

N° d'ordre : 3023

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **Lucie Payloune KHEMTEMOURIAN**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : CHIMIE-PHYSIQUE

**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.**

Soutenue le 10 octobre 2005

Après avis de :

M. Burkhard Bechinger
M. Gérard Chassaing

**Professeur de l'université de Strasbourg I
Directeur de recherche CNRS**

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. Burkhard Bechinger
M. Gérard Chassaing
M. Jean-Marie Schmitter
M. Fabrice Cornille
M. Juan Elezgaray
M. Erick J. Dufourc

**Professeur de l'université de Strasbourg I
Directeur de recherche CNRS**
**Professeur de l'université de Bordeaux I
Chef de Projet R&D – Senn Chemicals
Chargé de recherche CNRS
Directeur de recherche CNRS**

Rapporteur
Rapporteur
Président
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut Européen de Chimie et Biologie à Pessac (UMR-MOBIOUS 5144). Je tiens à remercier **Léon Ghosez** et **Jean-Jacques Toulmé**, co-directeurs de l'institut et **Jean-Marie Schmitter**, directeur de l'UMR pour m'avoir accueillie dans le laboratoire.

Mes plus profonds remerciements iront à **Erick J. Dufourc**, pour m'avoir intégrée dans son équipe. Sans DEA, trouver une thèse en France n'est pas chose facile, le "diplomarbeit" n'est malheureusement pas (re)-connu de tous ! Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir donnée la chance d'intégrer le laboratoire et permis d'y mener mes recherches en toute autonomie. Je te remercie de m'avoir guidée pendant ces trois ans. J'ai beaucoup appris et maintenant je peux dire que les chapeaux et les chaussettes n'ont plus aucun secret pour moi !

Je suis très reconnaissante envers **Jean-Marie Schmitter** et **Michel Laguerre** qui m'ont initié à la spectrométrie de masse et la modélisation moléculaire. Merci à vous de m'avoir consacré autant de temps. Votre aide était toujours efficace et vos précieux conseils m'ont été d'un grand secours.

Je remercie messieurs **Burkhard Bechinger**, **Gérard Chassaing**, **Fabrice Cornille**, **Juan Elezgaray** et **Jean-Marie Schmitter** pour l'intérêt scientifique qu'ils ont accordé à mon travail. J'ai été ravi que cette thèse soit jugée et discutée par vous tous.

J'exprime toute ma gratitude à toute l'équipe RMN : **Axelle**, dit Choco-Axelle (personne ne sait d'où vient ce surnom !!), notre ingénieur RMN et chef suprême des rotors, **Cécile**, dit Speed Cécile, mon élève guitariste (n'oublie de faire tes gammes) et colocataire de chambre lors des congrès avec laquelle j'ai réalisé un petit tour de Gaule (Biarritz, Dinard, Aussois, Montpellier, Carry le Rouet et peut-être bientôt Blankenberge), **Sébastien**, dit Séb la Menace ou Séb, j'comprends pas, ça marche pas, comment tu fais déjà ?, le sauveur informaticien et créateur de CDFriend (toi aussi, n'oublie de faire tes gammes), **Marc-Antoine** le suédois qui passe ses étés à l'IECB en notre compagnie, **Marie** la Londonienne qui nous apporte toujours pleins de chocolat, les nouveaux venus **Frantz** (prends bien soin de Neu et Neu*, ils ont besoin d'être chouchoutés tous les

jours) et **Yann** ; les anciens qui étaient présents lors de mes premiers pas au laboratoire : **Cécile S.**, **Christina** et **Fabien** ; les stagiaires pour leur grande motivation, leur sympathie et leur bonne humeur : **Catherine**, **Sébastien L.** et **Sébastien A.**

Mes remerciements les plus chaleureux à l'équipe de spectrométrie de masse, plus particulièrement à **Katell** qui a analysé plus de 600 spectres MALDI-ToF en trois ans (nouveau record à battre), **Benoît**, dit BigBen, le seul massiste du bureau (qui nous apporte un peu d'originalité), merci pour toutes tes idées originales de mise en forme des posters ou présentations diverses, **Stéphane** pour avoir analysé les spectres du mois d'août, **Anne** (et Tintin) et **Emmanuel**.

Au quotidien, vous avez tous participé à l'ambiance du laboratoire et fait de l'IECB un monde magique où il fait bon travailler !! Merci à tous les membres de l'équipe de "auto assemblage de molécules amphiphiles" avec qui nous partageons les palliasses et la bonne odeur des thiols : **Aurélié B.**, **Carole**, **Sabine**, **Roni**, **Thomas L.**, **Wissam** et **Reiko** ; Merci à l'équipe de modélisation : **Julien** pour les beaux dessins des hélices, **Nada**, **Jean** et **Juan**. Merci aux chimistes, les rois de l'organisation des pique-niques plages, des barbecues et des journées canoë : **Aurélié O.**, **Céline**, **Delphine**, **Elisabeth**, **Laurence**, **Marie**, **Nathalie**, **Arnaud**, **Fred**, **Ivan**, **Jean-Christophe**, **Jez**, **Jo**, **Loïc**, **Nicolas**, **Thomas D.**, **Yoann** et **Peter**.

Un grand merci à l'équipe administrative **Annie**, **Sandra** et **Stéphanie** pour avoir fait tout leur possible pour s'occuper des commandes et des missions de dernières minutes.

Merci à toutes les personnes qui m'ont aidé et donné des conseils lors de ces 3 ans, notamment **Fabrice Cornille**, **Claude Manigand**, **Loïc Martin** pour les synthèses et les purifications peptidiques et **Ijsbrand Kramer** pour avoir répondu à toutes mes interrogations sur les mécanismes biologiques.

Un merci tout particulier à tous les lecteurs qui ont lu cette thèse pour chercher et surtout corriger toutes les fautes d'accord, de temps, d'orthographe etc... Merci à vous tous !! Par ordre de participation : **Katell**, **Axelle**, **Benoît**, **Baptiste**, **Jean**, **Cécile**, **Sébastien**, **Anne**, **Emmanuel** et **Frantz**.

Je remercie l'association pour la recherche sur le cancer, la fondation pour la recherche médicale et la **ligue contre le cancer** pour avoir financé ma thèse.

Je tiens à remercier tout **particulièrement** :

Mes **parents** et **mon frère** pour leur soutien, tant moral que financier, tout au long de ces années à Orsay, Strasbourg, Réhovot, Hambourg, Sarbrücken et Bordeaux.

Ik bedank **Peter** voor zijn troost, zijn geduld en zijn begrip.

Mes **grands-parents** et **arrière grands-parents** pour m'avoir toujours soutenu et encourager, Iskouhie & Dikran, Yvonne & Pierre, Jeanne, Lucie et Charles.

Mes **tantes**, **oncles**, **cousines**, **cousins**, **grandes tantes**, **grands oncles**, **petites cousines** et **petits cousins**, plus particulièrement, **Denis** pour tous les déjeuners du jeudi que tu me préparais avant de retourner au labo et **François** pour m'avoir permis de me ressourcer les mois de septembre dans les vignes et dans les chais.

Mes **amis**, plus particulièrement Florence Moll, Sara Bauer, Hélène Gorju, Arnaud & Aurélie Delobel, Baptiste Guillemet, Matthieu & Clémentine Lantier. Merci pour votre amitié et votre soutien.

Merci à tous de m'avoir supporté (dans les 2 sens du terme) au cours de ma thèse et toutes les années précédentes.

Merci d'être venus de très loin, de loin, de moins loin ou par la pensée pour m'avoir supportée encore plus ce jour du 10 octobre 2005.

Bonne lecture,

Abréviations

ACN	Acétonitrile
ATP	Adénosine Tri Phosphate
Boc	t-Butoxycarbonyl
C-ter	extension Carboxy-terminale
Da	Dalton
DC	Dichroïsme Circulaire
DCC	DiCycloCarbodiimide
DCM	DiChloroMéthane
DCPC	DiCaproyl-PhosphatidylCholine
DIEA	DilsopropylEthylAmine
DMF	DiMéthylFormamide
DMPC	DiMyristoyl-PhosphatidylCholine
DMPG	DiMyristoyl-PhosphatidylGlycérol
DMPS	DiMyristoyl-PhosphatidylSérine
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DPC	DodecylPhosphoCholine
DPPC	Dipalmitoyl-PhosphatidylCholine
DSPC	Distéaroyl-PhosphatidylCholine
EDT	EthaneDiThiol
EGF	Facteur de croissance de l'épiderme
EGFR	Récepteur au facteur de croissance de l'épiderme
ErbB	Récepteurs des facteurs de croissance de l'épiderme chez l'homme
ESI	ElectroSpray Ionisation
EtOH	Ethanol
FID	Free Induction Decay
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FTIR	Spectroscopie à infra-rouge à transformée de Fourier
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-TetraméthylUronium hexafluorophosphate
HF	Acide Fluorhydrique
HOBt	1-HydrOxyBenzotriazole
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
iPrOH	Isopropanol

LC-MS	Couplage Liquide Chromatographie-spectrométrie de masse
MALDI-ToF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight
Neu	Récepteur Neu sauvage
Neu*	Récepteur Neu muté, portant la mutation dans le domaine transmembranaire
Neu _{TM35}	Domaine transmembranaire du récepteur Neu sauvage formé de 35 résidus
Neu* _{TM35}	Domaine transmembranaire du récepteur Neu* muté formé de 35 résidus
NMP	N-MéthylPyrrolidone
N-ter	extension amino-terminale
Pbf	2,2,4,5,7-PentamethyldihydroBenzoFuran-5-sulfonyl
PEG	PolyEthylèneGlycol
POPC	Palmitoyloléyl-phosphatidylCholine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	Root Mean Squared Deviation
RP-HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance en phase inverse
RTK	Récepteur à tyrosine kinase
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SM	Spectrométrie de Masse
SPPS	Synthèse de Peptides en Phase Solide
TBBPC	1-Tetra-decanoyl-2-BiphenylButanoylPhosphatidylCholine
t-Bu	t-butyl
TFE	TriFluoroEthanol
TFA	Acide TriFluoroacétique
TIS	TrilsopropylSilane
TM	Domaine Transmembranaire
tris	Tampon (hydroxyméthyl)aminométhane
Trt	Trityl
UV	Ultra Violet

Tables des Matières

Chapitre 1- Introduction

1. Généralités en cancérologie	1
1.1. Généralités	1
1.2. Objectif commun pour les anti-cancéreux : l'apoptose	2
2. Généralités sur les membranes biologiques	3
2.1. Structure et composition	3
2.1.1. Les lipides membranaires	5
2.1.2. Les protéines	8
2.2. Rôle des membranes biologiques	9
3. Les membranes modèles	9
3.1. Les dispersions aqueuses de phospholipides	10
3.2. Les micelles	12
3.3. Les liposomes	12
3.4. Un modèle de membranes intéressant: les bicelles	12
4. Généralités sur les protéines membranaires	14
4.1. Introduction générale sur les récepteurs des facteurs de croissances	15
4.2. Les récepteurs des facteurs de croissance de l'épiderme	17
4.2.1. Le récepteur ErbB2	18
4.2.2. Récepteur ErbB2 : cible privilégiée d'agents thérapeutiques	19
4.2.3. Les données structurales de ErbB2	23
4.2.4. Développement de la RMN pour les études structurales de protéines	28
4.3. Le modèle du matelas "mattress model"	30
5. Protéine anti-apoptotique Bcl-2	34
5.1. Introduction générale	34
5.2. La protéine Bcl-2	35
6. Objectifs et plan de la thèse	37

Chapitre 2 - Les techniques physico-chimiques

1. Dichroïsme circulaire	49
1.1. Introduction	49
1.2. Principe	50
1.3. Méthodes de déconvolution	51
1.4. Courbes Standards	52
1.5. Aspects expérimentaux	54
2. La spectrométrie de masse (SM)	55
2.1. Le Maldi-ToF	55
2.1.1. Principe de l'ionisation MALDI	55
2.1.2. Principe de l'analyseur à temps de vol	56

2.2.	L'ESI couplé au piège ionique	57
2.2.1.	Principe de l'électrospray	57
2.2.2.	Interprétation des spectres en ESI	59
2.2.3.	Principe de l'analyseur à piège ionique	59
2.2.4.	MS/MS dans le piège ionique	60
3.	Dynamique Moléculaire	61
3.1.	Généralités	61
3.1.1.	Introduction	61
3.1.2.	Le champ de Forces	61
3.1.3.	La notion de Cut-Off ou troncature	63
3.1.4.	La périodicité	64
3.1.5.	La minimisation	65
3.1.6.	La dynamique	66
3.2.	Dynamique moléculaire avec le logiciel Macromodel	68
3.2.1.	Champ de Forces	68
3.2.2.	Méthode de minimisation	68
3.2.3.	Cut-Off	69
3.2.4.	Solvants implicites : l'eau et le chloroforme	69
3.2.5.	Construction des peptides	70
3.3.	Dynamique moléculaire avec le logiciel DISCOVER	71
3.3.1.	Champ de Forces	71
3.3.2.	Méthode de minimisation	72
3.3.3.	Cut-Off	72
3.3.4.	Solvants explicites	72
3.3.5.	Construction des molécules et des assemblages de molécules	72
3.3.6.	Méthodes d'analyses	73
4.	La Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire	75
4.1.	Les bases de la RMN	75
4.1.1.	Spin nucléaire et moment magnétique associé	75
4.1.2.	Déroulement de l'expérience « classique » de RMN	76
4.1.3.	Le signal RMN	78
4.2.	Définitions : milieu isotrope et milieu anisotrope	78
4.3.	Les différents types de couplages ou d'interactions en phase liquide et solide	79
4.3.1.	Les couplages externes : l'interaction Zeeman	79
4.3.2.	Les couplages internes	81
4.4.	Les noyaux observés	83
4.4.1.	Le phosphore	84
4.4.2.	Le deutérium	88
4.5.	Aspects expérimentaux	94
4.5.1.	Acquisition des données – Traitement du signal	94
4.5.2.	Les séquences utilisées	94
4.5.3.	Traitement du signal	95
4.5.4.	Traitement des données	95

Chapitre 3 - Synthèse et purification de peptides hydrophobes et/ou amphipathiques

1.	Stratégie de la synthèse peptidique en phase solide (SPPS)	101
1.1.	Etapes de la synthèse	102
1.2.	Suivi de la synthèse par mesure de conductivité ou mesure de l'absorbance	105
1.3.	Choix du support solide	107
1.4.	Clivage de la résine et déprotection	108
1.5.	Analyse par Spectrométrie de Masse	108
1.6.	Purification par chromatographie liquide à haute performance	109
1.7.	Séquences des peptides synthétisés	109
2.	Résultats	110
3.	Discussion	112
3.1.	Les fragments transmembranaires Neu et Neu*	112
3.2.	Les polyvalines	116
3.3.	Synthèse et Purification des peptides BH4 et BH4- ¹⁵ N ₂	117
4.	Conclusion	118
5.	Généralisation des résultats	119

Chapitre 4 - Récupération quantitative des peptides et des lipides après formation d'un système membranaire

1.	Introduction	123
2.	Stratégie	125
3.	Matériaux et Méthodes	126
3.1.	Produits chimiques	126
3.2.	Description des systèmes	127
3.3.	Mode opératoire	127
3.4.	Vérification de la composition en masse par spectrométrie de masse	128
4.	Résultats	128
4.1.	Peptide Neu* _{TM35} dans des bicelles de DCPC/DMPC	128
4.2.	Peptide BH4 dans des liposomes de DMPC/DMPG	131
4.3.	Peptide Cateslytine dans des liposomes de DMPC/DMPS	133
4.4.	Récapitulatif	134
5.	Discussion	134
5.1.	Séparation membrane-peptide hydrophobe	135
5.2.	Séparation membrane-peptide amphiphile	135
5.3.	Généralisation des résultats	136

6.	Conclusion et Perspectives	137
-----------	-----------------------------------	------------

Chapitre 5 - A la recherche de l'hélice π

1.	Introduction	141
1.1.	Qu'est ce que l'hélice π ?	143
1.2.	Données Structurales sur les hélices	147
1.3.	Vers un nouveau standard de DC : stratégie mise en place	150
1.4.	Hélice π : réservoir d'élasticité lors de l'activation des RTK ?	151
2.	Vers un standard de l'hélice π	153
2.1.	Stratégie	153
2.2.	Résultats	155
	2.2.1. Le peptide KV ₁₂ K	155
	2.2.2. Les grands peptides (plus de 20 résidus)	158
2.3.	Discussion	169
3.	Hélice π : réservoir d'élasticité lors du processus d'activation des RTK ?	175
3.1.	Résultats des simulations de K ₂ V ₃₂ K ₂ en membrane	176
	3.1.1. Dynamique moléculaire à volume constant	176
	3.1.2. Dynamique moléculaire à pression constante	177
3.2.	Discussions	178
4.	Conclusions	180

Chapitre 6 - Etude structurale de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} en solution et en milieu membranaire par dichroïsme circulaire

1.	Introduction	185
2.	Matériaux et Méthodes	187
3.	Résultats et Discussions	188
3.1.	Etude structurale de Neu _{TM35} et Neu* _{TM35} en solution dans le TFE	188
3.2.	Etude structurale de Neu _{TM35} et Neu* _{TM35} insérés dans des membranes	196
3.3.	Etude détaillée du processus de dimérisation/oligomérisation de Neu _{TM35} et Neu* _{TM35} dans une membrane	202
4.	Conclusion et perspectives	206

Chapitre 7 - Etude de l'influence des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} sur des membranes modèles par RMN

1.	Introduction	209
-----------	---------------------	------------

2.	Matériaux et méthodes	211
2.1.	Préparation des systèmes membranaires	211
2.2.	RMN du deutérium et du phosphore	211
3.	Résultats	212
3.1.	Système DMPC + peptides	212
3.1.1.	Les spectres des bicouches en présence et en absence des peptides	212
3.1.2.	Les moments spectraux en présence et en absence des peptides	214
3.1.3.	Le profil d'ordre des bicouches en présence et en absence des peptides	215
3.2.	Système DPPC + peptides	220
3.2.1.	Les spectres des bicouches en présence et en absence des peptides	220
3.2.2.	Les moments spectraux en présence et en absence des peptides	222
3.2.3.	Le profil d'ordre des bicouches en présence et en absence des peptides	223
3.3.	Système DSPC + peptides	228
3.3.1.	Les spectres des bicouches en présence et en absence des peptides	228
3.3.2.	Les moments spectraux en présence et en absence des peptides	229
3.3.3.	Le profil d'ordre des bicouches en présence et en absence des peptides	230
4.	Discussion	235
5.	Conclusion et Perspectives	244

Chapitre 8 - Conclusions et Perspectives	249
---	-----

Annexes

1.	Annexe 1 - Synthèse peptidique	253
1.1.	Matériels et Méthodes	253
1.2.	Synthèse et clivage	254
1.3.	Purification par chromatographie en phase liquide	257
1.3.1.	Matériels et Méthodes	257
1.3.2.	Purification des peptides Neu	258
1.3.3.	Purification des peptides Neu*	262
1.3.4.	Purification de KV ₁₂ K	266
1.3.5.	Purification de KV ₂₀ K	267
1.3.6.	Purification de BH4 et BH4- ¹⁵ N ₂	270
2.	Annexe 2 - Préparation des modèles de membranes	272
2.1.	Produits chimiques	272
2.2.	Préparation des liposomes	273
2.3.	Préparation des bicelles	274
2.4.	Préparation des SUV et des LUV	275
2.5.	Reconstitution de peptides dans les modèles de membranes	276

Chapitre 1

Introduction

L'étude structurale et dynamique de protéines membranaires est l'une des thématiques développées par le laboratoire dans lequel j'ai effectué ma thèse. La première partie de cette thèse est consacrée à l'étude structurale et dynamique de peptides hydrophobes membranaires afin d'essayer de mieux comprendre le mécanisme de dimérisation/activation qui a lieu lors de certains processus de cancérisation. Dans une deuxième partie nous avons voulu améliorer la compréhension des mécanismes apoptotiques et ceci grâce à l'étude du peptide amphipathique BH4, domaine de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Afin de mieux appréhender ce travail, il est nécessaire de définir certains points tels que le phénomène de cancérisation, l'apoptose, les membranes biologiques et les membranes modèles, les protéines membranaires, les récepteurs à tyrosine kinase, les protéines anti-apoptotiques etc.

Dans ce qui suit nous allons donc présenter tout d'abord quelques généralités en cancérologie, puis sur les membranes biologiques. Nous détaillerons dans la troisième section la description des différents modèles de membranes. La quatrième section décrit le rôle et le fonctionnement des protéines membranaires et nous avons fait le point sur une partie des connaissances sur les récepteurs à tyrosine kinase, et plus particulièrement ceux de la famille ErbB, afin de décrire leur structure et leur mode de fonctionnement. La dernière section est consacrée aux protéines anti-apoptotiques. En fin de chapitre se trouvent les objectifs et le plan de ma thèse.

1. Généralités en cancérologie

1.1. Généralités

Un organisme humain est composé d'environ 60 000 milliards de cellules. Il existe 200 types de cellules différentes qui sont chacune capable de fonctions très diverses. Malgré ce nombre important de cellules, un ordre rigoureux règne dans l'organisme humain. Les cellules sont soumises à un renouvellement constant. Régulièrement une partie d'entre elles meurent, et sont alors

remplacées par de nouvelles cellules. Ainsi, au cours du temps, les tissus conservent leur forme et leur fonction respectives. Le cancer provient d'un déséquilibre de ce renouvellement. Il est dû à la prolifération anarchique d'une cellule anormale. Les tumeurs qui en résultent sont dites malignes quand ces cellules peuvent diffuser dans l'organisme. En diffusant une telle cellule peut entrer en contact avec un tissu différent de son tissu d'origine, et dans ce cas elle peut soit être détruite par le système de défense immunitaire, soit être acceptée et se multiplier en donnant une tumeur fille, appelée métastase. Dans ce dernier cas, si rien n'arrête la prolifération de la cellule cancéreuse, elle va se diviser avec un rythme de doublement ($1 > 2 > 4 > 8 > 16 \dots$) (Figure 1).

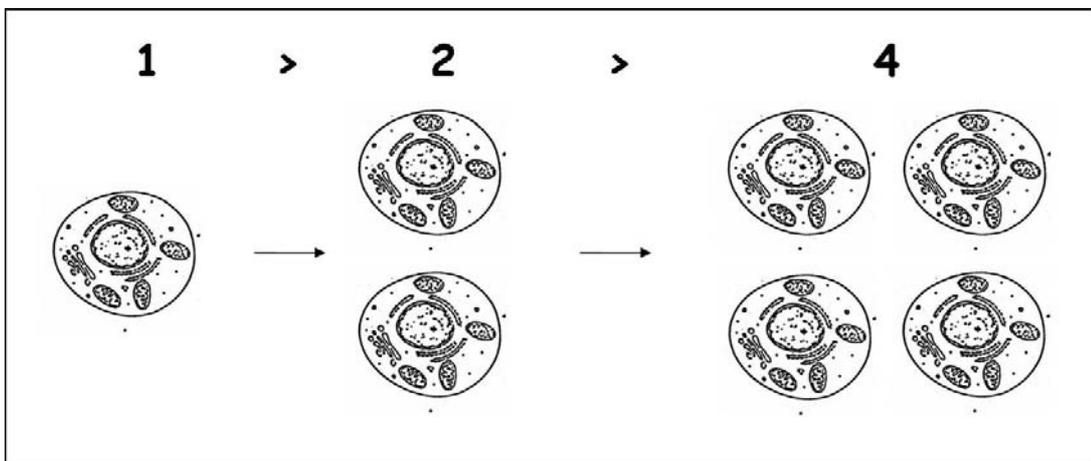


Figure 1. Représentation schématique de la prolifération cellulaire.

Pour atteindre un gramme, c'est-à-dire un milliard de cellules, il faut pour la plupart des cancers, 30 temps de doublement soit en moyenne 60 à 90 mois (5 à 8 ans). Quand une tumeur est cliniquement décelable, elle existe donc depuis plusieurs années.

Ainsi, pour comprendre la maladie cancéreuse, il faut d'abord étudier la cellule, les mécanismes qui président au contrôle de la division cellulaire et les acteurs qui entrent en jeu.

1.2. Objectif commun pour les anti-cancéreux : l'apoptose

Dans les thérapies anticancéreuses, autant les radiations ionisantes que la plupart des drogues utilisées en chimiothérapie partagent un unique objectif : le déclenchement de l'apoptose au sein des cellules tumorales.

L'apoptose est un mécanisme qui a été mis en évidence en 1972 par Kerr (Kerr *et al.*, 1972) pour caractériser une deuxième voie de fin de vie cellulaire. Jusqu'alors, la nécrose constituait la seule mort cellulaire connue. A la différence de la nécrose, qui intervient lorsque les cellules sont soumises à une agression extérieure, l'apoptose ou la mort cellulaire programmée est un processus au cours duquel la cellule développe elle-même les modifications biologiques nécessaires conduisant à sa destruction (Figure 2).

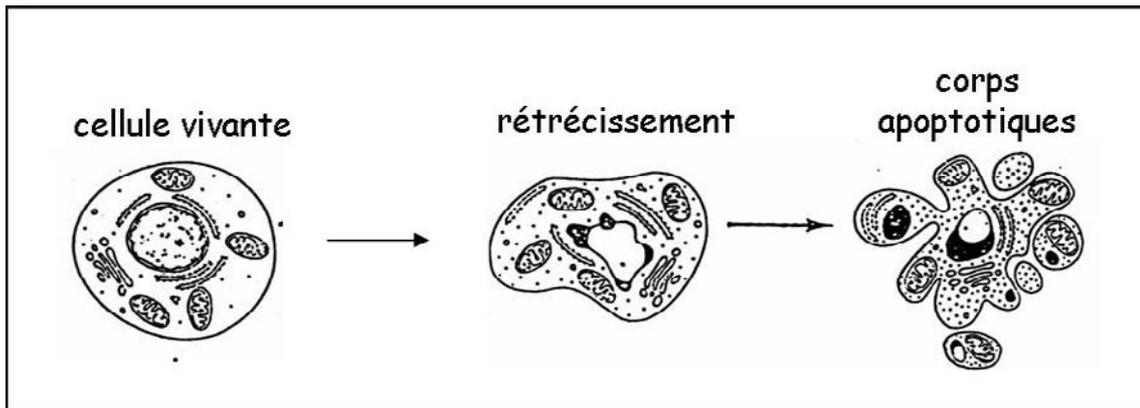


Figure 2 . Représentation schématique du mécanisme d'apoptose (d'après Jacqueline Bréard).

L'apoptose est un mode programmé et physiologique de la mort des cellules, c'est un mécanisme nécessaire qui participe activement à l'élimination des cellules âgées, dégénérantes et potentiellement dangereuses. L'apoptose est un processus contrôlé génétiquement qui est activé par des stimuli physiologiques normaux, intra ou extracellulaires de la cellule tels que, par exemple, une infection virale. De nombreuses pathologies possèdent pour origine un dérèglement de l'apoptose ou de la prolifération cellulaire : le cancer, le SIDA, les maladies auto-immunes et les maladies neuro-dégénératives (Thompson, 1995).

2. Généralités sur les membranes biologiques

2.1. Structure et composition

La cellule doit sa structure et ses fonctions à ses membranes, qui non seulement séparent le cytoplasme de l'environnement, mais délimitent aussi les compartiments intérieurs des cellules, notamment leur noyau et leurs organites cytoplasmiques. La formation des membranes biologiques repose sur les propriétés des lipides. Les membranes ont toutes une même infrastructure : une

bicouche lipidique emprisonnant des protéines. Ces protéines membranaires participent à de nombreuses fonctions ; certaines servent de récepteur à la cellule pour capter des signaux extérieurs, certaines transportent sélectivement des molécules à travers la membrane, d'autres prennent part au transport d'électrons et à l'oxydation phosphorylante. Les lipides et les protéines coopèrent pour former un film plus ou moins fluide qui isole la cellule du milieu extérieur et lui permet d'interagir. Ils forment un édifice supramoléculaire stabilisé par des interactions non covalentes de type hydrophobes/hydrophiles. Le modèle de "mosaïque fluide" a été proposé pour décrire la structure et l'organisation des membranes biologiques (Bothorel et Lussan, 1970 ; Singer et Nicolson, 1972) (Figure 3).

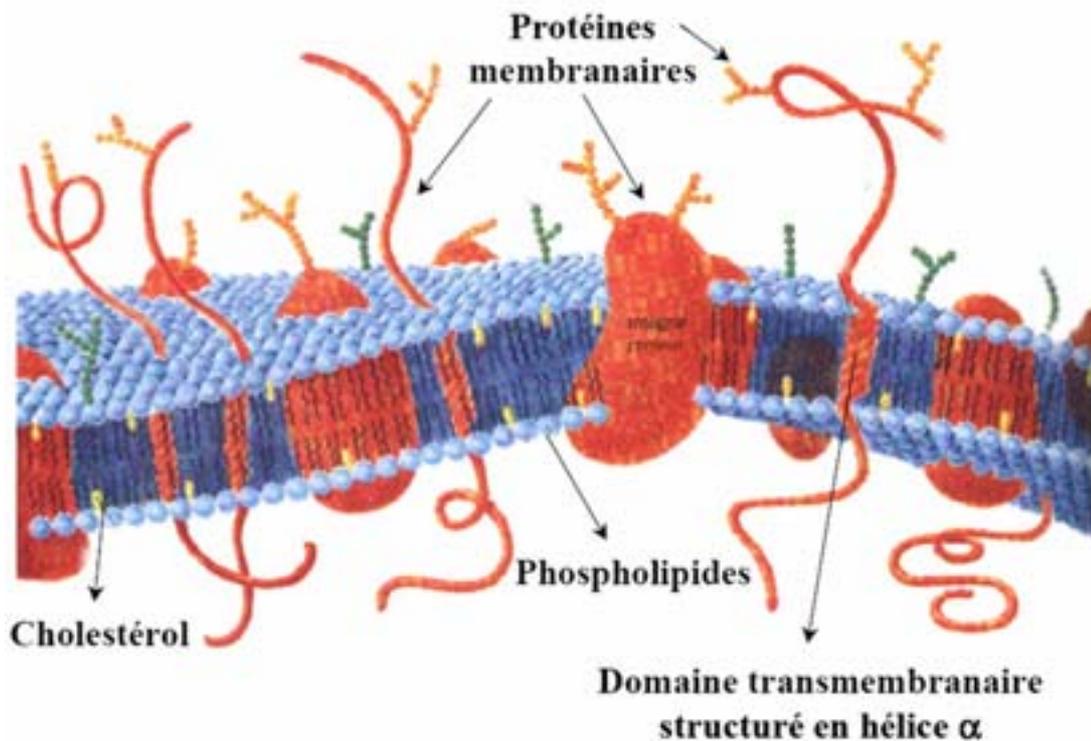


Figure 3. Représentation schématique d'une membrane biologique selon le modèle mosaïque fluide (d'après Voet et Voet, 1995).

Depuis une quinzaine d'années, l'organisation dynamique latérale des membranes biologiques est décrite à partir d'un nouveau concept. Certaines études ont mis en évidence l'existence de microdomaines lipidiques, ce concept des domaines lipidiques est également appelé "raft" (radeau). Les rafts sont présents à certains endroits de la membrane plasmique et particulièrement riches en cholestérol et en sphingomyéline qui rigidifieraient la membrane. Les

données concernant la rigidité des rafts ne sont pas clairement établies. Simon et Ikonen (Simon et Ikonen, 1997) ont étudiés les rafts et ont montré que ces domaines possédaient une composition protéique spécifique et contenaient également plusieurs molécules impliquées dans des voies de signalisation. Aussenac *et al.* ont étudié la rigidité des rafts par RMN des solides (Aussenac *et al.*, 2003). Ils ont plus particulièrement travaillé sur des échantillons de POPC/Sphingomyéline/Cholestérol-²H₅ (1/1/1) et SCRL : Liver-phosphatidylcholine/Liver-phosphatidylethanolamine/Sphingomyéline/Cerebrosides/ Cholestérol-²H₅ (1/1/1/1/2). Pour les deux compositions, ils ont pu identifier une phase liquide ordonnée, L₀, par des expériences de RMN du phosphore. Les propriétés dynamiques et structurales du cholestérol présent dans ces rafts ont été déterminées par le calcul des paramètres d'ordre et par la mesure des temps de relaxation. Dans des vésicules contenant des extraits naturels de lipides, ils ont pu démontrer l'existence de domaines rigides riches en cholestérol et en sphingomyéline.

Ces régions membranaires pourraient expliquer certains processus biologiques complexes tels que le trafic membranaire ou le transfert d'informations (Jacobson et Dietrich, 1999 ; London et Brown, 2000 ; Simon et Ikonen, 1997 ; Verkade et Simons, 1997).

2.1.1. Les lipides membranaires

Les éléments primordiaux de toute membrane cellulaire sont les phospholipides, des molécules amphipathiques formées de deux chaînes hydrophobes d'acides gras liées à un groupe polaire hydrophile phosphorylé. Comme leurs chaînes d'acide gras sont très peu solubles dans l'eau, les phospholipides forment spontanément des bicouches dans les solutions aqueuses, leurs chaînes hydrophobes tournées vers le cœur de la membrane, leur groupe polaire exposé sur l'une ou l'autre face, au contact de l'eau. Les lipides constituent donc le cœur de la membrane et les bicouches phospholipidiques constituent une barrière stable entre deux compartiments aqueux et sont la trame fondamentale de toutes les membranes biologiques. Les lipides constituent près de la moitié de la masse de la plupart des membranes cellulaires, bien que cette proportion varie selon le type de membrane (dans les membranes plasmiques on compte environ 50% de lipides et 50% de protéines et dans la membrane mitochondriale on compte 25% de lipides et 75% de protéines).

Il existe différentes classes de lipides membranaires (Figure 4) :

- les phospholipides
- les stéroïdes (tel que le cholestérol)
- les sphingolipides (telle que la sphingomyéline)
- les glycolipides

La composition d'une membrane en lipides varie selon l'origine de la membrane (Tableau 1), par exemple la membrane de *E. coli* comprend 80% de phosphatidyléthanolamine et celle des mammifères, beaucoup plus complexe, est faite de quatre phospholipides principaux, les phosphatidylsérines, phosphatidylcholines, phosphatidyléthanolamines et sphingomyélines.

Lipide	Membrane plasmique <i>E.coli</i>	Membrane plasmique Erythrocyte	Réticulum endoplasmique rugueux	Membrane mitochondriale externe
Phosphatidylcholine	0	17	55	50
Phosphatidylsérine	0	7	3	2
Phosphatidyléthanolamine	80	16	16	27
Sphingomyéline	0	18	3	5
Glycolipides	0	2	0	0
Cholestérol	0	40	6	<5
Divers	20	0	17	11

Tableau 1. Composants lipidiques des membranes en moles pour cent des principaux constituants. (D'après P.L. Yale, *the membranes of cells*, 2^{ème} édition (1993), Academic Press, San Diego, CA.)

En dispersion dans l'eau, les phospholipides se disposent en un film bi-moléculaire de quelques nanomètres d'épaisseur, le côté apolaire est enfoui au coeur de la membrane alors que le côté polaire est en contact avec l'eau. Cette structure est appelée bicouche lipidique, chaque couche de lipide constituant une demi membrane. La membrane n'est donc pas une structure solide mais une phase cristal-liquide. La bicouche lipidique se comporte donc comme un fluide bidimensionnel dans lequel les molécules hydrophobes possèdent une diffusion restreinte. Ces molécules sont libres de tourner sur elles-même et de diffuser dans le plan de la bicouche. A l'inverse, la bicouche bloque totalement les molécules polaires. La fluidité de la bicouche est primordiale pour une membrane et elle dépend de la composition en lipides et de la température.

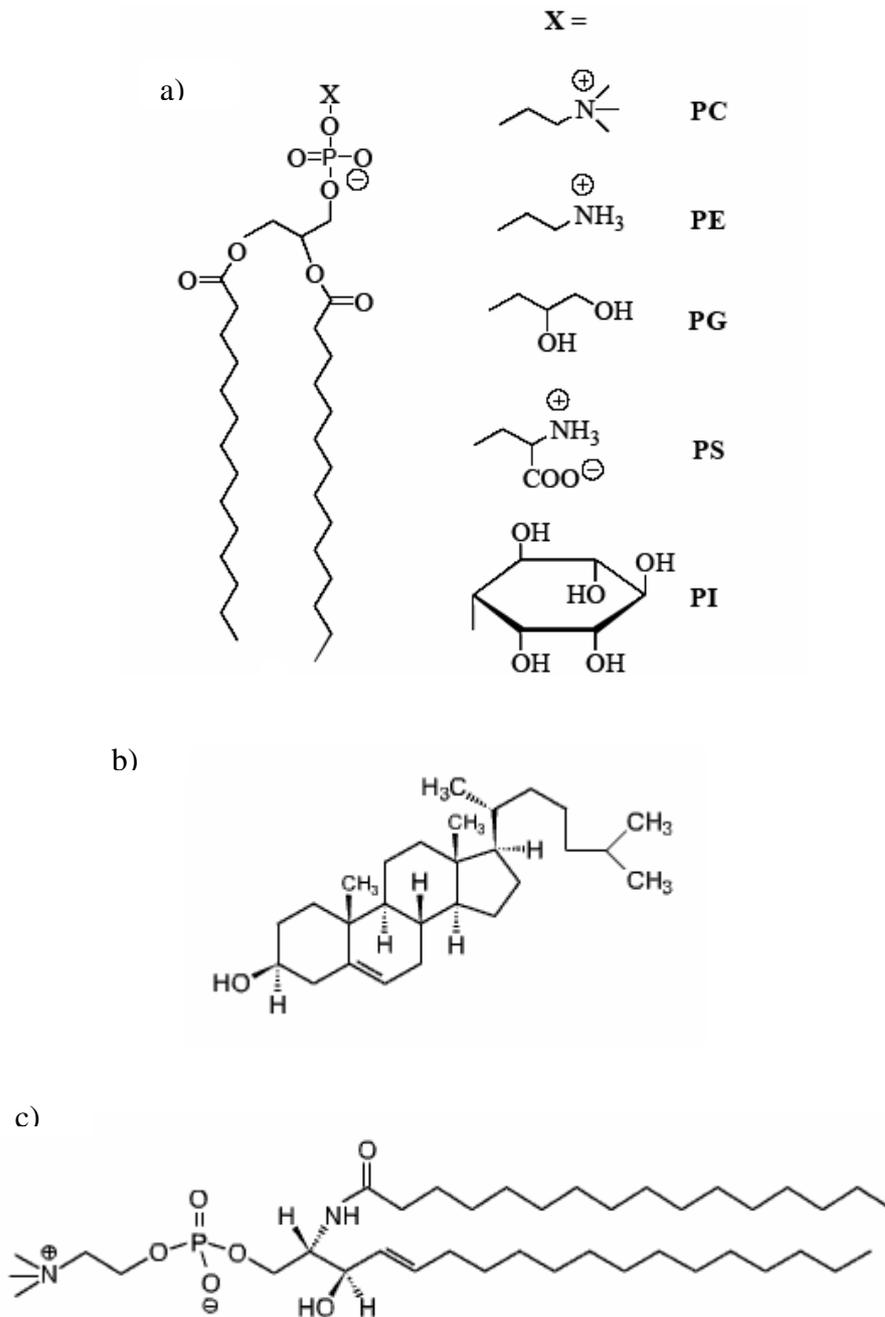


Figure 4. Structure de quelques lipides membranaires a) 1,2 dimyristoyl phospholipides : phosphatidyl-choline PC, -Ethanolamine PE, -Glycérol PG, -Sérine PS et -Inositol PI b) cholestérol et c) sphingomyéline.

Les membranes ont une asymétrie lipidique, c'est à dire que la composition en lipides des deux monocouches est souvent différente. Cette asymétrie est le résultat de la composition différente des deux compartiments aqueux de part et d'autre de la membrane ou d'une interaction spécifique entre un lipide de nature donnée et un constituant membranaire protéique localisé à une

interface. Dans ce cas, le lipide reste localisé à l'interface et l'asymétrie correspond à un état d'équilibre. L'asymétrie peut aussi être le résultat d'un transport actif de lipides d'une monocouche à l'autre et dans ce cas l'asymétrie correspond à un état stationnaire.

2.1.2. Les protéines

Les autres composants majeurs d'une membrane sont les protéines. Elles constituent 25% à 75% de la masse des diverses membranes d'une cellule. Le modèle de structure proposé par Singer et Nicolson en 1972 est une "mosaïque fluide" dans laquelle les protéines sont noyées au sein d'une bicouche lipidique (Figure 3). Le rôle des protéines est large : elles vont transmettre à l'intérieur de la cellule des informations sur le milieu extérieur, elles vont maintenir la forme et la stabilité de la membrane, elles vont servir de point d'ancrage à des structures extracellulaires ou intracellulaires et elles sont à l'origine de la dynamique membranaire.

On classe les protéines membranaires selon la nature de leur association avec la bicouche :

- les protéines intrinsèques sont enfouies directement au sein de la bicouche
- les protéines extrinsèques à la bicouche lipidique ne sont pas noyées dans la bicouche mais sont arrimées indirectement à la membrane par des interactions avec les protéines intrinsèques.

Les premières sont hydrosolubles et sont associées à la membrane avec les têtes polaires des lipides via des interactions électrostatiques. Elles sont confinées à la surface de la membrane ce qui favorise les interactions entre elles. Les secondes qu'on appelle aussi protéines transmembranaires sont associées à la membrane par des interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Dans certains cas la protéine est complètement localisée dans la bicouche, dans d'autres cas, la protéine a un accès d'un côté et/ou des deux côtés de la membrane. Certaines protéines transmembranaires ne traversent qu'une seule fois la membrane, d'autres la traversent plusieurs fois, comme la Bacteriorhodopsine (BR) qui possède 7 hélices transmembranaires.

2.2. Rôle des membranes biologiques

Chaque constituant membranaire a un rôle bien défini. Les lipides participent à la structuration de l'édifice membranaire, ils permettent la séparation entre les milieux intra et extra cellulaires. La membrane biologique est aussi le lieu privilégié d'échange de matière, de transfert d'informations et transformation d'énergie. Ce sont là les fonctions de base associées aux protéines membranaires.

Si les ions et la plupart des molécules polaires ne diffusent pas à travers la bicouche lipidique, un certain nombre d'entre elles, comme le glucose, est capable de traverser les membranes grâce à des protéines intrinsèques appelées transporteurs. Ces transporteurs se composent de plusieurs régions transmembranaires qui ménagent un tunnel au sein de la bicouche lipidique, tunnel par où les molécules polaires ou chargées franchissent la membrane. Le transfert d'information est transmis par des récepteurs membranaires qui fixent les messagers extracellulaires, ce qui induit un signal chimique à l'intérieur de la cellule. La transformation d'énergie est réalisée par des complexes protéiques, les ATP synthases, qui sont localisés dans la membrane interne des mitochondries. Les membranes biologiques possèdent leurs propres récepteurs et transporteurs ce qui leur donne leurs spécificités biologiques.

Les processus biologiques que nous venons d'énoncer ne sont pas tous parfaitement décrits. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, des modèles de membranes ont été développés. Cette approche biophysique limite la membrane biologique à seulement quelques constituants mais ces membranes modèles sont plus simples à paramétrer.

3. Les membranes modèles

Depuis quelques années, des membranes modèles ont été développées afin de créer un environnement proche des conditions naturelles. Parmi les modèles mis au point, nous pouvons mentionner :

- Les liposomes multilamellaires
- les extraits naturels de membranes (Wang *et al.*, 1997 ; Watts *et al.*, 1995)
- les amphipols (polymères amphipatiques) (Tribet *et al.*, 1996)
- les surfactants fluorés (Kimura *et al.*, 1996 ; McIntosh *et al.*, 1996)

- les micelles et les micelles mixtes (Fernandez *et al.*, 2001 ; Lindberg *et al.*, 2001, Sanders et Landis, 1995)
- les bicelles (Sanders et Prosser, 1998)
- Les DRM ou rafts (Edidin, 2001 ; Radhakrishnan *et al.*, 2000 ; van Meer et Lisman, 2002).

Nous avons utilisé pour nos études des liposomes multilamellaires comme modèle afin de caractériser la dynamique des lipides par RMN et les bicelles avec comme application l'étude structurale de protéines membranaires par dichroïsme circulaire.

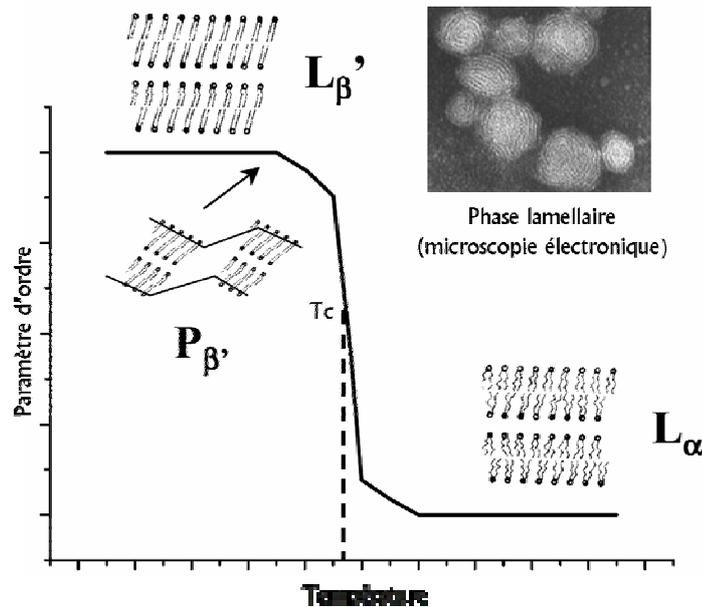
3.1. Les dispersions aqueuses de phospholipides

En présence d'eau, les phospholipides forment spontanément des phases cristal-liquide qui sont intermédiaires entre l'état liquide et l'état solide. Le diagramme de phases du phospholipide DPPC (dipalmitoylphosphatidylcholine) a été établi par les techniques de diffraction des rayons X et par analyse enthalpique différentielle en fonction de la température et du taux d'hydratation (Chapman, 1971, Rank *et al.*, 1974). Les phases cubiques, hexagonales et à "rubans" sont observées pour de faibles teneurs en eau (inférieurs à 10% en masse) et pour des températures supérieures à 80°C. Les phases lamellaires appelées L_{α} , L_{β}' , P_{β}' sont observées pour une teneur en eau supérieur à 20% en masse (le signe ' indique que les molécules sont inclinées par rapport à la bicouche lipidique). Pour une teneur en eau supérieure à 40% en masse, les propriétés du système membranaire ne dépendent plus de la quantité d'eau mais de la température. En effet, pour des basses températures, inférieures à la température de transition de phase d'un système lipidique, nous observons une phase gel (L_{β}') qui se caractérise par la conformation "tout trans" des chaînes aliphatiques des lipides. Lorsqu'on augmente la température, un désordre des chaînes apparaît et on observe une transition de conformations trans en conformation gauche (phase fluide L_{α}). La phase P_{β}' est une phase intermédiaire entre la phase gel et la phase fluide (Figure 5).

Les bicouches de phospholipides qui se forment spontanément en présence d'un excès d'eau, adoptent des états différents selon la température (propriété de thermotropisme). Le thermotropisme est caractérisé par la température de transition de phase T_c (température critique) ou T_m (température de fusion). T_m (ou T_c) est la température de fusion des chaînes aliphatiques

de la transition ordre-désordre. Cette valeur dépend de plusieurs paramètres notamment la structure du phospholipide, les longueurs des chaînes aliphatiques, le degré d'insaturation (Cevc, 1993). Plus les chaînes aliphatiques sont longues, plus la température critique est importante. Plus le nombre de doubles liaisons est important plus la température diminue.

a)



b)

Tête polaire Chaînes aliphatiques	PC	PE	PS	PG
C12 : 0*	-1	30.5	13	-2
C14 : 0	23.5	49.5	36	24
C16 : 0	41.5	65	54	41.5
C16 : 1 <i>cis</i>	-36	33.5		
C18 : 0	55.5	74	68	54.5
C18 : 1 <i>cis</i>	-14	-16		
C18 : 1 <i>trans</i>	9.5	35		
C20 : 0	66	83		
C22 : 0	75	90		
C24 : 0	80			

Figure 5. a) Représentation schématique des phases lamellaires en fonction de la température. T_c la température de transition de phase est représentée. L et P représentent les ordres à longues distances, L est le symbole d'un réseau mono dimensionnel lamellaire, P définit un réseau bi dimensionnel oblique, α et β représentent les ordres à courte distance, respectivement chaînes désordonnées, fluide pour le symbole α et chaînes partiellement ordonnées, gel pour β . b) Tableau représentant les températures critiques (en degrés C) en fonction de la tête polaire des lipides, du nombre de carbones et du nombre de doubles liaisons. (d'après Cevc, 1993). * le 1^{er} chiffre est le nombre total de carbones de la chaîne, le 2^{ème} chiffre est le nombre total d'insaturations.

3.2. Les micelles

Les micelles sont des agrégats de forme sphérique à tubulaire. Le centre de ces agrégats est constitué essentiellement par les chaînes hydrophobes du lipide. Cette organisation limite le contact entre l'eau et les parties hydrophobes du lipide.

Israelachvili a montré qu'il y existe une relation entre le paramètre de compactage (packing parameter) d'une molécule et la structure formée (Israelchvili *et al.*, 1976). Le paramètre de compactage est défini par : $P = v/a_0 l_c$ où v est le volume de la partie hydrophobe, a_0 représente la surface optimale de l'interface entre l'eau et la partie hydrophobe et l_c est la longueur des chaînes hydrophobes. Les micelles sont formées pour des valeurs de P assez faibles ($< 1/2$).

3.3. Les liposomes

Les liposomes se forment lorsque le paramètre de compactage est compris entre 0.5 et 1. Les liposomes sont constitués d'une ou plusieurs bicouches lipidiques refermées sur elles-mêmes et possèdent un milieu interne difficilement accessible aux molécules polaires ou chargées.

3.4. Un modèle de membranes intéressant: les bicelles

Gabriel *et al.* ont développé un nouveau modèle de membranes : les bicelles ou Bilayered micelles (Gabriel et Roberts, 1984 ; Gabriel et Roberts, 1986). Ces modèles de membranes sont constitués de deux classes de lipides : les lipides à chaînes longues aliphatiques (14 à 20 atomes de carbones) et les lipides à chaînes courtes (6 à 8 atomes de carbones). Dans ce travail nous avons utilisé la 1,2 dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) pour le lipide à chaîne longue et la dicaproylphosphatidylcholine (DCPC) pour le lipide à chaîne courte (Figure 6).

Ces nouveaux objets possèdent la forme d'une bicouche discoïdale, les lipides à chaînes longues constituent la partie plane de la bicouche et les lipides à chaînes courtes se répartissent dans le tore du disque (Sanders et Oxenoid, 2000 ; Sanders et Prosser, 1998).

Les bicelles ne possèdent donc pas de compartiment aqueux interne et conservent un domaine en bicouche dont les propriétés sont proches d'une phase cristal liquide. La taille des bicelles varie de quelques centaines d'Angström à 100 nm en fonction de la valeur du rapport [chaîne longue]/[chaîne courte] et en fonction de la concentration en sels utilisée (Arnold *et al.*, 2002 ; Picard *et al.*, 1999 ; Prosser *et al.*, 1996). Les bicelles sont translucides et ne diffusent pas

la lumière, elles peuvent donc être utilisées comme des modèles de membranes dans des expériences de spectroscopie optique, comme le dichroïsme circulaire.

