainsi envisager d'analyser la structure de biomolécules associées aux bicelles TBBPC/DCPC préalablement orientées, par Dichroïsme Circulaire Vibrationnel, par spectroscopie Raman ou par ATR. On pourrait également étudier le profil de diffusion X des bicelles biphényles orientées, lorsqu'elles sont associées à une biomolécule.

L'analyse par RMN du phosphore des systèmes ternaires (TBBPC:DMPC)/DCPC a montré que pour des proportions similaires des deux lipides à chaînes longues, les objets bicellaires étaient déstructurés au profit de phases lipidiques complexes (micelles géantes, vésicules oblates...). Il serait intéressant de caractériser ce polymorphisme lipidique très riche, par d'autres techniques que la RMN, comme la Diffusion des rayons X et la microscopie électronique.

Les bicelles sont aujourd'hui très largement utilisées pour l'étude de biomolécules ; ce sont en effet des bicouches lipidiques discoïdales qui s'orientent dans des conditions proches de celles physiologiques (très hydratées et température de 37°C), à la différence des membranes empilées entre lamelles que l'on oriente mécaniquement (très peu hydratées).

L'application des bicelles TBBPC/DCPC à l'étude de peptides ou protéines, est l'aspect qui reste le plus à approfondir ici.

Comme les bicelles saturées, on pourrait tout d'abord utiliser ce nouveau modèle pour étudier la structure de biomolécules hydrosolubles (couplages dipolaires résiduels deux fois plus importants par rapport au système DMPC/DCPC).

Nous avons vu que l'orientation  $n/B_0$  des bicelles biphényles permettait de déterminer très facilement l'orientation de peptides membranaires hélicoïdaux par RMN- $^{15}\text{N}$ . D'après les premiers résultats sur Neu\* $^{15}\text{N}_4$ , l'insertion en grande quantité de gros peptides hydrophobes (> 150 acides aminés) dans les bicelles DMPC/DCPC semble compromise sans déstructurer celles-ci. Il est alors difficile de détecter le signal RMN- $^{15}\text{N}$  du peptide lorsque sa proportion est trop faible. Toutefois, nous n'avons pas encore tenté d'incorporer un peptide transmembranaire dans les bicelles TBBPC/DCPC, qui pourraient s'avérer être plus stables, vu leur taille plus importante. L'étude sur la Menk $^{15}\text{N}_3$  a quant à elle montré que la dynamique importante du peptide compliquait l'interprétation des spectres et ne permettait pas de tirer profit de l'orientation de chaque système bicellaire.

On voit donc que l'interaction entre les modèles membranaires de type bicelle et des biomolécules comme les peptides est délicate à maîtriser ; le fait de ne pouvoir insérer que de faibles quantités de biomolécules dans les objets bicellaires peut être un facteur limitant dans le développement des applications de ces modèles membranaires. Toutefois, nous avons montré qu'il est possible d'en insérer en faible quantité, sans déstructurer les objets bicellaires. Notre problème provient surtout de la sensibilité des sondes RMN. Dans notre cas, Neu\* n'était marqué  $^{15}\text{N}$  que quatre fois, mais d'autres groupes ont pu obtenir des informations avec des peptides ou des protéines uniformément marqués. On peut espérer que l'avancée des techniques et en particulier le développement des cryo-sondes appliqués à des spectromètres solides, permettra d'améliorer ces problèmes de sensibilité.

Un point important est de vérifier si l'activité des biomolécules est conservée au sein des bicelles TBBPC/DCPC. Il faudrait en particulier étudier l'influence des deux cycles phényles du TBBPC sur la structure et donc la fonction des biomolécules. On peut en effet envisager que leurs interactions seront différentes de celles rencontrées avec la chaîne carbonée du DMPC. Toutefois, de nombreux cycles phényles sont naturellement présents dans les molécules des membranes biologiques, comme dans le cholestérol ; les bicelles biphényles possèdent donc un aspect des biomembranes supplémentaire par rapport à celles saturées.

Cette étude sur les bicelles TBBPC/DCPC, agrandit la famille actuelle des modèles membranaires de type bicouche discoïdale. Comme pour les bicelles saturées, il serait intéressant d'insérer des molécules lipidiques chargées positivement ou négativement (DMPS, DMPG...) ou du cholestérol dans les bicelles TBBPC/DCPC, afin de se rapprocher de la composition lipidique d'une membrane naturelle. Une idée serait également d'insérer des radeaux lipidiques « rafts » dans les bicelles afin d'étudier la dynamique de ces domaines, dont l'existence est encore sujet à controverse.