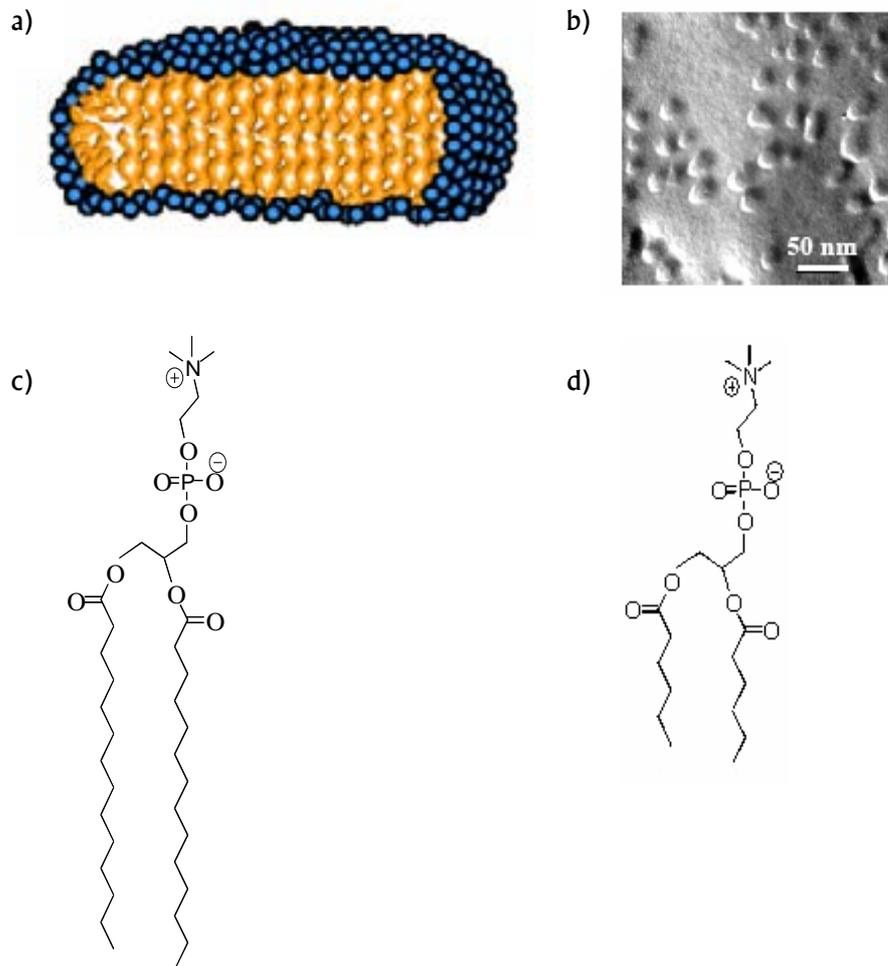


Figure 6. a) représentation schématique d'une bicelle. b) cliché de microscope électronique de bicelles (d'après Arnold *et al.*, 2002). c) structure du 1,2 dimyristoyl phosphatidylcholine et d) structure du dicalaproylphosphatidylcholine.

Les bicelles possèdent la propriété de s'orienter spontanément dans un champ magnétique intense (supérieur à 1 Tesla). L'application majeure des bicelles est l'étude structurale de biomolécules. Lorsqu'on incorpore une molécule biologique (un peptide par exemple) dans une bicelle, l'échantillon devient orienté et anisotrope. On peut alors mesurer les interactions magnétiques de couplage dipolaire et d'anisotropie du déplacement chimique, puisqu'elles dépendent de l'orientation de l'échantillon dans le champ (Bax et Tjandra, 1997 ; Tjandra et Bax, 1997). Cette méthode est utilisée pour déterminer la structure de protéines membranaires et pour

les protéines hydrosolubles (Cavagnero *et al.*, 1999 ; Losonczy et Pestegard, 1998). Les bicelles seront utilisées pour les études structurales de peptides marqués à l'azote 15 par RMN en mode statique. Seules les synthèses et les purifications seront abordées dans ce travail, la partie structurale sera réalisée par Cécile Loudet dans le cadre de son travail de thèse.

Dans notre travail nous avons travaillé avec les bicelles "classiques" formées de DMPC/DCPC pour étudier la structure des peptides transmembranaires par dichroïsme circulaire.

4. Généralités sur les protéines membranaires

Plus de 30% des protéines codées par le génome sont des protéines transmembranaires hydrophobes. La résolution de la structure tridimensionnelle de ces protéines reste aujourd'hui un challenge difficile. Très peu de structures ont été déterminées. La caractérisation structurale et fonctionnelle d'une protéine membranaire nécessite qu'elle soit conservée dans son environnement, c'est à dire dans la membrane lipidique. Ceci pose un problème majeur pour les études qui font appel aux principales techniques de détermination structurale (diffraction des rayons-X et la Résonance Magnétique Nucléaire en solution). Les interactions entre la protéine membranaire et les constituants de la membrane empêchent en effet la formation de cristaux ainsi que la réorientation isotrope de la molécule d'intérêt. Il existe d'autres techniques pour étudier les protéines membranaires, comme la microscopie électronique (coloration négative, cryomicroscopie...) ou les techniques de spectroscopie optique, telles que le dichroïsme circulaire. Cette dernière est une méthode très facile à mettre en œuvre, nécessite peu de matériel et à l'avantage d'être réalisable aussi bien en milieu liquide qu'en milieu membranaire. Cette méthode est adaptable pour n'importe quel type de peptides ou de protéines, il n'existe aucune limitation en taille. Nous pouvons aussi citer la RMN des solides qui permet de déterminer la structure des protéines membranaires dans leur environnement (membrane lipidique). Cette méthode est idéale mais difficile à réaliser.

4.1. Introduction générale sur les récepteurs des facteurs de croissances

Les récepteurs des facteurs de croissance à la surface des cellules constituent un groupe de molécules capables de recevoir des signaux de l'extérieur via leur partie extracellulaire pour les

transmettre à l'intérieur de la cellule et induire de nombreux messages cellulaires. Ces récepteurs ont généralement une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire. La transmission des messages à la cellule passe alors par l'autophosphorylation du récepteur sur les résidus tyrosine. Les récepteurs à tyrosine kinase peuvent être la cible de dérèglements dont les plus fréquents sont des mutations ponctuelles.

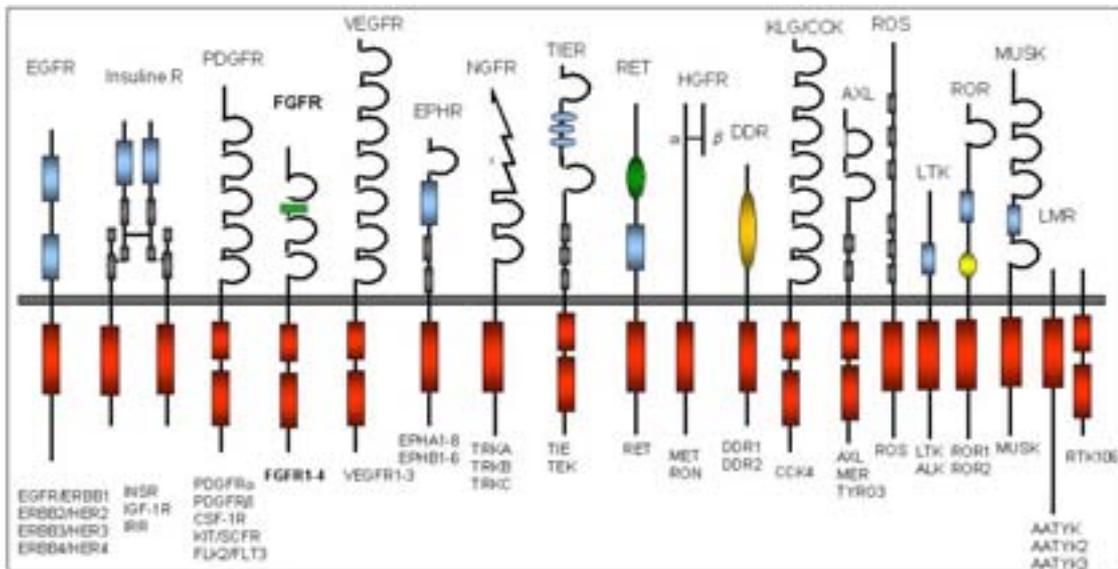


Figure 7 . Classification des récepteurs à activité tyrosine kinase (d'après Blume-Jensen et al., 2001). EGFR : récepteur aux facteurs de croissance épidermique, INSR : récepteur à l'insuline, PDGFR : récepteur aux facteurs de croissance des plaquettes, FGFR : récepteur aux facteurs de croissance des fibroblastes, VEGFR : récepteur aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire, EPHR: récepteur ephrin, NGFR: récepteur aux facteurs de croissance du système nerveux, TIE: récepteur à tyrosine kinase dans les cellules endothéliales RET: réarrangement pendant transfection, HGFR: facteur de croissance des hépatocytes, DDR: récepteur du domaine discoidin, KLG/CCK: colon carcinome kinase, AXL: tyro3PTK, ROS: RTK exprimé dans certaines cellules épithéliales, LTK: leucocytes tyrosine kinase, ROR: récepteur orphan, MUSK: muscle spécifique kinase, LMR: Lemur. Les rectangles rouges correspondent aux domaines à activité tyrosine kinase, les rectangles bleus aux domaines riche en cystéine, le rectangle vert aux boîte d'acide, les ovales bleus aux domaines type EGF, l'ovale vert aux domaines de type cadhérine, l'ovale jaune aux domaines de type discoidine, le rond jaune aux domaines Kringle, les carrés gris aux domaines de type fibronectine III.

A l'heure actuelle, il existe plus de 90 gènes codant des protéines à activité à tyrosine kinase, dont 58 codent des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Ces récepteurs se

regroupent en familles selon leur organisation structurale. 20 familles ont été décrites il y a 25 ans par Hunter et Sefton (Hunter et Stefton, 1980) (Figure 7). Ces récepteurs ont une structure et des mécanismes d'activation relativement similaires.

Les récepteurs à tyrosine kinase se composent d'une région extracellulaire comportant le site de fixation du ligand reliée par une seule région transmembranaire à un domaine intracellulaire douée d'une activité enzymatique de phosphorylation sur des résidus tyrosine. La partie extracellulaire comprend des domaines permettant au récepteur de dimériser (ou d'oligomériser) (Heldin, 1995 ; Ullrich et Schlessinger, 1990). La partie transmembranaire est caractérisée par une séquence hydrophobe dont la fonction est l'ancrage du récepteur à la membrane. Le domaine intracellulaire est formé de deux parties, une partie N-terminale capable de fixer l'ATP et une partie C-terminale dotée d'une activité phosphotransférase. Les RTK permettent la transmission d'un signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule et jouent ainsi un rôle important dans le contrôle de nombreux processus biologiques, tels que le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire (Ullrich et Schlessinger, 1990). Schlessinger émet l'hypothèse de l'existence de dimères (inactifs) même en l'absence de fixation de ligand (Schlessinger, 2000). Cette hypothèse conduit à l'existence de différents états d'équilibre entre dimères actifs et dimères inactifs. La fixation du ligand stabiliserait la formation du dimère actif.

L'activation des récepteurs à tyrosine kinase est régulée suivant un processus commun. Les kinases possèdent une séquence appelée "boucle d'activation" dont le positionnement par rapport au site de fixation de l'ATP, conditionne l'activité du récepteur. La boucle d'activation doit être phosphorylée pour que la kinase soit active. Dans la conformation dite "ouverte" il y a fixation de l'ATP et transphosphorylation, dans la conformation "fermée" la boucle masque le site de liaison de l'ATP, réduisant ainsi l'activité catalytique du récepteur. Ce mécanisme d'auto-inhibition, commun à de nombreuses kinases est fréquemment perturbé dans les cancers.

L'activation des récepteurs à tyrosine kinase passe par le mécanisme crucial de la dimérisation des récepteurs. En effet la dimérisation (ou l'oligomérisation), stabilisée par la fixation de ligand, est le mécanisme déclencheur de l'autophosphorylation des tyrosines (Ullrich et Schlessinger, 1990, Heldin, 1995). La fixation de ligand au domaine extracellulaire peut induire un réarrangement structural des récepteurs, facilitant l'autophosphorylation des tyrosines. A l'heure actuelle, les mécanismes liés à la transduction du signal du domaine extracellulaire vers le

domaine intracellulaire, via la dimérisation des récepteurs, ne sont pas bien connus. Dans certains cas, la dimérisation est certes nécessaire pour l'activation tyrosine kinase mais n'est pas suffisante. L'exemple est celui de l'étude de ErbB2 appartenant à la famille de l'EGFR, où l'activation du récepteur est dépendante de l'orientation relative de chaque monomère dans le dimère (Burke et al., 1998).

4.2. Les récepteurs des facteurs de croissance de l'épiderme

Les récepteurs des facteurs de croissance de l'épiderme ErbB-2 chez l'homme et son homologue Neu chez le rat font partie des récepteurs à tyrosine kinase de classe I et sont impliqués dans divers processus biologiques (multiplication, différenciation etc...)(Bargmann et al., 1986 ; Jones et al., 1998a). Cette famille est composée de 4 membres : ErbB1/HER1 ou récepteur au facteur de croissance de l'épiderme (EGFR), ErbB2/HER2 également appelé Neu chez le rat (ces deux récepteurs de 1255 et 1257 acides aminés partagent 88% d'homologie sur l'ensemble de leur séquence), ErbB3/HER3 et ErbB4/HER4. La dérégulation de signalisation de ces récepteurs entraîne de nombreuses pathologies (cancer du sein, poumon etc...). Comme nous l'avons vu au paragraphe précédent, ces récepteurs participent à la fonction de signalisation cellulaire et sont composés de trois régions distinctes. En présence d'un ligand, le récepteur va être activé en formant un homodimère ou hétérodimère, stabilisé par des interactions hydrophobes inter domaines transmembranaires. La forme dimérique induit la propagation d'un signal chimique à l'intérieur de la cellule via une cascade de réactions chimiques.

Le domaine transmembranaire joue aussi un rôle important dans la dimérisation et la stabilisation du dimère. Il a été montré que les domaines transmembranaires ErbB s'associent fortement en l'absence des domaines extracellulaires suivant l'ordre :

$\text{ErbB4-TM} > \text{ErbB1-TM} \approx \text{ErbB2-TM} > \text{ErbB3-TM}$ (Mendrola et al., 2002).

Dans la famille des ErbB, les récepteurs ErbB2 et ErbB3 sont particuliers. En effet, ErbB2 possède une forte activité tyrosine kinase, mais ne fixe pas de ligand, alors que ErbB3 fixe des facteurs de croissance mais ne possède pas d'activité tyrosine kinase. Cependant ErbB2 et ErbB3 peuvent participer à la transduction du signal par la formation d'hétérodimères avec les autres récepteurs. Le fait que le récepteur Neu peut-être activé sans fixation de ligand par une simple mutation ponctuelle (Val→Glu) dans le segment transmembranaire montre que l'hélice qui relie le

domaine extracellulaire du domaine intracellulaire ne reste pas passive lors du processus de dimérisation des récepteurs.

4.2.1. Le récepteur ErbB2

Les récepteurs Neu/ErbB2 sont codés par des proto-oncogènes. Dans sa forme oncogénique Neu/ErbB2 est impliqué dans une multitude de cancers (sein, estomac, poumon, ovaire etc...). L'oncogénicité de Neu s'exprime de 3 façons : i) soit par surexpression, ii) soit par délétion de résidus dans les domaines intra et extracellulaire, iii) soit à cause d'une mutation ponctuelle Val/Glu située dans le fragment transmembranaire. Le gène ainsi altéré conduit soit à la production de protéines anormales, soit à la production en quantité aberrante de protéines normales. Ceci a pour conséquence l'apparition des processus cancéreux.

- Délétion :

Les récepteurs ErbB2 peuvent être activés par la délétion de quelques acides aminés dans les domaines intra et extra cellulaire (Bargmann et Weinberg, 1988b ; Segatto *et al.* 1988) entraînant ainsi la multiplication cellulaire.

- Surexpression

L'augmentation de la quantité de récepteur dans les tissus touchés par les tumeurs peut provenir soit d'une amplification du nombre de copies du gène ErbB2 ou d'une altération au niveau de la transcription des gènes (Hynes et Stern, 1994).

- Mutation

La mutation unique d'un résidu valine par un résidu acide glutamique au sein du domaine transmembranaire de neu/erbB-2 provoque un changement important dans l'activité du récepteur. Le récepteur muté présente alors une activité constitutive en absence de ligand qui induit une prolifération cellulaire de façon non régulée, soit un processus de cancérisation (Hynes et Stern, 1994). Les gènes codant pour ces récepteurs sont les plus fréquemment altérés dans les cancers humains du sein et du système nerveux. La substitution de Val par Glu a pour origine la

substitution d'une thymine par une adénine dans la séquence du gène, en effet la valine ayant pour codon GTG devient l'acide glutamique qui a pour codon GAG.

4.2.2. Récepteur ErbB2 : cible privilégiée d'agents thérapeutiques

L'anticorps appelé trastuzumab (ou Herceptine) reconnaît spécifiquement le domaine extracellulaire des récepteurs et inhibe la croissance tumorale (Baselga, 2001 ; Slamon *et al.*, 2001). Cet anticorps est utilisé dans le traitement du cancer du sein où ErbB2 est surexprimé. L'association de ce médicament à une chimiothérapie classique augmente les bénéfices cliniques. Mais dans de nombreux cas la surexpression de ErbB2 dans un cancer donne un pronostic très défavorable quant à la survie du patient. Cho et ses collaborateurs ont publié la structure extracellulaire de ErbB2 seul et complexée avec l'Herceptine (Cho *et al.*, 2003). L'Herceptine se lie à ErbB2 sur la portion C-terminale du domaine IV (Figure 8). La Figure 8 montre les structures cristallographiques du domaine extracellulaire de ErbB2.

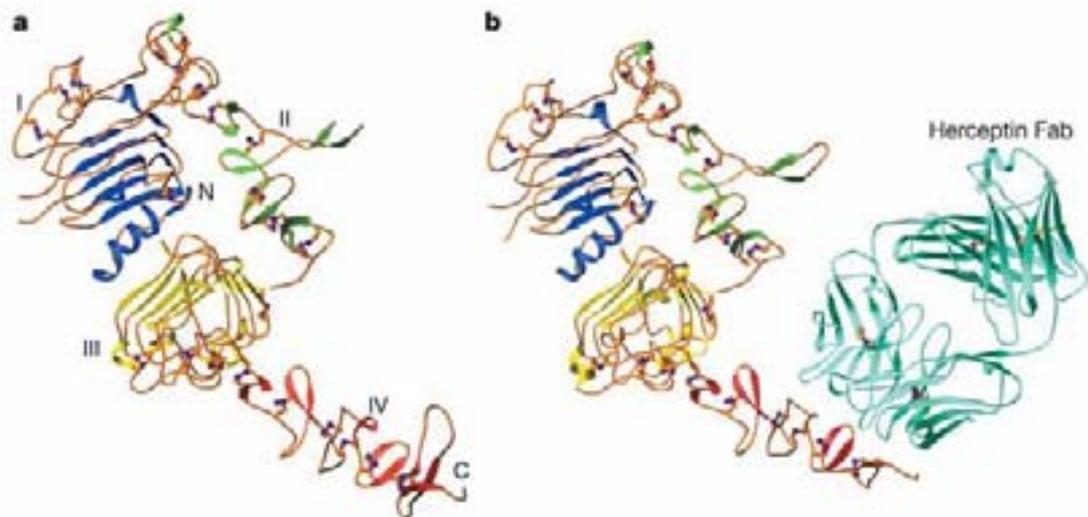


Figure 8 . Structure du domaine extracellulaire de ErbB2 a) représentation de ErbB2 (code PDB : 1N8Y) b) représentation de ErbB2 complexé avec l'Herceptine Fab (code PDB : 1N8Y). Les domaines de la partie extracellulaire sont numérotés sur le graphe a). Les terminaisons C et N sont notés. L'Herceptine est de couleur cyan. (d'après Cho *et al.*, 2003).

La principale différence entre ces deux structures (seule et complexée) est la variation de l'angle entre les domaines III et IV de 7°. La comparaison des domaines extracellulaires de ErbB2, ErbB3 (Cho et Leahy, 2002) et ErbB1 (Fergusson *et al.*, 2003 ; Garrett *et al.*, 2002) indique que les domaines I et II et les domaines III et IV conservent la même orientation relative. La configuration fermée est caractérisée par des contacts étroits entre les domaines II et IV et la configuration ouverte est caractérisée par des contacts étroits entre les domaines I et III. La structure du domaine ErbB2 extracellulaire prouve que l'accepteur de ligand s'est fermé vers le haut de sorte que les domaines I et III soient en contact directement (Cho *et al.*, 2003 ; Garrett *et al.*, 2002).

Un autre anticorps est utilisé contre le récepteur ErbB2, connu sous le nom de pertuzumab (Vajdos *et al.*, 2002), est actuellement en phase II sur des patients atteints de tumeurs aux seins, poumons, prostate et ovaires, où le récepteur n'est pas surexprimé (la phase II correspond à la phase efficacité, elle s'effectue chez des malades, en général en nombre restreint, présentant une maladie bien caractérisée et susceptible d'être améliorée par le médicament étudié. Le but de cette phase est de vérifier l'activité thérapeutique ou l'efficacité prévisible d'après les données de l'expérimentation animale, et de déterminer la posologie efficace). Franklin et ses collaborateurs ont publié la structure cristallographique du domaine extracellulaire de ErbB2 complexé avec le pertuzumab (Franklin *et al.*, 2004) (Figure 9).

Le pertuzumab se fixe au centre du domaine II de ErbB2 et bloque ainsi la boucle de dimérisation et empêche l'hétérodimérisation (Figure 10). La structure du domaine extracellulaire de ErbB2 couplée avec le pertuzumab est très proche de celle couplée avec le trastuzumab. Seul le domaine IV du complexe ErbB2/pertuzumab subit une rotation de 20° par rapport au reste de la protéine.

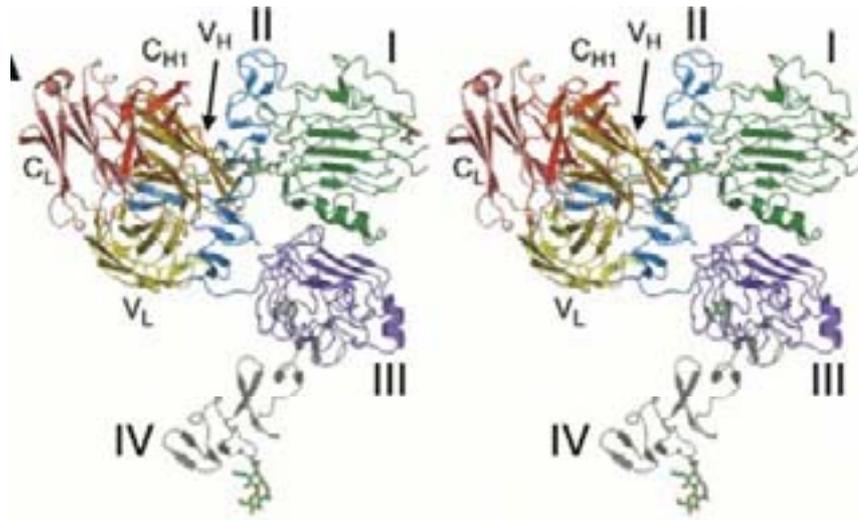


Figure 9. Structure du domaine extracellulaire de ErbB2 complexé avec le pertuzumab représenté en stéréo. Les domaines de la partie extracellulaire sont numérotés sur le graphe. ErbB2 est coloré par domaine, avec le domaine I (résidus 1-195) en vert, le domaine II (196-320) en bleu, le domaine III (321-488) en pourpre, et le domaine IV (489-560) en gris. Le pertuzumab est coloré par domaine et chaîne, avec le domaine variable à chaînes légères (résidus 1-109) en jaune-clair, le domaine variable à chaînes lourdes (1-113) en or, le domaine constant à chaînes légères (110-214) en rose, et le domaine constant à chaînes lourdes (114-216) en rouge (d'après Franklin *et al.*, 2004).

Beaucoup d'autres études cliniques ont été effectuées (Carter *et al.*, 1999, 1992, Ranson et Sliwkowski, 2002 ; Kute *et al.*, 2004). Cependant, les anticorps utilisés contre le cancer du sein ne fonctionnent pas bien et d'autres approches ont été développées, notamment l'utilisation d'un couplage entre un anticorps et un agent cytotoxique ou de petites molécules inhibiteurs de la tyrosine kinase etc.

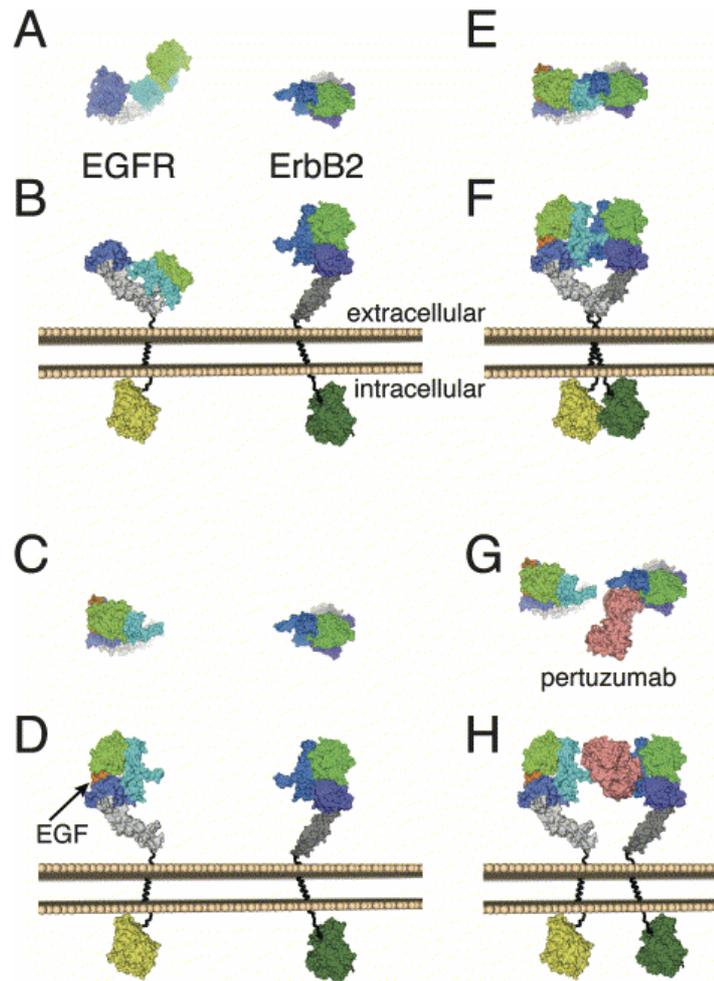


Figure 10. Hétérodimerisation de l'EGFR avec ErbB2. Les images A, C, E et G sont vues d'en haut et les images B, D, F et H sont vues de côté. Ces images représentent les différentes étapes de l'hétérodimerisation. Les domaines extracellulaires I, II, III et IV sont représentés respectivement en vert, bleu, violet et gris. L'EGFR est toujours à gauche et l'ErbB2 à droite. Le pertuzumab est représenté en orange. Le domaine transmembranaire est en noir. Les domaines intracellulaires sont en jaune et en vert. A et B : EGFR sans molécule de ligand fixé en proximité de ErbB2. Le domaine extracellulaire de EGFR est dans une conformation fermée qui ne permet pas la dimérisation (Cho et Leahy 2002 ; Ferguson et al., 2003). C et D : EGFR après fixation du ligand : EGFR est en configuration ouverte avec exposition des boucles de dimérisation. E et F : EGFR et ErbB2 sont dimérisés via leur boucle de dimérisation. G et H : la fixation du pertuzumab sur ErbB2 bloque l'hétérodimerisation en empêchant la boucle de dimérisation de EGFR d'interagir avec ErbB2. (d'après Franklin et al., 2004).

4.2.3. Les données structurales de ErbB2

Comme nous venons de voir, ErbB2 se compose de trois domaines : une partie extracellulaire, un unique fragment transmembranaire et un domaine intracellulaire. Le fragment transmembranaire occupe une place centrale dans le mécanisme biologique des récepteurs à tyrosine kinase dû à la localisation spécifique de la mutation (partie transmembranaire).

La séquence du domaine transmembranaire de Neu et ErbB2 est décrite ci dessous:

	656		664		680																				
Neu	Val	Thr	Phe	Ile	Ile	Ala	Thr	Val	Val	Gly	Val	Leu	Leu	Phe	Leu	Ile	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ile	Leu	Ile	
	650		659		675																				
ErbB2	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile	Ser	Ala	Val	Val	Gly	Ile	Leu	Leu	Val	Val	Val	Leu	Gly	Val	Val	Phe	Gly	Ile	Leu	Ile

Tableau 2. Séquence du domaine transmembranaire de Neu (rat) et ErbB2 (humain). Les acides aminés communs sont en gris. La mutation Val/Glu en position 664 chez Neu et 659 chez ErbB2 conduit à l'activation constitutive du récepteur.

- Etude de la structure des domaines extracellulaire et intracellulaire par cristallographie

Dans le domaine structural les études sont très rares surtout parce qu'il est difficile d'étudier les protéines membranaires dans leur environnement naturel. Les études de radiocristallographie nécessitent l'action de détergents puissants et la cristallisation très délicate de protéines souvent hydrophobes. Des études ont permis de déterminer la structure extracellulaire et intracellulaire de erbB-2. Comme nous l'avons vu précédemment Cho et ses collaborateurs ont déterminé la structure du domaine extracellulaire de Neu seul et complexé avec l'Herceptine (antigen-binding fragment) (Cho, 2003) par cristallographie avec une résolution de 2.4 et 2.5 Å respectivement (Figure 8). Franklin et collaborateurs ont résolu en 2004, la structure cristallographique du domaine extracellulaire de ErbB2 complexé avec un fragment de pertuzumab (Franklin *et al.*, 2004). Cette structure a été obtenue avec une résolution de 3.2 Å (Figure 9). La structure du domaine extracellulaire de ErbB2 complexé avec le pertuzumab est très proche de la structure couplée avec le trastuzumab.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de structure du domaine entier intracellulaire. En revanche Stamos et ses collaborateurs ont résolu la structure du domaine kinase du récepteur à l'EGF par cristallographie (Stamos *et al.*, 2002).

- Etude du domaine transmembranaire par DC et RMN

Les fragments de Neu_{TM35} et de Neu*_{TM35} très hydrophobes ont été synthétisés par voie chimique et purifiés au Laboratoire mais peuvent être aussi exprimés par biosynthèse pour être étudiés en tant que modèles (Jones *et al.*, 2000).

Sur le plan biochimique, de récentes publications ont permis de connaître les interactions transmembranaires (Smith, 2002). D'autre part plusieurs travaux portent sur l'expression, la purification du peptide et sur son assemblage dans les membranes (Jones, 2000).

La structure secondaire et tridimensionnelle de Neu_{TM35} a été déterminée par dichroïsme circulaire et par RMN en solution (Figure 11).

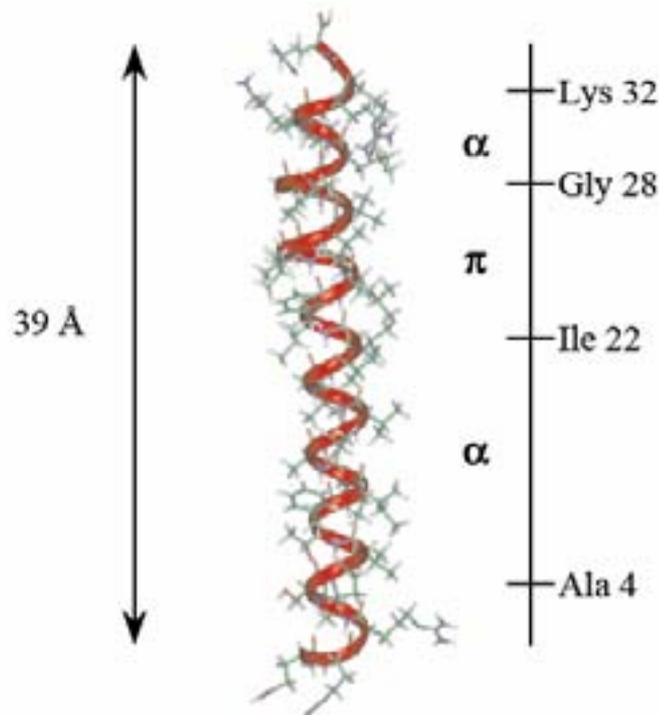


Figure 11 . Structure tridimensionnelle du fragment transmembranaire, Neu_{TM35}, déterminé par RMN du proton dans le TFE (d'après Goetz *et al.*, 2001). Les régions structurées en hélice α et en hélice π ainsi que la taille du peptide sont indiqués.

Ces travaux ont montré d'une part que la structure secondaire est conservée lorsque le fragment est reconstitué dans des membranes modèles constituées de phospholipides (Goetz *et al.*, 2001), d'autre part que les peptides se structurent en hélice α dans le trifluoroéthanol ainsi que dans les modèles de membranes (Goetz *et al.*, 2001 ; Gullick *et al.*, 1992)

Les techniques de RMN en solution ou RMN du solides (rotation à l'angle magique) ont également permis d'obtenir des données structurales sur le domaine transmembranaire du récepteur monomérique (Goetz *et al.*, 2001 ; Houliston *et al.*, 2003 ; Houliston *et al.*, 2004) ou dimérique (Smith *et al.*, 1996b). La structure en solution dans le TFE montre une déformation en hélice π sur deux tours (Goetz *et al.*, 2001). Houliston a travaillé sur les peptides Neu_{TM36} (Gln⁶⁵¹-Lys⁶⁸⁶) et Neu*_{TM36}. Les travaux d'Houliston ont aussi mis en évidence cette déformation (hélice π) mais elle est moins marquée.

L'équipe de C. Grant (Jones *et al.*, 1998b; Jones *et al.*, 1997 ; Sharpe *et al.*, 2000 ; Sharpe *et al.*, 2001) étudie le processus de dimérisation de ErbB2 (humain) par des expériences de RMN du deutérium "large bande" afin de suivre la dynamique, les interactions et les changements de conformations de la partie transmembranaire dans une membrane hydratée. Les études de RMN dans les bicouches de POPC montrent que la mutation induit des changements structuraux caractérisés par des modifications de l'orientation des chaînes latérales des résidus Ser⁶⁵⁶/Gly⁶⁶⁰, motif participant à la dimérisation (Sharpe *et al.*, 2000). Dans une bicouche de POPC avec et sans cholestérol, les segments transmembranaires (muté et sauvage) tendent à se dimériser voire s'oligomériser (Jones *et al.*, 2000 ; Jones *et al.*, 1998b). Le comportement du sauvage et du muté est similaire mais leurs spectres présentent quelques différences au niveau structural.

De récentes expériences ont été réalisées dans le groupe de Smith (Smith *et al.*, 2002) afin de déterminer la structure secondaire locale et de mesurer les distances inter-hélices dans la région transmembranaire de peptides modèles (natif et muté) du récepteur activé en utilisant la résonance rotationnelle en RMN (REDOR). Ils ont calculé les distances inter nucléaires et ont trouvé des distances semblables (4.5 ± 0.2 Å) pour Neu_{TM38} (Ala⁶⁴⁹-Lys⁶⁸⁹) et Neu*_{TM38}, montrant que la région près de la mutation (position 664) est hélicoïdale et n'est pas influencée par la mutation. Ces données ont pu fournir des contraintes suffisantes pour modéliser le dimère transmembranaire et définir l'orientation des hélices transmembranaires dans le récepteur activé. Leurs résultats confirment le modèle de "rotation flexible" introduit par Moriki lors de l'activation du récepteur.

- Etude sur la structure des monomères et des dimères par modélisation moléculaire

La structure des monomères et des dimères est étudiée au cours d'expériences de dynamique moléculaire depuis plus de 10 ans. Les premières études sur le récepteur Neu/ErbB2 ont été réalisées dans le vide (Sajot et Genest, 2000). Ces calculs ont été effectués sur le domaine transmembranaire sauvage (Neu_{TM35}) et muté (Neu*_{TM35}). Ces résultats ont montré que le peptide Neu_{TM35} est plus flexible que le peptide Neu*_{TM35} (Garnier *et al.*, 1994). De plus ces calculs montrent que les peptides sont en hélice et une transition $\alpha \rightarrow \pi$ est observée. Cette transition a été mise en évidence par la suite en utilisant des champs de forces différents et en changeant l'environnement du peptide (dans le vide ou dans un environnement lipidique de DLPE) (Duneau *et al.*, 1996 ; Duneau *et al.*, 1997 ; Duneau *et al.*, 1999). La présence de l'hélice de type π contribuerait à la stabilité de la dimérisation. Plus récemment, la structure du dimère a été étudiée (Garnier *et al.*, 1997). Les résultats montrent que le mécanisme de dimérisation de Neu_{TM35} et de Neu*_{TM35} est similaire et que les hélices ont une préférence pour les interactions de type gauche. Plusieurs simulations ont été effectuées et il a été montré que les hélices transmembranaires s'associaient de différentes façons. Lors de tous ces essais, l'hélice π a été observée. Dans un modèle trouvé par Sajot et Genest (Sajot et Genest, 2001) la chaîne latérale de l'acide glutamique en position 664 forme une liaison hydrogène inter-hélice avec le carbonyle de l'alanine en position 661. L'association des hélices a été observée par modélisation dans différents environnements membranaires composés de DMPC et de POPC (Garnier *et al.*, 2003 ; Aller *et al.*, 2005).

- Etude de la structure entière de ErbB2 par modélisation moléculaire

La structure générale du dimère a été récemment étudiée par Bagossi (Bagossi *et al.*, 2005) par modélisation moléculaire. Pour faciliter la compréhension de la structure et de la fonction du récepteur au niveau moléculaire, un modèle moléculaire a été établi pour le dimère erbB2. Cette modélisation s'est basée sur les résultats connus de rayons-X et de RMN des parties extracellulaires, transmembranaires et intracellulaires (Cho, 2003, Franklin *et al.*, 2004, Stamos *et al.*, 2002, Goetz *et al.*, 2001, Cho et Leahy 2002 ; Ferguson *et al.*, 2003). Le domaine extracellulaire a été placé au-dessus de la membrane et la distance entre ces deux domaines a été déterminée grâce à des expériences de FRET. La représentation du dimère ErbB2 complexé avec l'Herceptine proposé par Bagossi est représentée sur la Figure 12.



Figure 12. Représentation de l'homo-dimère ErbB2 (en foncé) complexé avec l'Herceptine (en clair) proposé par Bagossi (Bagossi *et al.*, 2005).

- Etude biologique sur le récepteur

Le groupe de James Sturgis a récemment rapporté les effets des peptides hydrophobes sur l'activation des récepteurs d'ErbB2 et d'EGF dans les cellules cancéreuses humaines (Bennasroune *et al.*, 2004). Leurs résultats ont démontré que les peptides transmembranaires de ces récepteurs peuvent empêcher spécifiquement l'activation du récepteur correspondant dans des cellules entières. Leur recherche vise à obtenir une information quantitative sur les interactions homo- et hétéro-dimères entre domaines transmembranaires des 4 membres de la famille ErbB (ErbB1, ErbB2, ErbB3 et ErbB4) *in vitro* (à l'aide de détergents ou de liposomes) et *in vivo* (à l'aide de cultures cellulaires).

Moriki propose un mode d'activation du récepteur à tyrosine kinase (Moriki *et al.*, 2001). Ils ont montré par réticulation chimique et par centrifugation qu'en absence de ligand le récepteur est capable de former un dimère et existe comme dimère préformé à la surface de la cellule. De plus

ils ont également analysé la dimérisation du récepteur en insérant des résidus de cystéine aux positions stratégiques (partie extracellulaire) et montrent que les récepteurs mutants forment spontanément des ponts disulfures. L'analyse cinétique de la formation de la liaison disulfure indique que la dimérisation du récepteur induit une rotation ou une torsion flexible au niveau de la région qui jouxte la partie externe de la membrane.

Toutes ces données (pas toujours en accord) montrent la complexité des mécanismes d'association des segments transmembranaires de ces récepteurs. Néanmoins il est admis que la mutation (Val→Glu) permet l'activation spontanée du récepteur, par stabilisation de l'interface dimérique par la formation de liaison hydrogène impliquant les chaînes latérales de Glu. Le domaine transmembranaire contribue à la dimérisation des récepteurs et joue un rôle plus important qu'un simple lien entre les domaines extracellulaires et intracellulaires. Le fait que le récepteur Neu peut-être activé sans fixation de ligand par une simple mutation ponctuelle Val→Glu dans le segment transmembranaire montre que l'hélice transmembranaire qui relie le domaine extracellulaire au domaine intracellulaire ne reste pas passive lors de la dimérisation des récepteurs. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier la structure et la dynamique des peptides transmembranaires Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} par DC et RMN afin de mieux appréhender le mécanisme de dimérisation.

4.2.4. Développement de la RMN pour les études structurales de protéines

- La RMN des solutions

La stratégie employée pour déterminer la structure 3D à la résolution atomique d'une protéine a été développée par Wütrich (Wütrich, 1986). L'attribution des résonances des spectres de la protéine se fait à l'aide des séquences "classiques" de RMN 2D : TOCSY (Total Correlation Spectroscopy, Braunschweiler et Ernst, 1983) et COSY (Correlation Spectroscopy, Nagayama *et al.*, 1980). La détermination de la séquence primaire et des contraintes de distances est donnée grâce à la séquence de type NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement, Noggle et Shirmer, 1971) ou ROESY (Rotational nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy, Bothner *et al.*, 1984 ; Bax et Davis, 1985). Ces techniques classiques nous permettent de déterminer les structures de protéines possédant 300 acides aminés. En revanche, lorsqu'il y a plus de 100

résidus, les cartes sont très complexes à interpréter. Le développement d'une nouvelle séquence d'impulsion TROSY (Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) permet d'obtenir des cartes moins complexes et de déterminer les structures de protéines plus rapidement (Arora *et al.*, 2001 ; Fernández *et al.*, 2001).

La détermination structurale de protéines en RMN des liquides est la 1^{ère} étape mais ces structures ne sont pas nécessairement voisines des structures membranaires, qui possèdent des degrés de liberté plus restreints. La 2^{ème} étape consiste donc à étudier la structure des protéines en milieu membranaire grâce à la RMN des solides. A l'heure actuelle l'étude des protéines membranaires s'est beaucoup développée grâce à de nouvelles méthodes (RMN MAS, RMN en bicouches lipidiques orientées, séquence PISEMA). Ces approches permettent d'étudier ces protéines à l'état solide (poudre sèche) et dans un environnement membranaire.

- La RMN des solides "HR-MAS"

L'utilisation d'une sonde HR-MAS (High resolution – Magic Angle Spinning) a plusieurs intérêts dans l'étude structurale des protéines. La rotation à l'angle magique (54.75°) permet de moyenniser les interactions dipolaires, supprimant ainsi les interactions magnétiques internes anisotropes (la moyenne spatiale étant ainsi réduite à zéro) à condition que la vitesse de rotation de l'échantillon soit suffisamment rapide. Les spectres obtenus en rotation sont donc typiques d'un spectre liquide. L'attribution des résonances et l'information structurale peuvent être ainsi en quelque sorte analogues à celles obtenues en RMN en solution.

A basse température et avec rotation rapide de l'échantillon l'angle magique, il est possible d'attribuer les résonances de résidus du squelette peptidique (Ergorova-Zachernyuk *et al.*, 2001 ; McDermott *et al.*, 2000). Certaines techniques sont utilisées pour mesurer les angles de torsion du squelette peptidique afin de prédire la structure secondaire de la protéine (Costa *et al.*, 1997 ; Hong, 1999). Des expériences de type REDOR (Rotational Echo Double Resonance) permettent de mesurer des distance nucléaires jusqu'à 6 Å et peuvent ainsi donner des informations sur la structure locale d'un site actif par exemple (Jaroniec *et al.*, 2001).

- La RMN des solides en milieu orientés/en membrane

La RMN des solides en milieu membranaire s'est beaucoup développée ces dernières années pour la recherche structurale sur les biomolécules en milieu membranaire (protéines et

peptides insérés dans des bicouches de phospholipides). Depuis plusieurs années, la RMN des solides a été utilisée dans le but d'étudier les peptides (marqués ^{15}N , ^{13}C et/ou ^2H) insérés dans des membranes. Ketchum (Ketchum *et al.*, 1993) a été le premier à utiliser cette technique pour déterminer la structure du peptide Gramicidine A de *Bacillus brevis* reconstitué dans une bicouche lipidique. Par la suite, il travaillé sur la structure de macromolécules en milieu membranaire (Ketchum *et al.*, 1996). Nous pouvons aussi citer le travail de Marassi (Marassi *et al.*, 1997) qui a résolu la structure complète d'une protéine membranaire de bactériophage marquée à l'azote 15 dans des bicouches de phospholipides orientées. D'autres exemples des peptides transmembranaires ont été étudiés en RMN- ^{15}N tels que le peptide fongique alaméthicine (Bechinger *et al.*, 2001 ; North *et al.*, 1985 ; Bak *et al.*, 2001), le peptide antibiotique magainin (Bechinger *et al.*, 1993). L'orientation des protéines dans des membranes peut aussi être étudiée grâce à la technique de PISEMA dans des expériences de RMN à deux dimensions (Polarization Inversion with Spin Exchange at the Magic Angle) (Wang *et al.*, 2000).

Une autre approche a été d'utiliser les bicelles pour l'étude structurale de peptides. Comme nous l'avons vu précédemment ces objets ont la particularité de s'orienter dans le champ magnétique. Les bicelles classiques de DMPC/DCPC ont été utilisées pour déterminer la structure de Neu_{TM35} (Carlotti *et al.*, 2002) et du pentapeptide méthionine-enképhaline (Sizun *et al.*, 2004).

La RMN MAOSS (Magic Angle-Oriented Sample Spinning) a été développée pour étudier la structure de peptides (Sizun et Bechinger, 2002 ; Ahmed *et al.*, 1998 ; Glaubitz *et al.*, 1999, Masson *et al.*, 2004). Cette méthode combine l'avantage de la RMN-MAS c'est à dire, en améliorant la résolution et la sensibilité, avec la capacité de mesurer l'orientation des interactions anisotropiques, ce qui fournit d'importantes informations structurales.

4.3. Le modèle du matelas "mattress model"

Les segments transmembranaires interagissent avec les lipides de la bicouche. En général les lipides permettent le repliement des domaines transmembranaires, mais ne sont pas nécessaires pour maintenir la structure repliée. En effet beaucoup de structures de protéines sont maintenues dans des détergents en absence de lipides. Mais il existe aussi des interactions plus spécifiques entre les lipides et les protéines membranaires. Les lipides peuvent stabiliser la conformation d'une

protéine ou permettre un déplacement d'équilibre entre différents états conformationnels (Popot et Engelman, 2000).

Un modèle thermodynamique a été proposé pour décrire les interactions des mélanges de bicouches lipidiques et de protéines (ou de polypeptides) (Mouritsen et Bloom, 1984). Les variables géométriques de base du modèle sont l'épaisseur de la région hydrophobe de la bicouche et la longueur de la région hydrophobe des protéines. Le modèle introduit les propriétés élastiques de la bicouche lipidique et des protéines. Le concept de "hydrophobic mismatch" ou mésappariement hydrophobe des régions hydrophobes des lipides et des protéines est un élément important du modèle. Le mésappariement hydrophobe peut être négatif (le segment hydrophobe du peptide est plus court que la partie hydrophobe de la membrane) ou positif (le segment hydrophobe du peptide est plus long que la partie hydrophobe de la membrane). Le mésappariement hydrophobe peut fortement affecter l'organisation des protéines et des lipides, mais cela dépend des différentes propriétés des protéines et des lipides (composition en acides aminés des segments hydrophobes, nature de la membrane, nombre d'hélices transmembranaires etc...).

Les protéines membranaires possèdent des segments hydrophobes en contact avec les chaînes aliphatiques des lipides, ce qui maintient la stabilité de la protéine dans la bicouche. D'un point de vue d'énergétique, il est préférable que la longueur des segments hydrophobes des protéines soit approximativement égale à l'épaisseur hydrophobe de la bicouche. Cependant, les protéines qui sont dans une membrane peuvent avoir des parties hydrophobes de longueurs différentes (Kuroiwa *et al.*, 1991 ; Chen et Kendall, 1995). Dans les cellules eucaryotes, la membrane plasmique est susceptible d'être plus épaisse que les membranes du réticulum endoplasmique, (dues au pourcentage plus élevé de cholestérol et de sphingomyéline), or les protéines présentes dans la membrane plasmique ont été synthétisées dans le réticulum endoplasmique. Van Meer émet l'hypothèse qu'une adaptation entre les protéines et la membrane (plasmique ou du réticulum endoplasmique) est très probable (Van Meer, 1989).

Théoriquement, il existe plusieurs possibilités afin de réduire les contraintes énergiques imposées par un mésappariement. Deux cas se posent à nous, lorsque le peptide est plus court que l'épaisseur hydrophobe de la membrane et lorsque le peptide est plus long que l'épaisseur hydrophobe de la membrane. Ces deux cas seront discutés ci-dessous.

- Mésappariement négatif : le peptide est plus court que l'épaisseur hydrophobe de la membrane

Lorsque le peptide est plus court que la membrane (Figure 13) on peut observer une adaptation de la membrane par rapport au peptide, et nous observons alors une contraction importante des chaînes aliphatiques des lipides (b). Le peptide peut s'adapter à la membrane (c). En effet un peptide en hélice α est capable d'augmenter sa longueur hydrophobique en préférant une conformation possédant une partie hélicoïdale plus fine, comme dans le cas de l'hélice de type 3_{10} . Le peptide s'oligomérisé, en effet lorsque le peptide s'agrège cela réduit le nombre de contacts défavorables entre le peptide et les lipides sans exiger de changements cruciaux du peptide ou de la conformation des lipides (d). Les lipides se structurent dans un autre type d'agrégat, perturbant de ce fait l'organisation planaire de la bicouche (e). Il n'a y aucune interaction entre le peptide et la membrane (f).

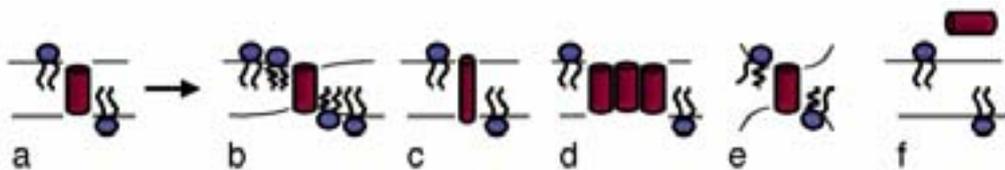


Figure 13. a) Représentation schématique de l'adaptation qui peut-être supprimée ou réduite lors du mésappariement négatif entre un peptide transmembranaire et une bicouche lipidique, b) désordre des chaînes aliphatiques des lipides, c) déformation du squelette peptidique, d) oligomérisation des peptides, e) formation d'une phase non lamellaire et f) aucune association transmembranaire. (d'après de Planque et Killian, 2003 et Killian 2003).

- Mésappariement positif : le peptide est plus long que l'épaisseur hydrophobe de la membrane

Lorsque le peptide est plus long que la membrane (Figure 14) on peut observer une adaptation de la membrane par rapport au peptide, et nous observons alors un étirement important des chaînes aliphatiques des lipides (b). Le peptide peut s'adapter à la membrane (c). En effet un peptide en hélice α est capable de réduire sa longueur hydrophobique en préférant une conformation possédant une partie hélicoïdale plus large, comme dans le cas de l'hélice de type π . Le peptide s'oligomérisé, en effet lorsque le peptide s'agrège cela réduit le nombre de contacts défavorables entre le peptide et les lipides sans exiger de changements cruciaux du peptide ou de la

conformation des lipides (d). Le peptide est incliné ou "tilté", le peptide et la membrane s'adaptent conjointement (e). Il n'a y aucune interaction entre le peptide et la membrane (f).

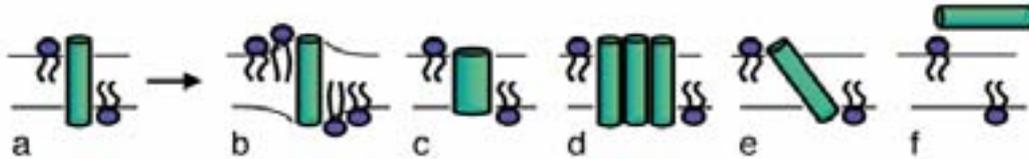


Figure 14. a) Représentation schématique de l'adaptation qui peut-être supprimée ou réduite lors du mésappariement positif entre un peptide transmembranaire et une bicouche lipidique, b) ordre des chaînes aliphatiques des lipides, c) déformation du squelette peptidique, d) oligomérisation des peptides, e) le peptide est "tilté" dans le membrane et f) aucune association transmembranaire. (d'après de Planque et Killian, 2003 et Killian 2003).

Une combinaison de ces différents modes possibles d'adaptations pourrait également être envisageables (Killian, 1998).

Les interactions entre une protéine et la région interfaciale de la membrane dépendent des propriétés des chaînes latérales des acides aminés, telles que leur polarité et leur potentialité à former des liaisons hydrogènes (Killian et von Heijne, 2000). L'analyse des structures tertiaires de protéines membranaires montre que les régions traversant la membrane sont riches en acides aminés aliphatiques et sont souvent bordées par des acides aminés possédants des cycles aromatiques (Trp, Tyr) qui interagissent favorablement avec les têtes des lipides. Les acides aminés chargés positivement comme la lysine et l'arginine peuvent se trouver à l'interface membrane-eau, car ils ont une longue chaîne aliphatique flexible terminée par un groupe chargé (amine ou guanidinium respectivement). La partie aliphatique de ces acides aminés pourrait se situer dans la zone hydrophobe et la terminaison chargée dans une région plus polaire et interagir avec le groupement phosphate des lipides chargé négativement. Ce comportement a été décrit par Killian et von Heijne.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour observer la structure et l'orientation des peptides transmembranaires dans une bicouche dont l'épaisseur varie. Ridder (Ridder *et al.*, 2004) a incorporé une sonde photoactivable dans un peptide synthétique et après irradiation, il analyse les

formations des liaisons covalentes avec le lipide. La réaction est observée par gel d'électrophorèse SDS-PAGE et le produit est analysé par spectrométrie de masse. Afin d'observer le phénomène, nous pouvons utiliser le dichroïsme circulaire et la RMN du solide. L'équipe de Killian (Strandberg *et al.*, 2004) a travaillé sur des peptides synthétiques incorporés dans des bicouches de phosphatidylcholine (de longueurs variables au niveau des chaînes). Dans les différents types de bicouches, le dichroïsme circulaire a montré que les peptides adoptaient une conformation en hélice α et donc ils ont vu qu'il n'y avait pas de déformation du squelette peptidique. En revanche un tilt a été observé et grâce aux différentes données de RMN (éclatement quadrupolaire) ils ont été capables de déterminer l'angle d'inclinaison.

5. Protéine anti-apoptotique Bcl-2

Dans certaines proliférations malignes la diminution de l'apoptose est un des incidents importants qui déterminent une prolifération cellulaire incontrôlée. Les voies induisant l'apoptose ainsi que les protéines impliquées dans la survie cellulaire, sont donc fréquemment dérégulées dans de nombreux cancers (Reed, 2001).

5.1. Introduction générale

Les cellules en apoptose subissent des modifications morphologiques caractéristiques : la cellule et son noyau rétrécissent, se condensent et se fragmentent en corps apoptotiques. La membrane plasmique ne se rompt pas mais exprime des signaux de mort reconnus par les macrophages, qui phagocytent les corps apoptotiques sans réponse inflammatoire (Zörnig *et al.*, 2001). Il est important de souligner que l'apoptose n'est pas le résultat d'une succession linéaire d'événements mais de multiples voies de signalisation qui doivent communiquer et s'autoréguler. L'apoptose peut être induite par "les récepteurs de mort" ou par la mitochondrie. Dans la deuxième voie, les cellules sont engagées en apoptose et une diminution du potentiel de membrane mitochondrial est alors observée et s'accompagne de l'ouverture de mégapores (Zörnig *et al.*, 2001). Cette ouverture est responsable de la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c, libéré par la mitochondrie, s'associe alors à une protéine régulatrice, qui s'unit à une procaspase pour former l'apoptosome (Hengartner, 2000). Dans ce complexe, la caspase 9 est

active et clive les protéases "effectrices" qui entraînent l'activation de programmes conduisant à la mort cellulaire par apoptose (Zou *et al.*, 1999).

5.2. La protéine Bcl-2

La protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Figure 15) est connue chez l'homme pour son implication dans une grande variété de cancers incluant des cancers de la prostate, du rein, du colon, de l'estomac, des neuroblastomes, des lymphomes non hodgkiniens et des leucémies chroniques et aiguës (Reed, 1995). Bcl-2 appartient à une famille de protéines qui sont impliquées, soit dans la survie, ce sont les molécules anti-apoptotiques, soit dans la mort cellulaire, ce sont les molécules pro-apoptotiques (Gross *et al.*, 1999a).

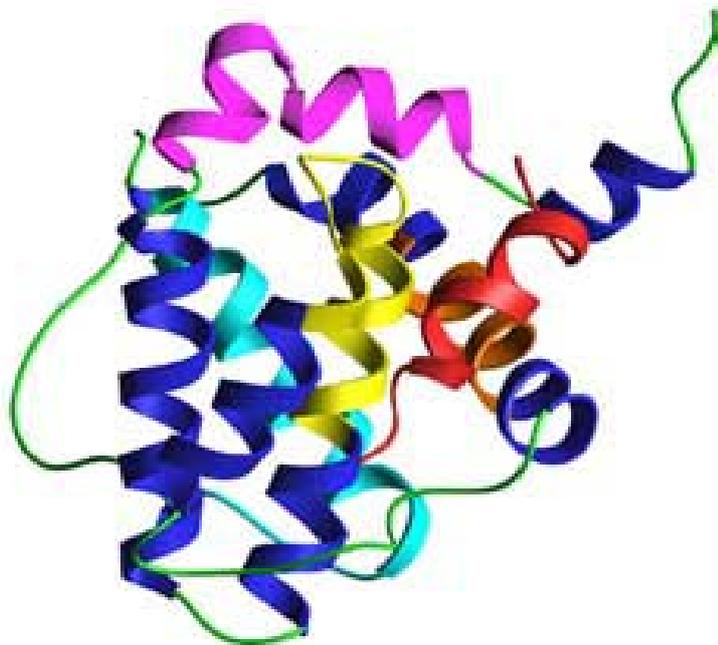


Figure 15 . Représentation des quatre domaines BH de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. La structure de Bcl-XL consiste en deux hélices α centrales qui contiennent les résidus principalement hydrophobes et sont arrangées en configuration antiparallèle. La figure montre le domaine BH1 en jaune, le domaine BH2 en magenta, le domaine BH3 en orange et le domaine BH4 en cyan. Le peptide Bak, en rouge (QAGRQLAIIGDDINR), interagit principalement avec des résidus des domaines BH2 et BH3. La figure ne montre pas le domaine transmembranaire. (d'après <http://www.mshri.on.ca/pawson/bh1-4.html>)

Les molécules anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 contiennent quatre domaines appelés BH (pour Bcl-2 Homology domain), BH1 à BH4, correspondant à des hélices α et essentiels aux

fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2. Le domaine BH4, spécifique des molécules anti-apoptotiques, n'est pas retrouvé dans les molécules pro-apoptotiques. Les membres de la famille Bcl-2 ont la capacité de former des homodimères ou des hétérodimères et c'est le rapport entre le niveau des protéines pro- et anti-apoptotiques qui semble déterminer la sensibilité de la cellule à l'apoptose. Bcl-2 et certaines protéines de cette famille (Bcl-xL par exemple) sont localisées sur les membranes externes de la mitochondrie, du noyau et du réticulum endoplasmique. Elles joueraient le rôle de canaux ioniques régulant ainsi le flux calcique et la libération du cytochrome c de la mitochondrie. Bcl-2 et Bcl-xL exercent leur effet anti-apoptotique en partie en se liant à BAX, une molécule pro-apoptotique via leurs domaines BH1, BH2, BH3. Cette interaction empêche la libération du cytochrome c et l'activation du complexe caspase. Cependant ce mécanisme reste toujours inconnu. la détermination de la structure tridimensionnelle du peptide BH4, domaine de la protéine anti-apoptotique BCL-2 représente une étape capitale dans la compréhension des mécanismes apoptotiques.

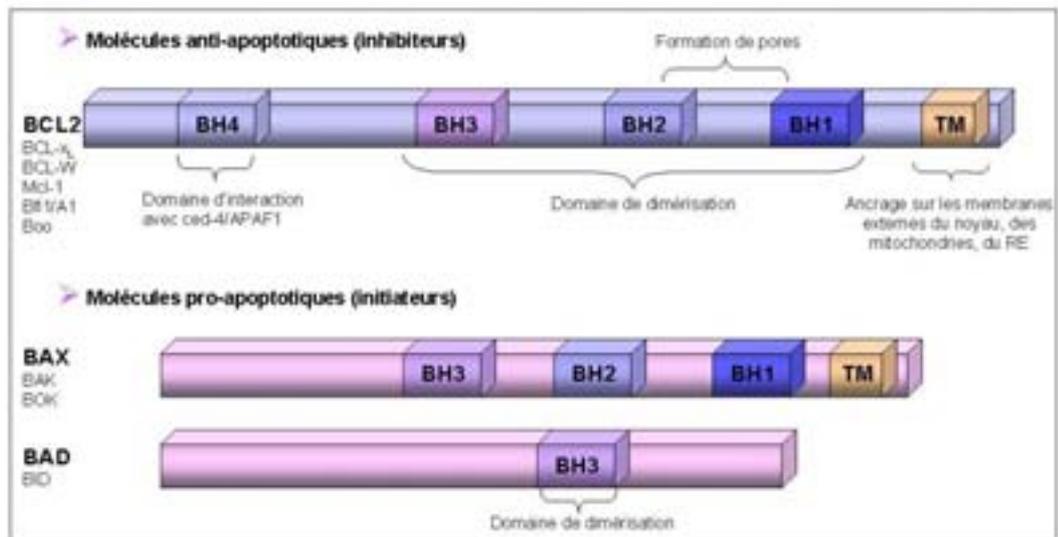


Figure 16. La famille Bcl2 d'après Segal-Bendirdjian, 1999 ; Adams *et al.*, 2001. BH : Bcl homologie de domaine, TM : domaine transmembranaire, RE : réticulum endoplasmique

6. Objectifs et plan de la thèse

Au cours de notre travail de thèse, nous nous sommes attachés à décrire certaines caractéristiques structurales et dynamiques de protéines dans des systèmes modèles. Nous avons cherché à comprendre les interactions peptides/membranes. De plus nous avons essayé de déterminer les paramètres stabilisant les dimères oncogéniques. Toutes ces études ont été réalisées grâce au dichroïsme circulaire, à la modélisation moléculaire et à la RMN.

Pour cela nous avons tout d'abord synthétisé le peptide transmembranaire natif neu/erbB-2, de la famille des récepteurs à tyrosine kinase, le peptide transmembranaire muté neu*/erbB-2 et le peptide BH4, domaine spécifique de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Ces peptides ont aussi été sélectivement marqués avec un isotope d'intérêt pour l'étude par RMN (^{15}N). Des lipides perdeutériés ont été utilisés. Les peptides ont tous été réincorporés dans des modèles de membranes perdeutériées ou non. Seules la synthèse et la purification de BH4 seront abordées dans ce travail. La partie structurale et dynamique par RMN sera réalisée par Marc-Antoine Sani dans le cadre de son travail de thèse.

Pour les études des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35}, nous avons utilisé les bicelles classiques avec comme application l'étude structurale de protéines membranaires par dichroïsme circulaire et des liposomes multilamellaires comme modèle afin de caractériser la dynamique des lipides par RMN des solides. Les principaux noyaux utilisés pour nos études RMN sont le deutérium (^2H) et le phosphore 31 (^{31}P). En combinant nos études, nous obtenons plusieurs informations concernant la dynamique locale ou globale et l'orientation des peptides dans les membranes. Ces études seront effectuées avec des lipides possédant des longueurs de chaînes aliphatiques différentes, dans le but d'étudier la flexibilité des peptides ou l'adaptation de la membrane (modèle du matelas). De plus les bicelles seront utilisées pour les études structurales de peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} marqués à l'azote 15 par RMN en mode statique. Seules les synthèses et les purifications des peptides marqués ^{15}N seront abordées dans ce travail, la partie structurale sera réalisée par Cécile Loudet dans le cadre de son travail de thèse.

Nous détaillerons dans le chapitre 2 l'aspect théorique des techniques physiques utilisées (dichroïsme circulaire, spectrométrie de masse, modélisation moléculaire et résonance magnétique nucléaire) nécessaire à l'interprétation des résultats. Le chapitre 3 est consacré à la

discussion des synthèses des différents peptides ainsi que leurs purifications. La récupération quantitative des peptides et des lipides après insertion dans la membrane fait l'objet du chapitre 4. Le chapitre 5, à la recherche de l'hélice π , décrira les différentes tentatives pour obtenir un peptide en hélice π et ceci afin de comprendre la stabilité des dimères neu et neu*. Les chapitres 6 et 7 relatent l'étude des peptides dans différents environnements par dichroïsme circulaire dans un premier temps et par Résonance Magnétique Nucléaire dans un second temps. La partie expérimentale, comprenant les matériaux et méthodes des synthèses peptidiques, des préparations des modèles de membranes (bicelles, liposomes...) ainsi que l'insertion des peptides dans ces modèles de membrane, se trouve en Annexe à la fin du manuscrit. Une conclusion générale et quelques perspectives termineront ce mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends. Biochem. Sci.* 2001; **26**: 61-66.
- Ahmed Z, Middleton D, Glaubitz C, Watts A. Studies on the transmembrane domain of phospholamban using rotational resonance and magic angle oriented sample spinning (MAOSS) NMR spectroscopy. *Biochem Soc Trans.* 1998; **26**: S194.
- Aller P, Voiry L, Garnier N, Genest M. Molecular dynamics (MD) investigations of preformed structures of the transmembrane domain of the oncogenic Neu receptor dimer in a DMPC bilayer. *Biopolymers.* 2005; **77**: 184-197.
- Arora A, Abildgaard F, Bushweller JH, Tamm LK. Structure of outer membrane protein a transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nature Struct. Biol.* 2001; **8**(4): 334-338.
- Arnold A, Labrot T, Oda R, Dufourc EF. K⁺, Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ modulation of "bicelles" size and orientation in a magnetic field as revealed by solid state NMR and electron microscopy. *Biophys. J.* 2002; **83**: 2667-2680.
- Aussenac F, Tavares M, Dufourc EJ. Cholesterol Dynamics in Membranes of Raft Composition: A Molecular Point of View from ²H and ³¹P Solid-State NMR. *Biochemistry.* 2003; **42**: 1383-1390.
- Bagossi P, Horvath G, Vereb G, szollosi J, Torzser J. Molecular Modeling of nearly Full-length ErbB2 Receptor. *Biophysical Journal.* 2005; **88**: 1354-1363.
- Bak M, Bywater RP, Hohwy M, Thomsen JF, Adelhorst K, Jakobsen HJ, Sorensen OW, Nielsen NC. Conformation of alamethicin in oriented phospholipid bilayers determined by (15)N solid-state nuclear magnetic resonance *Biophys. J.* 2001; **81**: 1684-1698.
- Bargmann CI, Huang MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth transmembrane domain by NMR spectroscopy. *Nature.* 1986; **319**: 226-230.
- Bargmann CI, Weinberg RA. Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *Embo J.* 1988b; **7**: 2043-2052.
- Baselga J. Clinical trials of Herceptin (trastuzumab). *Eur. J. Cancer.* 2001 ; **37** : 18-24.
- Bax A, Tjandra N. High-resolution heteronuclear NMR of human ubiquitin in an aqueous liquid crystalline medium. *J. Biomol. NMR.* 1997; **10**: 289-292.
- Bax A, Davis DG. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *Journal of Magn. Reson.* 1985; **63**: 207-213.
- Bechinger B, Zasloff M, Opella SJ. Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci.* 1993; **2**: 2077-2084.

- Bechinger B, Skladnev DA, Ogrel A, Li X, Swischewa NV, Ovchinnikova TV, O'Neil JDJ, Raap J. ¹⁵N and ³¹P Solid-State NMR Investigations on the Orientation of Zervamicin II and Alamethicin in Phosphatidylcholine Membranes. *Biochemistry*. 2001; **40**: 9428–9437.
- Bennasroune A, Fickova M, Gardin A, Dirrig-Grosch S, Aunis D, Cremel G, Hubert P. Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling. *Mol. Biol. Cell*. 2004; **15**: 3464-3474.
- Bothorel P, Lussan C. Quelques aspects nouveaux d'un modèle dynamique de membrane biologique. *C.R. Acad. Sci*. 1970; **271**: 680-683.
- Bothner-By AA, Stephens RL, Lee JM, Warren CD, Jeanloz RW. Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame. *J. Amer. Chem. Soc*. 1984; **106**: 811-813.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001; **411**: 355-365.
- Braunschweiler L, Ernst RR. Coherence transfer by isotropic mixing: Application to proton correlation spectroscopy. *Journal of Magn. Reson*. 1983; **53**: 521-528.
- Burke CL, Lemmon MA, Coren BA, Engelman DM, Stern DF. Dimerization of the p185neu transmembrane domain is necessary but not sufficient for transformation. *Oncogene*. 1998; **14**: 687-696.
- Cavagnero S, Dyson HJ, Wright PE. Improved low pH bicelle system for orienting macromolecules over a wide temperature range. *J. Biomol. NMR*. 1999; **13**: 387-391.
- Carlotti C, Aussenac F, Dufourc EJ. Towards high-resolution ¹H-NMR in biological membranes: magic angle spinning of bicelles. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002; **1564**: 156-164.
- Carter P, Fendly BM, Lewis GD, Sliwkowski MX. Development of Herceptin. *Breast Disease*. 1999; **11**: 103-111.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992; **89**: 4285-4289.
- Cevc G. Phospholipids Handbook. New York. Marcel Dekker Inc. 1983
- Chapman D. Physical studies of phospholipids. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins). *Chem. Phys. Lipids*. 1967; **1**:445-475.
- Chen H, Kendall DA. Artificial transmembrane segments. Requirements for stop transfer and polypeptide orientation. *J. Biol. Chem*. 1995; **270**: 14115–14122.
- Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney Jr, Leahy DJ. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex the Herceptin Fab. *Nature*, 2003; **421**: 756-760.
- Cho HS, Leahy DJ. Structure of the extracellulaire region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science*. 2002; **297**: 1330-1333.

- Costa PR, Gross JD, Hong M, Griffin RG. Solid-State NMR measurement of Ψ in peptides: a NCCN 2Q-heteronuclear local field experiment. *Chem. Phys. Letters*. 1997; **280**: 95-103.
- De Planque MR, Killian JA. Protein-lipid interaction studied with designed transmembrane peptides : role of hydrophobic matching and interfacial anchoring. *Mol. Membr. Biol.* 2003; **20**: 271-284.
- Duneau JP, Genest D, Genest M. Detailed description of an alpha helix-->pi bulge transition detected by molecular dynamics simulations of the p185c-erbB2 V659G transmembrane domain. *J Biomol Struct Dyn.* 1996; **5**: 753-769.
- Duneau JP, Garnier N, Genest M. Insight into signal transduction : structural alterations in transmembrane helices probed by multi-1 ns molecular dynamics simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1997; **15**: 555-572.
- Duneau JP, Crouzy S, Garnier N, Chapron Y, Genest M. Molecular Dynamics simulations of the ErbB-2 transmembrane domain within an explicit membrane environment: comparison with vacuum simulations. *Biophysical Chemistry*. 1999; **76**: 35-53.
- Edidin M. Shrinking patches and slippery rafts : scales of domains in the plasma membrane. *Trend in Cell Biology*. 2001; **11**: 492-496.
- Ergorova-Zachernyuk TA, Hollander J, Fraser N, Gast P, Hoff AJ, Cogdell R, de Groot HJM, Baldus M. Heteronuclear 2D-correlations in uniformly [¹³C, ¹⁵N] labelled membrane-protein complex at ultra-high magnetic fields. *J. Biomol. NMR*. 2001; **19**: 243-253.
- Fergusson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, Lemmon MA. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell*. 2003; **11**: 507-517.
- Fernandez C, Adeishvili K, Wüthrich K. Transverse relaxation-optimized NMR spectroscopy with the outer membrane protein OmpX in dihexanoyl phosphatidylcholine micelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001 ; **98**(5): 2358-2363.
- Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, De vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signalling from the structure of the ErbB2 pertuzumab complex. *Cancer Cell*. 2004; **5**: 317-328.
- Gabriel NE, Roberts MF. Spontaneous formation of stable unilamellar vesicles. *Biochemistry*. 1984; **23**(18): 4011-4015.
- Gabriel NE, Roberts MF. Interaction of short-chain lecithin with long-chain phospholipids: characterization of vesicles that form spontaneously. *Biochemistry*. 1986; **25**: 2812-2821.
- Garnier N, Genest D, Hebert E, Genest M. Influence of a mutation in the transmembrane domain of the p185c-erbB2 oncogene-encoded protein studied by molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn.* 1994; **5**: 983-1002.

- Garnier N, Genest D, Duneau JP, Genest M. Molecular modeling of c-erbB2 receptor dimerization: coiled-coil structure of wild and oncogenic transmembrane domains--stabilization by interhelical hydrogen bonds in the oncogenic form. *Biopolymers*. 1997; **2**: 157-168.
- Garnier N, Crouzy S, Genest M. Molecular dynamics simulations of the transmembrane domain of the oncogenic ErbB2 receptor dimer in a DMPC bilayer. *J Biomol Struct Dyn*. 2003; **2**: 179-200.
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoynes PA. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell*. 2002; **110**: 763-773.
- Glaubitz C, Burnett IJ, Gröbner G, Mason AJ, Watts A. Deuterium-MAS NMR Spectroscopy on Oriented Membrane Proteins: Applications to Photointermediates of Bacteriorhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.* 1999; **21**: 5787-5794.
- Goetz M, Carlotti C, Bontemps F, Dufourc EJ. Evidence for an α -helix \rightarrow π bulge helicity modulation for the neu/erbB-2 membrane-spanning segment. A ^1H NMR and circular dichroism study. *Biochemistry*. 2001; **40**: 6534-6540.
- Gross A, McDonnell JM., Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999a; **13**: 1899-1911.
- Gullick WJ, Bottomeley AC, Lofts FJ, Doak DG, Mulvey D, Newman R, Crumpton MJ, Sternberg MJE, Campbell ID. Three dimensional structure of the transmembrane region of the proto-oncogenic and oncogenic forms of the neu protein. *EMBO J*. 1992; **11**: 43-48.
- Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995; **80**: 213-223.
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; **407**: 770-776.
- Hong M. Determination of multiple Φ -torsion angles in proteins by selective and extensive ^{13}C labelling and two-dimensional solid state NMR. *J. Magn. Reson*. 1999; **139**: 389-401.
- Houliston RS, Hodges RS, Sharom FJ, Davis JH. Comparison of proto-oncogenic and mutant forms of the transmembrane region of the Neu receptor in TFE. *FEBS Lett*. 2003; **535**: 39-43.
- Houliston RS, Hodges RS, Sharom FJ, Davis JH. Characterization of the proto-oncogenic and mutant forms of the transmembrane region of Neu in micelles. *J.Biol.Chem*. 2004; **279**: 24073-24080.
- Hunter T, Stefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus family as signal integrators. *Endocr. Relat. Cancer*. 2001; **8**: 151-159.
- Hynes NE, Stern DF. The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. 1994; **1198**: 165-184.
- Israelchvili JN, Mitchell DJ, Ninham BW. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Amer. Chem. Soc. Faraday Transactions II*. 1976; **72**: 1525-1568.
- Jacobson K, Dietrich C. Looking at lipid rafts? *Trend in cell Biology*. 1999; **9**: 87-91.

- Jaroniec CP, Tounge BA, Herzfeld J, Griffin RG. Frequency selective heteronuclear dipolar recoupling in rotating solids: accurate ^{13}C - ^{15}N distance measurement in uniformly ^{13}C , ^{15}N -labeled peptides. *J. Amer. Chem. Soc.* 2001; **123**: 3507-3519.
- Jones DH, Barber KR, Grant CWM. Sequence-related behaviour of transmembrane domains from class I receptor tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998a; **1371**: 199-212.
- Jones DH, Barber KR, VanDerLoo AW, Grant CWM. Epidermal growth factor receptor transmembrane domain: ^2H NMR implications for orientation and motion in a bilayer environment. *Biochemistry.* 1998b; **37**: 16780-16787.
- Jones DH, Rigby AC, Barber KR, Grant CWM. Oligomerization of the EGF receptor transmembrane domain: a ^2H NMR study in lipid bilayer. *Biochemistry.* 1997; **36**: 12616-12624.
- Jones DH, Ball EH, Sharpe S, Barber KR, Grant CWM. Expression and membrane assembly of a transmembrane region from Neu. *Biochemistry.* 2000; **39**: 1870-1878.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; **26**: 239-57.
- Ketchum RK, Hu W, Cross TA. High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science.* 1993; **261**: 1457-1460.
- Ketchum RR, Lee KC, Huo S, Cross TA. Macromolecular structural elucidation with solid-state NMR-derived orientational constraints. *J Biomol NMR.* 1996; **8** :1-14.
- Killian JA. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998; **1376**: 401-415.
- Killian JA, von Keijne G. How proteins adapt to a membrane-water interface. *Trends Biochem. Sci.* 2000; **25**: 429-434.
- Killian JA. Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. *FEBS Letters.* 2003; **555**: 134-138.
- Kimura A, Kuni N, Fujiwara H. Orientation and Conformation of Met-enkephalin in a lipid crystal as studied by Magic-Angle- and Near-Magic-Angle Spinning two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry.* 1996; **100**: 14056-14061.
- Kuroiwa T, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. Systematic analysis of stop-transfer sequence for microsomal membrane. *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 9251-9255.
- Kute T, Lack CM, Willingham M, Bishwokama B, Williams H, Barrett K, Mitchell T, Vaughn JP. Development of Herceptin Resistance in Breast Cancer Cells. *Cytometry Part A.* 2004; **57**: 86-93.
- Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM, Schlessinger J. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J.* 1997; **16**(2): 281-294.

- Lindberg M, Jarvet J, Langel U, Gräslund A. Secondary structure and position of the cell- penetrating peptide transportin in SDS micelles as determined by NMR. *Biochemistry*. 2001; **40**: 3141-3149.
- London E, Brown DA. Insolubility of lipids in Triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta*. 2000; **1508**: 182-195.
- Losonczi JA, Pestegard JH. Improved dilute bicelle solutions for high-resolution NMR of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR*. 1998; **12**: 447-451.
- Marassi FM, Ramamoorthy A, Opella SJ. Complete resolution of the solid-state NMR spectrum of a uniformly ¹⁵N-labelled membrane protein in phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; **94**: 8551-8556.
- Mason AJ, Grage SL, Straus SK, Glaubitz C, Watts A. Identifying anisotropic constraints in multiply labeled bacteriorhodopsin by N¹⁵ MAOSS NMR: A general approach to structural studies of membrane proteins. *Biophys. Journal*. 2004; **86**: 1610-1617.
- McDermott A, Polenova T, Bockmann A, Zilm KW, Paulsen EK, Martin RW, Montelione GT. Partial assignments for uniformly (¹³C, ¹⁵N)-enriched BPTI in the solid state. *J. Biomol. NMR*. 2000; **16**: 209-219.
- McIntosh TJ, Simon SA, Vierling P, Santaella C, Ravily V. Structure and interactive properties of highly fluorinated phospholipid bilayers. *Biophys. J*. 1996; **71**: 1853-1868.
- Mendrola JM, Berger MB, King MC, Lemmon MA. The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J. Biol. Chem*. 2002; **277**: 4704-4712.
- Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J. Mol. Biol*. 2001; **311**: 1011-1026.
- Mouritsen OG, Bloom M. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophysical Journal*. 1984; **46**: 141-153.
- Nagayama K, Kumar A, Wütrich K, Ernst RR. Experimental techniques of two-dimensional correlated spectroscopy. *Journal of Magn. Reson.* 1980; **40**: 321-334.
- Noggle JH, Shirmer RE. The nuclear overhauser effects. Academic Press, New York. 1971.
- North CL, Barranger-Mathys M, Cafiso DS. Membrane orientation of the N-terminal segment of alamethicin determined by solid-state ¹⁵N NMR. *Biophys. J*. 1995; **69**: 2392-2397.
- Picard F, Paquet MJ, Levesque J, Bélanger A, Auger M. ³¹P NMR first moment bilayers with positive ordering: a new model membrane system. *Biophys. J*. 1999; **77**: 888-902.
- Popot JL, Engelman DM. Helical membrane protein folding, stability and evolution. *Annu Rev. Biochem*. 2000; **69**: 881-922.

- Prosser RS, Hunt SA, DiNatale JA, Vold RR. Magnetically aligned membrane model systems with positive order parameters: switching the sign of S_{zz} with paramagnetic ions. *J. Amer. Chem. Soc.* 1996; **118**: 269-270.
- Radhakrishnan A, Anderson TG, McConnell HM. Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; **97**: 12422-12427.
- Rank JL, Mateu L, Sadler DM, Tardieu A, Gulik-Krzywicki T, Luzzati V. Order-disorder conformational transitions of the hydrocarbon chains of lipids. *J. Mol. Biol.* 1974; **85**: 249-277.
- Ranson M, Sliwkowski MX. Perspectives on anti-HER monoclonal antibodies. *Oncology.* 2002; **63**: 17-24.
- Reed J.C. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol. Med.* 2001; **7**: 314-319.
- Reed JC. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Cur. Op. Oncol.* 1995; **7**: 541-546.
- Ridder AN, Spelbrink RE, Demmers JA, Rijkers DT, Liskamp RM, Brunner J, Heck AJ, de Kruiff B, Killian JA. Photo-crosslinking analysis of preferential interactions between a transmembrane peptide and matching lipids. *Biochemistry.* 2004; **43**: 4482-4489.
- Sajot N, Genest M. Structure prediction of the dimeric neu/ErbB-2 transmembrane domain from multi-nanosecond molecular dynamics simulation. *Eur. Biophys. J.* 2000; **28**: 648-662.
- Sajot N, Genest M. Dimer interface of transmembrane domains for neu/erbB2 receptor dimerization and transforming activation : a model revealed by molecular dynamics simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2001; **19**: 15-31.
- Sanders CR, Landis GC. Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayers mixed micelles for NMR studies. *Biochemistry.* 1995; **34**: 4030-4040.
- Sanders CR, Prosser RS. Bicelles : a model membrane system for all seasons? *Structure.* 1998; **6**: 1227-34.
- Sanders CR, Oxenoid K. Customizing model of membranes and samples for NMR spectroscopic studies of complex membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000; **1508**: 129-145.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinase. *Cell.* 2000; **103**: 211-225.
- Ségat-Bendirdjian E. Mort cellulaire: signalisation et exécution de l'apoptose. *Hématologie.* 1999; **5**: 376-387.
- Segatto O, King CR, Pierce JH, Di Fiore PP, Aaronson SA. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB2 gene. *Mol Cell Biol.* 1988; **8**: 5570-5574.
- Sharpe S, Barber KR, Grant CWM. Val659-Glu mutation within the transmembrane domain of ErbB-2: effects measured by 2H NMR in fluid phospholipids bilayers. *Biochemistry.* 2000; **29**: 6572-6580.
- Sharpe S, Grant CWM, Barber KR, Giusti J, Morrow MR. Structural implications of a Val-Glu mutation in transmembrane peptides from the EGF receptor. *Biophys J.* 2001; **81**: 3231-3239.

- Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997; **387**: 569-572.
- Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972; **175**: 720-731.
- Sizun C, Aussenac F, Grelard A, Dufourc EJ. NMR methods for studying the structure and dynamics of oncogenic and antihistaminic peptides in biomembranes. *Magn. Reson. Chem*. 2004; **42**: 180–186.
- Sizun C, Bechinger B. Bilayer Sample for Fast or Slow Magic Angle Oriented Sample Spinning Solid-State NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; **124**: 1146-1147.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M and others. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med*. 2001; **344**: 783-792.
- Smith SO, Aschheim K, Groesbeck M. Magic angle spinning NMR spectroscopy of membrane proteins. *Quarter Rev. Biophys*. 1996b; **3**: 252-258.
- Smith SO, Smith CS, Shekar S, Peersen O, Ziliox M, Aimoto S. Transmembrane interactions in the activation of the Jev receptor tyrosine kinase. *Biochemistry*. 2002; **41**: 9321-9332.
- Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C. Structure of the Epidermal Growth Factor Receptor Kinase Domain Alone and in Complex with a 4-Anilinoquinazoline Inhibitor. *J. Biol. Chem*. 2002; **277**: 46265-46272.
- Strandberg E, Ozdirekcazn S, Rijkers DT, van der Wel PC, Koeppe RE II, Kiskamp RM, Killian JA. Tilt angles of transmembrane model peptides in oriented and non oriented lipid bilayers as determined by ²H-solid state NMR. *Biophys. J*. 2004; **86**: 3709-3721.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; **267**: 1456-1462.
- Tjandra N, Bax A. Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science*. 1997; **278**: 1111-1114.
- Tribet C, Audebertet R, Popot JL. Amphipols : polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; **93**: 15074-15050.
- Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptor with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990; **61**: 203-12.
- Vajdos FF, Adams CW, Breese TN, Presta LG, de Vos AM, Sidhu SS. Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol*. 2002; **320**: 415-428.
- Van Meer G, Lisman Q. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J. Biol. Chem*. 2002; **277**: 25855-25858.
- Van Meer G. Lipid traffic in animal cells. *Annu. Rev. Cell Biol*. 1989; **5**: 247–275.

- Verkade P, Simons K. Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. *Histochem Cell Biol.* 1997; **108**: 211-220.
- Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. Second edition. Wiley, J. editor. New York. 1995. p.1360.
- Wang J, Balasz YS, Thompson LK. Solid-State REDOR NMR Distance Measurements at the ligand site of a Bacterial Chemotaxis Membrane Receptor. *Biochemistry*. 1997; **36**: 1699-1703.
- Wang J, Denny J, Tian C, Kim S, Mo Y, Kovacs F, Song Z, Nishimura K, Gan Z, Fu R and others. Imaging membrane protein helical wheels. *J. Magn. Reson.* 2000; **144**: 162-167.
- Watts A, Ulrich AS, Middleton DA. Membrane protein structure: the contribution and potential of novel solid state NMR approaches. *Mol. Membr. Biol.* 1995; **12**: 233-246.
- Wütrich K. *NMR of protein and nucleic acids*, Wiley, New York. 1986.
- Yale PL. *The membranes of cells*, 2ème édition (1993), Academic Press, San Diego, CA.
- Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Bioch. Biophys. Acta.* 2001; **1551**: F1-F37.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 11549-11556.

Chapitre 2

Les techniques physico-chimiques

L'analyse structurale et dynamique des peptides a été entreprise à l'aide de différentes méthodes. Dans ce chapitre, nous rappellerons brièvement les principes des techniques utilisées lors de cette thèse. Dans un premier temps, nous développerons la technique du dichroïsme circulaire (DC), qui permet d'étudier la structure secondaire des peptides. La deuxième section de ce chapitre est consacrée à la spectrométrie de masse (SM), cette méthode nous a permis tout d'abord de déterminer le gradient idéal pour la purification peptidique puis de contrôler la pureté du peptide à l'issue de la synthèse. Nous détaillerons dans la troisième section, la dynamique moléculaire, technique utilisée lors de l'étude de l'hélice π . Enfin la dernière section décrit sommairement le principe de résonance magnétique nucléaire. Deux noyaux ont été choisis pour décrire la dynamique de nos membranes : le deutérium et le phosphore. Nous développerons donc dans cette section la RMN- ^2H et RMN- ^{31}P large bande.

1. Dichroïsme circulaire

1.1. Introduction

Le dichroïsme circulaire (DC) est une technique très développée pour étudier la structure secondaire des protéines. Les spectres sont obtenus rapidement et seule une petite quantité de produits est nécessaire. Cette technique est une spectroscopie de différence sensible à l'activité optique de molécules chirales. Dans le cas des protéines, seul l'un des composés optiquement actif est présent et donc chaque protéine possède une empreinte spectrale qui lui est propre. Les spectres dichroïques sont sensibles au repliement de la chaîne peptidique et présentent des courbes différentes selon la structure secondaire et l'arrangement spatial qu'adoptent les protéines (Chen *et al.*, 1974). Le pourcentage de chaque structure (hélice α , feuillet β , pelote statistique...) d'une protéine est alors obtenu en déconvoluant le spectre expérimental de DC. Plusieurs programmes de déconvolution existent.

Nous allons tout d'abord rappeler le principe du DC, puis nous expliquerons les différentes méthodes de déconvolution et enfin nous décrirons plus en détails la méthode que nous avons utilisée.

1.2. Principe

Le phénomène de dichroïsme circulaire apparaît quand un chromophore absorbe différemment la lumière polarisée à droite et à gauche. Le chromophore possède donc deux coefficients d'extinction molaire ϵ_G et ϵ_D ce qui génère une différence d'absorption, ΔA , pour les deux composantes de la lumière polarisée ($\Delta A = A_G - A_D$). Cette différence est due à l'environnement asymétrique du chromophore. Après avoir traversé l'échantillon, le faisceau transmis n'est plus circulaire et il décrit alors une ellipse dans le plan perpendiculaire à la direction de propagation. L'ellipticité, notée θ , est définie par

$$\tan \theta = a/b$$

a et b étant respectivement le demi petit axe et le demi grand axe de l'ellipse (Berova *et al.*, 2000).

L'ellipticité enregistrée se définit dans l'équation 1.1, le terme θ est exprimé en degré.

$$\theta = \frac{\ln 10}{4} \times \Delta A \times \frac{180}{\pi} \approx 33 \times \Delta A \quad (1.1)$$

Afin de comparer les différentes valeurs d'ellipticité, θ doit être normalisé. Pour l'étude des peptides et des protéines, on introduit l'ellipticité molaire par résidu, notée $[\theta]_{mrw}$ et exprimée en degrés.dmol⁻¹.cm².résidu⁻¹:

$$[\theta] = \frac{100 \times \theta}{n \times l \times c} = \frac{3300 \times \Delta \epsilon}{n} \quad (1.2)$$

où l est le trajet optique exprimé en cm, c la concentration de l'échantillon en M, n est le nombre de liaisons peptidiques et $\Delta \epsilon$ est le coefficient d'extinction molaire (ou coefficient d'absorption molaire) en M⁻¹.cm⁻¹.

1.3. Méthodes de déconvolution

Les composantes élémentaires d'un spectre expérimental sont simplement définies par additivité. L'ellipticité molaire par résidu mesurée à une longueur d'onde λ , $[\theta]_{\lambda}$ est alors déterminée par la relation suivante (Casco et Wallace, 1995) :

$$[\theta] = \sum [\theta]_x f_x \quad (1.3)$$

où $[\theta]_x$ représente les ellipticités molaires par résidu correspondant à chaque structure secondaire canonique ($[\theta]_{\alpha}$ pour l'hélice α , $[\theta]_{\beta}$ pour le feuillet β etc...) et f_x représente les fractions de résidus appartenant à chaque type de structure ($x=\alpha$ pour l'hélice α , $x=\beta$ pour le feuillet β , $x=p$ pour la pelote statistique etc...).

La proportion de chaque structure au sein de la protéine suit la relation : $\sum f_x = 1$

Dans notre cas, nous travaillons avec quatre structures secondaires canoniques : hélice α , feuillet β , hélice de type II et pelote statistique. L'équation 1.3 s'écrit donc :

$$[\theta] = [\theta]_{\alpha} f_{\alpha} + [\theta]_{\beta} f_{\beta} + [\theta]_{II} f_{II} + [\theta]_p f_p \quad (1.4)$$

$$\text{avec } f_{\alpha} + f_{\beta} + f_{II} + f_p = 1 \quad (1.5)$$

Il existe aussi plusieurs méthodes pour analyser un spectre dichroïque. Ces programmes utilisent une bibliothèque de structures connues, réalisée d'après des expériences préalables de RMN ou de diffraction aux rayons X (Johnson, 1990; Greenfield, 1996; Fasman, 1995). Deux programmes de déconvolution ont été utilisés : CDPro2 et CDFriend.

Le programme CDPro2 (Sreerama et Woody, 1993) utilise des spectres de protéines qui possèdent un mélange de structures secondaires. Il possède 10 bases de référence et trois logiciels d'analyses (Sreerama et Woody, 2000). Les bases notées de 1 à 8 possèdent entre 22 et 48 structures de protéines solubles. Les bases 9 et 10 comprennent en plus des structures des protéines solubles, 13 structures de protéines membranaires. Le programme contient 10 structures canoniques : hélice α , feuillet β , hélice régulière, hélice distordue, feuillet régulier, feuillet distordu,

hélice 3_{10} , hélice de type II, coude et pelote statistique. Pour plusieurs raisons ce programme n'est pas adapté aux peptides et ne sera donc pas utilisé dans cette thèse. D'une part, ce programme renferme beaucoup de structures canoniques, notamment le coude qui n'est pas présent dans les peptides. De plus, l'ajustement des courbes modèles avec le spectre expérimental n'est pas toujours correct. En effet les courbes modèles contiennent un mélange de structures secondaires et l'ajustement est d'autant plus difficile. D'autre part, ce programme implique un biais dû à l'intervention de l'utilisateur, qui doit choisir entre 10 bases et trois méthodes d'analyses. Parce que nous estimons que ce programme n'est pas adapté aux peptides, nous avons décidé de créer un nouveau programme de déconvolution au laboratoire, qui comprend les 4 structures canoniques principales.

Le programme de déconvolution CDfriend, codé en Java, a été mis au point au Laboratoire (S. Buchoux, non publié). Ce programme utilise des courbes standard pour chaque structure canonique : hélice α , feuillets β , hélice II et pelote statistique. La déconvolution s'effectue par recuit simulé et par la méthode des moindres carrés. Le modèle de déconvolution développé dans ce travail est simple mais s'avère très adapté quand il s'agit de caractériser des changements conformationnels pour plusieurs peptides pour différentes conditions. La précision de la déconvolution est de l'ordre de 1%. La précision de la détermination de la structure secondaire est de l'ordre de 5% (bruit de la mesure, ajustement de la courbe, erreur expérimentale). L'hélice de type π n'est pas prise en compte pour le calcul de déconvolution car à l'heure actuelle il n'existe pas de peptide standard adoptant la configuration hélice π .

1.4. Courbes Standards

Afin d'accéder aux structures secondaires des protéines, le spectre dichroïque des différentes structures secondaires classiques de protéines connues doit être enregistré. Les polymères de poly-L-lysine sont généralement utilisés comme modèles pour définir les trois structures secondaires de base (feuillelet β , hélice α et pelote statistique). La protéine est non structurée à pH neutre (7.6), à pH basique (11.4) elle adopte une structure en hélice α et pour ce même pH et pour une température de 60°C, elle est structurée en feuillelet β (Shibata *et al.*, 1992). Cependant la distribution des masses des échantillons est importante (30 à 70 kDa, soit

environ 380 résidus en moyenne), ce qui génère une incertitude dans le calcul de l'ellipticité définie dans l'équation 1.2.

Nous avons donc réalisé des spectres dichroïques de références à partir de nouveaux standards dont la structure secondaire a été déterminée par des expériences en spectroscopie Infra-Rouge (Castano *et al.*, 1999a ; Castano *et al.* 1999b). Ces peptides sont constitués de motifs répétés de lysine et leucine et présentent soit une structure en hélice α soit en feuillet β pour l'ensemble de leurs résidus. Le spectre dichroïque caractérisant l'hélice de type II (hélice gauche avec 3 résidus par tour) a été effectué avec la poly-L-proline de Sigma. Pour le spectre dichroïque représentatif de la pelote statistique, nous avons gardé le spectre de la poly-L-lysine à pH neutre.

Les spectres dichroïques des quatre structures secondaires standard sont présentés sur la Figure 1.

Chaque motif structural possède un spectre dichroïque caractéristique. En général le spectre de la pelote statistique se distingue par deux intensités de signes opposées : un minimum pour une longueur d'onde $\lambda = 196$ nm et un maximum de faible intensité pour $\lambda = 220$ nm. Le spectre de l'hélice α possède trois points singuliers: un maximum d'intensité très importante à 192 nm, puis deux minima d'intensités voisines à 208 et 220 nm. La structuration en feuillet β conduit à un spectre dont les deux extrémités sont inversées par rapport à la pelote statistique et de moins grande intensité que l'hélice α avec un maximum d'absorption à 198 nm et un minimum à 217 nm. L'allure du spectre représentant l'hélice de type II est proche du spectre de la pelote statistique, mais a un minimum pour $\lambda = 206$ nm.

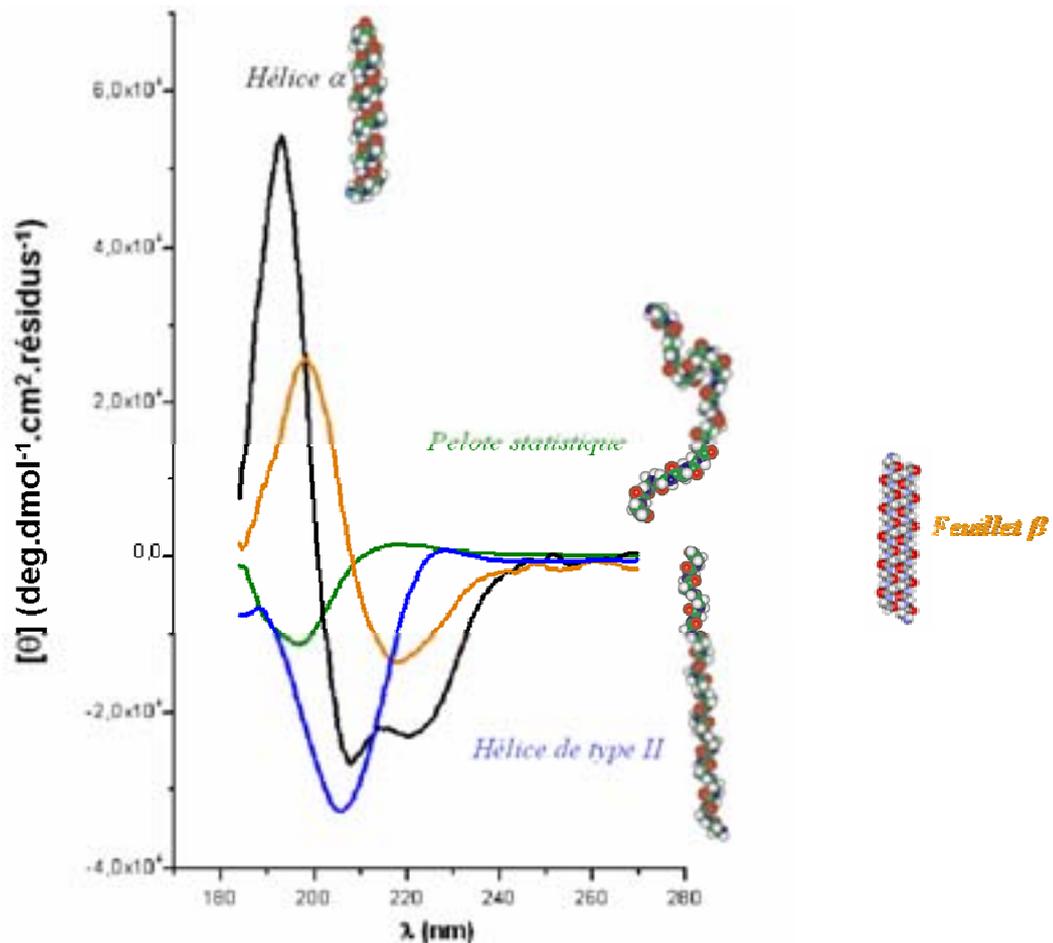


Figure 1 . Spectres dichroïques de peptides caractéristiques des principales structures secondaires de protéines : l'hélice α (noir), le feuillet β (orange), l'hélice de type II (bleu), ainsi que la pelote statistique (vert). $[\theta]$ est l'ellipticité molaire par résidu, définie dans l'équation 1.2.

1.5. Aspects expérimentaux

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur un dichrographe Mark VI (Jobin-Yvon) pour des longueurs d'ondes variant de 184 à 270 nm avec un défilement de 0.5 nm.s⁻¹ et un incrément de 0.5 nm. Les spectres sont obtenus après 2 à 4 accumulations. Les cuves de quartz de 0.1 mm de trajet optique ont été utilisées. Les spectres des blancs (eau, TFE, lipides) sont systématiquement soustraits. Dans certains cas, les spectres expérimentaux sont lissés à l'aide du programme MicroCal d'Origin (Filtre FFT).

2. La spectrométrie de masse (SM)

Un spectromètre de masse est un instrument composé d'une source, d'un analyseur et d'un détecteur. Dans la source, les molécules sont ionisées et amenées en phase gazeuse. Les ions formés dans la source sont ensuite séparés par l'analyseur suivant le rapport masse sur charge (m/z) avant d'atteindre le détecteur.

Pour notre étude, nous avons utilisé deux types de sources : l'une faisant appel à la désorption-ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) et une autre utilisant l'ionisation par électrobulisaison (electrospray, ESI). La source MALDI est associée à un analyseur à temps de vol (ToF), alors qu'un analyseur de type piège ionique est couplé à la source électrospray. Dans cette partie, nous allons introduire les techniques de spectrométrie de masse qui nous ont permis de réaliser cette étude.

2.1. Le MALDI-ToF

2.1.1. Principe de l'ionisation MALDI

L'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) doit son origine aux travaux de Karas (Karas *et al.*, 1980). Le principe de cette technique repose sur l'ionisation au moyen de photons laser d'une matrice, co-cristallisée avec l'échantillon. Le mélange matrice-échantillon est déposé sur un support métallique (la cible) et cristallise, après évaporation du solvant. La cible est ensuite introduite dans la source du spectromètre de masse maintenue sous vide. L'échantillon est irradié dans la source par un faisceau laser. Lorsque le rayonnement laser atteint les cristaux, son énergie est transférée à la matrice, qui se vaporise et entraîne en phase gazeuse des molécules intactes d'analytes. Pendant l'expansion du nuage moléculaire formé, l'analyte s'ionise par transfert de protons de la matrice vers l'analyte ou encore par collision des molécules entre elles. Notons que l'ionisation de l'échantillon peut également avoir lieu dans la phase solide, avant irradiation. Les protons proviennent en majorité de la matrice, mais aussi du solvant de l'analyte. Les ions positifs formés sont principalement des ions monochargés $[M+H]^+$, mais des espèces di- ou tri-chargées peuvent être observées, selon l'affinité protonique de la matrice employée et la taille des polypeptides analysés.

2.1.2. Principe de l'analyseur à temps de vol

Après avoir produit des ions en phase gazeuse, plus ou moins solvatés, il reste encore à transmettre ces ions de la source vers l'analyseur. Dans le cas du MALDI, ce transfert se réalise à l'aide de lentilles d'accélération ou de grilles d'accélération.