## Bibliographie



- Abragam, A. 1961. Principles of nuclear magnetism. Oxford University Press, London.
- Arnold, A., T. Labrot, R. Oda, and E.J. Dufourc. 2002.  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  modulation of "bicelle" size and orientation in a magnetic field as revealed by solid state NMR and electron microscopy. *Biophys. J.* 83:2667-2680.
- Arora, A., F. Abildgaard, J.H. Bushweller, and L.K. Tamm. 2001. Structure of outer membrane protein A transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nat. Struct. Biol.* 8(4):334-338.
- Aue, W.P., E. Bartholdi, and R.R. Ernst. 1975. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* 64:2229-2246.
- Aussenac, F., B. Lavigne, and E.J. Dufourc. 2005. Towards Bicelle Stability with Ether-linked Phospholipids: Temperature, Composition and hydration Diagrams by  $^2H$  and  $^{31}P$  Solid State NMR. *Langmuir* 21:7129-7135.
- Aussenac, F. 2002. "Les "Bicelles" et les "Rafts": de nouvelles membranes biomimétiques pour l'étude de protéines membranaires par RMN des solides". Université de Bordeaux I, Pessac.
- Aussenac, F., M. Laguerre, J.M. Schmitter, and E.J. Dufourc. 2003a. Detailed Structure and Dynamics of Bicelle Phospholipids Using Selectively Deuterated and Perdeuterated Labels.  $^2H$  NMR and Molecular Mechanics Study. *Langmuir* 19:10468-10479.
- Aussenac, F., M. Tavares, and E.J. Dufourc. 2003b. Cholesterol dynamics in membranes of raft composition: a molecular point of view from  $^2H$  and  $^{31}P$  solid-state NMR. *Biochemistry* 42(6):1383-1390.
- Bacon, G.E. 1972. *Acta Cryst. A* 28:357-358.
- Bargmann, C.I., M. Huang, and R.A. Weinberg. 1986. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319:226-230
- Bax, A., and D.G. Davis. 1985. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 63:207-213.
- Bax, A., and N. Tjandra. 1997. High-resolution heteronuclear NMR of human ubiquitin in an aqueous liquid crystalline medium. *J. Biomol. NMR* 10:289-292.
- Bechinger, B. 2001. Membrane insertion and orientation of polyalanine peptides: a  $^{15}N$  solid-state NMR spectroscopy investigation. *Biophys. J.* 81:2251-2256.
- Bian, J.R., and M.F. Roberts. 1990. Phase separation in short-chain lecithin/gelstate long-chain lecithin aggregates. *Biochemistry* 29:7928-7935.
- Bloom, M., J.H. Davis, and A.L. Mackay. 1981. Direct determination of the oriented sample NMR spectrum from the powder spectrum for systems with local axial symmetry. *Chem. Phys. Letters* 80(1):198-202.

- Bolze, J., T. Fujisawa, T. Nagao, K. Norisada, H. Saito, and A. Naito. 2000. Small angle X-ray scattering and  $^{31}\text{P}$  NMR studies on the phase behaviour of phospholipid bilayered mixed micelles. *Chem. Phys. Lett.* 329:215-220.
- Bothner-By, A.A., R.L. Stephens, J. Lee, C.D. Warren, and R.W. Jeanloz. 1984. Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame. *J. Amer. Chem. Soc.* 106:811-813.
- Bothorel, P., and C. Lussan. 1970. Quelques aspects nouveaux d'un modèle dynamique de membrane biologique. *C. R. Acad. Sci.* 271:680-683.
- Braunschweiler, L., and R.R. Ernst. 1983. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 53:521-528.
- Byrne, R.D., T.M. Barona, M. Garnier, G. Koster, M. Katan, D.L. Poccia, and B. Larijani. 2005. Nuclear Envelope Assembly is Promoted by Phosphoinositide-Specific PLC with Selective Recruitment of Phosphatidylinositol Enriched Membranes. *Biochem. J.* 387:393-400.
- Capaldi, R.A. 1974. A dynamic model of cell membranes. *Sci. Am.* 230:26-33.
- Carlotti, C., F. Aussenac, and E.J. Dufourc. 2002. Towards high-resolution  $^1\text{H}$ -NMR in biological membranes: magic angle spinning of bicelles. *Biochim. Biophys. Acta* 1564:156-164.
- Cevc, G. 1983. *Phospholipids Handbook*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Chapman, D., R.M. Williams, and B.D. Ladbroke. 1967. Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacylphosphatidylcholines (lecithins). *Chem. Phys. Lipids* 1:445-475.
- Cho, G.F., B. M.; Reddy, V. B. 2001. Phospholipid Bicelles with positive Anisotropy of the magnetic Susceptibility. *J. Am. Chem. Soc.* 123:1537-1538.
- Crowell, K.J., and P.M. Macdonald. 1999. Surface charge response of the phosphatidylcholine head group in bilayered micelles from phosphorus and deuterium magnetic resonance. *Biochim. Biophys. Acta* 1416:21-30.
- Crowell, K.J., and P.M. Macdonald. 2001. Europium III Binding and the Reorientation of Magnetically Aligned Bicelles: Insights from Deuterium NMR Spectroscopy. *Biophys. J.* 81:255-265.
- CRPP: <http://www.crpp.u-bordeaux.fr/transform/competences/cryofracture.html>.
- Da Costa, G., S. Chevance, E. Le Rumeur, and A. Bondon. 2006. Proton NMR Detection of Porphyrins and Cytochrome c in Small Unilamellar Vesicles: Role of the Dissociation Kinetic Constant. *Biophys. J.* 90:L55-57.
- Davis, J.H. 1979. Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biophys. J.* 27:339-358.