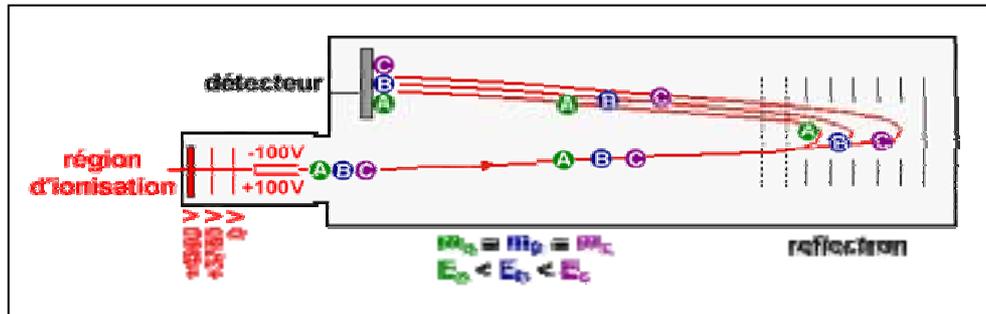


Figure 2. Schéma d'un analyseur à temps de vol (ToF) en mode réflectron

L'analyseur à temps de vol fut développé par Wiley et Mac Laren au milieu des années 1950 (Wiley *et al.*, 1955). Lorsque des ions de même charge z sont dans le champ électrique généré par un potentiel d'accélération V_0 , ils possèdent tous la même énergie cinétique zV_0 si leur énergie cinétique initiale est nulle ou négligeable. Lorsqu'un ion entre dans l'analyseur, zone libre de champ, son énergie cinétique s'exprime alors en fonction de sa masse m et du carré de sa vitesse v . On peut alors écrire l'égalité des deux expressions de l'énergie cinétique :

$$zV_0 = \frac{1}{2} mv^2 = \text{constante} \quad (2.1)$$

Il est donc simple d'exprimer le temps de vol t , grandeur accessible par la mesure en fonction de la longueur du tube de vol $L = vt$ en écrivant :

$$t = \left(\frac{m}{2zV_0} \right)^{1/2} L \quad (2.2)$$

La mesure du temps de vol permet alors de calculer le rapport m/z par l'équation :

$$\frac{m}{z} = \frac{2V_0 t^2}{L^2} \quad (2.3)$$

L'équation ci-dessus montre que deux ions de masses différentes et de même charge auront des vitesses différentes, puisqu'ils ont la même énergie cinétique. Ils auront donc, dans l'analyseur, des temps de vol différents: le tri des ions s'effectue selon leur masse, un ion léger étant détecté avant un ion plus lourd. L'étalonnage du spectromètre, à l'aide d'un mélange de molécules de masses connues, permet d'associer la masse d'un ion à un temps de vol donné.

Cependant, la condition (2.1) n'est pas facile à respecter en pratique. En effet, une forte hétérogénéité de l'énergie des ions existe au sein du volume gazeux créé après l'impact du faisceau laser, il en résulte une faible résolution. Deux dispositifs sont utilisés pour corriger cette dispersion d'énergie : l'extraction retardée des ions (Brown et Lennon, 1995 ; Vestal *et al.*, 1995) et le miroir électrostatique, ou reflectron. Dans le cas de l'extraction retardée, un délai destiné à favoriser l'homogénéisation des vitesses est utilisé avant l'application de la tension d'extraction-accelération des ions. Le miroir électrostatique utilise un jeu de lentilles qui établissent un champ électrostatique dans lequel les ions sont freinés puis réfléchis avant d'être détectés. Les instruments de ce type permettent d'atteindre une résolution supérieure ou égale à 10 000 pour des peptides de moins de 50 résidus.

Les analyses de masse par la technique de MALDI-ToF en mode reflectron (Bruker Reflex III) ont été effectuées après chaque synthèse pour vérifier la présence des protéines et après certaines étapes de purification pour contrôler leur pureté.

2.2. L'ESI couplé au piège ionique

2.2.1. Principe de l'électrospray

L'échantillon est introduit dans la source ESI à faible débit (1 à 20 $\mu\text{l}/\text{min}$) par un capillaire métallique auquel un potentiel élevé est appliqué (Figure 3). Un gaz de désolvatation (diazote), pouvant être chauffé, est introduit dans la source; le même gaz peut être envoyé de manière coaxiale au capillaire pour assister la nébulisation. Le champ électrique entre le capillaire et le cône d'entrée de l'analyseur (*skimmer*) entraîne une accumulation de charges en surface du liquide et son élongation en forme de cône de Taylor dans la direction de la contre électrode. A l'extrémité du cône de Taylor, la densité de charge est telle que les répulsions électrostatiques des charges entre elles sont supérieures à la tension superficielle qui garantit la cohésion du liquide

(Hayati *et al.*, 1987 ; Fenn *et al.*, 1989). Le cône donne alors naissance à de fines gouttelettes chargées (d'un diamètre de quelques dizaines de μm). Lorsque le solvant s'évapore, grâce au chauffage de la source et à l'introduction du gaz de désolvatation, les gouttelettes deviennent plus petites, mais conservent leur charge initiale. A cause des répulsions électrostatiques, la cohésion d'une goutte n'est plus assurée lorsqu'elle atteint la limite de stabilité de Rayleigh, c'est à dire son rayon maximum R en fonction de l'excès de charges q_R qu'elle contient. La charge et le rayon critique de Rayleigh sont reliés par l'équation :

$$q_R = 8 \pi (\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2} \quad (2.4)$$

Lorsque le rayon maximum R est atteint, on observe alors le phénomène d'explosion coulombienne : les gouttelettes du spray éclatent en gouttelettes "filles" de plus en plus petites, de même polarité. Le spray de gouttelettes est dirigé vers la contre électrode à cause de la polarité de celle-ci, et dans une moindre mesure, du gradient de pression dans la zone d'interface de la source (de la pression atmosphérique vers 10^{-5} Torr dans l'analyseur).

L'ordre de grandeur des concentrations utilisées pour l'analyse de peptides ou protéines est de 1 à $10 \mu\text{M}$. Le solvant utilisé est le plus souvent aqueux, à pH bas en présence d'un solvant organique; une formulation courante de solvant est : 1% acide acétique dans un mélange méthanol/ eau (1/1). La source ESI peut fonctionner dans une version miniaturisée (nanospray) avec des débits allant de 10 à 200 nl/min. (Wilm et Mann, 1996).

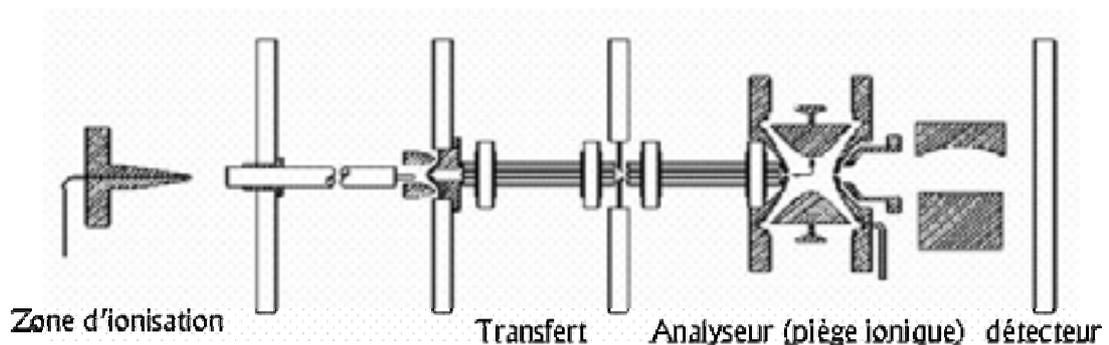


Figure 3. Schéma du principe d'un spectromètre ESI piège ionique.

2.2.2. Interprétation des spectres en ESI

Le spectre d'un polypeptide obtenu en ESI (ions positifs) se présente sous la forme d'une enveloppe de pics, correspondant à la distribution statistique des états de charge n de la molécule de masse M . Pour une molécule de masse M on obtient une série d'ions de masses : $[M+nH]^{n+}$, $[M+(n+1)H]^{(n+1)+}$, $[M+(n+2)H]^{(n+2)+}$, ..., $[M+(n+i)H]^{(n+i)+}$, où n est un entier positif dont la valeur dépend du nombre de sites basiques du peptide (essentiellement R, K, H et le N-terminal).

Chaque ion de la série décrite ci-dessus a un atome d'hydrogène et une charge de plus que le précédent. La seule difficulté est de connaître la valeur de l'état de charge n associé à un pic. La mesure des rapports masse sur charge de deux pics consécutifs sur le spectre, permet de calculer facilement M et n . On trouve ainsi que :

$$M = \frac{(m_1-1)(m_2-1)}{(m_2-m_1)} \quad \text{et} \quad n = \frac{m_1-1}{m_2-m_1} \quad (2.5)$$

2.2.3. Principe de l'analyseur à piège ionique

La conception du piège ionique quadripolaire est basée sur l'assemblage de trois électrodes de géométrie hyperbolique : une électrode centrale circulaire appelée également électrode annulaire est placée symétriquement entre deux électrodes chapeaux identiques. Les électrodes chapeaux se distinguent par le nombre de perforations en leurs centres. L'électrode d'entrée doit laisser pénétrer les ions générés dans une source d'ionisation externe à la cellule. L'électrode de sortie doit laisser passer les ions expulsés en vue de leur détection. Des ions de rapport m/z différents sont présents simultanément au sein du piège. En faisant varier les tensions on cherchera à éjecter les ions en fonction de leur rapport m/z pour obtenir un spectre de masse. L'hélium qui est introduit dans le piège (pression résiduelle de l'ordre de 10^{-5} Torr) sert à relaxer les ions en énergie cinétique pour mieux les piéger.

Le mouvement des ions dans le piège quadripolaire (solutions des équations différentielles de Mathieu) apparaît très proche d'une courbe de Lissajous, soit une sorte de huit dans l'espace (March and Londry, 1995 ; Todd et March, 1995).

2.2.4. MS/MS dans le piège ionique

Cette méthode permet de sélectionner dans le piège les ions d'une masse choisie sur le spectre primaire. Au cours du temps, ces ions vont se fragmenter dans le piège par collision avec les atomes d'hélium, ce qui permettra d'obtenir le spectre des ions fragments (Figure 4). Le processus de MS/MS est ainsi effectué dans le temps, au lieu de le réaliser dans l'espace (cas du triple quadrupole par exemple). Le processus peut être répété plusieurs fois en sélectionnant des ions précurseurs successifs (MS^n).

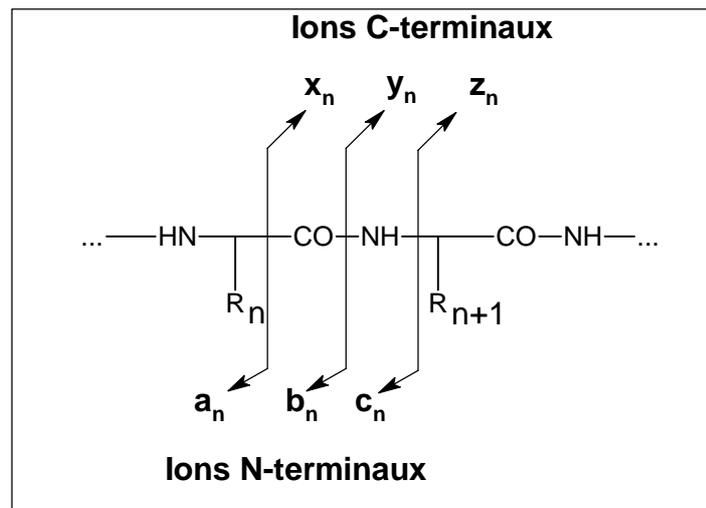


Figure 4. Nomenclature de la fragmentation d'un peptide. Les ions N-terminaux (a_n , b_n et c_n) sont décomptés à partir du résidu N-terminal. Les ions C-terminaux (x_n , y_n et z_n) sont décomptés à partir du résidu C-terminal.

La MS/MS a été utilisée dans le but d'identifier toutes les impuretés des peptides synthétisés. La visualisation d'impuretés par l'ESI couplé à un analyseur de type trappe à ions consiste en l'isolement d'un composé de masse donnée, puis sa rupture en différents ions fragments. Le spectre des ions fragments permet de remonter à la séquence du peptide et donc d'identifier les impuretés (Biemann, 1998).

3. Dynamique Moléculaire

3.1. Généralités

3.1.1. Introduction

La dynamique moléculaire est une méthode d'étude des mouvements et de l'évolution de la configuration spatiale des systèmes moléculaires. Elle propose une description à l'échelle atomique de la matière sans faire appel à la mécanique quantique. Les molécules peuvent être comparées à des boules reliées par des ressorts. Tout le système est régi par la mécanique classique et par simple intégration de l'équation de Newton on peut suivre la trajectoire des atomes au cours du temps. La description obtenue peut sembler superficielle et ne peut rendre compte d'un chemin réactionnel. Néanmoins, cette description simplifiée de la matière a prouvé qu'elle était suffisante et fiable pour les questions que se posent les scientifiques sur la structure et la dynamique des molécules.

3.1.2. Le champ de forces

Le mouvement des atomes est inhérent à tout système chimique et les vibrations atomiques dépendent de la température. Au niveau moléculaire, cet effet se traduit par une compression/extension des liaisons ou par la variation des angles de valence ou de torsion. Ainsi une molécule est considérée comme un ensemble d'atomes dont les interactions mutuelles peuvent être décrites par une fonction d'énergie potentielle ou champ de forces.

On appelle champ de forces le fichier où tous les paramètres de charges, de constantes d'oscillateur ou de rayons de Van der Waals sont définis. Il existe divers champs de forces. Deux champs de forces ont été utilisés pour ce travail, AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement) et CVFF (Consistent Valence Force Field) (Höltje *et al.*, 2003).

On distingue deux types de termes énergétiques : les termes liés dits intramoléculaires (angles, angles dièdres, liaisons) et les termes non liés intra ou intermoléculaires dus à l'interaction électrostatique ou à celle de Van der Waals (charge et rayon de Van der Waals). Dans le cadre des protéines, un terme spécifique pour les liaisons hydrogènes est indispensable et doit être rajouté.

Dans un champ de forces, l'énergie est exprimée comme étant la somme des différents termes explicités précédemment.

Par exemple :

$$E_t = \overbrace{E_{liaison} + E_{valence} + E_{torsion}}^{\text{Termes liés}} + \underbrace{E_{H-H} + VdW + e^-}_{\text{Termes non liés}} \quad (3.1)$$

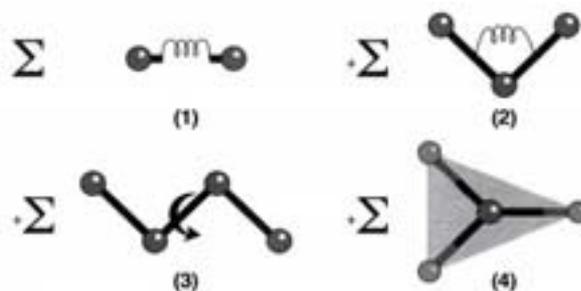


Figure 5 . Illustration graphique des quatre termes liés du champ de forces ; déformation (1) des liaisons, (2) des angles, (3) des angles de torsion et (4) des interactions en dehors du plan. Les atomes sont représentés par des sphères et les liaisons par des ressorts.

Les termes liés :

Les termes liés pour une molécule (équation 3.1) représentent respectivement les énergies de déformation de liaisons, des angles de valence, des angles de torsion et des interactions en dehors du plan.

Les termes non liés :

Pour avoir l'expression complète de l'énergie d'une molécule il faut ajouter les termes d'énergies dus à l'interaction électrostatique, à l'interaction de van der Waals et le terme spécifique pour les liaisons hydrogènes.

L'énergie de van der Waals, qui traduit la répulsion des atomes entre eux à courte distance et leur attraction à longue distance, est représentée par un potentiel de Lennard-Jones et est calculée en considérant l'ensemble des atomes de la structure moléculaire selon la formule :

$$V_{ij} = \sum_{\text{atomes}} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \quad (3.2)$$

A_{ij} et B_{ij} sont les constantes de Van der Waals pour les atomes considérés et r_{ij} est la distance entre les atomes.

Par ailleurs, l'énergie de Coulomb, qui traduit les interactions électrostatiques entre atomes, est calculée en considérant l'ensemble des atomes de la structure moléculaire selon la formule :

$$V_{el} = \frac{-q_i q_j}{4 \pi \epsilon_0 r_{ij}} \quad (3.3)$$

Où ϵ est la constante diélectrique du milieu, q_i et q_j sont les charges des atomes considérés et r_{ij} est la distance entre les atomes.

3.1.3. La notion de Cut-Off ou troncature

A chaque pas d'intégration, pour chaque atome, on doit calculer toutes les forces s'exerçant sur cet atome. Les interactions liées sont limitées mais les interactions non liées ont une portée infinie. En effet si le système étudié comporte 1000 atomes, la somme des interactions non-liées est d'environ 50 000 termes. Afin de réduire le nombre d'interactions non liées à calculer entre un atome et ses voisins on fait l'approximation qu'au delà d'une certaine distance, ces interactions sont négligeables. Cette distance est appelée distance de troncature ou « Cut-Off ». Le Cut-Off peut être défini par paire d'atomes ou par groupe.

Avec l'utilisation d'un Cut-Off on génère donc une erreur sur la valeur des interactions non liées. Il est utile d'évaluer cette erreur. Généralement le Cut-Off utilisé est de l'ordre de 10 Å, l'erreur pour le potentiel de Van der Waals sera donc inférieure à 1% en revanche elle sera de l'ordre de 10% pour le potentiel coulombien. Cette approximation est donc correcte pour nos systèmes qui sont plus ou moins neutres.

3.1.4. La périodicité

Afin de simuler le comportement du peptide dans un environnement le plus proche de la réalité, on est amené à l'entourer de solvant (eau, octanol). Pour maintenir la cohésion de ce nouveau système et éviter l'évaporation du solvant on utilise la méthode PBC (Periodic Boundary Conditions ou conditions périodiques limites). Les conditions périodiques limites permettent de simuler l'aspect infini d'une solution, l'influence d'un solvant ou un environnement cristallin et d'éliminer les problèmes de bords de boîtes.

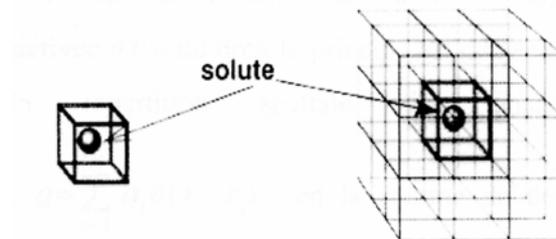


Figure 6. Soluté entouré par le solvant. Un soluté entouré par un cube de solvant est répliqué périodiquement dans les trois dimensions.

La Figure 6 représente un soluté dans une boîte de solvant. Une simulation de ce système cubique isolé ne serait qu'une mauvaise approximation de ce qui pourrait se passer dans un solvant réel puisque le soluté peut diffuser à travers la surface ou les molécules de solvant peuvent s'évaporer.

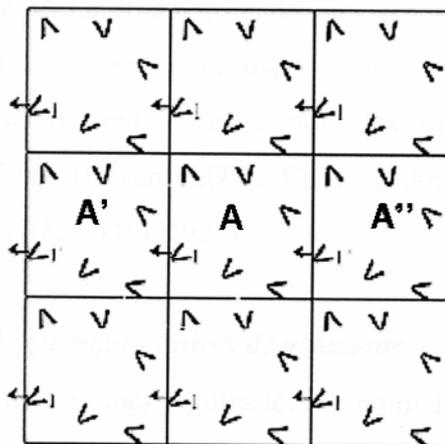


Figure 7. Représentation de la périodicité à deux dimensions. Si une molécule sort de la boîte A vers la boîte A', son image dans la boîte A'' sera alors considérée comme nouvelle molécule dans la boîte A.

Pour remédier à ceci, le cube est répliqué dans les trois dimensions de l'espace pour former un réseau $3 \times 3 \times 3$ de cubes identiques. De cette façon, les molécules proches de la surface peuvent maintenant interagir avec le solvant des cubes adjacents. De plus quand une molécule 1 sort de la boîte centrale et qu'elle pénètre dans la boîte voisine A' par une face, elle est remplacée par son image 1' provenant de la boîte A'' qui pénètre dans la boîte A par la face opposée (Figure 7).

La périodicité permet aux molécules proches du bord de la boîte d'être complètement entourées d'autres molécules de solvant. Elles interagiront donc avec les molécules ou l'une de leurs images se trouvant dans la limite du Cut-Off. La distance de Cut-Off utilisée doit être inférieure à la moitié de la plus petite des dimensions de la boîte de sorte que ni le soluté ni une molécule de solvant n'interagisse avec aucune de ses images présentes dans les boîtes voisines. Le Cut-Off devant être raisonnable, il en résulte que les dimensions de la boîte solvant doivent être suffisamment grandes. Dans notre cas, nos boîtes sont généralement cubiques et leur côté est de 45 Å.

3.1.5. La minimisation

Lors de la création d'un système à étudier, les atomes sont considérés comme des points géométriques, leurs positions sont donc arbitraires. Il est donc impératif de relaxer la géométrie du système, c'est à dire de diminuer son énergie. Ce mécanisme s'appelle la minimisation. En l'absence de minimisation, l'énergie deviendrait trop élevée et la dynamique conduirait alors à "l'explosion" des molécules et du système entier. La minimisation s'effectue en coordonnées cartésiennes et conduit au minimum local le plus proche du point de départ. Il est utile de noter que dans le cas d'un système complexe, avec une énergie dépendant de multiples variables, l'état final obtenu après minimisation dépendra du point de départ et de la taille du pas d'intégration (Figure 8).

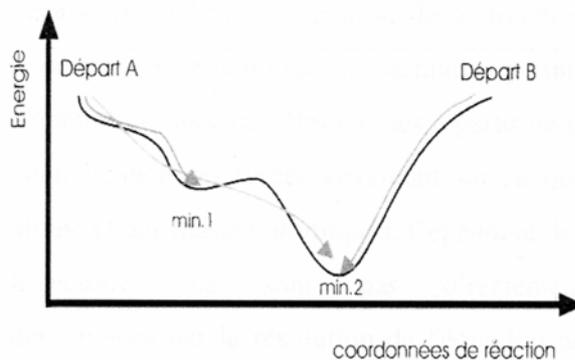


Figure 8. Représentation de minimisation d’une même structure représentée par un puit de potentiel depuis deux points de départ A et B différents.

La minimisation s’arrête lorsqu’un critère de convergence RMS (Root Mean Square : racine des moindres carrés) du gradient de l’énergie potentielle V atteint une valeur inférieure à celle définie par l’utilisateur ou lorsque le nombre de pas défini par l’utilisateur est atteint.

3.1.6. La dynamique

La simulation en dynamique moléculaire (DM) utilise la seconde loi de Newton pour décrire le mouvement d’une molécule en fonction du temps :

$$F_i = m_i a_i \quad (3.4)$$

F_i est la force, m_i est la masse et a_i est l’accélération de l’atome i .

Comme le montre l’équation de Newton, la vitesse et le sens du mouvement atomique dépendent des forces qui s’exercent entre les atomes. En pratique, les atomes possèdent une vitesse initiale propre qui se conforme à l’énergie cinétique totale du système. Cette énergie dépend elle-même de la température de simulation désirée. Elle est habituellement obtenue en élevant lentement la température d’un système moléculaire placé initialement au zéro absolu et en amenant ainsi progressivement les atomes qui le constituent à l’énergie d’équilibre. La dynamique moléculaire permet de calculer la force exercée sur chaque atome et de déterminer les différentes informations liées à la connaissance de cette donnée (vitesse et position des atomes pendant un intervalle de temps spécifique, de l’ordre de 1 ps à quelques ns suivant les systèmes moléculaires).

La force F_i qui s'exerce sur un atome i peut être directement calculée depuis la dérivée de l'énergie potentielle V en fonction des coordonnées r_i :

$$\frac{\partial V}{\partial r_i} = m_i \frac{\partial^2 V}{\partial t^2} \quad (3.5)$$

L'énergie potentielle du système V se calcule en utilisant les techniques de la mécanique moléculaire ou de la chimie quantique. La mécanique moléculaire ne permet de calculer l'énergie que pour des applications n'induisant pas de modifications importantes de la structure électronique (ex : rupture/formation d'une liaison). La chimie quantique donne une valeur de l'énergie permettant d'étudier des processus dynamiques entraînant des changements chimiques mais cette application est d'utilisation limitée compte tenu de la durée des calculs nécessaires à la détermination de la fonction énergie. La dynamique moléculaire permet d'étudier la trajectoire des atomes à partir de la connaissance des forces s'exerçant sur chaque atome et des masses atomiques. Cependant, les trajectoires ne sont pas directement déterminées par la résolution de l'équation de Newton précédente. Une approche différente est utilisée à l'aide de l'algorithme de Verlet (Verlet, 1967). Elle consiste à calculer :

Les accélérations atomiques à partir des forces s'exerçant sur chaque atome et des masses atomiques :

$$a_i = \frac{F_i}{m_i} = \frac{-1}{m_i} \frac{\partial V}{\partial r_i} \quad (3.6)$$

Les vitesses, V_i , de chaque atome à partir de la connaissance des accélérations atomiques :

$$V_i(t + \Delta t/2) = V_i(t - \Delta t/2) + a_i \Delta t \quad (3.7)$$

Les positions des atomes à partir des vitesses atomiques :

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + V_i \Delta t \quad (3.8)$$

où $r_i(t)$ désigne la position (coordonnées) de l'atome i au temps t

3.2. Dynamique moléculaire avec le logiciel Macromodel

3.2.1. Champ de Force

Le champ de force AMBER a été créé par Peter Kollman et ses collaborateurs (Weiner et Kollman, 1981), c'est un champ de force généraliste paramétré pour les protéines, les acides nucléiques et certaines molécules organiques.

La forme fonctionnelle de AMBER de l'énergie potentielle est donnée par l'équation suivante :

$$\begin{aligned}
 & \text{(1)} \qquad \qquad \qquad \text{(2)} \qquad \qquad \qquad \text{(3)} \\
 E_{pot} = & \sum_i K_i (r - r_0)^2 + \sum_\theta H_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_\varphi H_\varphi [1 + \cos (n\varphi - \varphi_0)] \\
 & \text{(4)} \qquad \qquad \qquad \text{(5)} \qquad \qquad \qquad \text{(6)} \\
 + & \sum_\lambda H_\lambda (\lambda - \lambda_0)^2 + \sum_{i < j} \left(\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\varepsilon R_{ij}} \right) + \sum \left(\frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right)
 \end{aligned}$$

Les termes 1 à 4 représentent respectivement les énergies de déformations des liaisons (1), des angles de valence (2), des angles de torsion (3) et des interactions en dehors du plan (4). K_i , H_φ , K_θ , H_λ représentent les constantes, r est la longueur entre 2 atomes liés, θ est l'angle de valence, λ est l'angle de torsion et φ l'angle dièdre.

Le terme 5 représente les interactions non liées : les interactions de van der Waals et l'interaction électrostatique. A_{ij} et B_{ij} sont les constantes de van der Waals dépendants pour les atomes i et j , R_{ij} est la distance entre les atomes considérés, ε est la constante diélectrique du milieu, q_i et q_j sont les charges des atomes considérés.

Le terme 6 correspond au terme spécifique des liaisons hydrogènes. C et D sont les constantes dépendantes des atomes et R_{ij} est la distance entre les atomes.

3.2.2. Méthode de minimisation

Avec le logiciel Macromodel deux méthodes de minimisations ont été utilisées : Steepest Descent (SD) et Truncated Newton Conjugate Gradient (TNCG).

La méthode par gradients « steepest descent » est une minimisation du premier ordre qui utilise la dérivée de l'énergie potentielle V par rapport aux coordonnées. Cette méthode permet de descendre rapidement vers un minimum local mais elle ne permet pas de converger rapidement. En pratique, elle permet à partir des structures initiales de rétablir les longueurs de liaisons ainsi que les angles dièdres aux valeurs standards et d'éliminer les interactions fortes.

La méthode de minimisation "conjugate gradient" (de gradient conjugué) est basé sur le calcul du gradient de la fonction énergétique par rapport aux coordonnées géométriques afin de déterminer la distance au minimum énergétique le plus proche et dans quelle direction modifier les coordonnées de chaque atome de la structure. Le gradient correspond à une conjugaison des dérivées premières entre elles. Cette méthode reprend donc, de manière plus précise, le principe des méthodes de minimisation de type "steepest descent".

Cette méthode est de loin la meilleure méthode, en revanche elle est limitée au mieux à 1000 atomes et ne peut donc pas être utilisée dans tous les cas.

3.2.3. Cut-Off

Avec le logiciel Macromodel, le Cut-Off est défini par paires d'atomes. Il est de 7 Å pour l'énergie de Van der Waals et de 12 Å pour l'énergie électrostatique.

3.2.4. Solvants implicites : l'eau et le chloroforme

L'eau et le chloroforme sont dits solvants explicites, en opposition avec la notion de solvant implicite, dans laquelle les atomes ne sont pas représentés et sont alors remplacés par un potentiel continu.

Le modèle explicite de l'eau utilisé dans notre étude, noté TIP3P (Jorgensen, 1983,1998) est un modèle rigide à trois points et trois liaisons où une liaison fictive entre les deux hydrogènes a été ajoutée. L'équilibration des molécules d'eau a été effectuée par Jorgensen (Jorgensen, 1983) dans une boîte de 216 molécules avec une méthode de type Monte Carlo. Ce modèle est souvent utilisé car il mime de façon satisfaisante le comportement de l'eau vis-à-vis des macromolécules biologiques et des ions.

Le modèle explicite du chloroforme utilisé a été fabriqué comme le modèle de l'eau (Jorgensen, 1983). C'est un modèle flexible à quatre points et six liaisons.

3.2.5. Construction des peptides

Tous les peptides étudiés sont construits dans Macromodel version 6.5. Leurs séquences sont données dans le Tableau 1.

Nom	Séquence
KV ₁₂ K	KVVVVVVVVVVVVVVK
K ₂ V ₂₀ K ₂	KKVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVKK
K ₂ V ₃₂ K ₂	KKVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVKK
KV ₂₀ K	KVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVK
KL ₂₀ K	KLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLKK
KI ₂₀ K	KIIIIIIIIIIIIIIIIKK
KA ₂₀ K	KAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAK
K ₂ I ₅ V ₁₆ K ₂	KKIVVVVIVVVVIVVVVIVVVVIKK
K ₂ I ₁₀ V ₁₀ K ₂	KKIVIVIVIVIVIVIVIVIVVKK
K ₂ L ₅ V ₁₆ K ₂	KKLVVVVLVVVVLVVVVLVVVVLKK
K ₂ L ₁₀ V ₁₀ K ₂	KKLVLVLVLVLVLVLVLVLVKK

Tableau 1. Séquence des peptides étudiés

Tous les peptides sont construits soit en hélice de type α soit en hélice de type π . Les structures des peptides ont été minimisées jusqu'à un RMS d'environ 0.01 kJ.Å⁻¹.mol⁻¹ par la méthode TNCG.

Un modèle de solvation virtuelle GB/SA (solvant implicite) a été utilisé avec l'eau comme solvant selon l'approximation de Born-Oppenheimer (Still, 1990).

3.3. Dynamique moléculaire avec le logiciel DISCOVER

3.3.1. Champ de force

Le champ de force CVFF a été construit par Dauber-Osguthorpe (Dauber-Osguthorpe, 1988), c'est un champ de force généraliste paramétré pour les acides aminés, l'eau et une variété d'autres groupes fonctionnels. La forme fonctionnelle de CVFF de l'énergie potentielle est donnée par l'équation suivante :

$$\begin{aligned}
 E_{pot} = & \sum_b D_b [1 - e^{-\alpha(b-b_0)}] + \sum_{\theta} H_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\varphi} H_{\varphi} [1 + s \cos(n\varphi)] + \sum_{\chi} H_{\chi} [1 + \cos(n\chi)] \\
 (1) & & (2) & & (3) & & (4) \\
 & + \sum_b \sum_{b'} F_{bb'} (b - b_0)(b' - b'_0) + \sum_{\theta} \sum_{\theta'} F_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) + \sum_b \sum_{\theta} F_{b\theta} (b - b_0)(\theta - \theta_0) \\
 & (5) & & (6) & & (7) \\
 & + \sum_{\varphi} F_{\varphi\theta\theta'} \cos \varphi (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0) + \sum_{\chi} \sum_{\chi'} F_{\chi\chi'} \chi\chi' + \sum \varepsilon [(r^*/r)^{12} - 2(r^*/r)^6] + \sum \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} \\
 & (8) & & (9) & & (10) & & (11)
 \end{aligned}$$

Les quatre premiers termes sont les termes diagonaux du champ de forces et représentent les énergies de déformations des longueurs de liaison, des angles de valence, des angles de torsion et des interactions en dehors du plan. Le premier terme est le potentiel de Morse utilisé pour le terme d'étirement de liaison.

Les termes de 5 à 9 sont les termes d'énergie croisés et représentent les couplages entre les liaisons, les angles de valence, les liaisons et les angles de valence, les angles de valence et les angles de torsions et entre les angles en dehors du plan. Ces termes sont requis pour reproduire avec précision les fréquences vibrationnelles expérimentales et les propriétés dynamiques des molécules. De plus ils prennent en compte les déformations structurales.

Les termes 10 et 11 représentent les interactions non liées : les interactions de van der Waals et électrostatiques.

Dans CVFF les liaisons hydrogènes sont la conséquence naturelle des paramètres de van der Waals et électrostatiques.

3.3.2. Méthode de minimisation

Les deux méthodes de minimisations utilisées avec Discover sont Steepest Descent (SD) et Conjugate Gradient (CG), dans ce dernier cas, vu le nombre d'atomes pris en compte, seule une méthode par dérivées premières peut être utilisée.

3.3.3. Cut-Off

Avec le logiciel InsightII, le Cut-Off est défini par groupe d'atomes. Pour toutes les simulations effectuées, que ce soit dans l'eau, l'octanol ou le système eau/chloroforme/eau, un Cut-Off de 13 Å a été choisi.

3.3.4. Solvants explicites

Les solvants utilisés sont l'eau et l'octanol.

3.3.5. Construction des molécules et des assemblages de molécules

Construction des peptides :

Les peptides sont construits dans Macromodel puis exportés dans InsightII après addition de tous les hydrogènes.

Construction d'une boîte d'eau pour l'étude du peptide KV₁₂K :

Une molécule du peptide KV₁₂K est placée au centre d'une boîte cubique de côté 45 Å qui est ensuite remplie d'eau pré-équilibrée. Ceci correspond à 2918 molécules d'eau pour un total de 8995 atomes, y compris 2 ions chlorures, contre-ions du peptide. La boîte est simulée pendant 5 ns à pression constante à 300 K et 1 atm.

Construction d'une boîte d'octanol pour l'étude du peptide KV₁₂K :

Une molécule du peptide KV₁₂K est placée au centre d'une boîte cubique de côté 45 Å qui est ensuite remplie d'octanol pré-équilibré. Ceci correspond à 274 molécules d'octanol pour un total de 7635 atomes, y compris 2 ions chlorures. La boîte est simulée pendant 5 ns à pression constante à 300 K et 1 atm.

Construction du système eau/chloroforme/eau pour l'étude du peptide K₂V₂₀K₂ :

Un système eau/chloroforme/eau est utilisé pour mimer une interface eau/membrane. L'épaisseur de la couche de chloroforme est de 30 Å. Le peptide est ensuite placé au centre d'une boîte (45 × 57 × 45) Å³. Les charges portées par les peptides sont neutralisées par des ions chlorures. La boîte contient 1777 molécules d'eau et 322 molécules de chloroforme pour un total de 7356 atomes. La boîte est simulée pendant 3 ns à volume constant à 300 K.

Construction des couches phospholipidiques pour l'étude de K₂V₃₂K₂:

Nous sommes partis d'une couche de DMPC préalablement minimisée et dynamisée (Aussenac et al., 2003). Elle est composée de 2 × 30 lipides mis en conformation A au début de la simulation et placés au centre d'une boîte de dimension 42.5 × 60.0 × 44.4 Å³ remplie d'eau. La boîte a été dynamisée pendant 2 ns à volume constant puis pendant 2 ns à pression constante.

Construction des systèmes peptides/membranes :

Un nombre suffisant de lipides est retiré au centre de la couche précédente pour permettre l'insertion du peptide. Ensuite le peptide est placé dans le trou juste à l'interface. On remplit ensuite la boîte d'eau et le système entier est traité dans des conditions périodiques limites. Les systèmes sont ensuite dynamisés d'abord à volume constant sans aucune contrainte pendant 1 ns puis à pression constante (P= 1 bar) à 300 K pendant 2 ns.

3.3.6. Méthodes d'analyses

Le module "Analysis" de InsightII développés par Molecular Simulations Inc. nous a permis d'exploiter une quantité importante de résultats issus des simulations par dynamique moléculaire. Ce module permet de suivre l'évolution des coordonnées d'un système au cours du temps. Dans ce travail, les coordonnées sont sauvegardés toutes les 1000 intégrations (1.5 ps).

L'analyse de cluster a été exécutée avec le programme de Xcluster fourni avec MacroModel. Les conformères obtenus peuvent être groupés dans un petit nombre de familles "cluster" qui sont représentatives de l'espace conformationnel possible de la molécule. Le critère de comparaison permettant la classification est appelé distance critique. La distance critique est soit le RMS de superposition des atomes non-hydrogène des molécules (critère de forme) ou le RMS des

angles dièdres correspondant à la constante de couplage 3J mesurées en RMN (critère RMN). Avec cette approche, on peut dire qu'un conformère appartient à un cluster s'il est à moins de la distance critique d'un élément du cluster et à plus de cette distance de tous les éléments de tous les autres clusters. Ceci implique qu'un élément du cluster peut très bien être à plus d'une distance critique de certains éléments de son propre cluster. De plus pour n conformères, le nombre des niveaux de clusterisation (n) peut varier de $N=1$ (tous les conformères sont dans un cluster simple) à $N=n$ (n groupe avec seulement un conformère dans chacun des clusters). Le choix de la pertinence est fait en fonction du critère de séparation qui est défini par le rapport de la distance critique entre deux clusters voisins : plus la valeur est haute, plus la séparation est pertinente, plus la valeur se rapproche de 1 et plus la séparation et donc la pertinence est limitée.

4. La Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

La RMN s'est largement développée ces dernières années pour l'étude de peptides et de protéines. Cette technique nous permet d'obtenir des informations sur leurs structures (primaires, secondaires et tertiaires) mais aussi sur leurs dynamiques et sur les interactions peptides/membranes. Dans le cadre de cette thèse, la RMN a été utilisée pour étudier les interactions entre les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} et la membrane.

4.1. Les bases de la RMN

4.1.1. Spin nucléaire et moment magnétique associé

La RMN est un phénomène par lequel le noyau de l'atome considéré absorbe les rayonnements électromagnétiques d'une fréquence spécifique en présence d'un fort champ magnétique. C'est une technique de spectroscopie appliquée aux particules ou ensembles de particules atomiques qui ont un spin nucléaire I . Un noyau est observable par RMN s'il présente des propriétés magnétiques caractérisées par l'existence d'un spin I non nul. Ces noyaux possèdent un moment magnétique μ et un moment cinétique de spin $\hbar \hat{I}$, qui sont reliés par la relation suivante :

$$\mu = \gamma \hbar \hat{I} \quad (4.1)$$

Où γ est le rapport gyromagnétique du noyau (valeur caractéristique du noyau) et $\hbar = h/2\pi$ où h est la constante de Planck.

Pour une particule ou un noyau placé dans un champ magnétique, les états de spin sont quantifiés, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent prendre qu'un nombre précis de valeurs définies par un nombre quantique magnétique de spin m_s . Les valeurs possibles du nombre quantique magnétique de spin d'une particule ou d'un noyau de spin égal à I sont $m_s = -I, -I+1, \dots, 0, \dots, I-1, I$. Le nombre d'états stationnaires distincts est donc égal à $2(I+1)$.

4.1.2. Déroulement de l'expérience « classique » de RMN

i) Le système de spin est à l'équilibre. A l'équilibre, lorsque les noyaux sont placés dans un champ magnétique principal, B_0 , les spins précessent à la fréquence de Larmor, que l'on note ω_0 (Figure 9).

9). La valeur de ω_0 est liée à B_0 par la relation de Larmor :

$$\omega_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (4.2)$$

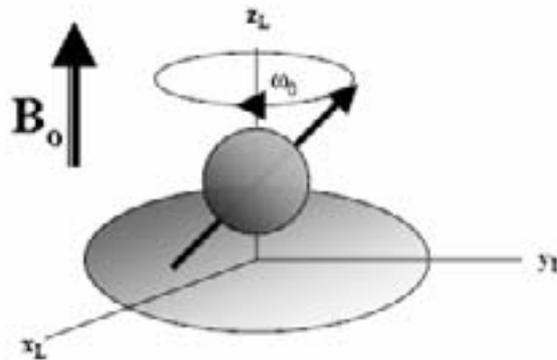


Figure 9. Schéma d'un noyau dans un champ magnétique B_0 , qui précesse à la fréquence ω_0 . x_L , y_L et z_L représentent le référentiel du laboratoire. (d'après Dufourc, 2002, cours de Master de Biochimie Structurale, Université Bordeaux 1 & 2).

A l'équilibre, les spins se répartissent sur les $2I+1$ niveaux d'énergie et la loi statistique de Boltzman régit la différence de population des états de spins. On obtient l'aimantation résultante M_0 dans la direction z (colinéaire à B_0).

ii) Le système est perturbé par un champ radiofréquence B_1 oscillant à une fréquence ω_1 . Le champ B_1 va interagir avec les spins et perturber ainsi leur distribution entre les différents niveaux d'énergies. Ce champ B_1 est appliqué perpendiculairement à B_0 le long de l'axe x' (du référentiel tournant) pendant une durée $\tau = \theta/\gamma B_1$, l'aimantation M_0 bascule d'un angle θ le long de l'axe y' .

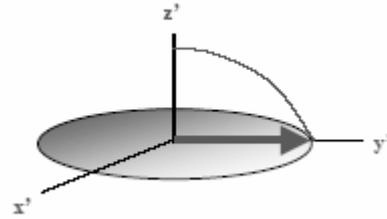


Figure 10. Basculement d'un angle $\theta = \pi/2$ du vecteur M_0 le long de l'axe y' (du référentiel tournant) après application de B_1 le long de l'axe x' . (d'après Dufourc, 2004, cours de Master de Biochimie Structurale, Université Bordeaux 1 & 2).

iii) Lorsque le champ radiofréquence B_1 cesse, on observe le retour à l'équilibre du système, l'aimantation va ainsi précesser dans le plan zy jusqu'à la position d'équilibre. Cette étape est appelée relaxation et peut se décomposer en une relaxation longitudinale (ou spin-réseau) selon l'axe z , de temps caractéristique T_{1z} , et une relaxation transverse (ou spin-spin) par rapport au plan xy de détection, de temps caractéristique T_2 . La relaxation longitudinale est liée à la dynamique rapide de l'environnement moléculaire du noyau. Son étude donne des informations importantes sur les mouvements moléculaires. La relaxation transverse est reliée à l'homogénéité du champ B_0 et dépend de la dynamique lente des molécules. A une faible valeur de T_2 , il faut associer un "FID" (Free Induction Decay) court dans le temps, se traduisant par un signal large dans l'espace des fréquences.

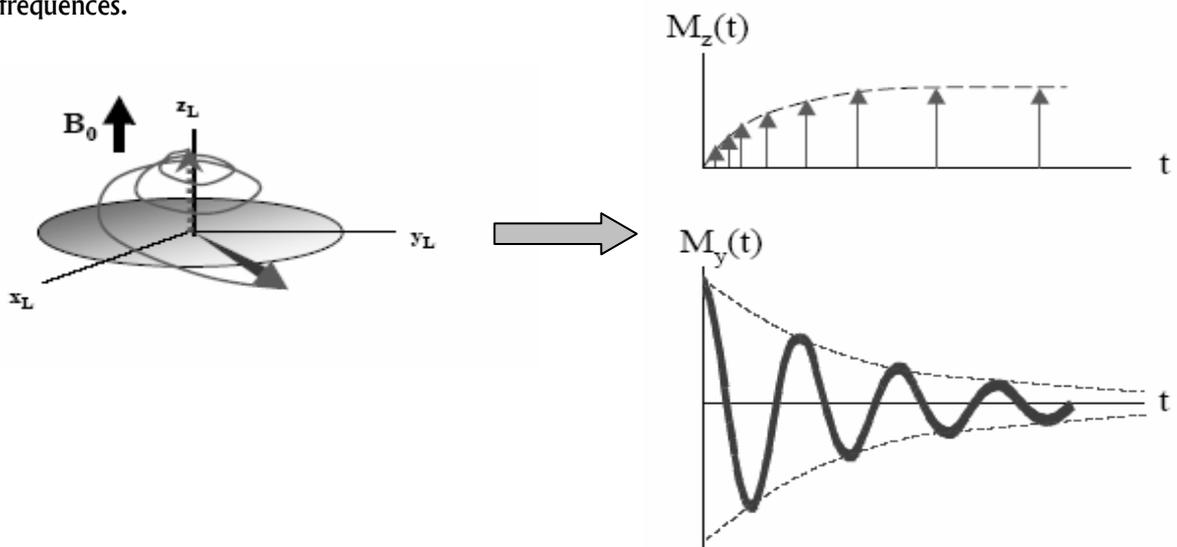


Figure 11. Le retour à l'équilibre lorsque le champ radiofréquence B_1 cesse. Ce retour à l'équilibre se décompose en relaxation longitudinale (en haut) et en relaxation transverse (en bas). (d'après Dufourc, 2004, cours de Master de Biochimie Structurale, Université Bordeaux 1 & 2).

4.1.3. Le signal RMN

Le signal de précession libre des spins ou FID (Free induction decay) que l'on peut détecter est une cosinusoïde d'argument (ωt) convoluée par une exponentielle décroissante caractérisant la relaxation transverse. Le passage du domaine temporel au domaine fréquentiel est assuré par un outil mathématique, la transformée de Fourier et conduit à l'obtention d'un spectre composé de raies dont la position en fréquence est associée à l'environnement électronique des noyaux et la largeur des raies à la dynamique des molécules.

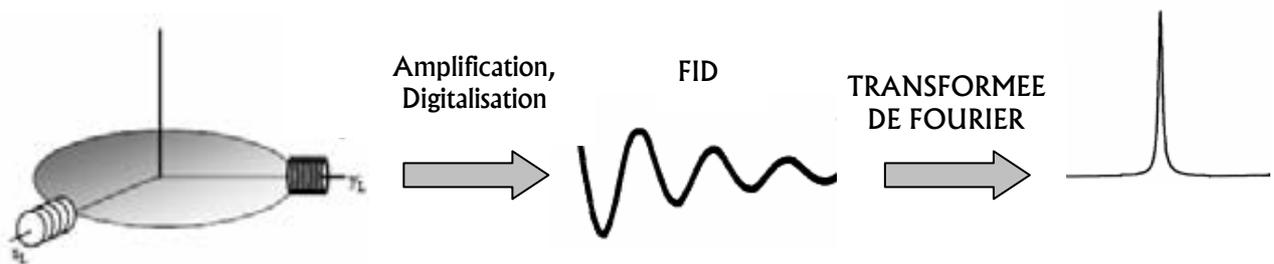


Figure 12. Schéma représentant la détection du signal. La FID est enregistrée grâce à un solénoïde placé sur l'axe des x et des y, par la transformation de Fourier, on obtient un signal qui représente le spectre RMN conventionnel sur une échelle de fréquence. (d'après Dufourc, 2004, cours de Master de Biochimie Structurale, Université Bordeaux 1 & 2).

4.2. Définitions : milieu isotrope et milieu anisotrope

L'environnement d'une molécule au sein d'un liquide est isotrope, c'est-à-dire qu'il est le même quelle que soit la direction de l'espace. On admet donc que l'on est dans un milieu isotrope si toutes les grandeurs sont moyennées sur toutes les directions de l'espace, ce qui conduit à ces 2 conditions :

- Lors du processus de réorientation, les mouvements moléculaires doivent être très rapides par rapport aux variations de toutes les interactions affectant les spins nucléaires.
- La molécule doit adopter toutes les orientations possibles avec la même probabilité.

Ces deux conditions permettent, *a contrario*, de caractériser un milieu anisotrope:

Pour un solide, monocristal ou poudre, ces deux conditions ne sont pas réalisées. Ces molécules possèdent un ordre de position et d'orientation. Les milieux organisés, les cristaux liquides, les membranes, possèdent une ou plusieurs directions privilégiées et la deuxième condition n'est donc pas satisfaite. Il existe un ordre d'orientation mais pas de position.

4.3. Les différents types de couplages ou d'interactions en phase liquide et solide

Dans un échantillon les spins nucléaires peuvent interagir avec des champs magnétiques ou des gradients de champs électriques (GCE). Les couplages peuvent être externes (champs magnétiques appliqués) et permettre la détection des signaux ou internes (champ locaux dans l'échantillon) et conduire à la structure et à la dynamique des molécules.

Les interactions peuvent être décrites grâce au concept d'hamiltonien de spin nucléaire (opérateur d'énergie \hat{H}) développé par Abragam (Abragam, 1961). L'hamiltonien se décompose donc en la somme d'un hamiltonien de couplage externe et un hamiltonien relatif aux couplages internes.

L'opérateur d'énergie est de la forme :

$$\hat{H} = \hat{H}_{\text{ext}} + \hat{H}_{\text{int}} \quad (4.3)$$

4.3.1. Les couplages externes : l'interaction Zeeman

L'interaction Zeeman est définie par l'interaction entre un noyau A de spin nucléaire I_A et d'une part le champ magnétique statique B_0 , et d'autre part par l'interaction entre un champ radiofréquence et les moments magnétiques. L'hamiltonien de Zeeman décrit le couplage entre le moment magnétique et le champ résultant B :

$$\hat{H}_{\text{ext}} = \hat{H}_Z = -\mu B = -\mu (B_0 + B_{1(t)}) = \hat{H}_0 + \hat{H}_1(t) \quad (4.4)$$

L'hamiltonien \hat{H}_0 associé au couplage entre les spins nucléaires et le champ magnétique statique B_0 s'écrit :

$$\hat{H}_0 = -\gamma \hbar \hat{I}_z B_0 \quad (4.5)$$

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

Si on applique B_1 selon la direction x' (du référentiel tournant), H_1 s'écrit :

$$\hat{H}_1 = -\gamma \hbar \hat{I}_x B_1 \quad (4.6)$$

Conséquence de l'effet Zeeman (cas stationnaire, pas de champ B_1 appliqué):

Lorsqu'on place par exemple, un spin $I=3/2$, dans un champ magnétique, quatre niveaux d'énergie distincts sont créés. Comme toute spectroscopie, une transition peut avoir lieu entre deux niveaux si le système est soumis à une radiation électromagnétique de fréquence obéissant à la loi de Bohr ($\Delta E = h\nu$). Une des originalités de la RMN tient au fait que la fréquence à laquelle a lieu la transition, appelée fréquence de résonance ou fréquence de Larmor, est proportionnelle au champ appliqué.

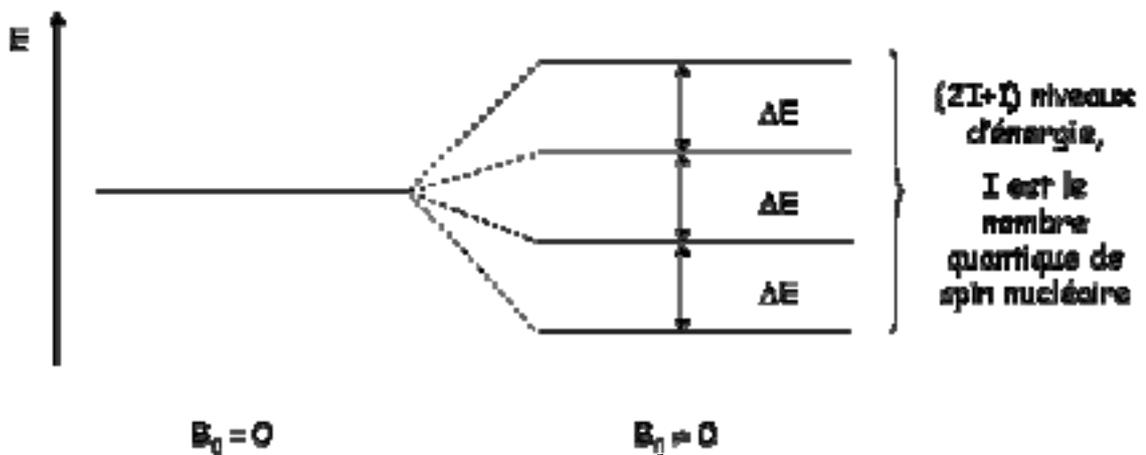


Figure 13. Eclatement des niveaux d'énergie d'un spin $I=3/2$ par application d'un champ magnétique statique B_0 . Les niveaux d'énergies créés se calculent à partir de l'énergie d'interaction entre moment et champ magnétique. (d'après Dufourc, 2004, cours de Master de Chimie, Université Bordeaux 1).

La fréquence de Larmor, ω_0 , est définie par la relation :

$$\Delta E = \hbar \omega_0 = \hbar \gamma_A B_0 \quad (4.7)$$

4.3.2. Les couplages internes

L'hamiltonien relatif aux couplages internes, \hat{H}_{int} , décrit les interactions entre le moment magnétique μ et les champs locaux présents dans l'échantillon (Mehring, 1983) :

$$\hat{H}_{int} = \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_C + \hat{H}_Q \quad (4.8)$$

L'hamiltonien \hat{H}_J relate les interactions spin-spin indirectes entre les moments magnétiques de deux noyaux d'une même molécule, via les électrons de la liaison chimique (Figure 14). Le couplage J peut être homo- ou hétéro-nucléaire. Il est indépendant de B_0 . Les couplages indirects sont liés à la densité électronique existant entre les noyaux couplés. Le couplage dépend du nombre de liaisons et de leurs orientations respectives. Dans le cas des couplages proton-proton, on peut admettre qu'au-delà de trois liaisons les couplages deviennent faibles (sauf géométrie particulière ou existence de liaisons multiples). Ce couplage rend compte de la structure en multiplets observée en RMN des liquides.

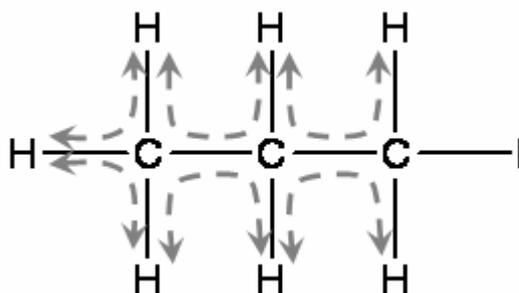


Figure 14. Schéma représentant l'interaction spin-spin indirecte (3J , homonucléaire).

\hat{H}_D représente l'interaction directe entre deux dipôles magnétiques voisins dans l'espace (Figure 15). Si deux noyaux A et B sont voisins dans l'espace, le moment magnétique du noyau A interagit avec le champ associé au moment magnétique du noyau B et inversement. Cette interaction, appelée également couplage dipolaire, peut se produire entre deux noyaux de même nature (on parlera de couplage homonucléaire) ou de nature différente (couplage hétéronucléaire).

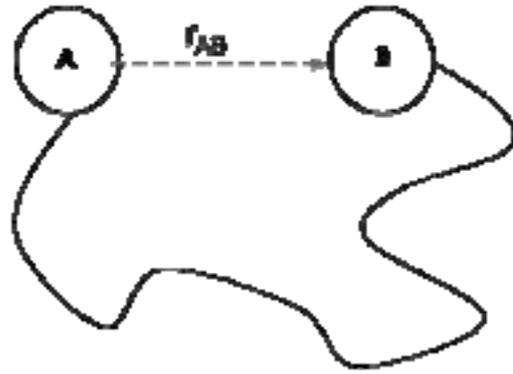


Figure 15. Schéma représentant l'interaction spin-spin directe.

Le blindage électronique, \hat{H}_c , représente le couplage entre le moment magnétique du noyau et le champ magnétique local induit par le nuage électronique entourant le noyau sous l'effet du champ magnétique statique. La densité de distribution des électrons autour du noyau et son anisotropie provoque un déplacement de la fréquence de résonance. C'est pour cette raison que l'on appelle aussi cette interaction déplacement chimique. \hat{H}_c est dépendant de B_0 , et est sensible à tout ce qui perturbe l'environnement électronique du noyau.

L'interaction quadrupolaire, \hat{H}_Q , apparaît pour les noyaux de spin $I > 1/2$, qui possèdent un moment quadrupolaire. Il s'agit du couplage entre le moment quadrupolaire d'un noyau (eQ) et le gradient de champ électrique local, créé par l'environnement des charges extérieures au noyau (Figure 16).

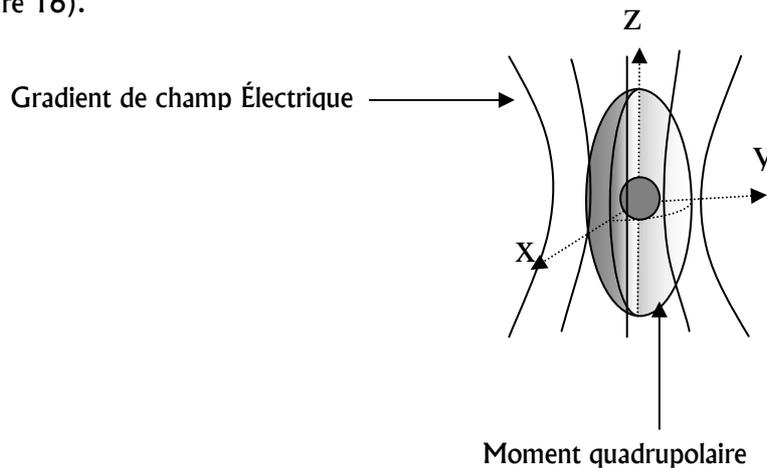


Figure 16. Schéma représentant l'interaction quadrupolaire. (d'après Dufourc, 2004, cours de Master de Chimie, Université Bordeaux 1).

L'hamiltonien stationnaire total d'un spin nucléaire peut être formulé de la manière suivante :

$$\hat{H}_{\text{total}} = \hat{H}_Z + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_\sigma + \hat{H}_Q \quad (4.9)$$

Ces interactions ne sont pas équivalentes et dépendent du type de noyau étudié et de la nature de l'échantillon. Les ordres de grandeurs pour des échantillons liquides (isotropes) et solides (anisotropes) des hamiltoniens sont donnés en hertz dans le tableau 2.

	Zeeman	Spin-spin direct	Spin-spin indirect	Blindage électronique	Quadrupolaire
	\hat{H}_Z	\hat{H}_D	\hat{H}_J	\hat{H}_σ	\hat{H}_Q
Solides	10^8	10^4	10^2	10^4	10^6
Liquides	10^8	0	10^2	10^4	0

Tableau 2. Ordre de grandeur des hamiltoniens.

Dans notre cas, nous avons travaillé avec des modèles de membranes qui sont des milieux organisés anisotropes et sont donc soumis en présence d'un champ magnétique à l'ensemble des interactions précédentes.

4.4. Les noyaux observés

Nous avons choisi deux noyaux pour décrire la structure et la dynamique de nos peptides dans les membranes : le deutérium (^2H) et le phosphore (^{31}P).

Les perturbations induites par les peptides sur la structure et la dynamique de la membrane seront étudiées par RMN- ^2H de lipides deutérés sur les chaînes. Les éclatements quadrupolaires observés nous renseigneront sur l'ordre local des lipides en surface et dans le cœur hydrophobe. On utilise aussi le phosphore 31, reporter naturel de l'interface membranaire, qui est naturellement présent sur la tête polaire des lipides. Tous ces noyaux sont détectés dans des expériences de RMN large bande.

Avantages des ces noyaux :

Il n'y a qu'un seul atome de phosphore sur les lipides utilisés (DCPC, DMPC, DPPC et DSPC), le spectre sera donc facilement identifiable. De plus l'abondance naturelle du phosphore est proche

de 100%. Les expériences sont donc faciles à mettre en œuvre et il est inutile d'effectuer un marquage isotopique.

L'abondance naturelle du deutérium est très faible (<0.05%), les signaux en RMN seront donc tous originaires du deutérium incorporé dans nos lipides.

Les spectres obtenus en RMN des solides dépendent de l'orientation du système par rapport au champ magnétique. Les différents types de spectres vont nous indiquer la phase dans laquelle se trouve le système (phase lamellaire, phase isotrope etc...).

4.4.1. Le phosphore

- Les interactions du noyau ^{31}P

Le noyau ^{31}P possède un spin $1/2$. La fréquence de résonance de ce noyau est déterminée par l'interaction de ce dernier avec son environnement. Trois types d'interactions peuvent être considérées : l'interaction Zeeman, l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique et l'interaction dipolaire phosphore-proton. Cependant cette dernière peut être éliminée par découplage des protons.

L'hamiltonien nucléaire des noyaux phosphore des têtes polaires se simplifie donc et on obtient (Dufourc *et al.*, 1992) :

$$\hat{H}_{\text{total}} = \hat{H}_Z + \hat{H}_{\text{ADC}} = -\gamma \hbar \hat{I}_z (1 - \sigma) \hat{B}_0 \quad (4.10)$$

σ représente le tenseur d'anisotropie du déplacement chimique (ou blindage électronique). La fréquence de résonance s'obtient par $\omega = \omega_0 (1 - \sigma)$ où ω_0 est la fréquence de Larmor.

- Le tenseur d'anisotropie du déplacement chimique

Cas des cristaux :

L'anisotropie de déplacement chimique peut être décrite de la manière suivante : un monocristal possédant des atomes de phosphore magnétiquement équivalents placés dans un champ magnétique donne une raie de résonance. Si on change l'orientation du monocristal, la fréquence de la raie va être décalée. Le déplacement chimique du phosphore dépend de l'orientation de l'atome de phosphore par rapport au champ magnétique.

Le nuage électronique entourant le noyau phosphore n'est généralement pas isotrope mais anisotrope. Sa morphologie dépend de son environnement direct (liaisons dans lesquelles le noyau est engagé, type de phase dans laquelle le phospholipide est présent). Le champ effectif perçu par le noyau n'est donc pas le même dans toutes les directions de l'espace. Dans le cas des milieux organisés le terme σ peut être décrit par un tenseur de rang deux. Dans son système d'axes principaux, ce tenseur est diagonal et s'écrit :

$$\sigma = \begin{bmatrix} \sigma_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{zz} \end{bmatrix} \quad (4.11)$$

Où σ_{xx} , σ_{yy} et σ_{zz} représentent les valeurs propres du tenseur d'anisotropie du déplacement chimique.

Cas des poudres de phospholipides :

Les poudres de phospholipides peuvent être assimilées à une multitude de grains monocristallins, orientés au hasard par rapport au champ magnétique. Le spectre RMN se compose d'une superposition des fréquences de résonance provenant des diverses orientations des monocristaux par rapport à B_0 , pondérées par leur probabilité d'existence (Figure 17a). A partir de ces spectres, il est aisé d'obtenir les valeurs propres du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique en déterminant la position en fréquence des épaules du spectre et de la discontinuité centrale. Ces valeurs principales ont aussi été déterminées pour des vésicules de DMPC à basse température ($T = 168K$) où tous les mouvements moléculaires sont bloqués : $\sigma_{xx} = -123$ ppm, $\sigma_{yy} = -24$ ppm et $\sigma_{zz} = 147$ ppm (Dufourc *et al.*, 1992).

Cas de bicouches lipidiques :

Les phospholipides en phase fluide possèdent un axe principal de rotation le long de l'axe longitudinal de la molécule. Cette rotation rapide, colinéaire à la normale à la bicouche, confère à la molécule une symétrie cylindrique et va donc provoquer des changements dans la forme des spectres. Les composantes σ_{xx} et σ_{yy} du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique deviennent

identiques dans le référentiel lié à la normale à la bicouche. On ne différencie que deux composantes principales σ_{\parallel} et σ_{\perp} respectivement colinéaire et perpendiculaire à l'axe directeur du mouvement. Le tenseur résiduel d'anisotropie de déplacement chimique s'exprime donc dans le référentiel lié à la bicouche (l'axe z de ce référentiel étant parallèle à la normale à la bicouche) de la façon suivante :

$$\langle \vec{\sigma} \rangle = \begin{bmatrix} \sigma_{\perp} & 0 & 0 \\ 0 & \sigma_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \sigma_{\parallel} \end{bmatrix} \quad (4.12)$$

- Types de phases et formes des spectres

Le phosphore est le noyau de choix pour caractériser une phase lipidique. En effet, la forme du spectre de RMN du phosphore d'échantillons lipidiques est affectée par la dynamique du système et par son état d'organisation. La Figure 17 représente les formes des spectres de poudre en RMN- ^{31}P du groupement phosphate d'un lipide engagé dans divers types de phases. Le spectre 10a représente le spectre de poudre d'un échantillon en l'absence de mouvement. Le spectre 10b obtenu est aussi un spectre de poudre auquel on a introduit un mouvement à symétrie axiale et dont les éléments principaux du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique sont σ_{\parallel} et σ_{\perp} . Ce spectre est caractéristique d'une phase lamellaire gel. Si en plus de ce mouvement, il apparaît une oscillation autour du même axe, l'anisotropie de déplacement chimique va diminuer et la forme spectrale va s'affiner. Le spectre obtenu est représenté sur la Figure 17c et est caractéristique d'une phase lamellaire fluide. Dans le cas des phases hexagonales il faut prendre en compte la rotation rapide autour de l'axe long des cylindres. On obtient le spectre 10d. Pour les petites vésicules phospholipidiques (d'un diamètre variant de 200 à 1000 Å), le spectre est une raie isotrope (Figure 17e), centrée sur la fréquence isotrope ν_{iso} .

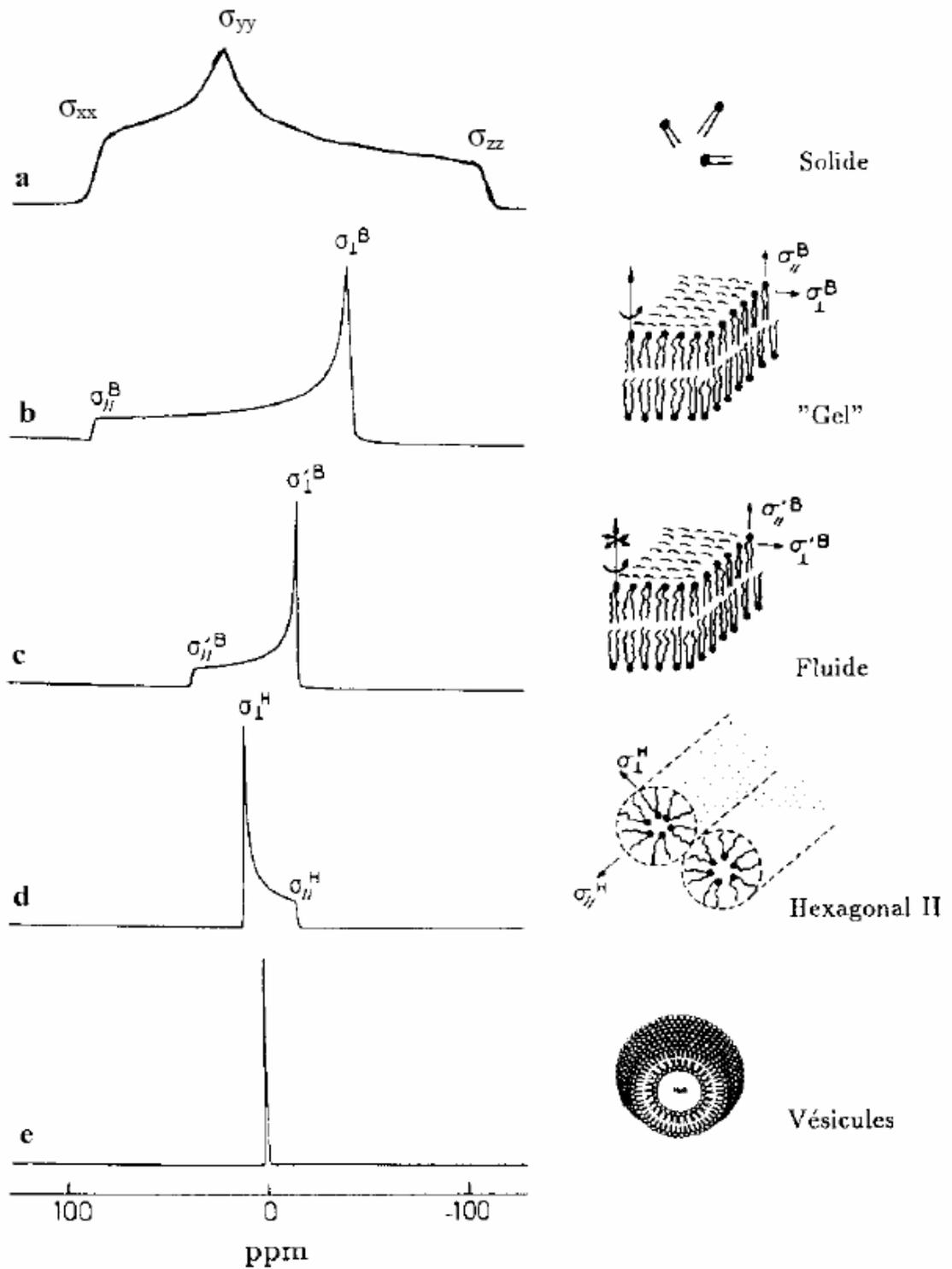


Figure 17. Formes des spectres de poudre en RMN-³¹P du groupement phosphate d'un lipide engagé dans divers types de phases (d'après Dufourc, 1986).

4.4.2. Le deutérium

- Les interactions du noyau deutérium

Le deutérium a un spin nucléaire $I=1$ et possède un moment électrique quadrupolaire noté eQ où e représente la charge élémentaire et Q le moment quadrupolaire du noyau. Plusieurs interactions peuvent être prises en compte mais dans nos systèmes, l'interaction quadrupolaire est beaucoup plus importante que les autres. L'hamiltonien total du système est soumis à l'interaction quadrupolaire et à l'interaction Zeeman et s'écrit de la manière suivante:

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_Q \quad (4.13)$$

Dans le référentiel du laboratoire l'hamiltonien quadrupolaire, qui décrit le couplage entre le moment magnétique et le gradient de champ électrique au noyau (GCE), s'écrit (Davis, 1983) :

$$\hat{H}_Q = \frac{e^2qQ}{4I(2I-1)} (3\hat{I}_z^2 - \hat{I}^2) \left[\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} + \frac{\eta \sin^2\beta \cos 2\alpha}{2} \right] \quad (4.14)$$

Où α et β sont les angles d'Euler de la transformation de coordonnées permettant de passer du système d'axes du GCE à celui associé au référentiel du laboratoire, eq est le gradient de champ au noyau et η le paramètre d'asymétrie du GCE.

L'hamiltonien total peut donc s'écrire:

$$\hat{H} = -\hbar\omega_0\hat{I}_z + \frac{e^2qQ}{4I(2I-1)} (3\hat{I}_z^2 - \hat{I}^2) \left[\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} + \frac{\eta \sin^2\beta \cos 2\alpha}{2} \right] \quad (4.15)$$

- L'éclatement quadrupolaire

Cas général :

Les transitions entre les trois niveaux d'énergie donnent naissance à un spectre RMN du deutérium qui est un doublet de raies centré sur la fréquence de Larmor (simple quantum $\Delta m = \pm 1$) (Figure 18). L'écart entre ces deux raies est appelé l'éclatement quadrupolaire $\Delta\nu_Q(\alpha, \beta)$ et se définit comme suit :

$$\Delta \nu_q(\alpha, \beta) = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \left[\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} + \frac{\eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha}{2} \right] \quad (4.16)$$

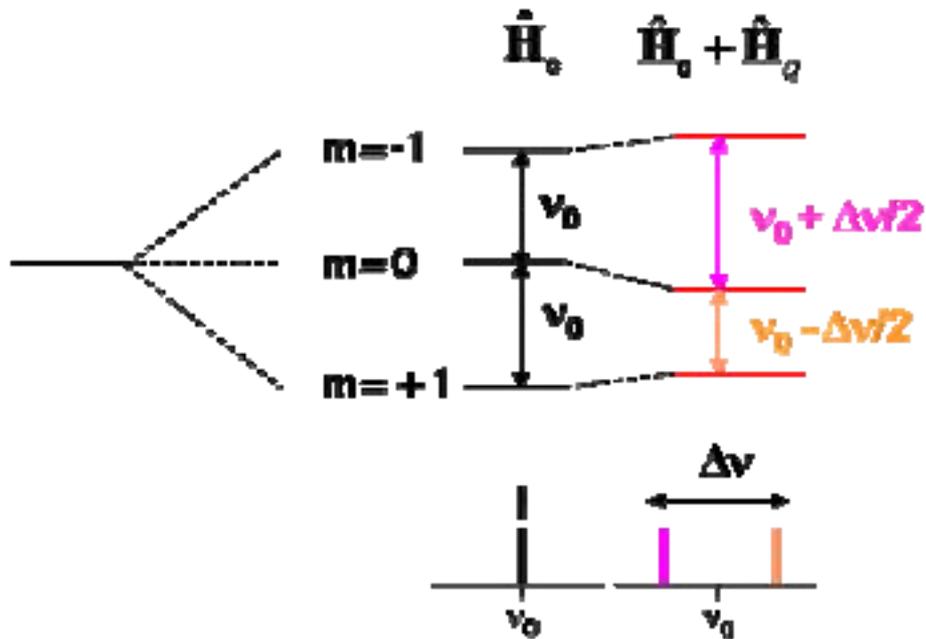


Figure 18. Niveaux d'énergie magnétique et raies de résonance d'un spin $I=1$. L'interaction quadrupolaire dédouble la raie Zeeman (d'après Dufourc, 1986).

Le terme $\frac{e^2 q Q}{h}$ représente la constante de couplage quadrupolaire statique, notée A_Q égale à 167 kHz pour les liaisons méthylènes C-D (Burnett et Muller, 1971). L'angle β définit l'orientation de la liaison C-D par rapport au champ magnétique B_0 (Figure 19).

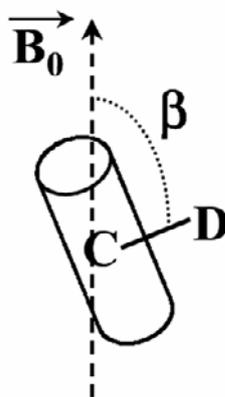


Figure 19. L'angle β définit l'orientation de la liaison C-D par rapport au champ magnétique.

Cas particulier où $\eta=0$:

Lorsque nous avons une symétrie axiale du gradient de champ électrique, les sites deutérés sont orientés de façon aléatoire par rapport au champ magnétique et $\eta \approx 0$. Un échantillon peut-être considéré comme la somme d'une multitude de microcristaux dont les axes principaux de tous les tenseurs sont distribués sur la surface d'une sphère. On obtient ainsi une distribution sphérique des liaisons C-D. Le spectre RMN résultant de ce type de distribution sera constitué de la somme des résonances associées à chaque orientation convoluée par sa probabilité d'existence (probabilité $p(\beta) = 1/2 \sin^2 \beta$). On peut alors déterminer la forme des spectres de RMN, également appelé "spectre de poudre" (Figure 20a).

L'équation 4.16 se simplifie alors :

$$\Delta \nu_Q(\beta) = \frac{3}{2} A_Q \left[\frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right] \quad (4.17)$$

L'angle β définit l'orientation de la liaison C-D (axe z du référentiel du GCE, le GCE est colinéaire aux liaisons C-D) par rapport à l'axe z du référentiel du laboratoire. L'équation fait apparaître clairement la dépendance angulaire de l'éclatement quadrupolaire des liaisons carbone-deutérium par rapport à l'axe z du champ magnétique statique.

Pour un site marqué donné, on peut déterminer la forme des raies de résonance des spectres RMN. Expérimentalement on mesure l'éclatement quadrupolaire $\Delta \nu_Q$ entre les raies les plus intenses (orientation la plus probable : $\beta = 90^\circ$) :

$$\Delta \nu_Q = \frac{3}{4} A_Q \quad (4.18)$$

On remarque ainsi, que la constante de couplage quadrupolaire statique, A_Q , peut être mesurée directement à partir d'un échantillon polycristallin.

- Dynamique des membranes biologiques et paramètres d'ordres

Dans le cas de biomembranes, le paramètre d'asymétrie η s'annule car la plupart des mouvements moléculaires sont à symétrie axiale. Jusqu'à présent nous avons vu le cas de systèmes statiques. La

présence de mouvements moléculaires et intramoléculaires va changer la largeur des spectres de RMN. La Figure 20 décrit l'influence des mouvements moléculaires sur la forme des spectres. L'interaction quadrupolaire est affectée par des mouvements suffisamment rapides (supérieurs à la microseconde), c'est le cas pour la majorité des mouvements moléculaires des lipides et des protéines membranaires, à l'exception des mouvements collectifs ou de diffusion latérale.

Le paramètre d'ordre S^{CD} peut être divisé en trois contributions : S_{coll} , S_{intra} et S_{mol} . S_{coll} est le paramètre d'ordre qui décrit les mouvements collectifs (déformation des membranes) (Douliez et al., 1995). La contribution intramoléculaire, S_{intra} , décrit l'isomérisation trans-gauche de la liaison C-C. S_{mol} décrit la réorientation anisotrope de la molécule entière. Ces deux derniers paramètres d'ordre introduits par Seelig (Seelig, 1977) permettent donc de décrire l'amplitude des mouvements moléculaires et intramoléculaires. Ils permettent de déterminer l'état d'organisation d'un système. Si on attache un système cartésien x, y, z sur un site particulier d'une molécule (une liaison carbone-deutérium), le paramètre d'ordre S_{ii} est défini par :

$$S_{ii} = \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta_i - 1}{2} \right\rangle \quad (4.19)$$

Les angles θ_i désignent les angles des axes x, y et z par rapport à l'axe du mouvement z^* (dans la plupart des cas, z^* est l'axe de la molécule). Du fait de l'orthogonalité des cosinus directeurs, les paramètres d'ordre sont liés par la relation: $\sum_i S_{ii} = 0$. Comme il a de plus symétrie axiale nous

obtenons:

$$S_{zz} = -2 S_{xx} = -2 S_{yy} \quad (4.20)$$

Ainsi, la seule estimation du terme d'ordre S_{zz} permettra de rendre compte des fluctuations de la liaison C-D d'une phase lamellaire. Dans ce cas l'équation (4.15) s'écrit :

$$\Delta \nu_Q(\beta') = \frac{3}{2} A_Q \frac{3 \cos^2 \beta' - 1}{2} S^{CD} \quad (4.21)$$

Où $S^{CD} = S_{zz}^{intra} S_{zz}^{mol} S_{xx}^{col}$

β' est l'angle entre la normale à la bicouche (le directeur du mouvement) et le champ magnétique B_0 . On remarque que la mesure directe de l'éclatement quadrupolaire sur les spectres de RMN du

deutérium donne le terme S^{CD} . Les paramètres d'ordre S_{zz}^{intra} , S_{zz}^{mol} et S_{xx}^{col} sont souvent difficiles à différencier, sauf dans le cas de molécules rigides car elles ne présentent pas de fluctuations intramoléculaires (Aussenac, 2002). C'est pour cela qu'on définit le paramètre d'ordre orientationnel de la liaison C-D qui donne une mesure globale de l'ordre résiduel dans la membrane par rapport à la bicouche.

Il se définit comme suit (Paddy *et al.*, 1981):

$$S^{CD} = \prod_{j=1}^n S_{ZZ}^j \quad (4.22)$$

j dénombre les mouvements anisotropes à symétrie axiale distincts présents dans le système. L'éclatement quadrupolaire est mesuré entre les pics les plus intenses ($\beta' = 90^\circ$) et l'équation se simplifie alors :

$$\Delta \nu_Q(90^\circ) = \frac{3}{4} A_Q S^{CD} \quad (4.23)$$

L'interaction quadrupolaire est progressivement moyennée à cause de l'augmentation du désordre dans le système (mouvements de fluctuations, rotation axiale, oscillation Figure 20). Pour les petites vésicules, les temps de corrélation associés aux mouvements de réorientations isotropes et à la diffusion latérale des lipides sont plus courts que l'inverse de l'éclatement quadrupolaire résiduel. Le spectre de poudre se transforme en une raie isotrope qui correspond à la fréquence du déplacement chimique isotrope du deutérium de la liaison C-D (Figure 20).

Nous venons de voir que dans des fluides anisotropes, l'éclatement quadrupolaire apporte une mesure du paramètre d'ordre orientationnel, S^{CD} , ainsi nous obtenons une estimation de l'organisation et de la dynamique des molécules engagées dans les membranes biologiques. Douliez a montré qu'il était possible de corréler S^{CD} avec la longueur hydrophobe d'une bicouche. La détermination des épaisseurs hydrophobes est précise dans le cas où S^{mol} est connu (Douliez, 1995). Il est bon de savoir qu'il est aussi possible d'étudier la dynamique en déterminant les temps de relaxation magnétique nucléaire. On accède ainsi à la vitesse des mouvements des molécules engagées dans la membrane. En revanche aucune expérience de mesure des temps de relaxation n'a été réalisée lors de cette thèse, cette partie ne sera donc pas développée.

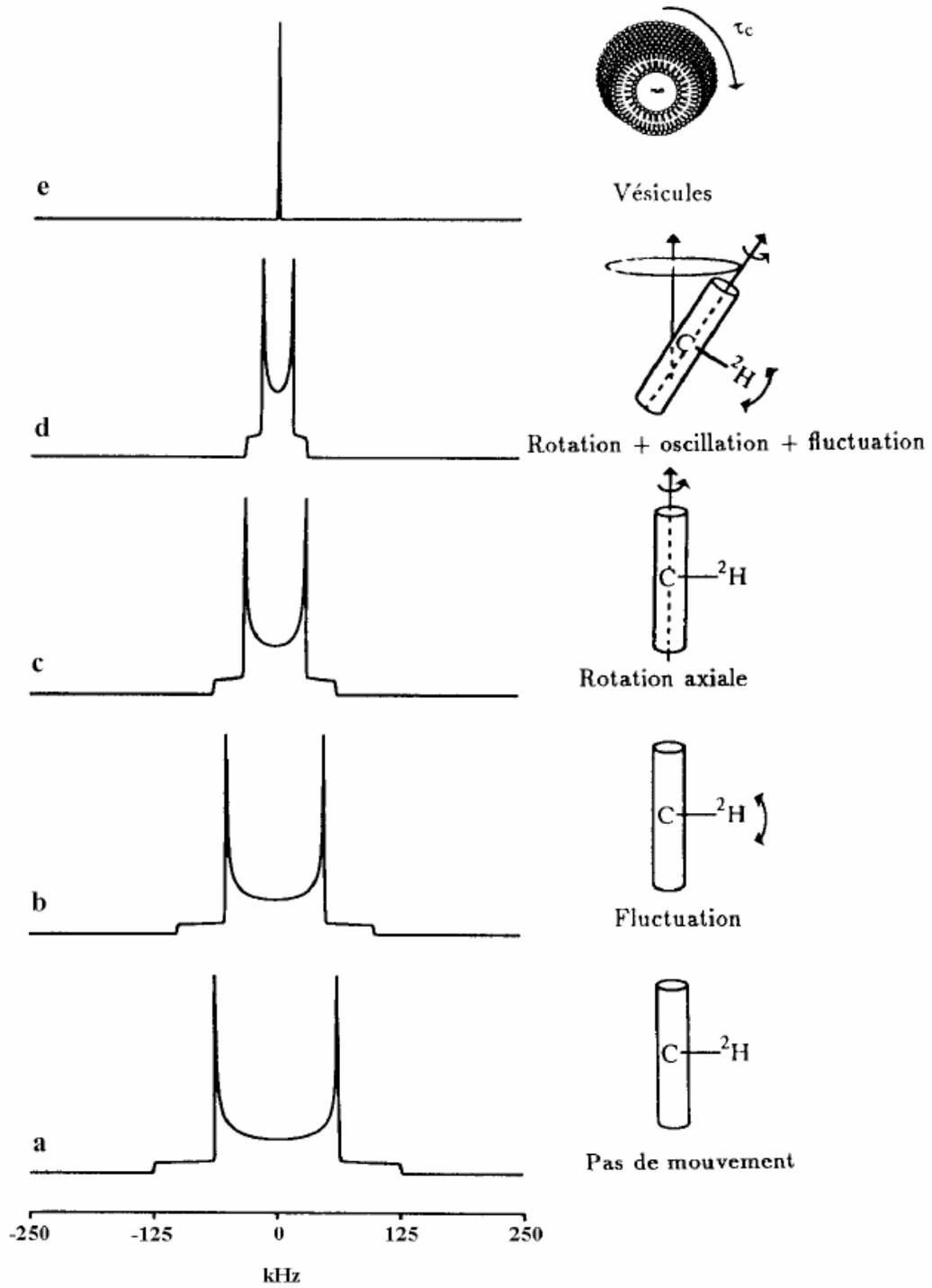


Figure 20. Influence des mouvements moléculaires en milieu membranaire sur la forme des spectres de RMN du deutérium (d'après Dufourc, 1986).

4.5. Aspects expérimentaux

4.5.1. Acquisition des données - Traitement du signal

Les expériences de ^{31}P -RMN ont été réalisées sur le spectromètre Bruker Biospin Avance 400 MHz (sonde QNP) et les expériences de ^2H -RMN ont été réalisées sur le spectromètre Bruker Biospin Avance 500 MHz (sonde CP MAS bas γ).

4.5.2. Les séquences utilisées

Pour des échantillons solides, plusieurs points particuliers doivent être pris en compte afin de détecter l'ensemble du signal au cours de l'expérience de RMN. Dans le cas des échantillons statiques, les largeurs spectrales peuvent atteindre 250 kHz. L'impulsion radiofréquence est appliquée pendant un temps fini τ , on dispose alors d'une fenêtre d'irradiation dans une gamme de fréquences de $2/\tau$ (largeur en fréquence du pic central de la transformée de Fourier). Cette fenêtre d'irradiation sera d'autant plus large que la durée de l'impulsion sera brève. Elle devra être la plus large possible de manière à irradier l'ensemble des populations de spins avec la même efficacité. Lors d'une acquisition RMN, (impulsion de champ radiofréquence suivie d'une acquisition) les premiers points détectés sont perturbés par le signal radiofréquence résiduel. Un temps mort est donc nécessaire pour s'affranchir de ce problème. Dans le cas des solides, les FID possèdent une décroissance rapide et ce temps mort devient discriminant pour le signal. Les séquences d'impulsions écho (2 impulsions de champ radiofréquence séparées par un temps τ) permettent de s'affranchir de ce problème (Hahn, 1950). En effet, elles conduisent à déplacer l'origine des temps du signal RMN au-delà du temps mort du récepteur. Le délai τ entre les deux impulsions 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 (Figure 21).

L'acquisition du signal se fait au sommet de l'écho obtenu après la dernière impulsion. Pour le noyau phosphore (spin $1/2$), nous utiliserons la séquence d'écho de Hahn (Rance et Byrd, 1983). Pour le deutérium (spin 1), nous utiliserons la séquence d'écho quadrupolaire (Davis *et al.*, 1976).

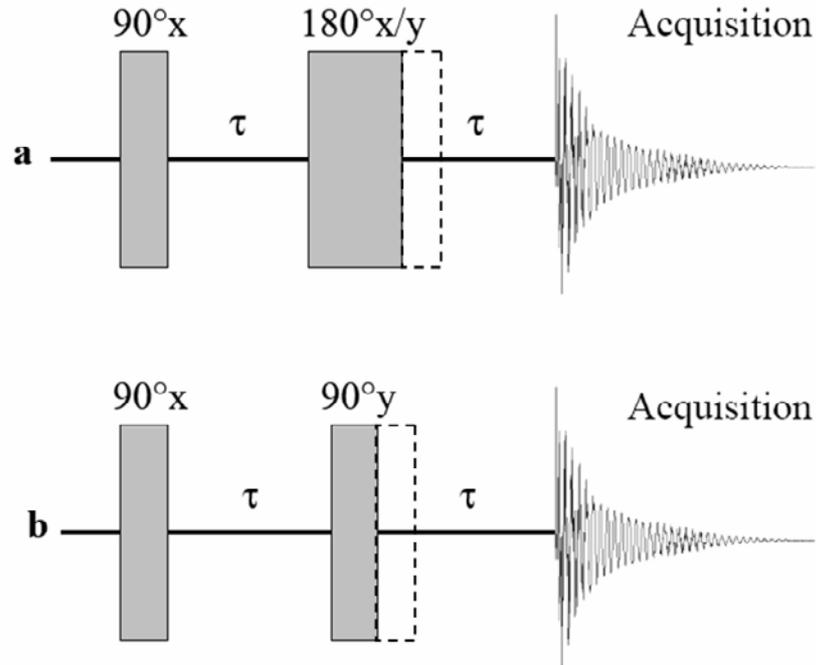


Figure 21. Séquences d'impulsions d'écho : a) écho de Hahn et b) écho quadrupolaire. Les traits en pointillés indiquent le délai relatif au temps mort.

4.5.3. Traitement du signal

Le traitement du signal est effectué à l'aide du logiciel BRUKER WXIN-NMR 3.1. Afin de diminuer le bruit détecté, le signal RMN est multiplié par une exponentielle décroissante de type e^{-LBt} (opération de filtrage). Le terme LB, exprimé en Hertz, est égal dans notre étude à 100 Hz.

4.5.4. Traitement des données

- Moments spectraux :

Nous avons vu que la mesure de l'éclatement quadrupolaire est un moyen d'estimer le paramètre d'ordre S^{CD} à un endroit déterminé d'une molécule. Cependant, il n'est pas toujours aisé de mesurer cet éclatement quadrupolaire, en particulier lorsque les largeurs de raie des composants individuelles de spectre de poudre sont importantes. Dans ce cas, on ne peut pas caractériser les paramètres d'ordre. Afin d'analyser de manière quantitative de tels spectres, une méthode fondée sur le calcul des moments spectraux a été développée par Bloom et Davis (Davis, 1979 ; Bloom et

al., 1978). Le moment d'ordre n d'un spectre de forme de raie $S(\omega)$ est défini selon Davis (Davis, 1983) :

$$M_n = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} \omega^n S(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{+\infty} S(\omega) d\omega} \quad (4.24)$$

Où la fréquence ω est définie par rapport à la fréquence isotrope ω_{iso} , arbitrairement égale à zéro (centre du spectre). Dans le cas de spectres symétriques (RMN du deutérium), les moments de rang impair devenant nuls, on calcule la différence la valeur absolue de $\Delta\omega$, avec $\Delta\omega = |\omega_0 - \omega_1|$ où ω_0 est la fréquence correspondant au milieu du spectre et ω_1 est la fréquence qu'on regarde.

Le calcul des moments spectraux est utilisé pour caractériser et quantifier les modifications de la forme et de la largeur des raies, aussi bien pour la RMN du phosphore que pour la RMN du deutérium.

- Déconvolution spectrale :

Le spectre d'un échantillon non orienté est large à cause de sa dépendance orientationnelle en fréquence par rapport au champ magnétique. De plus, les multiples sites marqués sur la molécule engendrent un recouvrement des signaux. Ces deux facteurs rendent difficile la mesure directe des éclatements quadrupolaires individuels. Davis et ses collaborateurs ont développé une technique de déconvolution spectrale appelé «de-Pake-ing » (Bloom *et al.*, 1981). A partir du spectre de poudre, le spectre d'un échantillon orienté à 90° par rapport au champ magnétique est reconstitué. On a ainsi une seule composante du signal pour chaque site deutérié, les éclatements quadrupolaires étant alors clairement distincts et résolus (Figure 22).

Les spectres des lipides seuls et après insertion des peptides Neu et Neu* ont été déconvolués selon cette méthode afin de mesurer convenablement l'éclatement quadrupolaire de chaque position marquée.

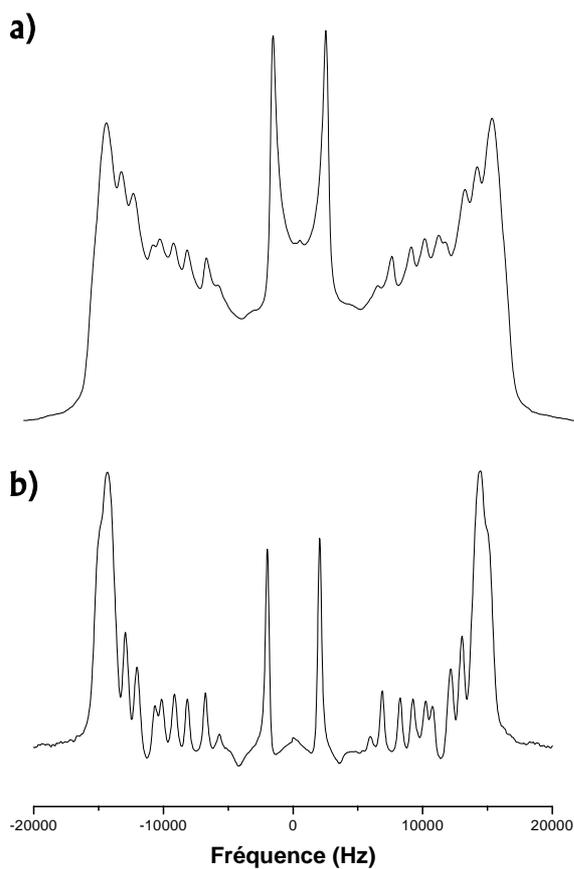


Figure 22. Illustration de la technique de déconvolution de « De-Pake-ing » : a) spectre poudre de liposomes non orienté de DMPC deutérié, b) spectre précédent déconvolué. Le doublet central correspond à la position 14, c'est-à-dire $C_{14}\text{-D}_3$. Le doublet externe qu'on appelle position plateau correspond aux positions 3 à 9, soit $C_{3-9}\text{-D}_2$. Les doublets intermédiaires correspondent aux positions 2S, 2R, 10, 11, 12 et 13.

BIBLIOGRAPHIE

- Abragam A. Principles of nuclear magnetism. London. Oxford University Press. 1961.
- Aussenac F, Laguerre M, Schmitter JM, Erick J. Dufourc. Detailed Structure and Dynamics of Bicelle Phospholipids using selectively Deuterated and Perdeuterated Labels. ²H NMR and Molecular Mechanics Study. *Langmuir*. 2003; **19**: 10468-10479.
- Aussenac F, Tavares M, Dufourc EJ. Cholesterol Dynamics in Membranes of Raft Composition: A Molecular Point of View from ²H and ³¹P Solid-State NMR. *Biochemistry*. 2003; **42**: 1383-1390.
- Berova N, Nakanishi K, Woody RW. Circular Dichroism Principles and applications. Wiley-VCH. Editor 2000; 1-877.
- Biemann K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. *Biomed. Environ Mass Spectrom*. 1998; **16**: 99-111.
- Bloom M, Davis JH, Mackay AL. Direct determination of the oriented sample NMR spectrum from the powder spectrum for systems with a local axial symmetry. *Chem. Phys. Lett*. 1981; **80**: 198-202.
- Brown RS, Lennon JJ. Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Anal. Chem*. 1995; **67**: 1998-2003.
- Burnett LJ, Muller BH. Deuteron quadrupole coupling constants in three solid deuterated paraffin hydrocarbons: C₂D₆, C₄D₁₀, C₆D₁₄. *J. Chem. Phys*. 1971; **55**: 5829-5831.
- Cascio M, Wallace BA. Effects of Local Environment on the Circular Dichroism Spectra of Polypeptides. *Analytical Biochemistry*. 1995; **227**: 90-100.
- Castano S, Cornut I, Bütnner K, Dasseux JL, Dufourcq J. The amphipathic helix concept: length effects on ideally amphipathic LiKj (i=2j) peptides to acquire optimal hemolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999a; **1416**: 161-175.
- Castano S, Desbat B, Laguerre M, Dufourcq J. Structure orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic LiKj (i=2j) peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999b; **1416**: 176-194.
- Chen YH, Yang JT, Chau KH. Determination of the helix and form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry*. 1974; **13**: 3350-3359.
- Dauber-Osguthorpe P, Roberts VA, Osguthorpe DJ, Wolff J, Genest M and Hagler AT. Structure and energetics of ligand binding to proteins: E. coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins: structure, function and genetics*. 1988; **4**: 31-47.

- Davis JH, Jeffrey KR, Bloom M, Valic MI, Higgs TP. Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chem. Phys. Letters*. 1976; **42**: 390-394.
- Davis JH. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by ²H-NMR. *Biochim. Biophys. Acta*. 1983; **737**: 117-171.
- Davis JH. Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biophys. J.* 1979; **27**: 339-358.
- Douliéz JP, Léonard A, Dufourc EJ. Restatement of Order Parameters in Biomembranes : Calculation of C-C Bond Order Parameters from C-D Quadrupolar Splittings. *Biophys. J.* 1995; **68**: 1727-1739.
- Douliéz JP. Propriétés dynamiques et conformationnelles des chaînes aliphatiques des phospholipides dans les membranes modèles. Thèse d'état de l'université Bordeaux I, France. 1995.
- Dufourc EJ, Mayer C, Stohrer J, Althoff G, Kothe G. Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. Comprehension analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements. *Biophys. J.* 1992; **61**: 42-47.
- Fasman GD. The measurement of transmembrane helices by the déconvolution of CD spectra of membrane proteins: a review. *Biopolymers*. 1995; **37**: 339-362.
- Fenn JB, Mann M, Meng C.K, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989; **246**: 64–71.
- Greenfield NJ. Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Circular Dichroism Data. *Analytical Biochemistry*. 1986; **235**: 1-10.
- Hahn EL. Spin echoes. *Phys. Rev.* 1950; **80**: 580-594.
- Hayati I, Bailey AI, Tadros TF. Investigation into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids. *Journal of Colloid Interface Science*. 1987; **117**: 205-221.
- Höltje HD, Sippl W, Rognan D, Folkers G. Molecular Modeling, basic Principles and Applications. 2nd Edition. Wiley-VCH. 2003. 15-26 & 119-125.
- Johnson WC Jr. Protein Secondary Structure and Circular Dichroism : A Practical Guide. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 1990; **7**: 205-214.
- Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 1983; **79**: 926-935.
- Jorgensen WL, Jenson C. Temperature Dependence of TIP3P, SPC, and TIP4P Water from NPT Monte Carlo Simulations: Seeking a Temperature of Maximum Density. *J. Comp. Chem.* 1998; **19**: 1179-1186.
- Karas M, Hillenkam F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 2299-2303.
- March RE, Londry FA, Todd JFJ. Fundamentals of ion trap mass spectrometry. Eds. *CRC Press, Inc Boca Raton*. 1995: 1-25.

- Mehring M. Principles of high resolution NMR in solids. Berlin. Springer-Verlag. 1983. 1-342.
- Paddy MR, Dahlquist FW, Davis JH, Bloom M. Dynamical and temperature-dependent effects of lipid-protein interactions. Application of deuterium nuclear magnetic resonance and electron paramagnetic resonance spectroscopy to the same reconstitutions of cytochrome c oxidase. *Biochemistry*. 1981; **20**: 3152-3162.
- Rance M, Byrd RA. Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media: phase-cycled Hahn echo spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 1983; **52**: 221-240.
- Seelig J. Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. *Q. Rev. Biophys.* 1977; **10**: 353-418.
- Shibata A, Yamamoto M, Yamashita T, Chiou JS, Kamaya H, Ueda I. Biphasic effects of alcohols on the phase transition of Poly(L-Lysine) between α -Helix and β -sheet conformations. *Biochemistry*. 1992; **31**: 5728-5733.
- Sreerama N, Woody RW. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 1993; **209**: 32-44.
- Sreerama N, Woody RW. Estimation of peptide secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 2000; **287**: 252-260.
- Still WC, Tempczyk A, Hawley RC; Hendrickson T. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. A. Chem. Soc.* 1990; **112**: 6127-6129.
- Todd JFJ, March RE. Practical Aspects of Ion Trap Mass Spectrometry. Volume 1: Fundamentals of Ion Trap Mass Spectrometry; Volume 2: Ion Trap Instrumentation; Volume 3: Chemical, Environmental and Biochemical Applications. *CRC Press: Boca Raton*. 1995.
- Verlet L. Computer experiments on classical fluids. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules. *Phys. Rev.* 1967; **159**: 98-103.
- Vestal M, Juhasz P, Martin SA. Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 1995; **9**: 1044-1050.
- Weiner SJ, Kollman PA, Case DA, Singh U, Ghio C, Alagona G, Profeta S Jr., Weiner PK. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J. A. Chem. Soc.* 1984; **106**: 765-784.
- Weiner SJ, Kollman PA. Description of the AMBER program for molecular mechanics. *J. Comput. Chem.* 1981; **2**: 287-303.
- Wiley WC, Mac Laren IH. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.* 1955; **16**: 1150-1157.
- Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem.* 1996; **68**: 1-8.

Chapitre 3

Synthèse et purification de peptides hydrophobes et/ou amphipathiques

L'étude structurale et dynamique de peptides requiert des quantités relativement importantes de matériel. La synthèse des peptides a donc été optimisée dans ce but. Plusieurs peptides ont été synthétisés et nous pouvons les classer par famille : le domaine BH4 de la protéine anti-apoptotique Bcl2, peptide amphipathique, les fragments transmembranaires du récepteur Neu/ErbB2, noté Neu_{TM35} pour le peptide sauvage et Neu*_{TM35} pour le peptide muté, peptides hydrophobes, et les polyvalines, peptides "ultra" hydrophobes. Le défi que constitue la synthèse des peptides amphipathiques, des peptides transmembranaires hydrophobes et des peptides "ultra" hydrophobes a été relevé.

Les synthèses peptidiques sur support solide ont été effectuées au moyen d'un synthétiseur de peptides semi-automatique. Chacune de ces synthèses a nécessité une optimisation particulière, soit lors de la réalisation des 4 étapes de synthèse elles-mêmes, soit lors de la purification du produit brut. Ces divers aspects sont décrits dans ce chapitre. Seule la méthodologie est discutée dans ce chapitre, les spectres et les modes opératoires sont présentés en Annexe. Nous invitons donc tous les lecteurs intéressés par les détails concernant les synthèses, les clivages et les purifications de tous les peptides étudiés dans cette partie à se référer à l'Annexe 1 intitulée synthèse peptidique.

1. Stratégie de la synthèse peptidique en phase solide (SPPS)

En 1963, Merrifield a introduit la synthèse de peptides en phase solide (SPPS) pour créer une chaîne peptidique linéaire (Merrifield, 1963). Cette technique, reconnue comme la meilleure méthode de synthèse de peptides, a été largement développée et permet d'obtenir rapidement des peptides très longs (jusqu'à 100 résidus). Le premier acide aminé est fixé sur le support solide, et

après trois étapes (déprotection, activation, couplage) le deuxième acide aminé se couple avec le premier pour former un dipeptide. Puis le troisième acide aminé va se coupler avec le deuxième, et ces étapes sont répétées jusqu'à obtenir le peptide voulu. Sur support solide deux types de stratégie existent : Boc et Fmoc. La stratégie Boc utilise un groupement tertibutyloxycarbonyle pour protéger la fonction amine de l'acide aminé à coupler. Le groupement Boc étant labile en milieu acide, chaque déprotection intermédiaire a lieu dans un milieu assez agressif, l'acide trifluoroacétique (TFA). Les protections latérales doivent résister au TFA et sont clivées en milieu hyperacide par l'acide fluorhydrique (HF) d'un maniement assez dangereux. La stratégie Fmoc utilise le fluorèneméthoxycarbonyle. Labile en milieu nucléophile, le Fmoc est clivé en quelques secondes par une solution de pipéridine dans des conditions douces. Les protections latérales doivent être stables en milieu basique et sont donc clivées en milieu acide (TFA). Par ailleurs, les acides aminés protégés par un groupement Fmoc sont plus coûteux que ceux protégés par un groupement Boc, mais les opérations de clivage sont plus douces pour le peptide (ainsi que pour l'utilisateur) avec la stratégie Fmoc. C'est pour cela que nous avons choisi cette dernière méthode pour la synthèse de nos peptides.

1.1. Etapes de la synthèse

La synthèse d'un peptide est réalisée par fixation séquentielle de chaque acide aminé constituant la chaîne peptidique. L'élongation procède à partir de l'acide amine C-terminal lié au support solide. Chaque cycle comprend 4 étapes, explicitées ci-dessous.

1^{ère} étape : la déprotection (Figure 1)

La résine est porteuse du premier acide aminé, la première étape dans l'assemblage de la chaîne est donc la déprotection du groupement Fmoc de l'acide aminé préchargé sur la résine, pour laisser une fonction α -amine libre à l'extrémité peptidique accessible. Cette déprotection est assurée par une amine secondaire : la pipéridine.