- Davis, J.H. 1983. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by  $^2\text{H}$ -NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 737:117-171.
- Davis, J.H., and M. Auger. 1999. Static and magic angle spinning NMR of membrane peptides and proteins. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 35:1-84.
- Davis, J.H., K.R. Jeffrey, M. Bloom, M.I. Valic, and T.P. Higgs. 1976. Quadrupolar echo deuterium magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chem. Phys. Lett.* 42(2):390-394.
- Deber, C.M., and B.A. Behnam. 1984. Role of membrane lipids in peptide hormone function: binding of enkephalins to micelles. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81:61-65.
- Douliez, J.P., L. A., and E.J. Dufourc. 1995. Restatement of order parameters in biomembranes: calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splittings. *Biophys. J.* 68:1727-1739.
- Dufourc, E.J. 1983. The effects of cyclopropane rings, sterols and antibiotics on the structure and dynamics of phospholipids membranes. A deuterium solid state nuclear magnetic resonance approach. University of Ottawa, Ottawa, Ontario.
- Dufourc, E.J., I.C.P. Smith, and H.C. Jarrell. 1983. A  $^2\text{H}$ -NMR analysis of dihydrosterculoyl-containing lipids in model membranes: structural effects of a cyclopropane ring. *Chem. Phys. Lipids* 33:153-177.
- Dufourc, E.J., I.C.P. Smith, and H.C. Jarrell. 1984. Amphotericin and model membranes. The effect of amphotericin B on cholesterol-containing systems as viewed by  $^2\text{H}$ -NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 776:317-329.
- Dufourc, E.J. 1986. La résonance magnétique nucléaire du deutérium et du phosphore dans les milieux organisés. Théorie et applications à l'étude de l'action de la mélittine et de la delta-lysine sur les membranes biologiques. Thèse d'état de l'université de Bordeaux I, France.
- Dufourc, E.J., C. Mayer, J. Stohrer, G. Althoff, and G. Kothe. 1992. Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. Comprehensive analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements. *Biophys. J.* 61:42-47.
- Dufourc, E.J. 2004. Cours de Master de Chimie, Université Bordeaux I.
- Edidin, M. 2001. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trend in Cell Biology* 11:492-496.
- Eggers, K., T.M. Fyles, and P.J. Montoya-Pelaez. 2001. Synthesis and Characterization of Photoswitchable Lipids Containing Hemithioindigo Chromophores. *J. Org. Chem.* 66:2966-2977.
- Egorova-Zachernyuk, T.A., J. Hollander, N. Fraser, P. Gast, A.J. Hoff, R. Cogdell, H.J.M. de Groot, and M. Baldus. 2001. Heteronuclear 2D-correlations in uniformly [ $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ] labeled membrane-protein complex at ultra-high magnetic fields. *J. Biomol. NMR* 19:243-253.

- Faure, C. 1996. Effet comparé du sulfate de cholestérol et du cholestérol sur la formation, la dynamique et l'hydratation de bicouches lipidiques modèles. Une approche par RMN des solides, diffraction des rayons X et des neutrons. Thèse de l'Université Bordeaux I.
- Faure, C., L. Bonakdar, and E.J. Dufourc. 1997. Determination of DMPC hydration in the  $L_{\alpha}$  and  $L_{\beta}$  phases  $^2\text{H}$  solid state NMR of  $\text{D}_2\text{O}$ . *F.E.B.S. Letters* 405:263-266.
- Fernández, C., K. Adeishvili, and K. Wüthrich. 2001. Transverse relaxation-optimized NMR spectroscopy with the outer membrane protein OmpX in dihexanoyl phosphatidylcholine micelles. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98(5):2358-2363.
- Gabriel, N.E., N.V. Agman, and M.F. Roberts. 1987. Enzymatic hydrolysis of short-chain lecithin/long-chain phospholipid unilamellar vesicles: sensitivity of phospholipases to matrix phase state. *Biochemistry* 26:7409-4718.
- Gabriel, N.E., and M.F. Roberts. 1984. Spontaneous formation of stable unilamellar vesicles. *Biochemistry* 23(18):4011-4015.
- Gabriel, N.E., and M.F. Roberts. 1986. Interaction of short-chain lecithin with long-chain phospholipids: characterization of vesicles that form spontaneously. *Biochemistry* 25:2812-2821.
- Gabriel, N.E., and M.F. Roberts. 1987. Short-chain lecithin/long-chain phospholipid unilamellar vesicles: asymmetry, dynamics and enzymatic hydrolysis of the short chain component. *Biochemistry* 26:2432-2440.
- Gaemers, S., and A. Bax. 2001. Morphology of three lyotropic liquid crystalline biological NMR media studied by translational diffusion anisotropy. *J. Am. Chem. Soc.* 123:12343-12352.
- Gally, H.-U., W. Niederberger, and J. Seelig. 1975. Conformation and motion of the choline head group in bilayers of dipalmitoyl-3-*sn*-phosphatidylcholine. *Biochemistry* 14(16):3647-3652.
- Goetz, M., C. Carlotti, F. Bontems, and E.J. Dufourc. 2001. Evidence for an  $\alpha$ -helix  $\rightarrow$   $\pi$ -bulge helicity modulation for the *neu/erbB-2* membrane-spanning segment. A  $^1\text{H}$  NMR and circular dichroism study. *Biochemistry* 40:6534-6540.
- Graham, W.H., E.S. Carter II, and R.P. Hicks. 1992. Conformational Analysis of Met-Enkephalin in Both Aqueous Solution and in the Presence of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles Using Multidimensional NMR and Molecular Modeling. *Biopolymers* 32:1755-1764.
- Gullick, W.J., A.C. Bottomley, F.J. Lofts, D.G. Doak, D. Mulvey, R. Newman, M.J. Crumpton, M.J.E. Sternberg, and I.D. Campbell. 1992. Three dimensional structure of the transmembrane region of the proto-oncogenic and oncogenic forms of the neu protein. *The EMBO Journal* 11:43-48.
- Hahn, E.L. 1950. Spin echoes. *Physical Review* 80:580-594.
- Hare, B.J., J.H. Prestegard, and D.M. Engelman. 1995. Small Angle X-Ray Scattering Studies of Magnetically Oriented Lipid Bilayers. *Biophys. J.* 69:1891-1896.

- Harroun, T.A., M. Koslowsky, M.P. Nieh, C.F. de Lannoy, V.A. Raghunathan, and J. Katsaras. 2005. Comprehensive examination of mesophases formed by DMPC and DHPC mixtures. *Langmuir* 21:5356-5361.
- Hartmann, S.R., and E.L. Hahn. 1962. Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame. *Phys. Rev.* 128(5):2042-2053.
- Hicks, R.P., D.J. Beard, and J.K. Young. 1992. The Interactions of Neuropeptides with Membrane Model Systems: A Case Study. *Biopolymers* 32:85-96.
- Hsu, F., and J. Turk. 2003. Electrospray Ionization/Tandem Quadrupole Mass Spectrometric Studies on Phosphatidylcholines: The fragmentation Processes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14:352-363.
- Hubbell, W.L., and H.M. McConnell. 1971. Molecular Motion in Spin-Labeled Phospholipids and Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 93(2):314-326.
- Hughes, J., T.W. Smith, and H.W. Kosterlitz. 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-579.
- Hynes, N.E., and D.F. Stern. 1994. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1198:165-184.
- Israelachvili, J.N., S. Marcelja, and R.G. Horn. 1980. Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics* 13:121-200.
- Israelachvili, J.N., D.J. Mitchell, and B.W. Ninham. 1976. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc., Faraday Transactions II* 72:1525-1568.
- Jacobson, K., and C. Dietrich. 1999. Looking at lipid rafts? *Trend in Cell Biology* 9:87-91.
- James, R.W. 1967. The optical principles of the diffraction of X-rays. London, editor.
- Jeener, J., B.H. Meier, P. Bachmann, and R.R. Ernst. 1979. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys* 71:4546-4563.
- Jones, D.H., K.R. Barber, and C.W.M. Grant. 1998a. Sequence-related behaviour of transmembrane domains from class I receptor tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1371:199-212.
- Jones, D.H., K.R. Barber, E.W. VanDerLoo, and C.W.M. Grant. 1998b. Epidermal growth factor receptor transmembrane domain:  $^2\text{H}$  NMR implications for orientation and motion in a bilayer environment. *Biochemistry* 37:16780-16787.
- Jones, D.H., A.C. Rigby, K.R. Barber, and C.W.M. Grant. 1997. Oligomerization of the EGF receptor transmembrane domain: a  $^2\text{H}$  NMR study in lipid bilayers. *Biochemistry* 36:12616-12624.
- Kates, M. 1975. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. Work TS, Work E, editors.

- Katsaras, J., R.L. Donaberger, J.P. Swainson, D.C. Tennant, Z. Tun, R.R. Vold, and R.S. Prosser. 1997. Rarely observed phase transitions in a novel lyotropic liquid crystal system. *Phys. Rev. Lett.* 78(5):899-902.
- Katsaras, J., T.A. Harroun, J. Pencer, and M.P. Nieh. 2005. "Bicellar" lipid mixtures as used in biochemical and biophysical studies. *Naturwissenschaften* 92:355-366.
- Kermaïdic, M. 2001. Travaux d'Etude et de Recherche (Maîtrise d'Informatique): "Modélisation d'une Cellule Biologique à l'aide de Java et de Java 3D". Université de Bretagne Occidentale.
- Ketchum, R.K., W. Hu, and T.A. Cross. 1993. High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science* 261:1457-1460.
- Ketchum, R.K., K.C. Lee, S. Huo, and T.A. Cross. 1996. Macromolecular structural elucidation with solid-state NMR-derived orientational constraints. *J. Biomol. NMR* 8:1-14.
- Khemtemourian, L., S. Lavielle, K. Bathany, J.M. Schmitter, and E.J. Dufourc. 2006. Revisited and large-scale synthesis and purification of the mutated and wild type neu/erbB-2 membrane-spanning segment. *J. Pept. Sci.* 12 (5):361-368.
- Khemtemourian, L. 2005. "Synthèse, Structure et Dynamique de peptides membranaires impliqués dans le cancer et l'apoptose. Une approche par modélisation moléculaire, dichroïsme circulaire et résonance magnétique nucléaire des solides". Université de Bordeaux I, Pessac.
- Killian, J.A. 1998. Hydrophobic Mismatch between Proteins and Lipids in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1376:401-416.
- Killian, J.A., and T.K. Nyholm. 2006. Peptides in lipid bilayers: the power of simple models. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 16:473-479.
- Kimura, A., N. Kuni, and H. Fujiwara. 1996. Orientation and Conformation of Met-enkephalin in a Liquid Crystal As Studied by Magic-Angle- and Near-Magic-Angle-Spinning Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *J. Phys. Chem.* 100:14056-14061.
- Kurita, J., H. Shimahara, N. Utsunomiya-Tate, and S. Tate. 2003. Measurement of  $^{15}\text{N}$  chemical shift anisotropy in a protein dissolved in a dilute liquid crystalline medium with the application of magic angle sample spinning. *J. Magn. Reson.* 163:163-173.
- Lancelot, N., K. Elbayed, and M. Piotto. 2005. Applications of variable-angle sample spinning experiments to the measurement of scaled residual dipolar couplings and  $^{15}\text{N}$  CSA in soluble proteins. *J. Biomol. NMR* 37:153-161.
- Larijani, B., T.M. Barona, and D.L. Poccia. 2001. Role for phosphatidylinositol in nuclear envelope formation. *Biochem. J.* 356:495-501.
- Léonard, A., and E.J. Dufourc. 1991. Interactions of cholesterol with the membrane lipid matrix. A solid state NMR approach. *Biochimie* 73:1295-1302.