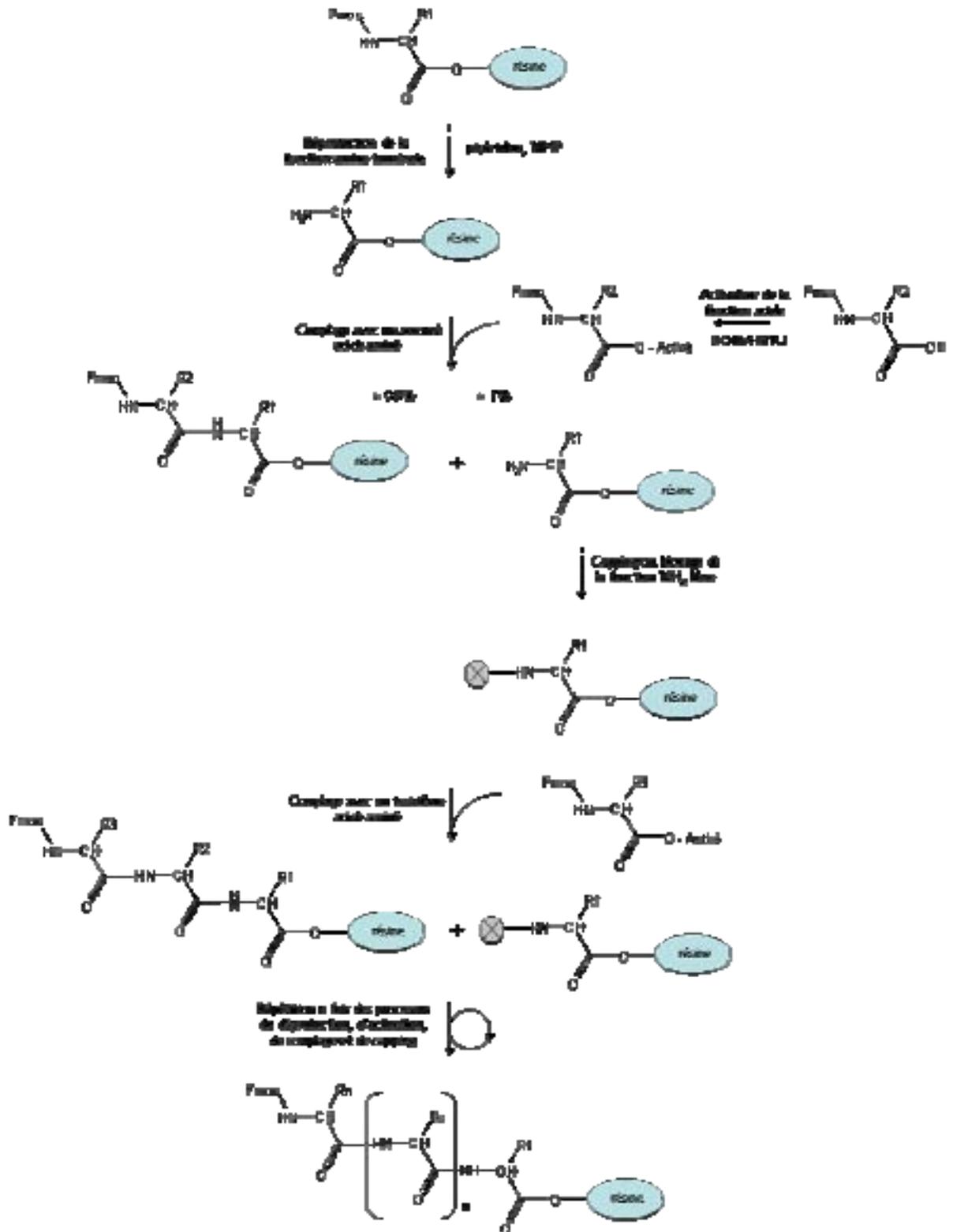


Figure 1. Schéma de synthèse sur support solide par la méthode FastMoc. L'activation par HBTU a été introduite d'après Dourtoglou *et al.* (Dourtoglou, 1984). R1 est le groupement latérale de l'acide aminé 1, R2 celui de l'acide aminé 2, Rn celui du dernier acide aminé. Représentation des étapes de déprotection, d'activation, de capping et de couplage.

2^{ème} étape : l'activation (Figure 1)

Avant le couplage, le groupe carboxyle de l'acide aminé doit être activé. Il existe différentes méthodes d'activations, comme HBTU/HOBt, HOBt/DCC, DCC et l'anhydride acétique symétrique. Nous avons choisi l'activation par HBTU/HOBt, nommée aussi HBTU-FastMoc par la fabricant (Applied Biosystems). L'HBTU (2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate) a été développé par Dourtoglou *et al.* dans les années 80. L'HBTU est mélangé à une solution de HOBt (N-hydroxybenzotriazole), DIEA (diisopropylethylamine) et DMF (diméthylformamide). Ensuite l'acide aminé est dissout dans cette solution avec de la NMP. L'acide aminé activé se forme instantanément et est enfin transféré dans le réacteur où se situe l'acide aminé déprotégé pour réaliser le couplage.

3^{ème} étape : le couplage (Figure 1)

Lors de cette étape, l'acide aminé activé réagit avec l'acide aminé déprotégé de la chaîne. Le succès du couplage d'acides aminés en phase solide dépend non seulement de la réactivité du groupement carboxyle de l'acide aminé protégé mais aussi de l'accessibilité du résidu terminal du peptide en cours d'élongation fixé à la résine (Barany et Merrifield, 1979). Les solvants de couplage doivent être compatibles avec les solvants destinés à favoriser la solvation du système peptide-résine (Rich et Singh, 1979). Durant le couplage, l'ester activé forme une liaison amide avec le résidu déprotégé en cours d'élongation. La mise en présence des deux groupements réactifs est réalisée comme suit : l'acide aminé est présenté à la résine avec un excès de quatre (0.25 mmol) ou 10 résidus (0.1 mmol) libres pour une chaîne en élongation. Le rendement de chaque couplage varie de 98 à 99% en fonction de la séquence du peptide.

4^{ème} étape : le capping ou le blocage (Figure 1)

Malgré toutes les précautions prises pour atteindre une fixation optimale de l'acide aminé activé sur l'acide aminé déprotégé, certains acides aminés (R1) ne fixent pas les acides aminés (R2) libres, laissant place à une fonction aminée active pouvant être fixée par le résidu présenté ultérieurement (R3). Ce phénomène donnerait naissance à des peptides possédant des délétions en milieux de chaîne. Afin d'éviter la formation de ces peptides tronqués, le blocage de toutes les fonctions amines qui n'ont pas réagi est réalisé par un traitement à l'anhydride acétique : c'est l'étape de blocage, ou capping.

Après ces quatre étapes, le premier cycle est terminé et un nouveau peut commencer par la déprotection de l'amine sur le peptide en élongation. Ces étapes sont alors répétées jusqu'à l'obtention du peptide complet.

1.2. Suivi de la synthèse par mesure de conductivité ou mesure de l'absorbance

Le suivi du succès de l'élongation est réalisé en temps réel après chaque déprotection de manière automatique soit par la mesure de la conductivité soit par une mesure d'absorbance UV (Figure 2).

Le synthétiseur ABI 433A possède une cellule de conductivité, c'est donc par cette méthode que nous avons suivi la déprotection des acides aminés. Le principe repose sur l'étroite corrélation entre la déprotection et le couplage (Atherton, 1989). Un faible taux de déprotection indique un couplage faible ou incomplet. Ce contrôle se fait à l'aide de la pipéridine. En effet à chaque cycle, la pipéridine est utilisée pour la déprotection des groupements Fmoc. Elle conduit à la formation d'un dibenzofulvène qui réagit avec une autre molécule de pipéridine pour donner d'une part un dibenzofulvène-pipéridine, quantifiable par une mesure d'absorbance dans l'UV (301 nm), et d'autre part un sel de carbamate détectable par mesure de conductivité. Un exemple d'enregistrement schématisé est présenté sur la Figure 3. L'étape de déprotection cesse dès que la différence entre le dernier pic et l'avant dernier est inférieure à 5%.

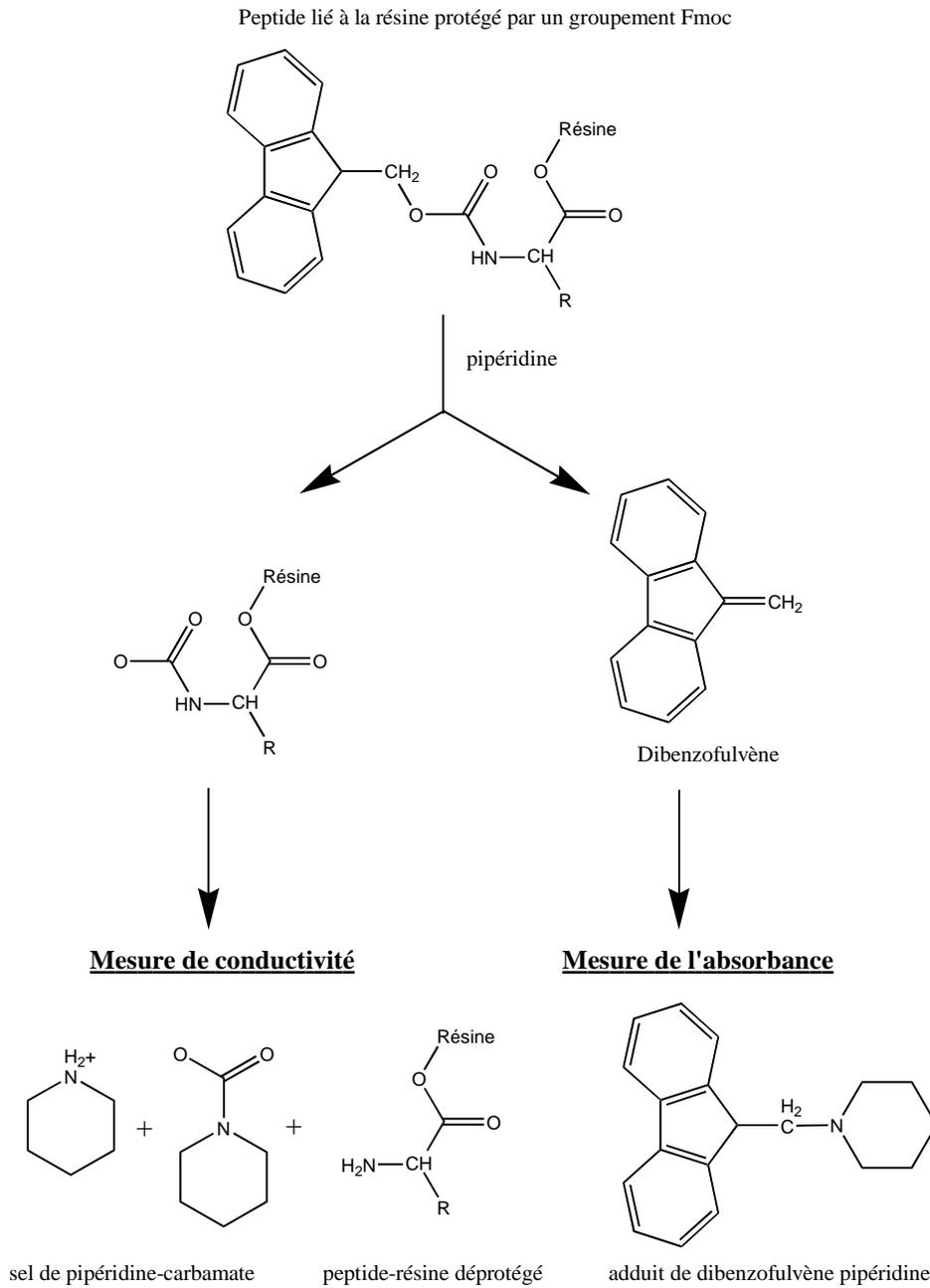


Figure 2 . Mode d'action de la pipéridine et produits secondaires formés permettant le suivi en temps réel de la synthèse, par mesure de la conductivité et de l'absorbance.

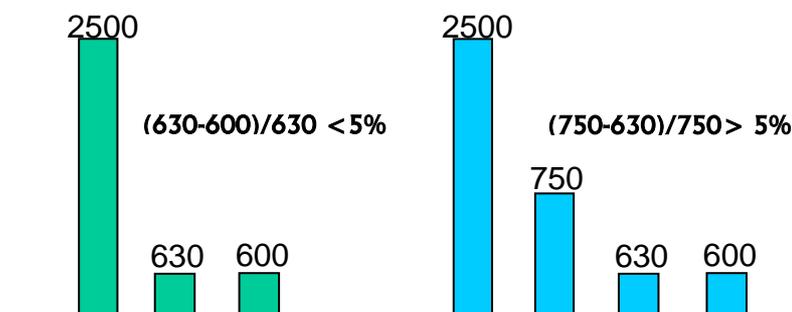


Figure 3. Représentation du suivi de la conductivité après action de la pipéridine. Dans le 1^{er} cas, après 3 cycles, la déprotection s'arrête car la différence entre le dernier pic et l'avant dernier est inférieure à 5%. Le couplage va pouvoir avoir lieu. En revanche dans le 2^{ème} cas, la différence est supérieure à 5%, une 4^{ème} déprotection est donc nécessaire avant le couplage.

A la fin de la synthèse le peptide est séparé de son support solide, et les groupements protecteurs des chaînes latérales sont ôtés par traitement en milieu acide (TFA).

1.3. Choix du support solide

La SPPS utilise un support solide polymérique (résine), élément crucial dans la synthèse. Ce support doit présenter une bonne solvation dans les solvants organiques employés au cours du cycle d'élongation (DMF, pipéridine, NMP), sans être solubilisé. Il doit gonfler et être bien perméable pour exposer tous les sites aux réactifs de synthèse. Les synthèses ont été effectués à l'aide de deux résines différentes : NovasynTGA[®] et WANG. Les résines WANG, standards pour la synthèse de peptide en phase solide, sont constituées de polystyrène réticulé à 1% de divinylbenzène. Les NovasynTGA[®] sont des résines de Tentagel, composite de polyéthylène oxide greffé à une matrice de polystyrène réticulé, possédant une fonction amine. Ces résines sont dotées d'un polyéthylèneglycol (PEG) qui constitue le bras espaceur (linker). Ce PEG empêche un retour de l' α -amine sur la résine. Ces résines possèdent une excellente stabilité à la pression et de bonnes propriétés de gonflement. Les résines NovasynTGA[®] ont été préférentiellement choisies pour la synthèse des longs peptides (plus de 25 résidus) pour plusieurs raisons : ces résines ont une meilleure solvation, une substitution plus basse (entre 0.1 et 0.3 mmol.g⁻¹ de résine) que des résines polystyrène WANG (entre 0.3 et 1 mmol.g⁻¹ de résine) et une distribution de la fonctionnalité plus homogène sur la résine. Tous ces facteurs vont conduire à la diminution des problèmes d'agrégation des peptides au cours de la synthèse. Le peptide formé aura donc une meilleure pureté et le rendement sera plus élevé.

Les résines sont toutes préchargées, c'est-à-dire qu'elles portent le résidu aminé par lequel la synthèse doit commencer. La synthèse se faisant de l'extrémité C-terminal vers l'extrémité amino-terminale (N-ter), l'acide aminé accroché sur la résine est donc le carboxy-terminal (C-ter).

Les groupements amines des monomères sont protégés par un groupement Fmoc ce qui permet de rendre l'extrémité N-ter momentanément non réactive. Afin de prévenir des réactions secondaires entre les α -amines et les chaînes latérales fonctionnelles, d'autres protections masquent les groupements réactifs des chaînes latérales. Les différentes protections ainsi que leurs masses sont données dans le Tableau 1.

Groupements protecteurs	Incréments de masse (Da)
Boc	100.05
t-Bu	56.06
pbf	251.96
trt	242.11
Fmoc	222.07

Tableau 1. Incréments de masse (en Dalton) des différents groupements protecteurs des chaînes latérales des acides aminés et du groupement Fmoc, protecteur du groupement amines.

1.4. Clivage de la résine et déprotection

A la fin des synthèses, les peptides vont subir un traitement en milieu acide dans le but de récupérer les peptides libérés de leurs groupements protecteurs. Le clivage s'effectue en plusieurs étapes : i) traitement acide (contenant 95% de TFA) ii) séparation peptide-résine par filtration, iii) précipitation dans l'éther et iv) récupération du peptide par filtration ou centrifugation. Les différents processus de clivage des peptides sont explicités dans la partie expérimentale (Annexe 1).

1.5. Analyse par Spectrométrie de Masse

Les bruts de synthèse obtenus sont analysés par spectrométrie de masse en mode MALDI-ToF afin de vérifier la présence du peptide voulu. Il reste ensuite à purifier le peptide parmi les intermédiaires de synthèse, par chromatographie liquide haute performance. L'optimisation des

conditions de séparation a été mise au point par couplage HPLC et spectrométrie de masse (LC-MS) et la vérification de la pureté des peptides est ensuite effectuée par spectrométrie de masse de type MALDI-ToF.

1.6. Purification par chromatographie liquide à haute performance

L'analyse et la purification des protéines sont effectuées par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC). Les solvants et les colonnes utilisées sont présentés en Annexe 1.3.1. A la fin de chaque purification, la pureté du peptide est contrôlée par HPLC et par spectrométrie de masse en mode MALDI-ToF.

1.7. Séquences des peptides synthétisés

Les séquences des onze peptides synthétisés sont données dans le tableau ci-dessous, les résidus hydrophobes sont représentés en rouge, l'acide aminé muté pour le peptide Neu* a une *. Les acides aminés ¹⁵N sont doublement surlignés et en gris, le pourcentage d'hydrophobicité est indiqué dans la colonne de droite:

Peptide	Séquence	% d'hydrophobicité
Neu _{TM35}	¹ EQRASPVTFIIATVVG VLLFLILVVVV GILIKRRR ³⁵	68%
Neu _{TM35}	¹ EQRASPVTFIIATVVG VLLFLILVV <u>V</u> GILIKRRR ³⁵	68%
Neu _{TM35}	¹ EQRASPVTFIIATVVG VLLFLILVV <u>V</u> GILIKRRR ³⁵	68%
Neu* _{TM35}	¹ EQRASPVTFIIATVE* G VLLFLILVVVVGILIKRRR ³⁵	65%
Neu* _{TM35}	¹ EQRASPVTFIIATVE* G VLLFLILVV <u>V</u> GILIKRRR ³⁵	65%
Neu* _{TM35}	¹ EQRASPVTFIIATVE* G VLLFLILVV <u>V</u> GILIKRRR ³⁵	65%
KV ₁₂ K	¹ KVVVVVVVVVVVVVV K ¹⁴	85%
KV ₂₀ K	¹ KVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVV K ²⁴	91%
BH4 (6-30)	⁶ RTGYDNREI VMKYI HYKLSQRGYEW ³⁰	33%
BH4 (6-31)	⁶ RTGYDNREI VMKYI HYKLSQRGYEW ³¹	32%
BH4 (6-31)	⁶ RTGYDNREI VMKYI HYKLSQRGYEW ³¹	32%

Tableau 2. Séquences des peptides. Les acides aminés hydrophobes sont en rouge, les acides aminés marqué ¹⁵N sont doublement surlignés et en gris, la mutation est marqué par *.

2. Résultats

Les synthèses en phase solide ont été effectuées en utilisant la stratégie FastMoc dans un mode simple couplage, avec 0.1 mmol de résine (1 équivalent de résine pour 10 équivalents d'acides aminés) pour les synthèses de Neu, Neu*, KV₁₂K, KV₂₀K et BH4 et avec 0.25 mmol de résine (1 équivalent de résine pour 4 équivalents d'acides aminés) pour les synthèses de Neu¹⁵N₂, Neu¹⁵N₄, Neu*¹⁵N₂, Neu*¹⁵N₄ et BH4¹⁵N₂. Les études structurales nécessitent une grande quantité de peptides marqués ¹⁵N, c'est pourquoi les dernières synthèses ont été effectuées à une échelle moyenne (0.25 mmol de résine).

Le tableau 3 résume les rendements théoriques de synthèse, les rendements expérimentaux de synthèse, les rendements de purification, les rendements totaux, la masse de produit obtenu et la pureté des peptides. Le rendement théorique de synthèse se calcule en fonction du nombre d'étape et en considérant que le rendement de chaque étape de synthèse est de 99%. Pour un peptide de 30 résidus, le rendement théorique de synthèse est de $(0.99^{29}) * 100$, soit 75%.

peptides	(1) peptide brut (mg)	(2) Rendement synthèse	(3) peptide pur (mg)	(4) Rendement purification	(5) Rendement total	(6) Degré de pureté
Neu EQRASPVTFIATVVGVLFLILVVVGILIKRRR	135	35 %	20	15 %	5 %	95 %
Neu¹⁵N₂ EQRASPVTFIATVVGVLFLILVVVGILIKRRR	486	50%	83	15%	8%	95%
Neu¹⁵N₄ EQRASPVTFIATVVGVLFLILVVVGILIKRRR	398	41%	55	15%	6%	95%
Neu* EQRASPVTFIATVVGVLFLILVVVGILIKRRR	201	52 %	40	20 %	10.5 %	97 %
Neu*¹⁵N₂ EQRASPVTFIATVVGVLFLILVVVGILIKRRR	425	44 %	94	22 %	10 %	98 %
Neu*¹⁵N₄ EQRASPVTFIATVVGVLFLILVVVGILIKRRR	541	55 %	97.7	18 %	10 %	98 %
KV₁₂K KVVVVVVVVVVVVVVK	50	34 %	2	4 %	1 %	85 %
KV₂₀K KVVVVVVVVVVVVVVVVVVVVK	50	22 %	-	-	-	-
BH4 (6-30) RTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEW	135	54 %	1	0.7 %	0.23 %	98 %
BH4 (6-31) RTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWD	188	74 %	67	36 %	26 %	99 %
BH4¹⁵N₂ (6-31) RTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWD	615	75 %	250	41%	30 %	98 %

Tableau 3. Masse et rendements de synthèse et de purification). (1) masse de produit obtenu après la synthèse ; (2) rendement de synthèse ; (3) masse de peptide obtenu après purification ; (4) rendement de purification ; (5) rendement total (rendement synthèse x rendement purification) ; (6) degré de pureté contrôlé par HPLC

Le rendement de synthèse est calculé en fonction de la masse de peptide brut obtenu en fin de synthèse et la masse de peptide brut théorique (obtenu si toutes les étapes de synthèses s'étaient déroulées à 100%). Les rendements de purifications sont calculés à partir des masses des peptides obtenus avant purification et après purification. Les rendements totaux sont la multiplication des rendements de synthèse et de purification. Les puretés des peptides sont déterminées à l'aide du logiciel Millénium® (Waters).

Trois différentes familles de peptide ont été synthétisés.

La première famille rassemble les domaines transmembranaires hydrophobes du récepteur à tyrosine kinase, Neu_{TM35} et Neu*_{TM35}. Ces peptides sont très hydrophobes. Les rendements de synthèses sont de 35% pour le peptide Neu, 50% pour le peptide Neu¹⁵N₂, 41% pour le peptide Neu¹⁵N₄, 52% pour le peptide Neu*, 44% pour le peptide Neu*¹⁵N₂, 55% pour le peptide Neu*¹⁵N₄. Le rendement théorique pour toutes ces synthèses est de 71%. Les synthèses de ces peptides ont été obtenues avec de bons rendements si on considère qu'ils possèdent plus de 60% de résidus hydrophobes.

La deuxième famille de peptides regroupe les polyvalines. Le rendement de synthèse est de 34 % pour le peptide KV₁₂K (rendement théorique de 88%). Le rendement de synthèse est 22 % pour le peptide KV₂₀K (rendement théorique de 81%). Les synthèses de polyvalines ont donc donné de faibles rendements, mais ce résultat était attendu, car ces peptides possèdent entre 85 et 91% de résidus hydrophobes.

La troisième famille regroupe les peptides amphipathiques, soit BH4 (5-30) et BH4 (6-31). Les rendements des synthèses sont de 54% pour BH4 (6-30), 74% pour le peptide BH4 (6-31) et 75% pour le peptide BH4¹⁵N₂. Le rendement théorique pour ces synthèses est de 79%. Comme nous pouvons le constater, les synthèses de ces peptides se sont déroulées dans de très bonnes conditions vraisemblablement à cause du caractère hydrophile majoritaire de BH4.

Les degrés de pureté des peptides amphipathiques et hydrophobes après purification sont excellents, toujours supérieurs à 95%. En revanche, le degré de pureté des polyvalines, qui sont "ultras" hydrophobes, sont beaucoup plus faible, de l'ordre de 80-85%.

Nous remarquons aussi que les rendements totaux de BH4 (6-30) et KV₁₂K sont extrêmement faibles. Nous verrons l'explication dans la discussion.

3. Discussion

3.1. Les fragments transmembranaires Neu et Neu*

Trois approches ont été examinées dans le but de fournir des quantités suffisantes de peptides purs de Neu_{TM35}, de Neu*_{TM35} et de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} marqués ¹⁵N pour les études biophysiques. Toutes les synthèses ont été exécutées avec la résine NovasynTGA[®], préchargée avec l'arginine. Tous les peptides ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-ToF.

- Synthèse et purification des fragments Neu

La faisabilité d'une synthèse peptidique en phase solide dépend de la nature et de la fréquence des acides aminés dans la protéine. Les peptides hydrophobes sont connus pour être difficiles à synthétiser en raison entre autre de leur faible solubilité. Lors des synthèses, l'objectif est d'obtenir le rendement le plus élevé possible pour chaque étape de couplage, de préférence au-dessus de 98%. Les faibles rendements semblent se corrélérer avec la faible solvation de la résine. Il est important de choisir une résine qui présente une bonne solvation dans les solvants organiques employés au cours du cycle d'élongation (DMF, pipéridine) sans être solubilisée ! On notera que l'introduction des solvants dipolaires lors de la synthèse, tels que DMF ou DMSO, et l'utilisation de résines polaires comme les polyamides peuvent améliorer la solvation (Oliveira *et al.*, 1992), mais dans notre cas, cela n'a pas été nécessaire. Dans la plupart des cas, la séquence peptidique semble affecter l'efficacité de couplage. Afin d'augmenter les rendements de synthèse et de purification, nous avons testé deux types de résines, trois voies de clivages, plusieurs colonnes de chromatographie et nous avons essayé différents gradients pour optimiser la purification.

Tout d'abord nous avons remarqué qu'il était plus judicieux d'employer une résine de type NovaSynTGA[®] plutôt que la résine WANG classiquement utilisée. Comme indiqué plus haut, les résines NovasynTGA[®] sont chimiquement plus robustes et moins substituées. Par rapport à une résine WANG, ce type de résine a une meilleure solvation, une distribution plus homogène de la fonctionnalité et une substitution plus faible. Tous ces facteurs mènent à la diminution des problèmes d'agrégation des peptides au cours de la synthèse ; par conséquent, les peptides synthétisés auront une meilleure pureté et le rendement sera plus important.

Pour améliorer le rendement de synthèse nous avons utilisé comme activateur le mélange HBTU/HOBt, récemment développé et donnant de très bons résultats (Dourouglou *et al.*, 1984 ; Fields *et al.*, 1991 ; Chang et Meienhofer, 1978 ; Nilson *et al.*, 2001).

Afin d'améliorer l'étape de clivage, nous avons testé trois voies différentes dans le but d'éliminer tous les groupements protecteurs et la résine du peptide. Ces tests ont été effectués sur de petites quantités, entre 10 et 15 mg de peptide-résine. Le clivage optimum dépend des différents résidus de la séquence, de leur nombre, des groupements protecteurs et de la résine. Pour la majorité des peptides, le clivage peut être fait avec la solution TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5 v/v/v). Quand le peptide a un acide glutamique en position N-terminale, nous devons omettre l'eau dans le mélange pour empêcher la transformation d'acide glutamique en résidu pyroglutamyl (Introduction to cleavage technique, 1995). Tous les essais ont donc été effectués sans eau. Si cette solution de clivage n'est pas adéquate, l'utilisation d'EDT ou de réactif K au mélange fournit généralement une solution satisfaisante. Notre premier essai a été effectué avec TFA/TIS (95/5, v/v), le second a été effectué avec TFA/TIS/EDT et le dernier a été effectué avec la solution TFA/TIS/thioanisole/EDT/cristaux de phénol. En parallèle, des essais ont été effectués afin de déterminer le temps de clivage le mieux adapté. Une étude préliminaire par couplage LC/MS a été effectuée sur chaque échantillon clivé et avec différent temps de clivage. Le mélange TFA/TIS a été utilisé avec des temps de clivage allant de 2 heures à 12 heures. Ce mélange n'a pas été assez efficace pour ce peptide puisque nous avons observé sur les spectres deux pics correspondants à deux groupements tBu, toujours présents après 12 heures de clivage. Ce mélange n'a donc pas été employé lors des synthèses suivantes. Nous avons alors décidé d'ajouter dans le mélange ci-dessus de l'EDT, molécule présentant une bonne efficacité de piégeage (scavenger) pour les cations t-butyliques. Avec cette solution nous avons également observé un pic correspondant à un tBu, mais de plus faible intensité. Ce pic est encore présent après 12 heures de clivage. Cet essai, meilleur que le précédent n'est toujours pas assez satisfaisant. Le dernier test a consisté à utiliser la solution TFA/TIS/thioanisole/EDT/cristaux de phénol, et aucun pic de tBu n'a été observé sur les spectres après 2 heures de clivage. Toutes ces expériences nous ont permis de choisir le clivage le plus adapté pour nos peptides, soit la solution TFA/TIS/thioanisole/EDT/cristaux de phénol pendant 2 heures.

Neu est composé de presque 70% d'acides aminés hydrophobes (alanine, isoleucine, leucine, phénylalanine et valine). Les essais effectués par couplage LC/MS nous ont permis d'optimiser le

gradient et le choix de colonne de purification. Après plusieurs essais, nous avons décidé de choisir la colonne Vydac C4 (300 Å, 5 µm, 250 x 10 mm) qui est la mieux adaptée aux peptides hydrophobes. Nous noterons que ce peptide reste fixé sur un support portant un greffage C18. Le meilleur gradient obtenu est divisé en deux pentes ; ainsi, les petits peptides sont élués au début de l'analyse et le peptide désiré en fin d'analyse. Nous notons que l'utilisation de l'isopropanol est un avantage pour la solubilisation et la désorption du peptide de la colonne de chromatographie. Bien que le peptide soit très hydrophobe nous avons réussi à obtenir un rendement de purification de 15%. La Figure 4 représente le spectre de masse du peptide Neu après clivage et avant la purification. La numérotation entre crochets [x-35] correspond aux peptides tronqués, observés sous forme acétylée à la suite de la réaction de capping. Les peptides Neu¹⁵N₂ et Neu¹⁵N₄ ont été synthétisés, clivés et purifiés de la même manière que le peptide Neu.

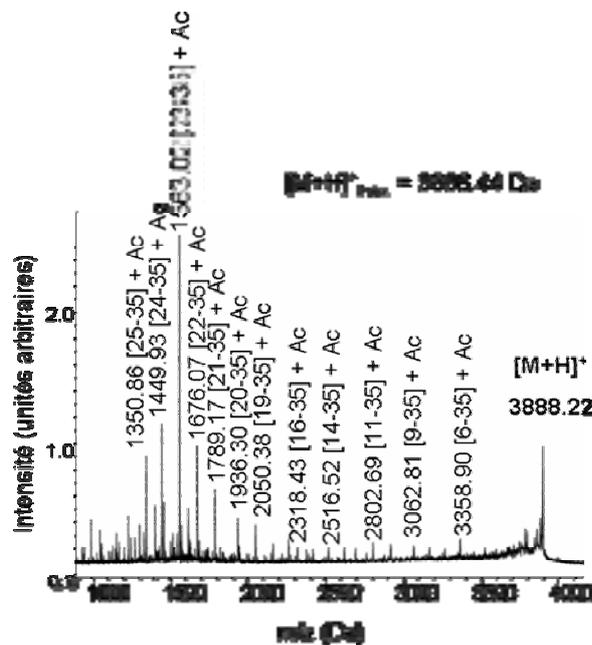


Figure 4. Spectre MALDI-ToF du peptide Neu brut. Le pic majeur de 3888.22 Da correspond au peptide Neu monoprotoné. La numérotation entre crochets [x-35] correspond aux peptides tronqués, observés sous forme acétylée à la suite de la réaction de capping.

- Synthèse et purification des peptides Neu*

La mutation (Val→Glu) change le comportement du peptide, qui est maintenant un peu moins hydrophobe. En dépit de cette mutation le procédé mis au point pour le peptide Neu a été peu

modifié. Les rendements des synthèses pour les peptides Neu* marqué ^{15}N sont de 44 à 55% et celui pour le peptide Neu* est de 52 %, qui restent corrects face au rendement théorique (71%). Nous remarquons que les rendements de synthèse et de purification du peptide Neu sont inférieurs à celui de Neu* (50% de rendement de synthèse et 20% de rendement de purification pour Neu*, 40% de rendement de synthèse et 15% de rendement de purification pour Neu). Ceci est dû au fait que l'hydrophobicité de Neu est légèrement plus importante que celle de Neu*. Comme nous l'avons vu Neu possède 68% d'acides aminés hydrophobes alors que Neu* en possède 65% (Tableau 2). Cette légère différence est importante lors de la synthèse et de la purification. Nous remarquons aussi que la mutation est au milieu de la séquence hydrophobe. Ce qui n'est pas négligeable, en effet l'acide glutamique de Neu* rompt l'hydrophobicité de cette région de la séquence et ceci implique que les rendements sont plus élevés. La stratégie de synthèse et les voies de clivage développées pour le peptide Neu ont été employées pour les peptides Neu*. La méthode de purification a été un peu changée, puisque Neu est plus hydrophobe que Neu*. Les nouvelles conditions de la séparation ont été déterminées par couplage LC/MS. La meilleure purification a été obtenue avec un gradient à pentes multiples comme avec le peptide Neu afin d'éluer les petits peptides au début de l'analyse. Nos résultats montrent que Neu* a été élué à un pourcentage inférieur d'acetonitrile/isopropanol que Neu (91% pour Neu* et 93% pour Neu), avec un meilleur rendement de purification (18% à 22%). La Figure 5 représente le spectre de masse (MALDI-ToF) du peptide Neu* purifié.

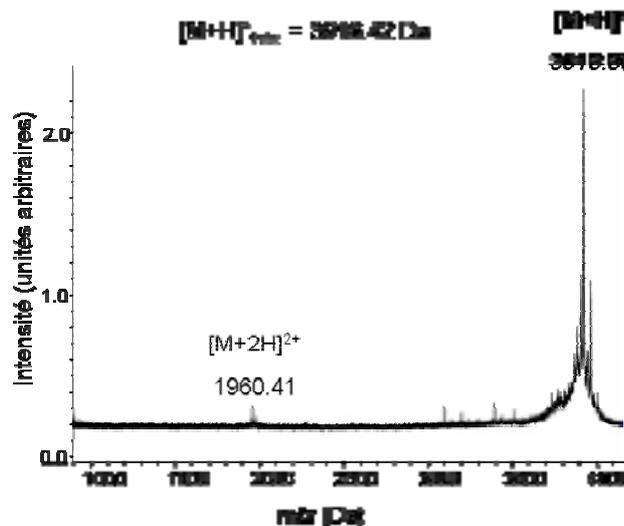


Figure 5. Spectre MALDI-ToF du peptide Neu* pur. Le pic majeur de 3918.80 Da correspond au peptide Neu* monoprotomé.

3.2. Les polyvalines

Les synthèses des polyvalines ont été obtenues avec de très mauvais rendements, dûs au taux d'hydrophobicité très important (entre 85 et 91%). Plusieurs voies de purification ont été étudiées afin d'obtenir le peptide pur. Différentes colonnes et différents systèmes de solvant ont été testés. Pour la purification de ces peptides très hydrophobes, les conditions habituelles de séparation avec des colonnes C4 ou C18 sont inadéquates. Nous avons constaté que l'emploi d'une colonne C1 (Spherisorb de Waters, 80 Å, 10 µm, 4.6 x 150 mm) avec un solvant d'élution comme un alcool à longue chaîne conduisait aux meilleures conditions de séparation pour la purification. L'échantillon ainsi que la colonne sont chauffés durant l'analyse. Les conditions de gradient proposées par Glover (Glover *et al.*, 1999) ont été améliorées et nous ont permis d'obtenir quelques mg de peptide KV₁₂K pur. Ces quelques milligrammes, d'une pureté faible mais acceptable (85%), ont été suffisants pour réaliser les tests de dichroïsme circulaire (cf. Chapitre 5).

Synthèse et Purification de KV₂₀K :

Ce peptide, encore plus hydrophobe que le précédent, a été extrêmement difficile à synthétiser. La synthèse a été réalisée deux fois. Lors de la première synthèse, nous avons utilisé une résine WANG, le peptide désiré était très peu présent dans le mélange brut (MS) et nous avons donc choisi de recommencer la synthèse. La deuxième synthèse a été réalisée avec une résine NovasynTGA®. Elle a mieux fonctionné et nous avons essayé de purifier ce peptide. Plusieurs essais de séparation ont été effectués avec une colonne SepPack C2, une colonne Spherisorb C1, une colonne Vydac C4, une colonne monolithique (polymérique, similaire à un greffage C4) et avec une colonne échangeuse d'ions (Amersham Biosciences), avec différents systèmes de solvants. Aucune de ces méthodes n'a permis d'obtenir une séparation correcte et nous n'avons pas pu à l'heure actuelle purifier ce peptide. La Figure 6 représente le spectre de masse du peptide KV₂₀K brut obtenu après clivage.

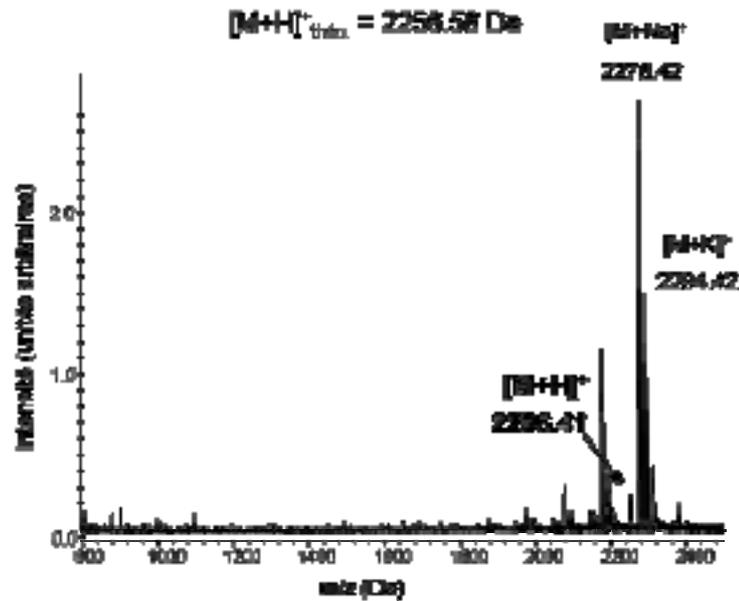


Figure 6. Spectre MALDI-ToF du peptide KV₂₀K brut. Le pic majeur de 2256.59 Da correspond au peptide monoprotoné.

3.3. Synthèse et Purification des peptides BH4 et BH4¹⁵N₂

Trois différentes voies de synthèse ont été examinées dans le but de fournir des quantités suffisantes de peptide BH4 pur pour les études biophysiques.

Le rendement de synthèse du peptide BH4 (6-30) est de 54% tandis que celui des peptides BH4 (6-31) est de 74%. Le rendement théorique est de 79%, en considérant 99% de couplage par étape (Field *et al.*, 1991). On voit donc que la synthèse BH4 (6-31) a bien mieux fonctionné que celle de BH4 (6-30). Cette première synthèse (6-30) n'a pas été réussie vraisemblablement parce que la résine a été préchargée avec du tryptophane non protégé. Seule une quantité de peptide a pu être clivée de la résine. Comme cela a été suggéré dans la littérature, ce faible rendement serait lié non pas au clivage inachevé mais simplement à la ré-addition du cation benzylique intermédiaire au noyau d'indole (Atherton *et al.*, 1988). Après retraitement répété avec du TFA, nous n'avons pas récupéré de peptide. Lors de la deuxième synthèse nous avons donc utilisé une résine préchargée avec de l'acide aspartique pour éliminer tout processus intramoléculaire impliquant le tryptophane. Cette fois-ci le groupement latéral du tryptophane a été protégé par un groupement Boc (Chang *et al.*, 1978). La séquence comporte quelques acides aminés ayant des groupements fonctionnels nucléophiles (Trp, Tyr et Arg) pouvant être modifiés pendant le clivage. Ces groupements sont en particulier susceptibles d'être alkylés par des cations produits lors de ce

processus de clivage ; ce phénomène est limité par l'utilisation de thiols dans la solution de clivage. Les bons rendements obtenus lors de la deuxième et de la troisième synthèse sont dûs au caractère amphiphile du peptide et aux méthodes avancées qui se sont récemment développées dans la synthèse peptidique et notamment avec l'utilisation des activateurs de HBTU/HOBt. Le temps de clivage a été crucial. Une longue période de clivage permet d'enlever correctement des groupes protecteurs pbf mais la probabilité qu'un complexe se forme entre le bras espaceur (linker) de la résine et le noyau d'indole du tryptophane augmente (Petros *et al.*, 2001 ; Giraud *et al.*, 1999). Dans notre cas, un temps de deux heures a été utilisé, fournissant le meilleur compromis pour les peptides BH4 (6-31). La Figure 7 représente le spectre de masse du peptide BH4 (6-31) marqué ^{15}N après purification.

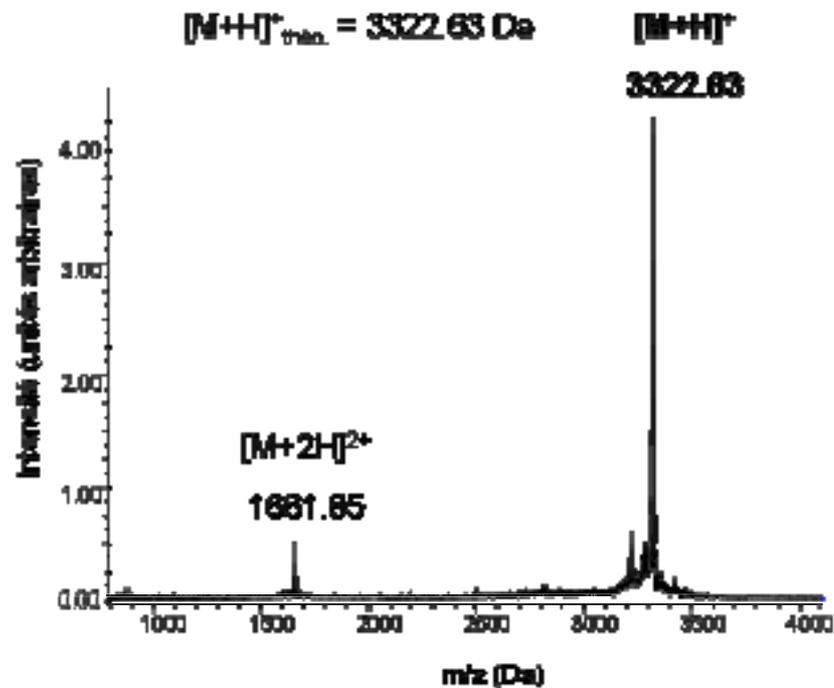


Figure 7. Spectre MALDI-ToF du peptide BH4 (6-31) $^{15}\text{N}_2$ pur. On observe le deuxième produit d'ionisation à $(M+2H)/2$, avec un m/z de 1661.85. Le massif de petits pics avant la crête principale résulte de fragmentations induites par les photons lasers.

4. Conclusion

Après optimisation des conditions de synthèse et de purification, les peptides ont été obtenus avec des rendements acceptables. Le développement de ces méthodes et leur optimisation

nous permet de renouveler ces synthèses de manière quasi-routinière, aussi bien pour les peptides non-marqués que pour les peptides incorporant des traceurs isotopiques.

L'obtention de quantités suffisantes de Neu, Neu* nous permet d'envisager l'étude de la dimérisation de ces peptides par dichroïsme circulaire et l'étude dynamique par RMN des solides.

L'obtention de quantités suffisantes de BH4 (marqué ou non) nous permet d'envisager l'étude des interactions protéines-membranes. Les résultats de ces travaux seront présentés dans la Thèse de Marc-Antoine Sani.

De plus nous avons assez de produits marqués à l'azote 15 pour étudier la topologie des peptides Neu et Neu* dans des modèles de membranes et ainsi tenter de mieux comprendre le changement d'orientation des monomères lors du processus de dimérisation. L'orientation des peptides au sein de la bicouche est effectuée par RMN-¹⁵N et les résultats seront présentés dans la Thèse de Cécile Loudet.

5. Généralisation des résultats

Nous pouvons résumer et généraliser nos résultats pour la synthèse, le clivage et la purification dans l'optique de synthétiser de nouveaux peptides.

Pour la synthèse de peptides amphiphiles il n'y a pas de mesure particulière à prendre. L'utilisation du programme de synthèse le plus simple est recommandée et tous les types de résines sont envisageables lors de la synthèse. Pour les peptides de plus de 60 résidus, l'utilisation de la résine Novasyn TGA® est adéquate. Les rendements de synthèse sont très corrects.

Pour la synthèse de peptides hydrophobes, le choix de la résine est un critère important. Pour les petits peptides (moins de 20 résidus), les résines de type WANG sont à préconiser, en revanche pour les peptides plus longs, la résine NovasynTGA® est mieux appropriée (cf. 1.3 choix du support solide).

Pour la synthèse de peptides très hydrophobes, nos résultats ne permettent pas de conclure. Nous pouvons juste observer que les synthèses de polyvalines (KV₁₂K ou KV₂₀K) ont été effectuées avec

plusieurs types de résines et dans tous les cas les rendements étaient très faibles. Il faut omettre, dans la mesure du possible, de commencer la synthèse avec un tryptophane non protégé (cyclisation possible entre le noyau indole du tryptophane et la résine) et une proline (cyclisation possible entre la proline et la résine).

Le choix des réactifs de clivage et le temps de clivage sont des paramètres délicats à cause de nombreuses réactions secondaires possibles (racémisations, cyclisations, alkylations). Ces paramètres sont à déterminer en fonction de la nature des acides aminés, mais il y a quelques règles à suivre. Lors du clivage, les groupements protecteurs enlevés forment des carbocations très réactifs qu'il faut piéger par l'addition des piègeurs (scavengers), tels que phénol, thiols, silanes, eau afin de les empêcher de se fixer sur des sites sensibles du peptide. C'est notamment le cas avec les groupements Pmc et le Pbf qui ont tendance à attaquer le tryptophane, s'il n'est pas protégé, et le tBu qui peut alkyler la tyrosine. De plus on notera que les thiols sont employés pour empêcher l'oxydation de la méthionine. Si la séquence contient beaucoup d'arginine, il est préférable d'augmenter le temps de clivage (qui classiquement est de 90 minutes). Si le clivage est trop long et que la résine choisie est une Novasyn TGA®, le bras espaceur (PEG) risque d'être coupé et de contaminer les échantillons. Il faut donc trouver un bon compromis.

L'optimisation du gradient de purification est à déterminer individuellement pour les peptides. L'utilisation du couplage LC-MS permet d'aller plus vite dans cette recherche. Plusieurs types de colonnes existent, pour des peptides hydrophiles, les colonnes greffées C18 sont conseillées et pour les peptides hydrophobes l'utilisation des colonnes greffées C4 est plus appropriée.

La chimie des peptides reste toujours un défi, les peptides sont tous différents et ce n'est pas évident d'établir un protocole. Il y a quelques règles à suivre et des pièges à éviter mais synthétiser un peptide reste un art.

BIBLIOGRAPHIE

- Atherton E, Sheppard RD. *Solid phase peptide synthesis - A practical approach*. 1989 (Oxford University Press, IRL).
- Atherton E, Cameron LR, Sheppard RC. Peptide synthesis: Part 10. Use of pentafluorophenyl esters of fluorenylmethoxycarbonylamino acids in solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron*. 1988; **44**: 843-857.
- Barany G, Merrifield RB. *The peptides* (edition Gross E. & Meienhofer J.). 1979; 1-284 (Academic Press, New-York).
- Chang CD, Meienhofer J. Solid-phase peptide synthesis using mild base cleavage of N alpha-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1978; **11**: 246-249.
- Dourouglou V, Gross B, Lambropoulou V, Zioudrou D. O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate as coupling reagent for the synthesis of peptides of biological interest. *Synthesis*. 1984; 572-574.
- Fields CG, Lloyd DH, MacDonald RL, Otteson KM, Noble RL. HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Peptide Research*. 1991; **4**: 95-101.
- Giraud M, Cavelier F, Martinez J. A side-reaction in the SPPS of Trp-containing peptides. *Journal of Peptide Science*. 1999; **5**: 457-461.
- Glover KJ, Martini PM, vold RR, Komives EA. Preparation of Insoluble Transmembrane Peptides: Glycophorin-A Prion, and FGFR. *Analytical Biochemistry*. 1999; **272**: 270-274.
- Merrifield RB. *Journal of American Chemical Society*. 1963 ; **85**: 2149-2154.
- Nilsson MR, Nguyen LL, Raleigh DP. Synthesis and purification of amyloidogenic peptides. *Analytical Biochemistry*. 2001; **288**: 76-82.
- Oliveira L. Peptides, Chemistry, Structure et Biology: Proc. 12th American Peptide Symposium. J. Smith et J. Rivier (Eds.), ESCOM, Leiden. 1992. pp.569.
- Petros AM, Medek A, Nettekheim DG, Kim DH, Yoon HS, Swift K, Matayoshi ED, Oltersdorf T, Fesik SW. Solution structure of the antiapoptotic protein Bcl2. *PNAS*. 2001; **98**: 3012-3017.
- Rich DH, Singh J. *The peptides* (edition Meienhofer). 1979. 241-261 (Academic Press, New York).
- Introduction to cleavage techniques. *Strategies in Peptide Synthesis*. Perkin Elmer. 1995.

Chapitre 4

Récupération quantitative des peptides et des lipides après formation d'un système membranaire

Nous venons juste de voir dans le chapitre précédent qu'il était difficile de synthétiser et de purifier des peptides transmembranaires hydrophobes. Pour les études de DC et de RMN, les peptides sont incorporés dans des modèles de membranes (bicelles, liposomes etc...). Une fois les peptides insérés dans la membrane, il n'était jusqu'à présent pas possible de récupérer le peptide. Le peptide était alors perdu et il était nécessaire d'utiliser à nouveau quelques mg de peptides pour effectuer un autre échantillon. Pour réaliser entre 10 et 15 échantillons, nous avons besoin d'environ 10 à 20 mg de peptides. La consommation de peptides était relativement importante. Afin d'y remédier, nous avons décidé de trouver une méthode pour récupérer le peptide après incorporation dans les membranes. Nous avons mis au point une méthode de séparation quantitative et rapide des peptides des lipides et cette méthode est explicitée ci-dessous. Cette méthode a été testée et mise au point sur trois peptides différents.

1. Introduction

Comme nous l'avons vu au chapitre 3, il est difficile d'obtenir des quantités importantes de peptides transmembranaires. En effet les purifications sont ardues et les rendements totaux (rendement de synthèse x rendement de purification) peu élevés. Une fois le peptide inséré dans les bicelles ou les liposomes, il était jusqu'à présent impossible de l'en extraire. C'est pourquoi nous avons cherché une méthode qui permette de récupérer les peptides d'une part et les lipides d'autre part.

Il est relativement difficile d'extraire des peptides membranaires d'une membrane lipidique. Notre première idée a consisté à solubiliser le système peptide/lipides dans un solvant qui possède peu d'eau afin d'éviter la reformation de liposomes, de phases lamellaires... Notre deuxième idée a été d'analyser le comportement des espèces séparément par HPLC. Les peptides ont été purifiés au Laboratoire (cf. Chapitre 3) et nous connaissons leurs comportements lors d'un gradient eau/méthanol et eau/acétonitrile. Le peptide Neu*_{TM35} est élué à un fort pourcentage d'acétonitrile/isopropanol avec une colonne de type C4. Ce peptide n'est pas élué lors d'un gradient eau/méthanol. Le peptide BH4 est élué sur une colonne C18 à 30% d'acétonitrile lors d'un gradient eau/acétonitrile et à 50% de méthanol lors d'un gradient eau/méthanol. La cateslytine est éluee à 20% d'acétonitrile lors d'un gradient eau/acétonitrile et à 40% de méthanol lors d'un gradient eau/méthanol avec une colonne de type C18. Nous avons de même analysé le comportement de lipides lors d'un gradient eau/méthanol et les résultats montrent que le DCPC est élué à un faible pourcentage de méthanol et les lipides à longues chaînes sont élués à 100% de méthanol. Toutes ces données vont nous servir pour optimiser notre gradient de séparation des peptides des lipides.