- Léonard, A., C. Escrive, M. Laguerre, E. Pebay-Peyroula, W. Néri, T. Pott, J. Katsaras, and D.E. J. 2001. Location of cholesterol in DMPC membranes. A comparative study by neutron diffraction and molecular mechanics simulations. *Langmuir* 17:2019-2030.
- Li, L. 2005. Structural Analysis of Cylindrical Particles by Small Angle X-ray Scattering. University of Bayreuth.
- Lin, T.L., C.C. Liu, M.F. Roberts, and S.H. Chen. 1991. Structure of mixed Short-chain lecithin/long-chain lecithin aggregates studied by small-angle neutron scattering. *J. Phys. Chem.* 95:6020-6027.
- Lindberg, M., H. Biverstahl, A. Graslund, and L. Maler. 2003. Structure and positioning comparison of two variants of penetratin in two different membrane mimicking systems by NMR. *Eur. J. Biochem.* 270:3055-3063.
- Lindberg, M., J. Jarvet, Ü. Langel, and A. Gräslund. 2001. Secondary structure and position of the cell-penetrating peptide transportan in SDS micelles as determined by NMR. *Biochemistry* 40:3141-3149.
- London, E., and D.A. Brown. 2000. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta* 1508:182-195.
- Lorch, M., S. Fahem, C. Kaiser, I. Weber, A.J. Mason, J.U. Bowie, and C. Glaubitz. 2005. How to prepare membrane proteins for solid-state NMR: A case study on the alpha-helical integral membrane protein diacylglycerol kinase from E. coli. *ChemBioChem* 6:1693-1700.
- Loudet, C., L. Khemtemourian, F. Aussenac, S. Gineste, M.F. Achard, and E.J. Dufourc. 2005. Bicelle membranes and their use for hydrophobic peptide studies by circular dichroism and solid state NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 1724:315-323.
- Luchette, P.A., T.N. Vetman, R.S. Prosser, R.E. Hancock, M.P. Nieh, C.J. Glinka, S. Krueger, and J. Katsaras. 2001. Morphology of fast-tumbling bicelles: a small angle neutron scattering and NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* 1513:83-94.
- Marassi, F.M., C. Ma, H. Gratkowski, S.K. Straus, K. Sterbel, M. Oblatt-Montal, M. Montal, and S.J. Opella. 1999. Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:14336-14341.
- Marassi, F.M., A. Ramamoorthy, and S.J. Opella. 1997. Complete resolution of the solid-state NMR spectrum of a uniformly  $^{15}\text{N}$ -labeled membrane protein in phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:8551-8556.
- Marcotte, I., E.J. Dufourc, M. Ouellet, and M. Auger. 2003. Interaction of the Neuropeptide Met-Enkephalin with Zwitterionic and Negatively Charged Bicelles as Viewed by  $^{31}\text{P}$  and  $^2\text{H}$  Solid-State NMR. *Biophys. J.* 85:328-339.
- Marcotte, I., F. Separovic, M. Auger, and S.M. Gagné. 2004. A Multidimensionnal  $^1\text{H}$  NMR Investigation of the Conformation of Methionine-Enkephaline in Fast-Tumbling Bicelles. *Biophys. J.* 86:1587-1600.

- Matsumori, N., A. Morooka, and M. Murata. 2006. Detailed Description of the Conformation and Location of Membrane-Bound Erythromycin A Using Isotropic Bicelles. *J. Med. Chem.* 49(3501-3508).
- McCaughan, L., and S. Krimm. 1982. Biochemical profiles of Membranes from X-Ray and Neutron Diffraction. *Biophys. J.* 37:417-426.
- McDermott, A., T. Polenova, A. Bockmann, K.W. Zilm, E.K. Paulsen, R.W. Martin, and G.T. Montelione. 2000. Partial assignments for uniformly ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )-enriched BPTI in the solid state. *J. Biomol. NMR* 16:209-219.
- Mehring, M. 1983. Principles of high resolution NMR in solids. Springer-Verlag, Berlin.
- Menashe, M., G. Romero, R.L. Biltonen, and D. Lichtenberg. 1986. Hydrolysis of Dipalmitoylphosphatidylcholine Small Unilamellar Vesicles by Porcine Pancreatic Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 261(12):5328-5333.
- Merrifield, R.B. 1963. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154.
- Meyer, H.W., and W. Richter. 2001. Freeze-fracture studies on lipids and membranes. *Micron* 32:615-644.
- Milne, S., P. Ivanova, J. Forrester, and H.A. Brown. 2006. Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS. *Methods* 39:92-103.
- Morris, G.A., and R. Freeman. 1979. Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarization Transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 101:760-762.
- Nieh, M.-P., C.J. Glinka, S. Krueger, R.S. Prosser, and J. Katsaras. 2001. SANS study of the structural phases of magnetically alignable lanthanide-doped phospholipid mixtures. *Langmuir* 17:2629-2638.
- Nieh, M.-P., C.J. Glinka, S. Krueger, R.S. Prosser, and J. Katsaras. 2002. SANS Study on the Effect of Lanthanide Ions and Charged Lipids on the Morphology of Phospholipid Mixtures. *Biophys. J.* 82:2487-2498.
- Nieh, M.-P., V.A. Raghunathan, C.J. Glinka, T.A. Harroun, G. Pabst, and J. Katsaras. 2004. Magnetically Alignable Phase of Phospholipid "Bicelle" Mixtures Is a Chiral Nematic Made Up of Wormlike Micelles. *Langmuir* 20:7893-7897.
- Oldfield, E., M. Meadows, D. Rice, and R. Jacobs. 1978. Spectroscopic Studies of Specifically Deuterium Labeled Membrane Systems. Nuclear Magnetic Resonance Investigation of the Effects of Cholesterol in Model Systems. *J. Am. Chem. Soc.* 100(14):2727-2739.
- Orädd, G., G. Lindblom, and P.W. Westerman. 2002. Lateral diffusion of cholesterol and dimyristoylphosphatidylcholine in a lipid bilayer measured by pulsed field gradient NMR spectroscopy. *Biophys. J.* 83:2702-2704.
- Park, S.H., A.A. Mrse, A.A. Nevzorov, A.A. De Angelis, and S.J. Opella. 2005. Rotational diffusion of membrane proteins in aligned phospholipids bilayers by solid-state NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 177:397-400.

- Park, S.H., S. Prytulla, A.A. De Angelis, J. Miles Brown, H. Kiefer, and S.J. Opella. 2006. High Resolution NMR Spectroscopy of a GPCR in Aligned Bicelles. *J. Am. Chem. Soc.* 128:7402-7403.
- Patel, K.M., J.D. Morrisett, and J.T. Sparrow. 1979. A convenient synthesis of phosphatidylcholine with fatty acid anhydride and 4-pyrrolidinopyridine. *J. Lipid Res., Notes on Methodology* 20:674-677.
- Picard, F., M.J. Paquet, J. Levesque, A. Bélanger, and M. Auger. 1999.  $^{31}\text{P}$  NMR First Spectral Moment Study of the Partial Magnetic Orientation of Phospholipid Membranes. *Biophys. J.* 77:888-902.
- Pott, T., and E.J. Dufourc. 1995. Action of Melittin on the DPPC-Cholesterol Liquid-Ordered Phase: A Solid State  $^2\text{H}$ -and  $^{31}\text{P}$ -NMR Study. *Biophys. J.* 68:965-977.
- Prosser, R.S., H. Bryant, R.G. Bryant, and R.R. Vold. 1999. Lanthanide chelates as bilayer alignment tools in NMR studies of membrane-associated peptides. *J. Magn. Reson.* 141(2):256-260.
- Prosser, R.S., F. Evanics, J.L. Kitevski, and M.S. Al-Abdul-Wahid. 2006. Current Applications of Bicelles in NMR Studies of Membrane-Associated Amphiphiles and Proteins Biochemistry. *Biochemistry* 45(28):8453-8465.
- Prosser, R.S., J.A. Hunt, J.A. Dinatale, and R.R. Vold. 1996. Magnetically aligned membrane model systems with positive order parameters: switching the sign of  $S_{zz}$  with paramagnetic ions. *J. Am. Chem. Soc.* 118:269-270.
- Prosser, R.S., J.S. Hwang, and R.R. Vold. 1998. Magnetically aligned phospholipids bilayers with positive ordering : a new model membrane system. *Biophys. J.* 74:2405-2418.
- Prosser, S. 2002. Bicelle. <http://www.erin.utoronto.ca/mbiotech/page/prosser/>.
- Radhakrishnan, A., T.G. Anderson, and H.M. McConnell. 2000. Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 97:12422-12427.
- Raffard, G., S. Steinbruckner, A. Arnold, J.H. Davis, and E.J. Dufourc. 2000. Temperature-composition diagram of dimyristoylphosphatidylcholine-dicaproylphosphatidylcholine "bicelles" self-orienting in the magnetic field . A solid state  $^2\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR study. *Langmuir* 16:7655-7662.
- Rance, M., and R.A. Byrd. 1983. Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media : phase-cycled Hahn echo spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 52:221-240.
- Rank, J.L., L. Mateu, D.M. Sadler, A. Tardieu, T. Gulik-Krzywicki, and V. Luzzati. 1974. *J. Mol. Biol.* 85:249-277.
- Reinl, H., T. Brumm, and T.M. Bayerl. 1992. Changes of the physical properties of the liquid-ordered phase with temperature in binary mixtures of DPPC with cholesterol. *Biophys. J.* 61:1025-1035.