Il est à noter qu'une séparation de peptides des lipides par HPLC est difficile et un peu plus longue. Les coefficients d'absorption des lipides et des peptides sont différents, il faut donc réaliser la séparation à des longueurs d'ondes différentes. Environ 6 injections auraient été nécessaires pour une séparation par HPLC avec l'utilisation d'une colonne semi-préparative.

La méthode mise au point est une méthode d'extraction en phase solide (SPE). Il suffit d'une à deux injections pour extraire le peptide du système (3 à 6 fois plus rapide que par HPLC). Cette méthode est très simple, efficace et peu coûteuse. Les colonnes d'extraction en phase solide sont des cartouches possédant un support chromatographique (SepPak, Waters). Il existe plusieurs types de SepPak (C2, C18, échange d'ions, phase normale etc..) qui peuvent donc être adaptés à plusieurs types de systèmes.

La méthode SPE existe depuis plusieurs années et a été utilisée pour divers procédés. La colonne SepPak est utilisée comme colonne de pré-purification, notamment lors de la purification de bactéries (Svetoslav *et al.*, 2004), ou d'échantillons biologiques (Morales *et al.*, 2000). Plusieurs groupes de recherche ont purifié des lipopeptides à l'aide de ces colonnes (Williams *et al.*, 2004 ; Zornes et Stratford, 1997). Razafindralambo a purifié un lipopeptide antifongique de

Bacillus subtilis à l'aide d'une colonne SepPak C18 et a proposé un protocole de séparation pour les lipopeptides en général (Razafindralambo *et al.*, 1993). La colonne est lavée et équilibrée avec de l'eau puis un gradient partant de 100% d'eau vers 100% de méthanol est utilisé. Les colonnes SepPak sont aussi utilisées dans la purification de certains lipides. Morisaki a décrit une méthode de séparation des phosphatidylinositol 4-phosphate (PI 4-P) des phosphatidylinositol (PI) et phosphatidylserine (PS) (Morsaki *et al.*, 2000). Avalli a développé une méthode de séparation des phospholipides dans les produits laitiers (Avalli *et al.*, 2005). Jusqu'à maintenant, les colonnes SepPak ont donc été utilisées pour purifier des lipopeptides et séparer des phospholipides, nous avons donc eu l'idée d'utiliser ces colonnes pour séparer nos peptides des phospholipides.

La méthode a été testée sur trois systèmes différents. Le premier système est Neu*_{TM35} incorporé dans des bicelles de DCPC/DMPC. Nous avons vu précédemment que ce peptide possède 35 résidus et est très hydrophobe. Le deuxième système est BH4 dans des liposomes de DMPC/DMPG. Ce peptide de 26 résidus est amphiphile. Notre dernier système est le peptide cateslytine, peptide antimicrobien étudié au Laboratoire, dans des liposomes de DMPC/DMPS. La cateslytine est un peptide amphiphile de 15 résidus. Afin d'optimiser la purification des peptides, nous avons choisi, en fonction des caractéristiques des peptides, le greffage des colonnes, le solvant de solubilisation et le gradient de séparation. Pour le peptide Neu*_{TM35}, très hydrophobe, nous avons choisi une colonne C2 et pour les peptides BH4 et cateslytine nous avons opté pour une colonne C18.

La première section de ce chapitre est consacrée aux résultats. Nous allons étudier tout d'abord la séparation du peptide Neu*_{TM35} dans des bicelles formées de DCPC/DMPC, puis la séparation du peptide BH4 dans des liposomes de DMPC/DMPG et enfin la séparation de la cateslytine dans des liposomes de DMPC/DMPS. Dans la deuxième section, nous allons discuter nos résultats, plus particulièrement les rendements et les difficultés rencontrées lors des essais.

2. Stratégie

Dans un premier temps, trois conditions nous ont paru très importantes : i) le système peptide/lipides doit s'adsorber le mieux possible sur la colonne, pour cela nous avons décidé d'ajouter 0.1% de TFA dans le solvant de solubilisation, ii) mettre le moins possible d'eau dans le

solvant de solubilisation afin d'éviter la reformation de liposomes, de bicelles ou phases lamellaires et iii) ne pas solubiliser les peptides amphiphiles avec plus de 20% d'acétonitrile pour éviter qu'ils ne s'éluent dans le volume d'injection. La condition 1 a été appliquée pour tous les systèmes, en revanche la condition 2 n'a pu être prise en compte que pour la séparation du peptide hydrophobe et la condition 3 est uniquement nécessaire pour les peptides amphiphiles.

Dans un second temps, il est important de connaître la solubilité de nos lipides afin de mieux appréhender leurs éluions. Le DMPC et le DCPC sont solubles dans le méthanol et l'acétonitrile et insolubles dans l'eau. Le DMPG et le DMPS sont solubles dans l'acétonitrile et insolubles dans l'eau et le méthanol. Nous avons testé l'éluion de deux lipides (DCPC et DMPC) au préalable par HPLC avec un gradient allant de 100% d'eau vers 100% de méthanol. Les résultats montrent que le DCPC est élué très vite (5-10% d'eau) et que le DMPC est élué à 100% de méthanol. Nous avons utilisé ces données pour la mise au point des gradients.

Dans un troisième temps, il était nécessaire d'étudier l'éluion de nos peptides dans un gradient allant de 100% d'eau à 100% de méthanol. Nos résultats ont montré qu'à 100% de méthanol, le peptide hydrophobe n'était toujours pas élué, en revanche les peptides amphiphiles étaient élués à environ 40-50% de méthanol.

Toutes ces données ont permis de focaliser nos essais afin de trouver le gradient le mieux adapté à nos séparations.

3. Matériaux et Méthodes

3.1. Produits chimiques

L'acétonitrile, l'isopropanol et le méthanol proviennent de la compagnie Fisher (Gell Belgium). Le TFA est commercialisé par Applied Biosystems (Nieuwerkerk A-D Ijssel, Pays-Bas). L'eau ultra pure est issue du système de purification d'eau « Elga ». Les colonnes SepPak C2, C18 et échangeuse d'ions proviennent de Waters (Saint-Quentin en Yvelines, France). La phase stationnaire est une cartouche greffée de chaînes aliphatiques de 2 ou 18 carbones. Les lipides (DMPC, DMPG, DMPS, DPPC et DSPC) proviennent de Avanti Polar Lipids.

3.2. Description des systèmes

Les séquences des trois peptides utilisés lors du développement de cette méthode sont données dans le tableau ci-dessous, les résidus hydrophobes sont représentés en rouge, le pourcentage d'hydrophobicité est indiqué dans la colonne de droite:

Peptide	Séquence	% d'hydrophobicité
Neu* _{TM35}	¹ EQRASPVTFIIATVEGVLLFLILVVVVGILIKRRR ³⁵	65%
BH4 (6-31)	⁶ RTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEW ³¹	32%
Cateslytine	¹ RSMLSFRRARGYGF ¹⁵	33%

Tableau 1. Séquence des trois peptides, Neu*_{TM35}, BH4 et Cateslytine. Les acides aminés hydrophobes sont en rouge.

Le peptide Neu*_{TM35} a été inséré dans des bicelles de DCPC/DMPC. Pour nos études, nous avons travaillé avec un rapport molaire de DMPC de 80% et une hydratation de 80% en masse. La préparation de bicelles ainsi que l'insertion de Neu*_{TM35} sont explicitées dans l'Annexe 2. Les peptides BH4 et cateslytine ont été insérés dans des liposomes de DMPC/DMPG et DMPC/DMPS respectivement avec une hydratation de 80%. La préparation de ces modèles de membranes ainsi que l'incorporation des peptides sont aussi explicitées en Annexe 2. Les systèmes peptide/lipides sont ensuite lyophilisés puis solubilisés dans un solvant approprié (cf. mode opératoire).

3.3. Mode opératoire

L'extraction se fait en une ou deux étapes selon la nature du peptide et des lipides. Avant la séparation, la colonne SepPak est lavée avec 10 mL de méthanol, puis équilibrée avec 30 mL d'eau. 10 mg de Neu*_{TM35}/DCPC/DMPC (ratio 1 peptide pour 200 lipides) ont été solubilisés dans 3 mL d'un mélange acétonitrile/eau (75/25 v/v, contenant 0.1% de TFA). 10 mg de BH4/DMPC/DMPG (ratio 1 peptide pour 100 lipides) ont été solubilisés dans 3 mL d'un mélange acétonitrile/eau (25/75 v/v, contenant 0.1% de TFA). 10 mg de cateslytine/DMPC/DMPS (ratio 1 peptide pour 60 lipides) ont été solubilisés dans 3 mL d'eau (contenant 0.1% de TFA). L'utilisation du bain à ultrasons a été nécessaire pour bien solubiliser ce système.

Les échantillons sont ensuite injectés. Au cours de cette étape, le débit d'élution doit être suffisamment faible (5 mL/min) afin de permettre aux solutés peu polaires de s'adsorber sur la phase stationnaire. On récupère l'éluat et cette étape est appelée fraction injection. Pour chaque étape suivante, on injecte 5 mL de solvant et on récolte l'éluat, chaque étape dure 2 minutes. On notera fraction 1 la première étape, fraction 2 la deuxième étape etc. Les échantillons sont concentrés par évaporation du solvant avant d'être analysés par spectrométrie de masse.

3.4. Vérification de la composition en masse par spectrométrie de masse

Tous les échantillons sont analysés par spectrométrie de masse avec un spectromètre de masse MALDI-ToF (mode positif et mode négatif). Les éluats sont directement mélangés à la matrice, l'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique, puis le mélange déposé sur la cible métallique afin d'être analysé. Pour chaque séparation, la fraction contenant le peptide pur est analysée en spectrométrie de masse et en HPLC pour connaître la pureté du produit. Les puretés sont déterminées à l'aide du logiciel Millénium® de Waters.

4. Résultats

Trois différents systèmes ont été étudiés. Le premier système est constitué du peptide Neu*_{TM35} (hydrophobe) et des lipides DCPC, DMPC (zwitterions). Le deuxième système comprend le peptide BH4 (amphiphile) et les lipides DMPC (zwitterion) et DMPG (anionique) et le dernier système est formé du peptide cateslytine (amphiphile) et des lipides DMPC et DMPS (anionique).

4.1. Peptide Neu*_{TM35} dans des bicelles de DCPC/DMPC

Le système peptide/lipides est solubilisé dans un mélange eau/acétonitrile (25/75 v/v) avec 0,1% de TFA. Nous avons utilisé le gradient suivant : eau vers méthanol pour éluer tout d'abord le DCPC puis le DMPC, ensuite eau vers acétonitrile pour achever l'élimination des lipides et enfin acétonitrile vers isopropanol afin d'éluer le peptide. Il est à noter qu'entre les deux premiers gradients, une étape de lavage est réalisée afin de se situer de nouveau à 100% d'eau. La Figure 1 représente le gradient choisi pour cette séparation. Cette séparation s'effectue en quatre étapes. Dans un premier temps, le gradient part de 100% d'eau vers 100% de méthanol. Dans un second temps, la colonne est re-équilibrée pour se situer à 100% d'eau de 12 à 16 minutes. Dans

un troisième temps, le deuxième gradient part de 100% d'eau (0.1% TFA) vers 100% d'acétonitrile (0.1% TFA) puis dans un dernier temps, le troisième gradient part de 100% d'acétonitrile (0.1% TFA) vers 100% d'isopropanol (0.1% TFA).

Pour chaque essai, on analyse le mélange de référence lipides/peptide avant l'injection pour vérifier la présence de toutes les espèces. On remarque sur la Figure 2 que le pic de Neu*_{TM35} est beaucoup moins intense que les pics des lipides, ceci est dû au rendement d'ionisation important du DMPC qui se traduit par un pic très intense. Le signal du peptide est négligeable par rapport à celui du lipide (phénomène de suppression spectrale).

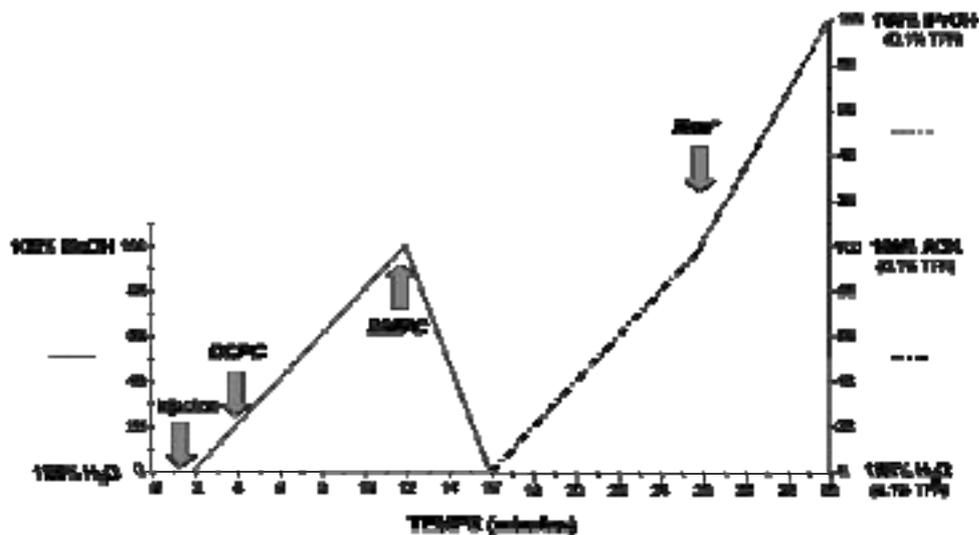


Figure 1 . Schéma du gradient de séparation de Neu* et des lipides. La séparation s'effectue en quatre étapes. Le 1^{er} gradient de 1 à 12 minutes (ligne continue normale) de 100% d'eau vers 100% de méthanol est réalisé pour extraire les lipides. Le DCPC est élué à 20% de méthanol et le DMPC est élué à 100% de méthanol. La 2^{ème} étape est un lavage de 12 à 16 minutes. Lors de la 3^{ème} étape, le 2^{ème} gradient est réalisé de 16 à 28 minutes (ligne trait-point) et part de 100% d'eau (0.1% TFA) pour aller vers 100% d'acétonitrile (0.1% TFA) puis le 3^{ème} gradient de 28 à 32 minutes (ligne en pointillée) part de 100% d'acétonitrile (0.1% TFA) vers 100% d'isopropanol (0.1% TFA) afin d'extraire le peptide. Les flèches indiquent le temps d'élution des espèces.

Dans les fractions collectées de 1 à 3, c'est à dire de 0 à 40% de méthanol, on observe un pic à 907.4 Da correspondant au dimère du DCPC (Figure 2). Dans les fractions 4 et 5, aucune espèce n'est détectée lors de l'analyse de masse.

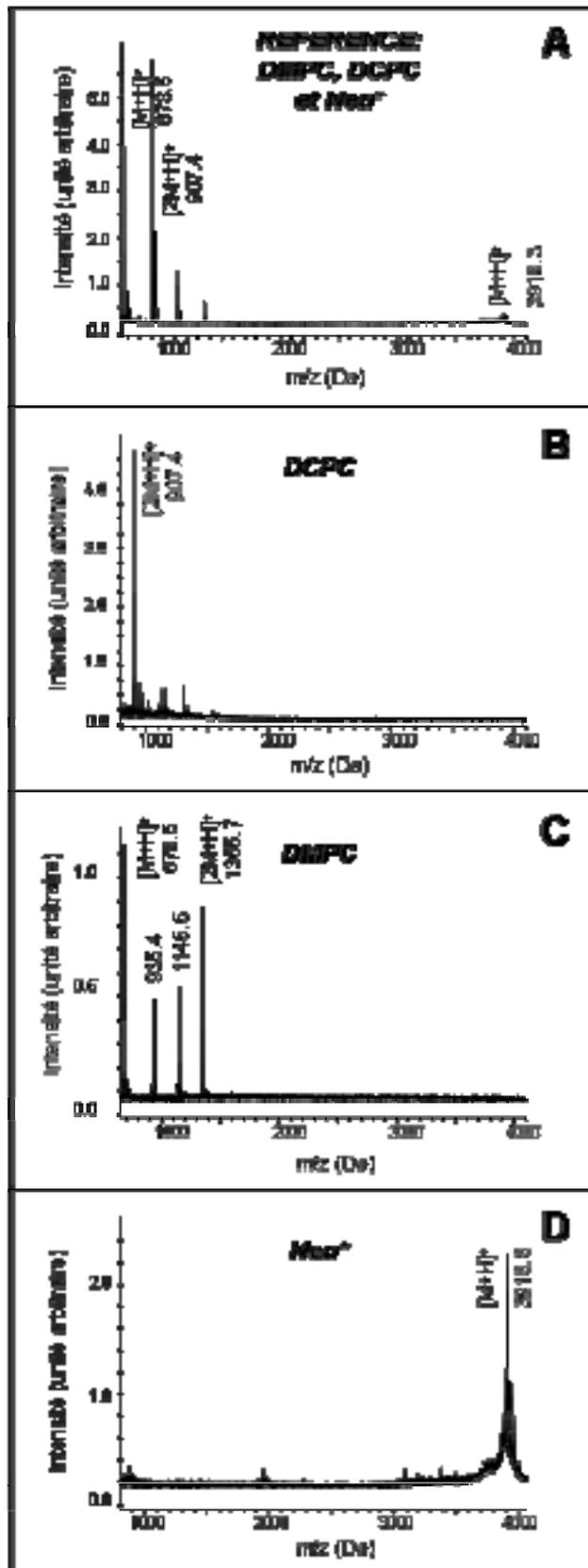


Figure 2. Spectres de masse A) référence : mélange de DMPC, DCPC et Neu* avant séparation, B) DCPC, C) DMPC et D) Neu*.

La fraction 6 correspondant à 100% de méthanol, montre un pic à 1455.7 Da représentant le dimère du DMPC et un pic à 678.5.7 Da correspondant au monomère de DMPC. De plus on observe deux pics à 935.4 Da et à 1145.5 Da qui correspondent au dimère DMPC ayant perdu 1 chaîne aliphatique et 2 chaînes aliphatiques. A la fin de ce premier gradient, qui a duré 12 minutes, les lipides ont été élués. On change alors le système de solvants pour accéder à la 2^{ème} phase : 100% d'eau est injecté afin de re-équilibrer la colonne.

Ensuite le second gradient allant de 100% d'eau (0.1% TFA) vers 100% d'acétonitrile (0.1% TFA) puis vers 100% d'isopropanol (0.1% TFA) va permettre l'extraction du peptide. Le pic à 3918.8 Da correspondant à Neu* est visible sur les spectres de masse des fractions 13 et 14, c'est à dire à 26 et 28 minutes. Ce 2^{ème} gradient comme le 1^{er} dure 16 minutes. La séparation complète dure 32 minutes, le rendement de récupération du peptide est de 76% et celui des lipides est de 67%.

4.2. Peptide BH4 dans des liposomes de DMPC/DMPG

La méthode de purification optimale a été obtenue avec des solvants qui contiennent tous 0.1% de TFA et un gradient allant de 100% d'eau vers 100% de méthanol par sauts de 10% (Figure 3). Nous analysons la référence qui correspond à notre mélange avant l'injection pour vérifier la présence de toutes les espèces (BH4, DMPC et DMPG). Cette analyse a été effectuée pour les ions positifs et négatifs, mais seul le spectre positif est montré (Figure 4A).

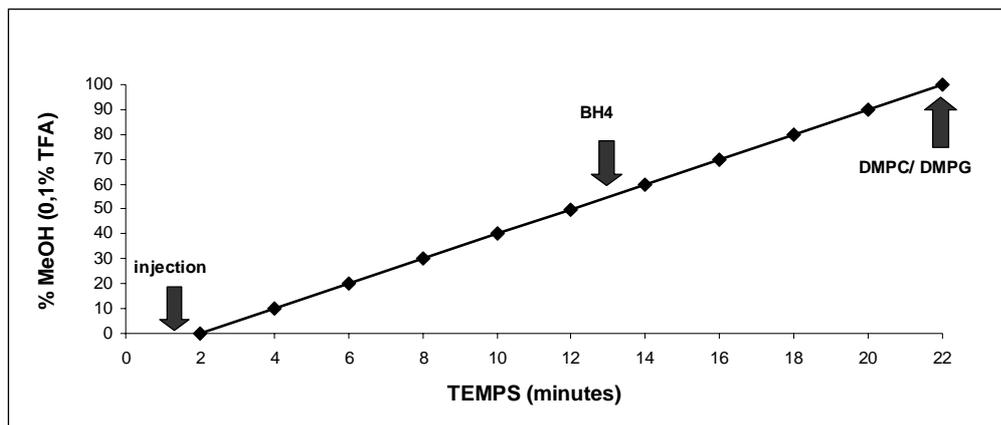


Figure 3. Schéma du gradient de séparation de BH4 des lipides (DMPC, DMPG). Le gradient s'effectue en une seule étape. Les points correspondent aux différentes étapes. Les flèches indiquent le temps d'éluion des espèces.

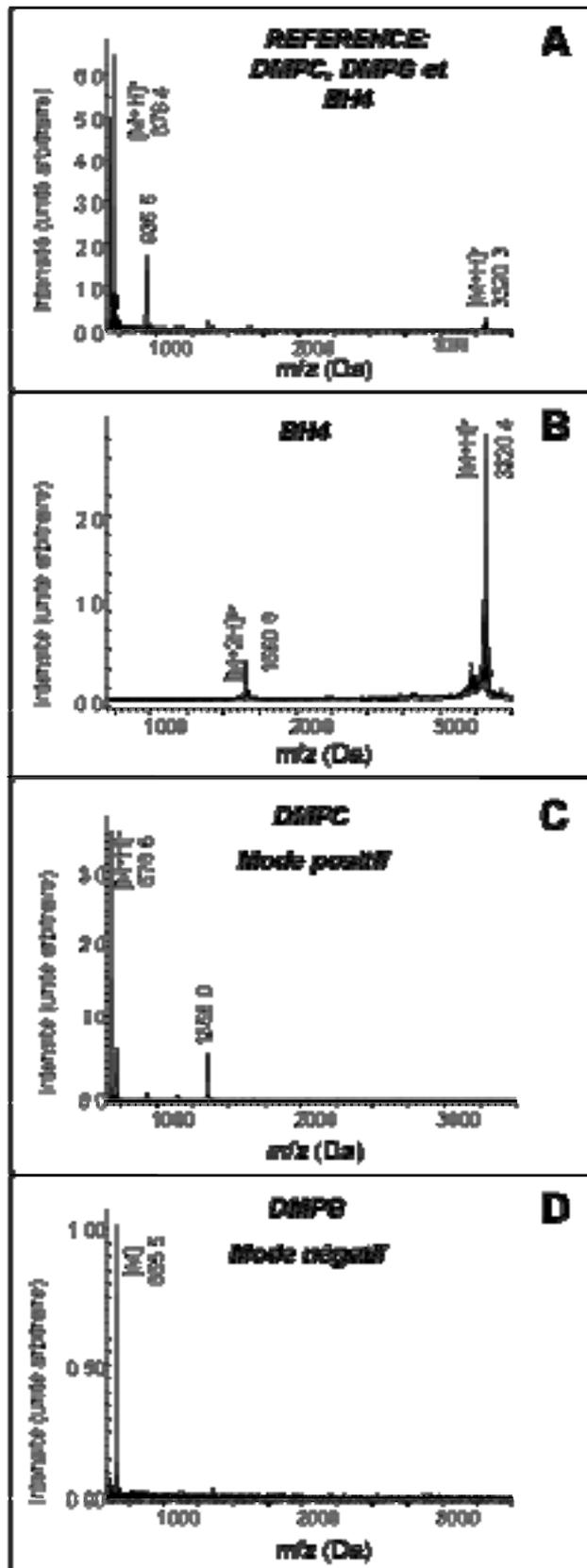


Figure 4 . Spectres de masse A) référence : DMPC, DMPG et BH4, B) BH4, C) le DMPC et D) le DMPG.

Comme précédemment, nous remarquons que le pic du peptide est beaucoup moins intense que les pics des lipides, le signal du peptide est négligeable par rapport à celui du lipide (phénomène de suppression spectrale). Dans les fractions collectées 6 et 7, c'est à dire de 50 à 60% de méthanol, on observe un pic à 3320.44 Da correspondant au peptide BH4 (Figure 4).

La fraction 11 correspondant à 100% de méthanol, montre un pic à 1356 Da représentant le dimère du DMPC et un pic à 678.3 Da correspondant au monomère DMPC. Le DMPC est un lipide anionique et l'analyse MALDI-ToF doit donc se faire en mode négatif. Dans la fraction 11 en mode négatif on observe un pic à 665.5 Da correspondant au monomère du DMPC. La séparation complète dure 22 minutes.

Avec ces conditions de solubilisation, le rendement de récupération du peptide est 68% et celui des lipides est de 59%. Il est à noter toutefois que les lipides DMPC et DMPC n'ont pas été séparés et donc l'analyse de leur pureté n'a pas été effectuée.

4.3. Peptide Cateslytine dans des liposomes de DMPC/DMPS

Cette séparation a été réalisée avec le même gradient que celui utilisé pour BH4, c'est-à-dire allant de 100% d'eau vers 100% de méthanol. La Figure 5 représente le gradient utilisé.

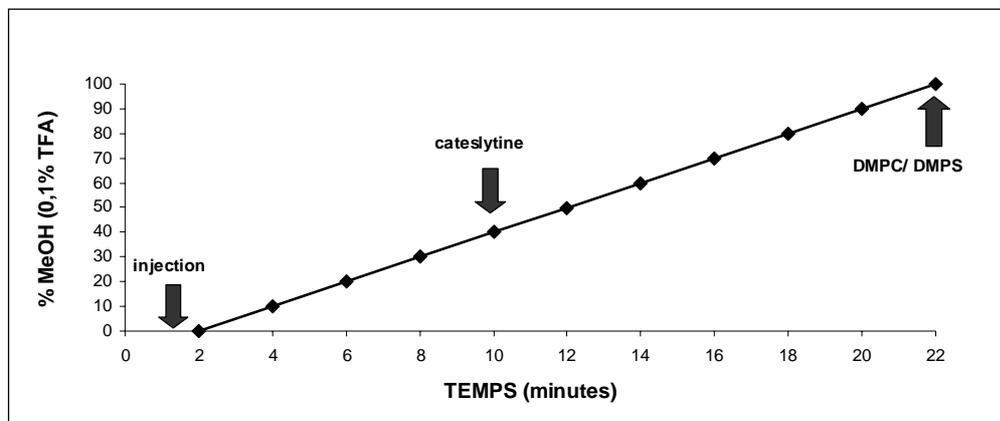


Figure 5. Schéma du gradient de séparation de la cateslytine des lipides (DMPC, DMPS). Le gradient s'effectue en une seule étape. Les points correspondent aux différentes étapes. Les flèches indiquent le temps d'éluion des espèces.

Les spectres de masse nous indiquent un pic à 1875.84 Da correspondant à la cateslytine dans les fractions 5 et 6, c'est-à-dire à 30%-40% de méthanol. Les lipides DMPS et DMPC sont élués à 100% de méthanol comme nous avons vu précédemment (spectres non montrés). Les spectres

sont similaires aux spectres de la Figure 4. Cette méthode a donné de bons rendements (68% pour le peptide et 61% pour les lipides) et a été très rapide (22 minutes).

4.4. Récapitulatif

Le tableau 1 résume les rendements de séparation pour les peptides et les lipides ainsi que la pureté des peptides obtenus par HPLC. Les quantités et les rendements ont été déterminés par une moyenne sur trois injections (les quantités peptidiques obtenues après une seule injection étant trop faibles, inférieures à 1mg, la mesure comprend alors trop d'incertitude).

	Quantité avant séparation (mg) (1)	Quantité après séparation (mg) (2)	Rendement de séparation (%) (3)	Degré de pureté (%) (4)
Neu*	1.7	1.3	76	95
Lipides: DCPC/DMPC	28.8	19.3	67	-
BH4	3.0	2.0	68	98
Lipides: DMPC/DMPG	27	15.9	59	-
cateslytine	2.2	1.5	68	96
Lipides: DMPC/DMPS	25	15.3	61	-

Tableau 1. Masses et rendements de la séparation. (1) masse de peptide avant la séparation ; (2) masse de peptide après séparation ; (3) rendement (masse de peptide ou lipide après/masse de peptide ou lipide avant*100) (4) degré de pureté contrôlé par HPLC. La pureté des lipides n'a pas été déterminée. Les mélanges lipides (DMPC/DMPG et DMPC/DMPS) n'ont pas été séparés.

Nous noterons que le rendement de séparation avec le peptide hydrophobe est nettement meilleur qu'avec les peptides amphiphiles. Nous discuterons ce résultat par la suite. Les degrés de pureté des peptides amphiphiles et hydrophobes sont excellents, (95%). Nous rappelons que les lipides DMPC/DMPG et DMPC/DMPS n'ont pas été séparés.

5. Discussion

Notre méthode nous a permis de récupérer des peptides insérés dans des membranes. Il est intéressant de noter que les rendements de récupération des peptides sont bons (entre 68 et 76%) et la pureté des peptides est toujours supérieure à 95%. Jusqu'à présent, aucune méthode n'avait été proposée pour réaliser des séparations de peptides insérés dans des membranes.

Nous allons dans un premier temps expliciter plus en détails la séparation avec le peptide hydrophobe et celles avec les peptides amphiphiles, nous verrons les différences des extractions (temps de séparation, gradient, éluant, rendement). Dans un second temps, nous allons discuter des différentes mises au point.

5.1. Séparation membrane-peptide hydrophobe

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, Neu*_{TM35} est un peptide hydrophobe qui est élué à un pourcentage important d'acétonitrile/isopropanol, même sur les supports greffés avec des chaînes courtes. Nous avons utilisé pour cette séparation une colonne greffée C2. Nos études HPLC ont montré que les lipides DCPC et DMPC sont élués avec du méthanol. La stratégie choisie pour cette séparation est très simple i) le peptide reste accroché sur la colonne quelles que soient les conditions de solubilisation et d'injection, ii) les lipides sont élués lors du gradient eau/méthanol et iii) le peptide est ensuite élué avec une solution d'acétonitrile/isopropanol. Trois essais ont été réalisés et ont tous donné le même résultat. Notre méthode de séparation pour le peptide Neu*_{TM35} a l'avantage d'être rapide (moins de 1 heure) et de donner de bons rendements pour le peptide et pour les lipides.

5.2. Séparation membrane-peptide amphiphile

BH4 et la cateslytine sont des peptides amphiphiles. La méthode de séparation doit donc être différente de celle de Neu*_{TM35}. Etant donné le caractère amphiphile des peptides, une colonne greffée C18 a été choisie pour les séparations. Plusieurs essais d'extraction ont été effectués avant d'optimiser le gradient. Malgré leurs faibles pourcentages d'hydrophobicité, ces séparations ont été plus difficiles que la précédente. Des essais de solubilisation ont été nécessaires avant de trouver le gradient de séparation idéal. Il a fallu trouver un compromis entre la quantité d'eau et d'acétonitrile. Avec trop d'acétonitrile, le peptide est élué immédiatement dans l'injection, avec trop d'eau, il y a un risque de reformation de phases lamellaires (ou autre). La meilleure solution de solubilisation est donc un mélange H₂O/ACN (75/25 v/v) contenant 0.1% TFA pour le peptide BH4 et 100% H₂O (0.1% TFA) pour le peptide cateslytine. L'analyse par spectrométrie de masse a confirmé l'accrochage des peptides sur la colonne avec cette solution de solubilisation.

Il est intéressant de noter qu'une expérience a été réalisée avec une colonne SepPak cationique échangeuse d'anions pour la séparation de BH4 des lipides DCPC/DMPC. BH4 possède 4 résidus acides (2 aspartiques et 2 glutamiques) et il est donc apte à s'accrocher sur la colonne à l'inverse des lipides zwitterioniques DCPC et DMPC. Le système a été solubilisé dans un tampon tris 100 mM. Lors du gradient nous avons augmenté la concentration en NaCl de 100 mM à 1000 mM. Nous avons analysé tous les échantillons en masse, malheureusement nous observons un signal seulement dans la fraction référence, dans les autres fractions rien n'est détectable. La présence des sels perturbe l'analyse. Un "lavage sur cible" a été effectué afin d'enlever partiellement ou complètement les sels, mais après cela nous n'observons toujours aucun signal. Plusieurs solutions s'offraient à nous pour le dessalage de l'échantillon, notamment à l'aide d'embouts de micropipettes « ziptip » (microcolonne de chromatographie, adsorption de l'échantillon puis désorption à l'aide de solvants organiques) mais cette méthode était un peu lourde à mettre en œuvre, et nous avons décidé d'abandonner cet essai.

Un test a été réalisé afin de déterminer la quantité maximale que l'on pouvait injecter sur une colonne SepPak. Cet essai a été effectué en injectant plus de 20 mg du système BH4/lipides. Après la séparation, l'analyse MALDI montre qu'une partie du système est élués dans l'injection, la colonne a donc été saturée ; les lipides et peptides n'ont pas pu tous s'accrocher sur la colonne. D'autres essais ont été effectués et nous avons montré que l'on pouvait injecter jusqu'à 12 mg de peptide/lipides sans surcharger la colonne.

La méthode d'extraction avec les peptides amphiphiles a été plus difficile à réaliser qu'avec le peptide hydrophobe. Les peptides amphiphiles sont élués rapidement, dans la 1^{ère} partie du gradient là où sont élués les lipides. Il a donc fallu optimiser le gradient pour ne pas éluer les lipides et le peptide en même temps. Notamment, la pente du gradient de séparation est plus faible que pour la séparation de peptides hydrophobes. Les rendements de cette méthode sont plus faibles que précédemment mais restent toutefois satisfaisants, nous avons 68% de récupération peptidique. En revanche, cette méthode est encore plus rapide que la précédente, il faut moins de 30 minutes pour extraire le peptide.

5.3. Généralisation des résultats

Nous pouvons résumer et généraliser nos résultats pour l'extraction des peptides en membrane dans l'optique d'appliquer notre méthode pour de nouveaux peptides. Avant de vouloir

extraire un peptide d'une membrane, il est important de connaître les propriétés d'élution du peptide et des lipides qui constituent la membrane. Si ces propriétés ne sont pas connues, il est recommandé d'essayer des gradients d'élution pour le peptide et les lipides séparément. Néanmoins, après nos expériences, plusieurs points nous ont paru importants.

Lors d'une séparation peptide hydrophobe/lipides, la méthode explicitée pour l'extraction de Neu*_{TM35} est la mieux adaptée. Il faut dans un premier temps éluer les lipides à l'aide d'un gradient eau/méthanol et dans un second temps éluer le peptide à l'aide d'un gradient eau/acétonitrile ou acétonitrile/isopropanol. Cette méthode est applicable pour tous les peptides hydrophobes insérés dans une membrane. La plupart des lipides sont élués entre 10 et 100% de méthanol, il n'y aura donc pas d'interférences dans la séparation.

Pour un peptide amphiphile, la méthode développée pour extraire BH4 et la cateslytine est appropriée. A l'inverse de la méthode ci-dessus, le peptide est élué en premier puis les lipides en second. Cette méthode est adéquate pour tous les peptides amphiphiles. Néanmoins, cette méthode ne sera pas adaptée pour tous les systèmes peptide/lipides. En effet, si notre système comprend du DCPC et un petit peptide amphiphile qui est élué à 20% de méthanol, les deux espèces seront donc éluées en même temps. Dans ce cas là, si le peptide est chargé et si les lipides sont zwitterioniques, il est donc judicieux d'utiliser une colonne SepPak échangeuse d'ions. Les espèces non chargées (les lipides) seront éluées instantanément, quant au peptide, il restera accroché sur la colonne et sera par la suite élué avec un gradient approprié. Toutefois, il est à noter qu'un dessalage des échantillons est fortement recommandé afin d'observer un signal lors de l'analyse par spectrométrie de masse.

Nos travaux ont été réalisés avec quatre lipides : DCPC, DMPC, DMPG et DMPS. Lors de toutes ces études, nous remarquons que le DCPC, lipide à chaîne courte, est élué en début de gradient (0%-20% de méthanol) et que les lipides à longues chaînes (C14) DMPC, DMPG et DMPS sont élués à 100% de méthanol. Ces lipides gardent les mêmes propriétés de séparation malgré leurs différences au niveau de la tête polaire (choline sérine, ou glycérol respectivement).

6. Conclusion et Perspectives

Après optimisation des conditions de séparation, les peptides ont été récupérés avec des rendements acceptables. Le développement de ces méthodes et leur optimisation nous permet de

renouveler ces extractions de manière quasi-routinière, aussi bien pour les peptides hydrophobes que pour les peptides amphiphiles.

La méthode d'extraction SepPak fonctionne bien, donne de bons rendements (environ 70% pour les peptides et 60% pour les lipides) et est rapide (la séparation la plus longue dure 32 minutes). Il existe plusieurs types de SepPak (C2, C18, échange d'ions, phase normale) et elles peuvent donc être adaptées à plusieurs types de systèmes (peptides hydrophobes, hydrophiles ou chargés, lipides zwitterioniques ou chargés, différentes longueurs de chaînes aliphatiques). Cependant, pour chaque nouveau système, il est souhaitable d'adapter le gradient de séparation à partir de nos propositions en fonction des propriétés des peptides et des lipides afin de trouver les meilleures conditions de séparation.

Un des avantages des colonnes SepPak est qu'elles sont jetables et donc utilisables une seule fois. Nous pouvons donc utiliser des systèmes de solvants extrêmes (très acides par exemple) dans le but de purifier des peptides. Par exemple, nous pouvons envisager de purifier des peptides très hydrophobes avec comme solvant d'élution 60% d'acide formique dans de l'eau. Ces systèmes de solvants ont déjà été utilisés (Whitelegge *et al.*, 1998), mais ce pourcentage d'acide est beaucoup trop élevé pour les colonnes "classiques".

Notre méthode de séparation des peptides des lipides est très intéressante pour les études d'échange isotopique hydrogène/deutérium couplé à la spectrométrie de masse afin de déterminer la structure de peptides. Cette technique est utilisée pour l'analyse de nombreux peptides qui sont difficiles à étudier par d'autres méthodes. Ces études sont possibles lorsqu'il y a au moins 1 peptide pour 40 lipides, dans le cas contraire, les résultats ne sont pas exploitables, le signal du peptide sera alors négligeable par rapport à celui du lipide (Demmers *et al.*, 2000). Une séparation du peptide des lipides par la méthode SepPak est donc un réel avantage pour ces études. En outre, notre méthode de séparation est rapide et pourra ainsi mieux préserver l'échange. Plus la méthode de séparation est longue, plus l'échange inverse risque de se produire et plus l'analyse risque d'être perturbée (Nazabal *et al.*, 2003).

BIBLIOGRAPHIE

- Avalli A, Contarini G. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *J Chromatogr A*. 2005; **1071**:185-190.
- Demmers JAA, Haverkamp J, Heck AJR, Koeppe RE, Killian JA. Electrospray ionization mass spectrometry as a tool to analyze hydrogen/deuterium exchange kinetics of transmembrane peptides in lipid bilayers. *PNAS*. 2000; **97**: 3189-3194.
- Morales JM, Jung CH, Alarcon A, Barreda A. Solid-phase extraction and liquid chromatographic quantitation of quinfamide in biological samples. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000; **746**: 133-139.
- Morisaki N, Masaoka M, Shirai R, Hashimoto Y. Separation of phosphatidylinositol 4-phosphate from a mixture with phosphatidylserine and phosphatidylinositol by Sep-Pak C18 cartridge. *Biol Pharm Bull.* 2000; **23**:1088-1089.
- Nazabal A, Laguerre M, Schmitter JM, Vaillier J, Chaignepain S, Velours J. Hydrogen/deuterium exchange on yeast ATPase supramolecular protein complex analyzed at high sensitivity by MALDI mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003; **14**: 471-481.
- Razafindralambo H, Paquot M, Hbid C, Jacques P, Destain J, Thonart P. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr. A*. 1993; **639**: 81-85.
- Todorov SD, Dicks LM. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2004; **31**: 323-329.
- Williams BH, Hathout Y, Fenselau C. Structural characterization of lipopeptide biomarkers isolated from *Bacillus globigii*. *J. Mass. Spec.* 2002; **37**: 259-264.
- Whitelegge JP, Gundersen CB, Faull FK. Electrospray-ionization mass spectrometry of intact intrinsic membrane proteins. *Protein Science*. 1998; **7**: 1423-1430.
- Zornes LL, Stratford RE. Development of a plasma high-performance liquid chromatographic assay for LY303366, a lipopeptide antifungal agent, and its application in a dog pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1997; **695**: 381-387.

Chapitre 5

A la recherche de l'hélice π

Deux questions se sont posées à nous. Dans un premier temps, nous avons cherché un standard de l'hélice π afin d'établir un spectre de référence et l'ajouter à notre banque de spectres. Dans un second temps, nous souhaitons comprendre le rôle de l'hélice π , présente dans le domaine transmembranaire du récepteur à tyrosine kinase et ceci dans le but de mieux appréhender les mécanismes de dimérisation et d'activation du récepteur.

Le dichroïsme circulaire est une technique spectroscopique facile à mettre en œuvre et très rapide. Plusieurs programmes de déconvolution existent et permettent de nous donner des informations quant à la structure secondaire des peptides (feuillet β , hélice α , hélice de type II, pelote statistique, ou un mélange de ces différentes structures). Notre programme se base sur les spectres DC de peptides standard possédant des structures secondaires définies. Le pourcentage de structure secondaire est obtenu en déconvoluant le spectre DC du peptide. A l'heure actuelle, nous possédons les standards suivants : hélice α , feuillets β , hélice de type II et pelote statistique. Jusqu'à présent l'hélice π a été observée dans des protéines globulaires par cristallographie (Hasemann *et al.*, 1995 ; Vainhstein *et al.*, 1986) et dans des peptides transmembranaires, dont le peptide Neu_{TM35} en solvant organique et en micelles par RMN (Goetz *et al.*, 2001 ; Houliston *et al.*, 2004). Cette hélice a été observée sur quelques résidus seulement et jusqu'à maintenant aucun peptide connu n'adopte complètement une structuration en hélice π . Il n'existe par conséquent aucun standard pour cette structure, nous allons donc chercher un peptide stable en hélice π . Les synthèses peptidiques sont difficiles à réaliser, notamment avec les peptides hydrophobes, nous avons donc choisi d'utiliser la modélisation moléculaire pour optimiser le choix du peptide représentatif de l'hélice π . La stratégie mise en place a donc été de modéliser dans un premier temps les peptides modèles, puis de synthétiser les peptides les plus adaptés à notre étude et enfin d'entreprendre l'analyse structurale par dichroïsme circulaire. La RMN a montré que le peptide

Neu_{TM35} possédait 17% d'hélice π (Goetz *et al.*, 2001). Cette hélice π est observée dans la séquence entre les résidus 22 et 28 (Ile²²-Gly²⁸), soit Ile-Leu-Val-Val-Val-Val-Gly. Comme nous pouvons le constater, cette séquence est riche en résidus hydrophobes, plus particulièrement en valine. Nous avons par conséquent choisi comme peptide modèle des peptides riches en résidus valine, puis des peptides contenant des résidus hydrophobes, autre que la valine (leucine, isoleucine et alanine) et enfin des peptides possédant deux résidus hydrophobes différents (leucine et valine ou isoleucine et valine). Castano *et al.* ont montré que les peptides L_iK_j ($i=2j$) se structurent en hélice α lorsque $i+j > 15$ résidus (Castano *et al.*, 1999). Nous avons décidé de travailler avec deux familles de peptides, les petits (possédant moins de 15 résidus) et les grands (possédant plus de 15 résidus). Notre étude a donc été menée en parallèle avec les petits peptides et les grands peptides en solvants implicites et explicites et ceci dans le but de trouver un standard en hélice π . Les expériences de DC sont réalisées dans l'eau et dans le TFE, nous avons par conséquent voulu nous rapprocher de ces conditions pour réaliser nos calculs. Le modèle de solvatation du TFE n'est pas disponible avec le champ de force utilisé dans le logiciel InsightII, ni avec celui de MacroModel. Il est à noter que l'octanol et le TFE ont une constante diélectrique très proche ($\epsilon_{TFE}=26$, $\epsilon_{octanol}=25$). Les solvants implicites disponibles sur MacroModel au moment où nous avons effectués les dynamiques sont l'eau et le chloroforme (depuis, l'octanol a été ajouté dans la dernière version du logiciel). Les simulations en solvant implicite ont été réalisées dans l'eau et dans le chloroforme. Les solvants explicites utilisés ont été l'eau, l'octanol et un système eau/chloroforme/eau. Le système eau/octanol/eau est techniquement très difficile à réaliser c'est pour cela que nous avons travaillé avec le système eau/chloroforme/eau.

Dans un second temps, nous voulions comprendre le rôle de l'hélice π dans les processus d'activation et de dimérisation du récepteur Neu/ErbB2. Nous avons vu que le domaine transmembranaire contribuait à la dimérisation des récepteurs et jouait un rôle plus important qu'un simple lien entre les domaines extra- et intra-cellulaires. L'hélice transmembranaire ne reste donc pas passive lors de la dimérisation. Au Laboratoire, les études de RMN ont montré que le peptide transmembranaire, Neu_{TM35}, se structure majoritairement en hélice α mais 17% sont en hélice π (Goetz *et al.*, 2001). Des travaux de modélisation moléculaire ont pu montrer la présence de cette hélice π dans le vide et dans différents environnements membranaires composés de DMPC

et POPC (Sajot et Genest, 2001 ; Garnier *et al.*, 2003 ; Aller *et al.*, 2005). On s'est donc posé la question du rôle de l'hélice π dans le phénomène de dimérisation. Cette hélice π serait-elle un réservoir d'élasticité dans les membranes et faciliterait-elle le réarrangement structural des monomères ? Est-ce que l'hélice s'adapte à la membrane ou est-ce que la membrane s'adapte au peptide ? Afin de répondre à ces questions, nous avons modélisé la dynamique du peptide K₂V₃₂K₂ dans une bicouche de DMPC à volume constant puis à pression constante afin d'observer le comportement du peptide et de la membrane.

1. Introduction

1.1. Qu'est ce que l'hélice π ?

La structure secondaire rend compte de l'organisation de groupes d'acides aminés en éléments structuraux simples : l'hélice α et le feuillet β , l'hélice 3_{10} , l'hélice de type I et II et l'hélice π (cf. Chapitre 2). Ces structures secondaires sont maintenues par des liaisons hydrogène entre les groupes -NH et C=O des liaisons peptidiques.

Une chaîne polypeptidique a deux types de liberté de rotation qui lui permettent d'adopter les conformations qui caractérisent sa structure secondaire (Figure 1) :

- la liberté de rotation d'un angle Φ autour de la liaison unissant le carbone α à l'azote amidique (liaison C α -N),
- la liberté de rotation d'un angle Ψ autour de la liaison unissant ce même carbone α au carbone du groupe carbonyle CO (liaison C α -C).

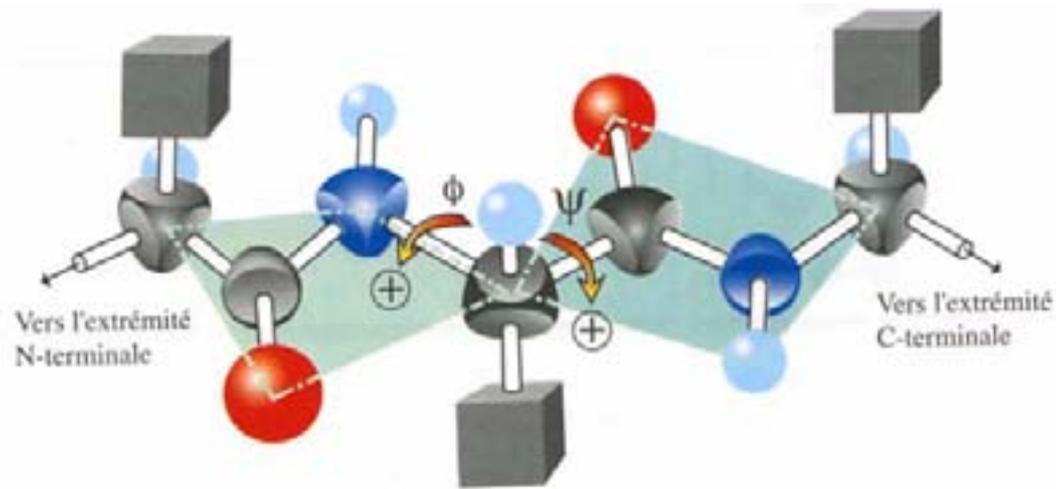


Figure 1 . Figure représentant les angles de rotation Ψ et Φ au sein d'une chaîne polypeptidique. Seuls sont possibles les mouvements de rotation Φ autour de la simple liaison $C\alpha-N$ et Ψ autour de la simple liaison $C\alpha-C$. R_1 , R_2 et R_3 représentent les chaînes latérales des acides aminés. Les deux angles ont la valeur de $+180^\circ$ (ou de -180°) lorsque les deux unités peptidiques sont coplanaires. Les couples $\Psi=180^\circ$ et $\Phi=0^\circ$, et $\Psi=0^\circ$ et $\Phi=180^\circ$ sont impossibles en raison du recouvrement maximal des rayons de van der Waals des atomes d'oxygène et des atomes d'hydrogènes.

Le tableau 1 donne les valeurs des angles Ψ et Φ de certaines des conformations régulières (hélice α , hélice 3_{10} , hélice π , hélice de type I et de type II). Selon une convention internationale, les rotations mesurées par Ψ et Φ sont positives lorsqu'elles sont vues dans le sens des aiguilles d'une montre à partir du carbone α . Les deux angles ont la valeur de $+180^\circ$ lorsque la chaîne est totalement étirée, ce qui est le cas pour des unités peptidiques coplanaires.

conformation	angles Φ (degrés)	angles Ψ (degrés)	résidus/tour	translation/résidu (Å)
Hélice α (droite)	-57	-47	3.6	1.50
Hélice 3_{10} (droite)	-49	-26	3.0	2.00
Hélice π (droite)	-57	-70	4.4	1.15
Hélice de type II	-78	+149	3.0	3.12
Hélice de type I	-83	+158	3.3	1.90

Tableau 1. Valeurs théoriques des paramètres des conformations régulières des chaînes polypeptidiques (d'après Weinman et Méhul, Biochimie, Dunod Edition, 2000).

- Hélice α

L'hélice α a 3.6 résidus par tour et la distance séparant chaque tour de l'hélice est de 5.41 Å, ce qui signifie que l'hélice α a un acide aminé tous les 1.50 Å (5.41/3.6), on dit que l'hélice α a une translation de 1.50 Å par résidu. Cette structure permet l'établissement d'une liaison hydrogène, d'une longueur moyenne de 2.86 Å, entre l'oxygène d'un résidu i et l'hydrogène du quatrième résidu qui lui fait suite dans la chaîne ($i, i+4$) en direction de l'extrémité C-ter. Il y a 13 atomes dans un cycle fermé par une liaison hydrogène. En raison de son pas de 3.6 résidus et des 13 atomes de la boucle fermée par une liaison hydrogène, l'hélice α est aussi appelé hélice 3.6₁₃. Les atomes sont bien compactés, ce qui est favorable aux interactions de van der Waals. Le centre de l'hélice est "vide", mais avec un diamètre très faible, lequel est insuffisant pour laisser la place à un ion. Les chaînes latérales des résidus amino-acide se projettent vers l'extérieur, et bien qu'elles soient légèrement inclinées vers l'extrémité N-terminale, elles n'interfèrent pas avec l'hélice elle-même, sauf celle de la proline dont le dernier carbone est lié à l'azote imidique (Figure 2).