- Riske, K.A., L.Q. Amaral, and M.T. Lamy-Freund. 2001. Thermal transitions of DMPG bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1511:297-308.
- Rowe, B.A., and S.L. Neal. 2003. Fluorescence Probe Study of Bicelle Structure as a Function of Temperature: Developing a Practical Bicelle Structure Model. *Langmuir* 19(2039-2048).
- Sakurai, I., Y. Kawamura, A. Ikegami, and S. Iwayanagi. 1980. Magneto-orientation of lecithin crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 77:7232-7236.
- Sanders, C.R., and G.C. Landis. 1995. Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayered mixed micelles for NMR studies. *Biochemistry* 34:4030-4040.
- Sanders, C.R., and K. Oxenoid. 2000. Customizing model membranes and samples for NMR spectroscopic studies of complex membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1508:129-145.
- Sanders, C.R., and R.S. Prosser. 1998. Bicelles : a model membrane system for all seasons ? *Structure* 6:1227-1234.
- Sanders, C.R., J.E. Schaff, and J.H. Prestegard. 1993. Orientational behavior of phosphatidylcholine bilayers in the presence of aromatic amphiphiles and a magnetic field. *Biophys. J.* 64:1069-1080.
- Sanders, C.R., and J.P. Schwonek. 1992. Characterization of magnetically orientable bilayers in mixtures of dihexanoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine by solid-state NMR. *Biochemistry* 31:8898-8905.
- Sani, M.A., C. Loudet, G. Gröbner, and E.J. Dufourc. Accepté en Septembre 2006. Pro-Apoptotic Bax- $\alpha$ 1 Synthesis and Evidence for b-sheet to  $\alpha$ -helix conformational change as triggered by negatively charged lipid membranes. *J. Pept. Sci.*
- Sarret, P. Mécanismes de la signalisation médiée par les récepteurs couplés aux protéines-G. <http://www.123bio.net/revues/psarret/fig1.html>.
- Schechter, E. 1990. Biochimie et Biophysique des Membranes. Masson, editor.
- Schindler, H., and J. Seelig. 1975. Deuterium Order Parameters in Relation to Thermodynamics Properties of a Phospholipid Bilayer. A statistical Mechanical Interpretation. *Biochemistry* 14:2283-2287.
- Seelig, J. 1977. Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* 10:353-418.
- Seelig, J., F. Borle, and T.A. Cross. 1985. Magnetic ordering of phospholipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 814:195-198.
- Selinger, Z., and Y. Lapidot. 1966. Synthesis of fatty acid anhydrides by reaction with dicyclohexylcarbodiimide. *J. Lipid Res.* 7:174-175.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.

- Simons, K., and E. Ikonen. 2000. How cells handle cholesterol. *Science* 290:1721-1726.
- Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
- Sizun, C., F. Aussenac, A. Grelard, and E.J. Dufourc. 2004. NMR methods for studying the structure and dynamics of oncogenic and antihistaminic peptides in biomembranes. *Magn. Reson. Chem.* 42:180-186.
- Tan, C., B.M. Fung, and G. Cho. 2002. Phospholipid bicelles that align with their normals parallel to the magnetic field. *J. Am. Chem. Soc.* 124:11827-11832.
- Tian, F., J.A. Losonczi, M.W.F. Fisher, and J.H. Prestegard. 1999. Sign determination of dipolar couplings in field-oriented bicelles by variable angle sample spinning (VASS). *J. Biomol. NMR* 15:145-150.
- Tiburu, E.K., D.M. Moton, and G.A. Lorigan. 2001. Development of magnetically aligned phospholipid bilayers in mixtures of palmitoylstearylphosphatidylcholine and dihexanoylphosphatidylcholine by solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1512:206-214.
- Tolman, J.R., H.M. Al-Hashimi, L.E. Kay, and J.H. Prestegard. 2001. Structural and Dynamic Analysis of Residual Dipolar Coupling Data for Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 123:1416-1424.
- Traikia, M., D.E. Warschawski, M. Recouvreux, J. Cartaud, and P.F. Devaux. 2000. Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance. *Eur. Biophys. J.* 29(3):184-195.
- Triba, M., D.E. Warschawski, and P.F. Devaux. 2005. Reinvestigation by Phosphorus NMR of Lipid Distribution in Bicelles. *Biophys. J.* 88:1887-1901.
- Triba, M.N., P.F. Devaux, and D.E. Warschawski. 2006a. Effects of lipid chain length and unsaturation on bicelles stability. A phosphorus NMR study. *Biophys. J.*
- Triba, M.N., M. Zoonens, J.L. Popot, P.F. Devaux, and D.E. Warschawski. 2006b. Reconstitution and alignment by a magnetic field of a beta-barrel membrane protein in bicelles. *Eur. Biophys. J.* 35:268-275.
- Tribet, C., R. Audebert, and J.-L. Popot. 1996. Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 93:15047-15050.
- Ullrich, A., and J. Schlessinger. 1990. Signal transduction by receptor with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61:203-212.
- van Dam, L., G. Karlsson, and K. Edwards. 2004. Direct observation and characterization of DMPC/DHPC aggregates under conditions relevant for biological solution NMR. *Biochim. Biophys. Acta* 1664:241-256.

- van Meer, G., and Q. Lisman. 2002. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem.* 277:25855-25858.
- Verkade, P., and K. Simons. 1997. Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. *Histochem Cell Biol* 108:211-220.
- Visscher, I., M.C.A. Stuart, and J.B.F.N. Engberts. 2006. The influence of phenyl and phenoxy modification in the hydrophobic tails of di-n-alkyl phosphate amphiphiles on aggregate morphology. *Org. Biomol. Chem.* 4:707-712.
- Vist, M.R., and J.H. Davis. 1990. Phase equilibria of cholesterol dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures:  $^2\text{H}$ -nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* 29:451-464.
- Vold, R.R., and R.S. Prosser. 1996. Magnetically oriented phospholipid bilayered micelles for structural studies of polypeptides. Does the ideal bicelle exist? *J. Magn. Reson.* 113:267-271.
- Wang, J., Y.S. Balasz, and L.K. Thompson. 1997. Solid-State REDOR NMR Distance Measurements at the Ligand Site of a Bacterial Chemotaxis Membrane Receptor. *Biochemistry* 36:1699-1703.
- Wang, J., X. Guo, Y. Xu, L. Barron, and F.C. Szoka. 1998. Synthesis and Characterization of Long Chain Alkyl Acyl Carnitine Esters. Potentially Biodegradable Cationic Lipids for Use in gene Delivery. *J. Med. Chem.* 41:2207-2215.
- Wang, J., J. Denny, C. Tian, S. Kim, Y. Mo, F. Kovacs, Z. Song, K. Nishimura, Z. Gan, R. Fu, J.R. Quine, and T.A. Cross. 2000. Imaging membrane protein helical wheels. *J. Magn. Reson.* 144:162-167.
- Watts, A., A.S. Ulrich, and D.A. Middleton. 1995. Membrane protein structure: the contribution and potential of novel solid state NMR approaches. *Mol. Membr. Biol.* 12:233-246.
- Wütrich, K. 1986. NMR of protein and nucleic acids. Wiley, editor, New York.
- Yeagle, P.L. 1985. Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 822:267-287.
- Zandomenighi, G., M. Tomaselli, J.D. Beek, and B.H. Meier. 2001. Manipulation of the director in bicellar mesophases by sample spinning: a new tool for NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 123:910-913.

## Résumé :

Nous avons développé un nouveau modèle de biomembrane de type bicelle, dont la normale  $n$ , s'oriente parallèlement au champ magnétique  $B_0$ , sans ajout d'ions paramagnétiques. Ces nouveaux objets, de forme bicouche discoïdale, ont pu être observés par microscopie électronique et un diamètre moyen de 800 Å a été statistiquement déterminé. Ce système est constitué d'un mélange approprié de lipides à chaînes courtes (DCPC) et à chaînes longues, le 1-Tétradécanoyl-2-(4-(4-Biphényl)Butanoyl)-sn-glycero-3-PhosphatidylCholine (TBBPC). La présence de deux cycles phényles sur l'une des chaînes aliphatiques confère au TBBPC une anisotropie de susceptibilité magnétique positive, à l'origine de l'orientation spécifique  $n//B_0$  des bicelles TBBPC/DCPC. Cette orientation a été caractérisée par diffusion des rayons X aux petits angles et par RMN des solides  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$  et  $^{14}\text{N}$ . Les domaines d'existence de ces bicelles en fonction de la composition lipidique, de la température et de l'hydratation, ont ainsi pu être déterminés et comparés à ceux du système DMPC/DCPC, dont la normale s'oriente perpendiculairement à  $B_0$ . Par l'analyse RMN- $^2\text{H}$  du TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ , nous avons évalué la dynamique des bicelles biphenyles, qui est équivalente à celle des bicelles saturées. Nous avons également montré par diffusion des rayons X, que ces bicelles TBBPC/DCPC conservent leur orientation spécifique  $n//B_0$  pendant plusieurs jours en dehors du champ magnétique, ce qui peut trouver de nombreuses applications dans des études biophysiques. Enfin, ces nouveaux modèles membranaires présentent des avantages pour l'étude structurale et orientationnelle (par RMN- $^{15}\text{N}$ ) de biomolécules telles que des peptides amphipatiques.

## Mots clés :

Bicelles, phospholipides, TBBPC, unité biphenyle, RMN des Solides  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$  et  $^{14}\text{N}$ , diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), microscopie électronique, peptides membranaires.

## Abstract :

We have developed a new type of bicelles, which orient such as their normal  $n$  aligns parallel to the magnetic field  $B_0$  without paramagnetic ions. These new discoidal nano-objects were observed by freeze fracture electron microscopy and an average diameter of 800 Å was statistically determined. This system is composed of an appropriate mixture of short chain (DCPC) and long chain lipids (1-Tetradecanoyl-2-(4-(4-Biphenyl)Butanoyl)-sn-glycero-3-PhosphatidylCholine, TBBPC). The presence of two phenyl rings on one of the aliphatic chains of TBBPC confers to this molecule a positive anisotropic susceptibility, such that TBBPC/DCPC bicelles orient with their normal parallel to  $B_0$ . This specific orientation was characterized by SAXS analysis and by  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$  and  $^{14}\text{N}$  solid state NMR. Consequently, partial temperature-composition-hydration diagrams of these new bicelles were established by  $^{31}\text{P}$ -NMR and compared to the ones of DMPC/DCPC bicelles, which orient with their normal perpendicular to  $B_0$ . The dynamics of biphenyl bicelles was probed by  $^2\text{H}$  NMR, analysing the TBBPC- $^2\text{H}_{27}$ , and is equivalent to the one of saturated bicelles. We also proved by X-ray scattering that TBBPC/DCPC bicelles can keep their specific orientation  $n//B_0$  outside the magnetic field for several days, which can be useful for biophysical applications. Finally, these new bicelles are shown to be very promising to study the structure and the orientation (by  $^{15}\text{N}$ -NMR) of biomolecules such as amphipathic peptides.

## Key words :

Bicelles, phospholipids, TBBPC, biphenyl unit,  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$  and  $^{14}\text{N}$  Solid State NMR, Small Angle X-ray Scattering (SAXS), electron microscopy, membrane peptides.