- Hélice 3₁₀

L'hélice 3₁₀ a 3 résidus par tour et une translation de 2.00 Å par résidu, soit une translation de 6.00 Å par tour. Cette structure permet l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'oxygène d'un résidu i et l'hydrogène du troisième résidu qui lui fait suite dans la chaîne ($i, i+3$) en direction de l'extrémité C-ter. Il y a 10 atomes dans un cycle fermé par une liaison hydrogène. Elle est observée dans certaines protéines globulaires. Elle ne contient que quelques résidus et elle est souvent le dernier tour de l'extrémité C-ter d'une hélice α . Son compactage moléculaire est particulièrement dense (Figure 2).

- Hélice de type I et de type II

Le résidu proline induit une contrainte stérique importante due à la cyclisation de la chaîne latérale sur la fonction amine. Les polyprolines sont donc incapable de prendre une structure secondaire classique (hélice α , feuillet β , pelote statistique) due aux contraintes conformationnelles imposées par ses chaînes latérales pyrrolidine cyclique. Cette nature cyclique lui confère la particularité d'adopter les configurations cis ou trans. Il existe donc deux types d'hélice, les hélices de type II ou de type I.

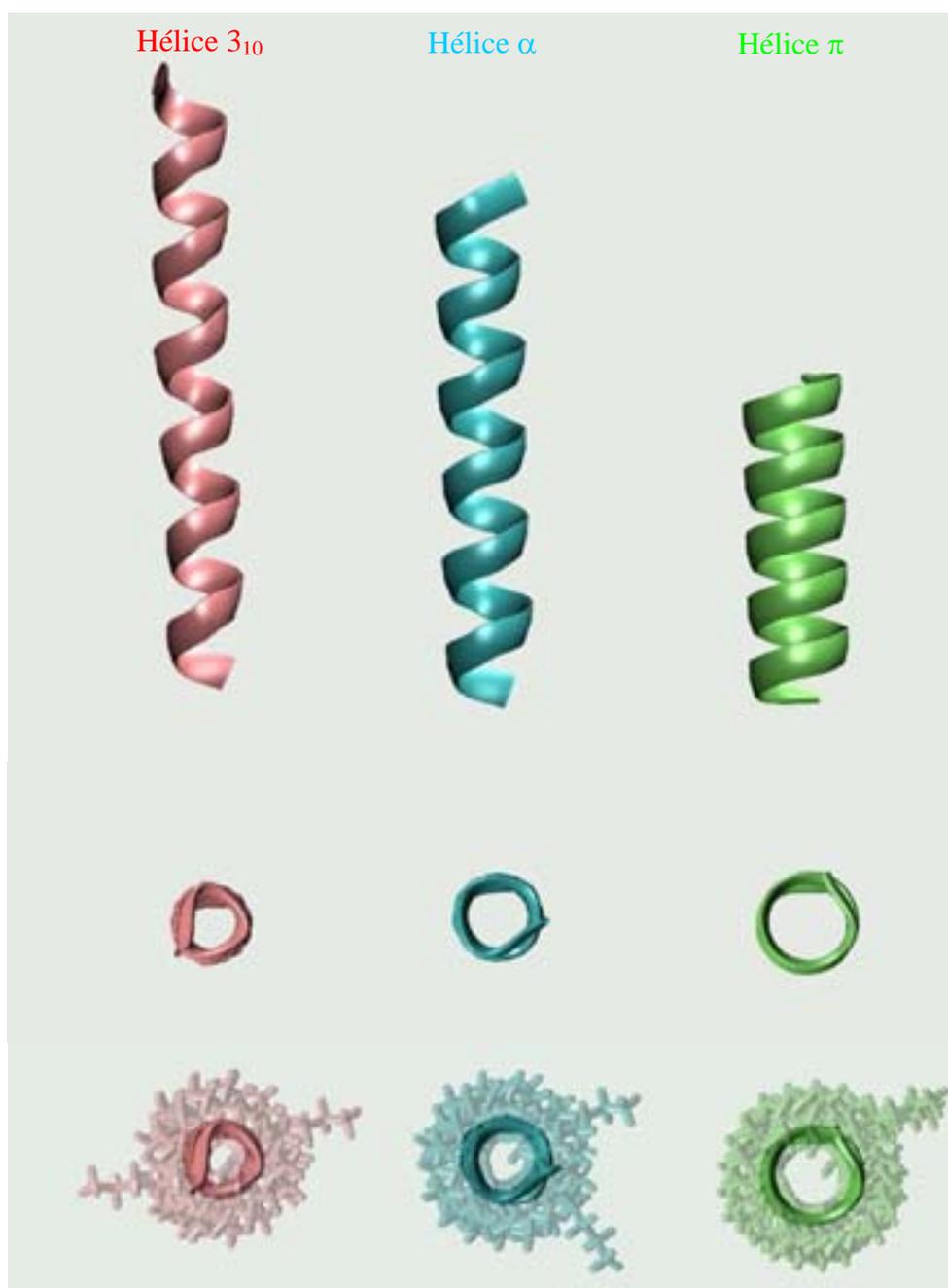


Figure 2 . Dessin représentant les différentes hélices. De gauche à droite, l'hélice 3_{10} , l'hélice α et l'hélice π . En haut une représentation en ruban vu de profil, au milieu une représentation en ruban vu de haut et en bas une représentation en licorice (CPK amélioré). La construction a été réalisée avec l'interface Maestro (logiciel Schrödinger) et la production grâce au logiciel VMD (visual molecular design). Ce logiciel a été développé et est rendu disponible pour l'usage public grâce au National Institutes of Health.

Les liaisons peptidiques des hélices de type I sont toutes cis alors que pour les hélices de type II, les liaisons sont trans. La forme de l'hélice adoptée dépend de la nature du solvant : la formation de l'hélice de type I est favorisée dans un milieu apolaire alors que la formation d'hélice de type II est favorisée dans un milieu polaire (Rabanal *et al.*, 1993). L'hélice de type I forme une hélice droite avec 3.3 résidus par tour, l'hélice de type II est une hélice gauche avec 3 résidus par tour.

- Hélice π

L'hélice π a 4.4 résidus par tour et une translation de 1.15 Å par résidu, soit une translation de 5.06 Å par tour. Cette structure permet l'établissement d'une liaison hydrogène entre l'oxygène d'un résidu i et l'hydrogène du cinquième résidu qui lui fait suite dans la chaîne ($i, i+5$) en direction de l'extrémité C-ter. Il y a 16 atomes dans un cycle fermé par une liaison hydrogène. En raison de son pas de 4.4 résidus et des 16 atomes de la boucle fermée par une liaison hydrogène, l'hélice π est aussi appelé hélice 4.4₁₆. Cette hélice a été très peu observée dans les protéines par cristallographie. Elle est beaucoup moins compacte et possède une cavité au centre de 1 Å de diamètre (Figure 2).

- Hélice π (L,D)

L'hélice du peptide gramicidine A est communément appelée hélice π , mais cette hélice possède en fait 5.6 ou 6.4 résidus par tour et non pas 4.4 comme nous venons de le voir précédemment. Ce peptide forme en fait une hélice droite (tête-tête ou tête-bêche) très aplatie dans la membrane dont la longueur est à peu près la moitié d'une épaisseur de bicouche. Cette forme très particulière d'hélice par rapport à celles que l'on observe habituellement est due à une séquence où sont alternés les acides aminés L et D. Les hélices de la gramicidine possèdent entre 5.6 et 6.4 résidus par tour, cette différence est due à l'absence ou la présence de cations, tels que le césium ou le potassium. Il est maintenant bien connu que la double hélice de la gramicidine forme des canaux ioniques spécifiques au transport de cations monovalents au travers des membranes (Urry, 1971 ; Burkhart *et al.*, 1998 ; 1999)

1.2. Données Structurales sur les hélices

Les hélices α et 3_{10} sont bien connues. En cristallographie, on a déterminé qu'environ 31% des hélices sont des hélices de type α , alors que seulement 5% sont de type 3_{10} . (Creighton, 1993 ; Barlow et Thornton, 1998 ; Baker et Hubbard, 1998).

La présence de l'hélice π dans les protéines semble être tout à fait rare. Plusieurs raisons du manque apparent de stabilité de l'hélice π ont été proposées : les angles dièdres du squelette sont moins favorables en hélice π qu'avec l'hélice α (Low et Grenville-wells, 1953 ; Ramachandran et Sasisekharan, 1968) et l'existence d'une cavité de 1 Å de diamètre au centre de l'hélice π , qui est suffisamment large pour causer la perte des interactions de van der Waals mais pas assez gros pour capter une molécule d'eau (Low et Baybutt, 1952). Musso *et al.* ont prouvé que les peptides dans un environnement hydrophobe, tel que vésicules ou membranes lipidiques, pouvaient former des hélices π stables (Musso *et al.*, 1998). Kaiser et Kézdy ont proposé que les hélices π amphipathiques puissent être stabilisés dans une interface, par exemple lipide/eau ou air/eau (Kaiser et Kézdy, 1983).

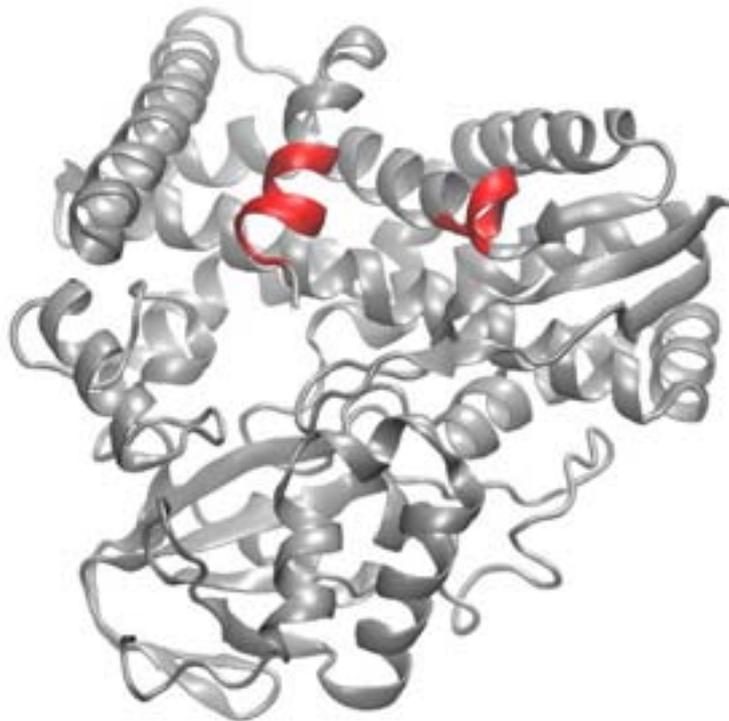


Figure 3. Structure du cytochrome P450. En gris sont représentés les hélice α , les feuillets β , les coudes et les pelotes statistiques et en rouge les 2 hélices π (Haseman *et al.*, 1995) Code PDB : 1CPT.

L'hélice π a été observée dans des protéines hydrophiles, notamment dans le cytochrome P450 (Hasemann *et al.*, 1995, Figure 3), la catalase (Vainshtein *et al.*, 1986) et la fumarase (Weaver et Banaszak, 1996). Dans le cytochrome P450 apparaissent deux hélices π de courtes séquences, la 1^{ère} hélice possède 5 résidus (séquence : MTDCA) et la 2^{ème} possède 7 résidus (séquence : KLTQDFE). La résolution de la catalase est de 2.0 Å mais a été réalisé sans les chaînes latérales. Dans la fumarase, l'hélice π contient 6 résidus (séquence : PNDDVN) avec des résolutions variant entre 2.0 et 2.3 Å.

De plus l'hélice π a été plusieurs fois observée par RMN en solvant organique (TFE) et en micelles (SDS et DPC) dans la partie transmembranaire du peptide Neu (Goetz *et al.*, 2001; Houliston *et al.*, 2004). Cette hélice de 2 tours est observable dans la séquence : ILVVVVG (Figure 4). Cette même hélice π a été observé par modélisation moléculaire dans le vide et dans différents environnements membranaires composé de DMPC et POPC (Sajot et Genest, 2001 ; Garnier *et al.*, 2003 ; Aller *et al.*, 2005).

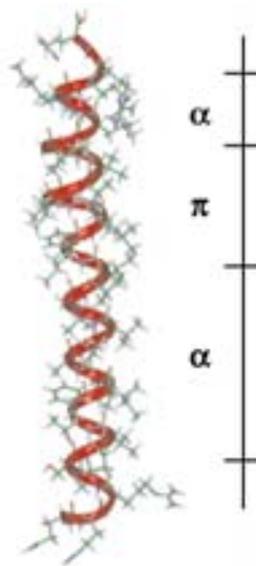


Figure 4. Structure de l'hélice transmembranaire du récepteur à tyrosine kinase ErbB2 dans le TFE. Les différentes hélices sont spécifiées. (d'après Goetz *et al.*, 2001).

La présence de l'hélice π a été trouvée dans plusieurs simulations de dynamique moléculaire mais en général le pourcentage d'hélice π dans ces modèles n'excédait pas 30% (Shirley et Brooks, 1997 ; Armen *et al.*, 2003).

1.3. Vers un nouveau standard de DC : stratégie mise en place

Comme nous l'avons vu le dichroïsme circulaire donne rapidement des informations sur la structure secondaire des protéines (cf. Chapitre 2). A l'heure actuelle, nous possédons les standards suivants : hélice α , feuillets β , hélice de type II et pelote statistique. Il n'existe pas encore de standard pour l'hélice π . Nous allons donc chercher un peptide stable en hélice π afin d'établir un spectre de référence et l'ajouter à notre banque de spectres de références.

A partir des données RMN (Goetz *et al.*, 2001), nous pouvons estimer le spectre dichroïque de l'hélice π . Avec les spectres de référence des structures secondaires, on calcule le spectre dichroïque d'un peptide structuré à 74% en hélice α et 9% en structure désordonnée. Par différence entre le spectre expérimental de Neu_{TM35} et le spectre précédemment calculé, on obtient la contribution du spectre de l'hélice de type π (Figure 5).

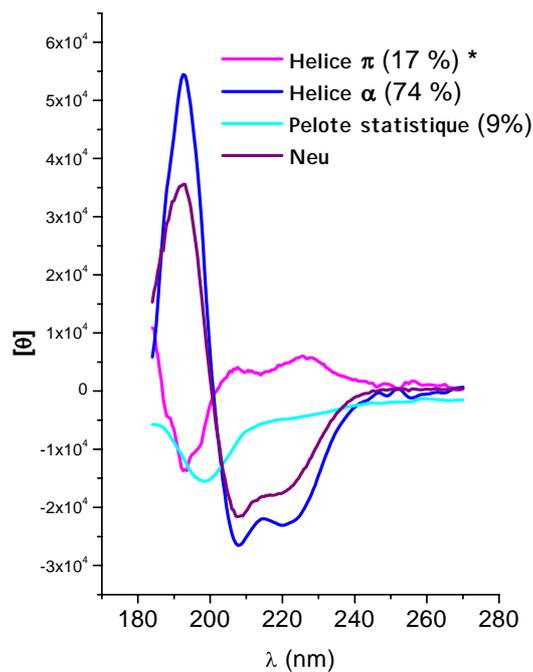


Figure 5. Déconvolution du spectre dichroïque de Neu dans le TFE. Les fractions relatives des structures secondaires de base et la forme du spectre dichroïque de l'hélice π (en mauve) sont indiquées. * avec les spectres de référence des structures secondaires, nous avons calculé le spectre dichroïque d'un peptide structuré à 74% en hélice α et 9% en structure désordonnée. Par différence entre le spectre expérimental de Neu_{TM35} et le spectre précédemment calculé, on obtient le spectre de l'hélice π .

Le spectre de l'hélice π ainsi déterminé est caractérisé par un minimum qui est proche, en fréquence et en intensité, de celui de la pelote statistique ($\lambda = 193$ nm). Il présente également deux maxima de faible intensité pour les longueurs d'onde $\lambda = 207$ nm et $\lambda = 226$ nm. Néanmoins, cette méthode trop imprécise ne nous convient pas et nous n'avons pas ajouté ce spectre à notre banque de données des spectres dichroïques de référence pour le programme de déconvolution. En revanche, grâce aux données de RMN et aux calculs de déconvolution, nous avons une idée générale de l'allure du spectre dichroïque de l'hélice π . Afin d'obtenir le spectre théorique, nous avons cherché un peptide qui se structurerait en hélice π . Nous avons vu au chapitre 3 que la synthèse peptidique était particulièrement difficile et fastidieuse pour les peptides hydrophobes. Notre stratégie a donc été de modéliser des peptides, puis d'entreprendre la synthèse peptidique pour nos peptides les plus adaptés à notre étude et enfin de réaliser l'analyse structurale de l'hélice par dichroïsme circulaire et éventuellement par RMN. Comme nous l'avons vu maintes fois, l'hélice π est présente dans le peptide Neu dans une séquence riche en valine : ILVVVVG.

Nous avons décidé d'étudier deux familles de peptides, les petits contenant moins de 15 résidus et les grands possédant plus de 15 résidus. Comme nous l'avons déjà dit, les peptides de moins de 15 résidus ne se structuraient en principe pas en hélice (Castano *et al.*, 1999). Nous avons choisi de mener notre étude en parallèle avec des petits peptides pour vérifier cette hypothèse et avec des grands peptides dans le but de trouver un standard en hélice π . La partie 2 de ce chapitre est donc consacré aux résultats et à la discussion de modélisation moléculaire en solvant implicite et explicite. Après avoir effectué tous ces calculs, nous avons dressé un bilan sur l'évolution des hélices des peptides, afin de déterminer un ou des peptide(s) modèle(s) à synthétiser et à analyser par DC et RMN.

1.4. Hélice π : réservoir d'élasticité lors de l'activation des récepteurs à tyrosine kinase ?

Afin de tester l'hypothèse de flexibilité et/ou d'adaptabilité d'une hélice nous avons essayé de voir si un peptide pouvait s'adapter à une épaisseur de membrane donnée. Ceci dans le but de mieux comprendre le mécanisme de dimérisation/activation des récepteurs à tyrosine kinase. L'activation des récepteurs à tyrosine kinase passe par le mécanisme crucial de la dimérisation des récepteurs. En effet la dimérisation (ou l'oligomérisation), stabilisée par la fixation de ligand, est le

mécanisme déclencheur de l'autophosphorylation des tyrosines (Ullrich et Schlessinger, 1990, Heldin, 1995). En outre, Schlessinger a émis l'hypothèse de l'existence de dimères (inactifs) même en l'absence de fixation de ligand (Schlessinger, 2000). Cette hypothèse conduit à l'existence de différents états d'équilibre entre dimères actifs et dimères inactifs. La fixation du ligand stabiliserait la formation du dimère actif. Les dimères seraient donc présents dans la membrane et déclencheraient l'autophosphorylation par changement d'orientation ou de configuration. Le domaine transmembranaire contribuerait à la dimérisation des récepteurs et jouerait un rôle plus important qu'un simple lien entre les domaines extracellulaires et intracellulaires. Nous avons voulu savoir si un peptide transmembranaire hydrophobe était capable de changer d'orientation ou de conformation pour s'adapter à une membrane.

Dans le chapitre 1 nous avons vu que lorsque nous insérons un peptide dans une membrane dont la longueur hydrophobe est plus courte, plusieurs possibilités étaient envisageables (Figure 6) (De Planque et Killian, 2003) : a) la membrane s'adapte au peptide, et nous observons alors un étirement important des chaînes acétylées des lipides, b) le peptide peut s'adapter à la membrane. En effet, un peptide en hélice α est capable de réduire sa longueur hydrophobe en préférant une conformation possédant une partie hélicoïdale plus large, comme dans le cas de l'hélice de type π , c) le peptide est incliné ("tilt").

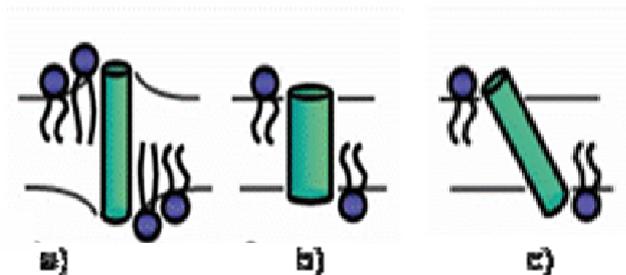


Figure 6 . Représentation schématique de l'adaptation possible entre un peptide transmembranaire et une bicouche lipidique lorsque le peptide est plus long que la longueur hydrophobe de la membrane, a) la membrane s'adapte et les chaînes acétyles s'ordonnent, b) le peptide s'adapte, il y a une déformation du squelette peptidique, c) le peptide est "tilté".

Nous avons donc testé l'hypothèse de flexibilité et/ou d'adaptabilité de l'hélice $K_2V_{32}K_2$ dans une bicouche de DMPC par simulation moléculaire à volume constant dans un premier temps et à pression constante dans un deuxième temps. Nous avons essayé de voir si ce peptide de

longueur hydrophobe L pouvait s'adapter à une épaisseur hydrophobe L' de la membrane de DMPC. Pour cela, nous avons incorporé le peptide $K_2V_{32}K_2$ dans une bicouche de DMPC. Ce peptide est en hélice α au début de la dynamique et nous voulions voir si une transition $\alpha \rightarrow \pi$ était observable. Est-ce que le peptide a la fonction d'un ressort et est capable de changer de configuration et de s'adapter à l'épaisseur de la bicouche ou est-ce que la membrane est capable de s'adapter au peptide? Nous avons effectué plusieurs calculs pour observer l'éventuelle flexibilité de l'hélice et ceci afin de mieux comprendre le mécanisme de dimérisation/activation des récepteurs à tyrosine kinase. Dans la partie 3 de ce chapitre se trouvent les résultats et la discussion des modélisations réalisées en membrane.

2. Vers un standard de l'hélice π

2.1. Stratégie

Comme nous l'avons vu précédemment, les expériences de dichroïsme circulaire ont été effectuées dans l'eau et dans le TFE, nous avons essayé dans la mesure du possible de nous rapprocher de ces conditions. Les simulations en solvants implicites ont été réalisées dans l'eau et le chloroforme. De plus, nous avons choisi l'eau et le système eau/chloroforme/eau pour nos calculs en solvant explicite.

Comme nous avons vu dans l'introduction, nous avons décidé de travailler avec deux familles de peptides, les petits (possédant 14 résidus) et les grands (possédant plus de 20 résidus).

Nous avons choisi comme modèle de peptide dans un premier temps un peptide de 14 résidus et ne possédant que des résidus valines ($KV_{12}K$). Ce peptide a été modélisé en solvant implicite (eau et chloroforme) et en solvant explicite (eau et octanol). Dans un second temps, nous avons choisi des peptides possédant plus de 20 résidus afin d'être sûr que ces peptides soient stables en structure hélicoïdale. De plus nous avons choisi comme résidu, la valine et d'autres résidus hydrophobes (leucine, isoleucine et alanine). En effet, nous avons vu que les interactions entre les chaînes latérales hydrophobes pourraient contribuer à la formation de l'hélice π . Nous avons donc choisi tout d'abord le résidu alanine ($KA_{20}K$), le moins hydrophobe et le moins encombré stériquement. Puis nous avons étudié une polyisoleucine ($KI_{20}K$), en effet le résidu isoleucine est le plus hydrophobe (Hessa *et al.*, 2005) et est très encombré, ensuite nous avons

choisi une polyleucine (KL₂₀K), un peu moins hydrophobe que l'isoleucine et avec un encombrement stérique plus faible et enfin une polyvaline (KV₂₀K), qui possède un encombrement stérique très important près du noyau peptidique. Dans un troisième temps, nous avons choisi des peptides de plus de 20 résidus possédant plus de 2 résidus hydrophobes avec des motifs différents. En effet, dans Neu_{TM35} l'hélice π est présente sur la séquence ILVVVVG. Nous avons choisi comme modèle des peptides contenant des résidus valine et isoleucine ou valine et leucine, ceci afin de diminuer l'encombrement stérique du à la compacité de l'hélice π , en effet le CH₂ de la leucine est plus loin du squelette peptidique que le CH de l'isoleucine. Pour le premier système, nous avons choisi deux peptides K₂L₅V₁₆K₂ et K₂L₁₀V₁₀K₂ avec comme motif respectif IVVVVI et IVIVIV. Pour le second système nous avons choisi deux peptides K₂L₅V₁₆K₂ et K₂L₁₀V₁₀K₂ avec comme motif respectif LVVVVL et LVLVLV. Une lysine a été ajoutée de part et d'autre des peptides dans l'optique d'une éventuelle synthèse afin de diminuer l'hydrophobicité du peptide. Pour tous les peptides de plus 20 résidus, les simulations ont été effectués en solvant implicite (eau et chloroforme). Dans un dernier temps, nous avons voulu approfondir notre recherche et effectué un calcul plus proche d'une membrane. Ce calcul a été effectué avec le peptide K₂V₂₀K₂ dans un système eau/chloroforme/eau. Une lysine a été ajoutée de part et d'autre du peptide afin d'avoir une longueur cohérente avec l'épaisseur de l'interface.

Au départ de tous les calculs, les peptides sont soit en hélice α soit en hélice π . Nous avons suivi le comportement des peptides dans ces différentes configurations. Pour cela nous avons d'une part observé le comportement et l'évolution des hélices via les distances interpeptidiques, $i, i+4$ pour une hélice α et $i, i+5$ pour l'hélice π qui nous permet d'avoir une information locale. D'autre part nous avons examiné les changements structuraux durant la dynamique par l'étude des "clusters" (cf. Chapitre 2) pour obtenir une information plus globale quant à la conformation du peptide.

Les calculs en solvant implicite ont été réalisés de manière générale pendant 5 ns, si un changement apparaissait juste avant les 5 ns et si le temps nous le permettait, nous avons alors réalisés des simulations de 10 ns. Les dynamiques dans le système eau/chloroforme/eau ont été effectuées entre 4 et 6 ns, les dynamiques en membrane, tout atome, ont duré entre 1 et 2 ns.

2.2. Résultats

2.2.1. Le peptide KV₁₂K

2.2.1.1. Modélisation moléculaire en solvant implicite (H₂O et chloroforme)

Les premiers calculs ont été effectués en solvant implicite. La Figure 7 permet de suivre l'évolution de l'hélice α au cours du temps dans l'eau. On voit que la conformation d'origine n'est pas conservée durant la simulation et qu'il y a formation d'une pelote statistique. L'hélice se déroule complètement et n'est absolument pas stable. A la fin de la simulation les distances $i, i+4$ et $i, i+5$ sont de l'ordre de 10-15 Å.

Par souci de clarté, seule la courbe dans l'eau a été représentée, mais les résultats obtenus montrent que les hélices évoluent de la même manière dans les deux milieux. Le peptide en configuration de départ hélice α ou hélice π se déstructure totalement dans l'eau et dans le chloroforme après 500 ps.

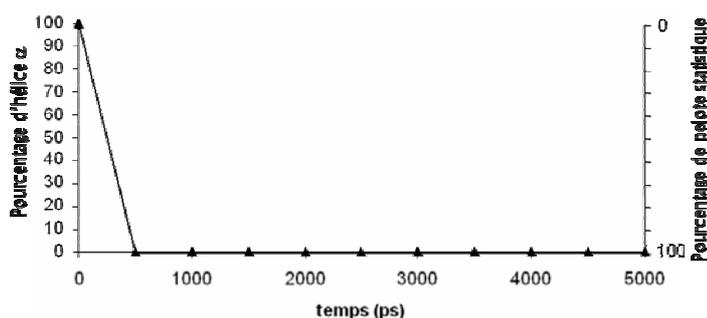


Figure 7. Evolution temporelle du taux d'hélice α du peptide KV₁₂K dans l'eau. La simulation a été réalisée pendant 5 ns.

2.2.1.2. Modélisation moléculaire en solvant explicite (H₂O et octanol)

- KV₁₂K dans une boîte d'eau :

La Figure 8 présente l'évolution de l'hélice α en fonction du temps. On remarque que le pourcentage d'hélice α diminue de manière constante pendant la dynamique à l'avantage de la pelote statistique. Les extrémités du peptide se déroulent petit à petit dès le début du calcul. Cette simulation a été réalisée pendant 4 ns seulement, il est probable que si nous avons continué jusqu'à

10 ou 20 ns, le peptide aurait continué doucement sa déstructuration pour obtenir 100% de pelote statistique, conduisant aux résultats observés précédemment en solvant implicite.

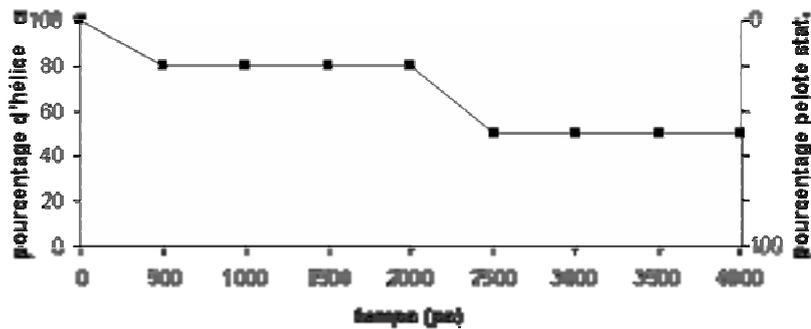


Figure 8. Evolution temporelle du taux d'hélice α de KV₁₂K en solvant explicite (eau). Le calcul a été effectué pendant 4 ns.

- KV₁₂K dans une boîte d'octanol :

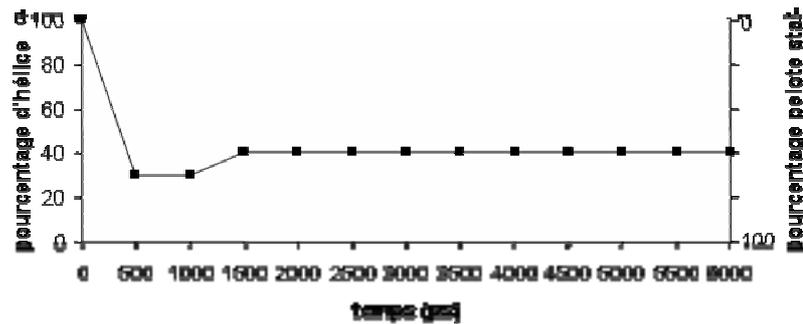


Figure 9. Evolution temporelle du taux d'hélice α de KV₁₂K en solvant explicite (octanol). Le calcul a été effectué pendant 6 ns.

Dès le début de la dynamique à 0.5 ns, le peptide se déstructure très rapidement (Figure 9). Puis le peptide se stabilise dans une conformation pauvre en hélice (40%) et riche en pelote statistique (60%). On notera que seuls les résidus du cœur (V₈-V₁₀) restent structurés en hélice α , les autres résidus se déstructurent.

Tous nos résultats avec le peptide KV₁₂K montrent que celui-ci est instable, nous avons préféré ne pas effectuer les calculs en configuration hélice π de départ et commencer l'étude des peptides plus longs.

2.2.1.3. Synthèse peptidique du peptide KV₁₂K

La synthèse et la purification sont explicitées dans le chapitre 3 et dans les Annexes. Comme nous l'avons vu les rendements de synthèses et de purifications sont mauvais dû au pourcentage d'hydrophobicité très important (85%). Plusieurs voies de purification ont été étudiées afin d'obtenir le peptide pur et 2 mg ont été obtenus. Ces quelques milligrammes d'une pureté faible mais acceptable (85%) ont été suffisants pour réaliser les tests de dichroïsme.

2.2.1.4. Analyse structurale par dichroïsme circulaire

Les expériences ont été effectuées dans le TFE et dans l'eau à différentes concentrations. La Figure 10 représente le spectre dichroïque de KV₁₂K dans l'eau (en magenta) et dans le TFE (en noir). Les spectres de référence, feuillet β et pelote statistique, sont représentés respectivement en cyan et en violet. Après déconvolution (Logiciel CDFriend, cf. Chapitre 2) du spectre expérimental dans le TFE on obtient 70% de pelote statistique, 5% d'hélice α et le reste de la séquence peptidique est en feuillet β . De même, dans l'eau nous observons un pourcentage de pelote statistique de 70%, le reste du peptide est sous forme feuillet β . Ce programme nous donne 0% d'hélicité dans l'eau. Nous en concluons que le peptide KV₁₂K est majoritairement en structure désordonnée dans l'eau et dans le TFE.

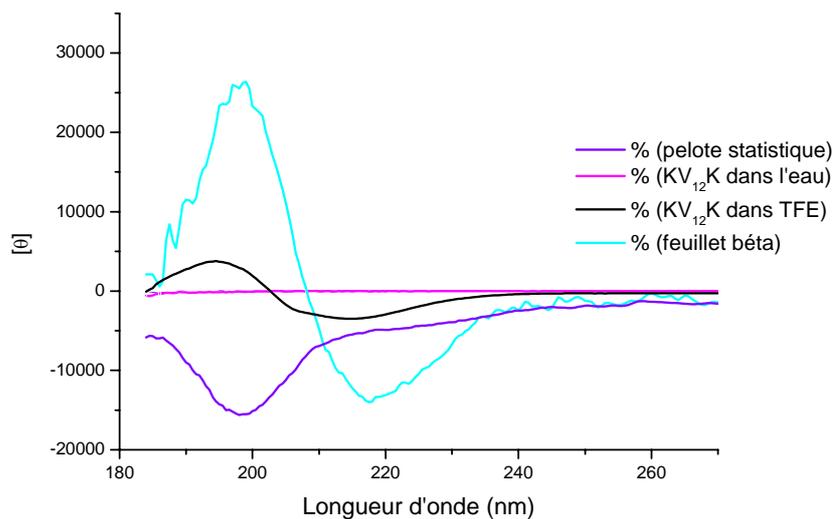


Figure 10. Spectres dichroïques de KV₁₂K dans l'eau et dans le TFE à température ambiante et à $c=200 \mu\text{M}$. Les spectres de référence, pelote statistique et feuillet β sont représentés respectivement en violet et en cyan.

Les calculs en solvant implicite et en solvant explicite sont en assez bon accord avec l'expérience. En solvant implicite, le peptide est complètement en pelote statistique (100%), en solvant explicite dans l'eau et dans l'octanol le peptide est majoritairement en pelote statistique (respectivement 50% et 60%), nos données CD nous informent que le peptide se déstructure à 70%.

On remarque que le pourcentage de pelote statistique dans l'eau en solvant implicite est de 100% alors qu'il est de 50% dans l'eau en solvant explicite. Cette différence est probablement due à la présence des atomes d'eau, qui agissent comme une contrainte stabilisatrice et de ce fait, l'hélice se déstructure plus lentement. Il aurait été intéressant de continuer le calcul en solvant explicite afin de laisser évoluer le peptide pour connaître la structure finale du peptide. Le calcul ayant été arrêté après 4 ns en raison de manque de temps, on peut émettre l'hypothèse que le pourcentage de pelote statistique aurait continué d'augmenter.

Le pourcentage de l'hélice α dans l'octanol, solvant explicite dans la modélisation, est de 40%, le reste est en pelote statistique, alors que les mesures réalisées dans le TFE par CD donnent seulement 5% d'hélice α , 70% de pelote statistique et 25% de feuillet β . Ces différences sont vraisemblablement dues aux solvants, bien que leurs constantes diélectriques soient similaires, leurs propriétés physico-chimiques ne sont pas identiques. D'autre part la transition entre l'hélice α et feuillet β n'est pas observable par modélisation moléculaire dans l'échelle de temps dans laquelle nous travaillons.

2.2.2. Les grands peptides (plus de 20 résidus)

2.2.2.1. Modélisation en solvant implicite avec des peptides "mono-résidus"

Nous appellerons dans la suite de ce chapitre, un peptide "mono-résidus", un peptide possédant le même résidu hydrophobe dans sa séquence, bien que nous ajoutions de part et d'autre de chaque peptide un résidu lysine, ce qui fait deux résidus différents. Les peptides possédant deux résidus hydrophobes différents (par exemple valine et leucine) seront nommés "bi-résidus".

- KA₂₀K dans H₂O et chloroforme

La Figure 11 présente la dynamique du peptide KA₂₀K dans l'eau. KA₂₀K dans l'eau en configuration de départ hélice α reste stable pendant 1 ns puis se déstructure très rapidement. A 3

ns, le peptide est majoritairement en structure désordonnée et à la fin de la dynamique l'hélice α n'est absolument pas conservée.

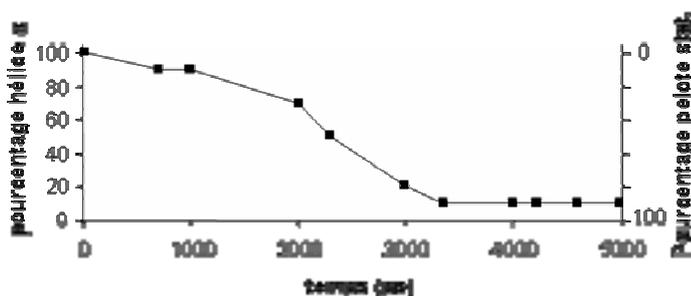


Figure 11. Evolution temporelle du taux d'hélice α du peptide KA₂₀K en fonction en solvant implicite (eau). Le calcul a été effectué pendant 5 ns.

Le peptide dans le chloroforme en configuration de départ hélice α est lui aussi instable (spectre non montré). Il se déstructure plus doucement que dans l'eau et à 3.5 ns le peptide est majoritairement en pelote statistique. L'hélice α est conservée à 10%. A la fin de la dynamique les liaisons $i, i+4$ et $i, i+5$ ont des longueurs comprises entre 12 et 15Å.

KA₂₀K dans l'eau en configuration de départ hélice π se déroule également dès le début de la simulation. A la fin du calcul, les liaisons $i, i+4$ et $i, i+5$ ont un ordre de grandeur compris entre 9 et 11Å. Le pourcentage de structure désordonnée est très majoritaire (80%) et l'hélice est très peu conservée (20%) (courbe non montrée).

Le peptide dans le chloroforme en configuration de départ hélice π ne reste pas dans cette configuration (Figure 12). Après quelques ps il commence à se structurer en hélice α et à 0.7 ns il est totalement en hélice α . L'hélice α est conservée jusqu'à la fin de la dynamique. A aucun moment le peptide ne s'est déstructuré.

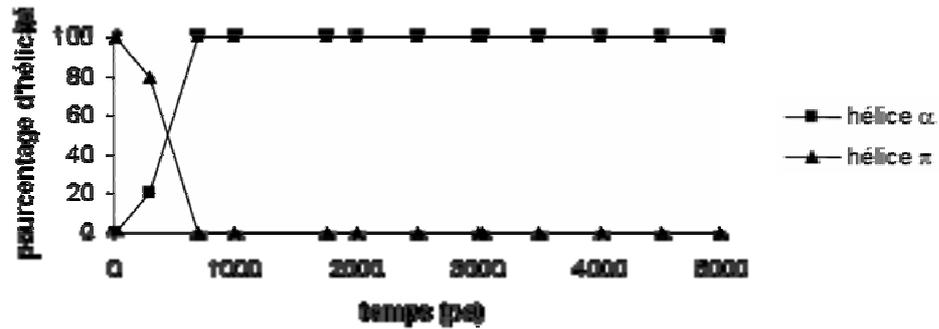


Figure 12. Evolution temporelle du taux l'hélice α du peptide KA₂₀K en configuration de départ hélice π dans le chloroforme. La transition $\pi \rightarrow \alpha$ est très visible à environ 0.7 ns.

Ce résultat est en contradiction avec les précédents, en effet nous venons de voir que le peptide KA₂₀K est instable en hélice α et dans le derniers cas, on observe une transition $\pi \rightarrow \alpha$ et le peptide reste stable en hélice α . On peut émettre l'hypothèse suivante, le peptide est piégé dans un état métastable et n'a pas assez d'énergie pour en sortir et adopter sa configuration préférentielle qui serait, d'après nos données précédentes, la pelote statistique.

Nous avons représenté sur la Figure 13 un graphique représentant le RMSD (Root Mean Squared Deviation) calculé entre les coordonnées des résidus pris à un intervalle de 1.5 ps durant la dynamique de 0 à 5 ns de KA₂₀K dans l'eau et dans le chloroforme. Les conformères obtenus lors de la simulation peuvent être groupés dans un petit nombre de familles aussi nommées "cluster" qui sont représentatives de l'espace conformationnel possible de la molécule. Avec cette approche, on peut dire qu'un conformère appartient à un cluster s'il est à moins de la distance critique d'un élément du cluster et à plus de cette distance de tous les éléments de tous les autres clusters (cf. Chapitre 2). Ce type d'analyse nous donne une information globale et temporelle de la structure du peptide. Ce graphique montre les vallées de stabilité dans l'espace conformationnel du peptide au cours du temps et nous permet de savoir si le peptide est globalement resté stable pendant la dynamique ou s'il a changé de configuration. De plus si sa configuration a changé, on peut savoir si la nouvelle configuration est proche ou loin de la configuration de départ.

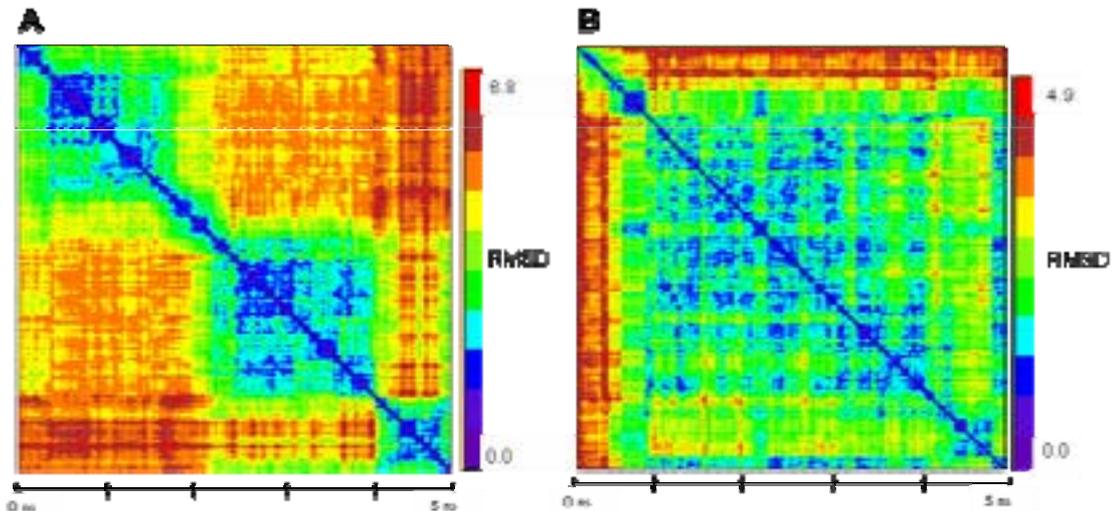


Figure 13. Représentation des différents « clusters » de KA₂₀K : A) dans l'eau en configuration de départ hélice π et B) dans le chloroforme en configuration de départ hélice π . L'échelle du RMSD est en Angström et l'échelle du temps en ns.

Nous distinguons sur la Figure 13A trois zones de couleur vert bleu (RMSD faible) indiquant l'appartenance à une famille de conformations. Tout d'abord de 0 à 2.2 ns une famille de structures proches de la structure de départ correspondant à la configuration π . Puis nous observons une autre famille de structures de 2.2 à 4 ns, entièrement différente de la configuration de départ. Enfin on voit une dernière famille de 4 à 5 ns. Cette figure nous montre que le peptide est très instable, change de configuration et que la dernière configuration est très éloignée de la première. Il est à noter que cette configuration finale n'est peut-être pas la configuration d'équilibre.

Nous distinguons sur la figure B deux zones. Tout d'abord de 0 à 0.5 ns une famille de structures proche de la structure de départ correspondant à la configuration π . Puis nous observons une autre famille de structures de 0.5 à 5 ns, entièrement différente de la configuration de départ. On peut confronter les Figure 12 et Figure 13 B. Sur la Figure 12 on voit bien que l'hélice π de départ passe en configuration α dès le début du calcul et reste stable en configuration α jusqu'à 5 ns. C'est précisément ce que nous observons avec le RMSD de 0 à 5 ns. La première zone correspond à l'hélice π et la deuxième zone correspond au peptide en hélice α . Le changement d'hélice s'est effectuée à 0.7 ns. On remarque aussi que le peptide semble être stable dans cette configuration,

mais là aussi il est à noter que cette configuration finale n'est peut-être pas la configuration d'équilibre.

Globalement, nous pouvons dire que le peptide KA₂₀K est instable en hélice et se déstructure. Il aurait été intéressant de continuer la dynamique de KA₂₀K dans le chloroforme en configuration hélice π de départ, afin d'observer la possible transition hélice \rightarrow pelote statistique.

- KL₂₀K dans H₂O et chloroforme

Le peptide KL₂₀K dans l'eau et dans le chloroforme est stable en hélice α pendant toute la dynamique. Dans ces deux milieux, l'hélice α est conservée à 100%. Les graphes représentant l'évolution de l'hélice n'ont pas été représenté puisque cette hélice est totalement stable, il n'y a aucune modification.

La Figure 14 représente l'évolution des hélices π dans l'eau et dans le chloroforme. Nous remarquons que l'hélice π n'est absolument pas stable dans ces deux solvants à l'avantage de l'hélice α . Une conversion d'hélice $\pi \rightarrow \alpha$ est observée à 1 ns. Les hélices π dans le chloroforme et dans l'eau ne sont pas conservées. Il est à noter que les peptides ne se déstructurent pas.

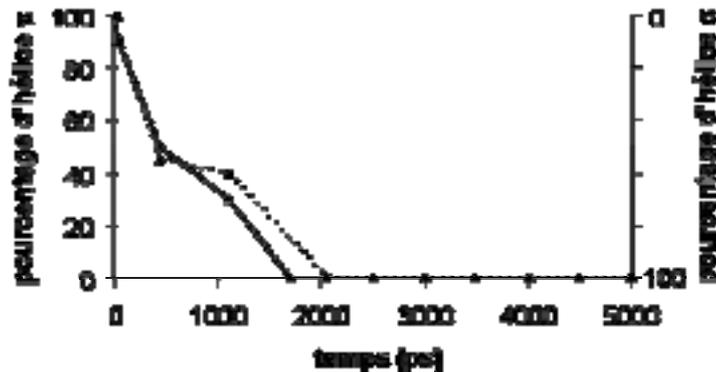


Figure 14. Evolution temporelle du taux d'hélice π du peptide KL₂₀K dans l'eau (trait pointillé) et dans le chloroforme (trait continu).

Dans tous les milieux, le peptide KL₂₀K est stable en hélice α , quelque soit sa configuration de départ. Ce peptide est un excellent candidat pour représenter l'hélice α .

- KI₂₀K dans H₂O et chloroforme

Le peptide KI₂₀K dans l'eau et dans le chloroforme en configuration hélice α de départ est très stable. Les liaisons $i, i+4$ et les liaisons $i, i+5$ sont quasiment inchangées pendant toute la dynamique.

On observe le même phénomène lorsque le peptide est en configuration de départ π . Après 5 ns de dynamique, l'hélice π est conservée et il n'y a pas eu de fluctuations durant le calcul.

Le graphe représentant l'évolution des hélices n'a pas été représenté. Nous distinguons sur le RMSD de 0 à 5 ns de KI₂₀K dans l'eau en configuration hélice π de départ une seule zone, ce qui signifie que nous avons une seule famille et que toutes les structures sont proches de la structure de départ qui est une hélice π (graphique non montré).

Le peptide KI₂₀K est stable en hélice α et en hélice π , quelque soit sa configuration de départ, il reste stable pendant toute la dynamique.

- KV₂₀K dans H₂O et chloroforme

La Figure 15 permet de suivre l'évolution du peptide en configuration de départ hélice α en fonction du temps dans l'eau.

L'hélice α dans l'eau est stable jusqu'à 3 ns. A partir de 3.5 ns on observe une transition $\alpha \rightarrow \pi$, la partition entre hélice π et hélice α est moitié-moitié. Le pourcentage de l'hélice π va augmenter pendant toute la fin de la dynamique pour atteindre environ 60% à 5 ns. Un calcul pendant 5 ns a été réalisé à la suite du précédent afin de vérifier la stabilité de l'hélice π . Cette simulation montre que de 5 ns à 10 ns l'hélice π est stable et aucune transition $\pi \rightarrow \alpha$ n'est observée (graphique non montré).

Nous obtenons les mêmes résultats dans le chloroforme, la transition $\alpha \rightarrow \pi$ est observable à partir de 1 ns. A 5 ns le peptide est complètement en configuration hélice π et reste stable jusqu'à la fin de la dynamique.

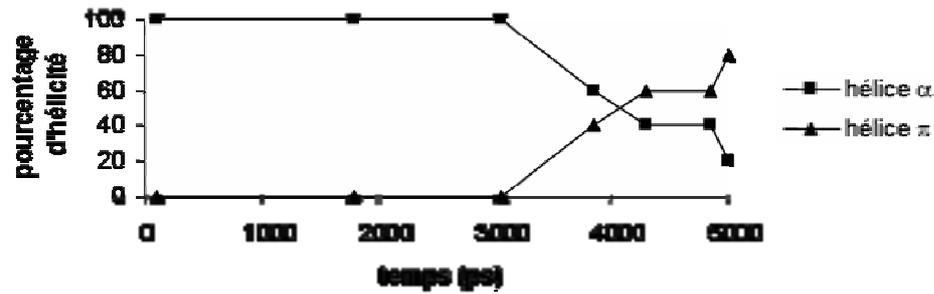


Figure 15. Evolution temporelle de l'hélicité de KV₂₀K dans l'eau en configuration de départ hélice α .

On observe la transition $\alpha \rightarrow \pi$ à partir de 3.5 ns.

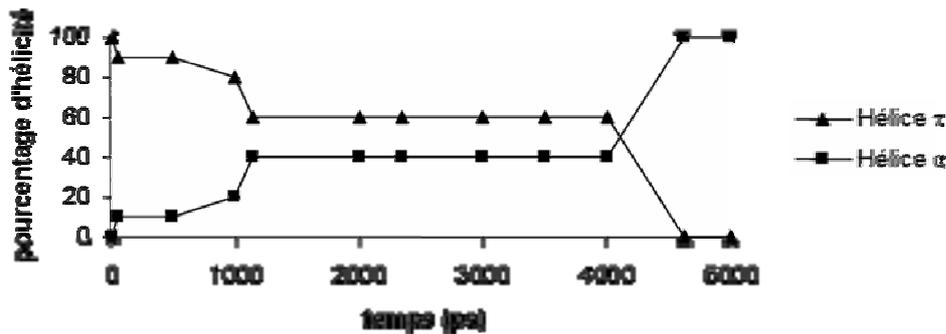


Figure 16. Evolution temporelle de l'hélicité de KV₂₀K dans le chloroforme en configuration de départ hélice π .

La Figure 16 représente l'évolution temporelle de l'hélice π dans le chloroforme. L'hélice π dans le chloroforme est stable au début de la simulation mais peu à peu se déstabilise. Une transition $\pi \rightarrow \alpha$ est observée et à 4.5 ns le peptide est totalement stable en hélice α .

Dans l'eau l'hélice π est stable. Un petit pourcentage d'hélice α apparaît pendant la dynamique mais à la fin du calcul le peptide est en hélice π à 100% (courbe non montrée).

Nous avons représenté sur la Figure 17 un graphique représentant le RMSD calculé entre les coordonnées des résidus pris à un intervalle de 1.5 ps durant la dynamique de 0 à 5 ns de KV₂₀K dans l'eau : A) en partant de la configuration de départ hélice α et B) en partant de la configuration π .

Sur la Figure 17A, on distingue deux zones : tout d'abord de 0 à 3.2 ns une famille de structures proche de la structure de départ correspondant à la configuration α , puis une autre famille de structures de 3.2 à 5 ns, entièrement différentes de la configuration de départ. Cette dernière peut être subdivisée en trois configurations proches mais tout de même distinctes. On peut comparer la

Figure 15 et la Figure 17A. La Figure 15 nous montre que l'hélice α de départ passe en configuration π après 3 ns de calcul et reste dans l'ensemble stable en configuration π jusqu'à 5 ns. On observe le même comportement sur la Figure 17A.

On distingue sur la Figure 17B, une seule zone, ce qui signifie que nous avons une seule famille et que toutes les structures sont proches de la structure de départ qui est une hélice π .

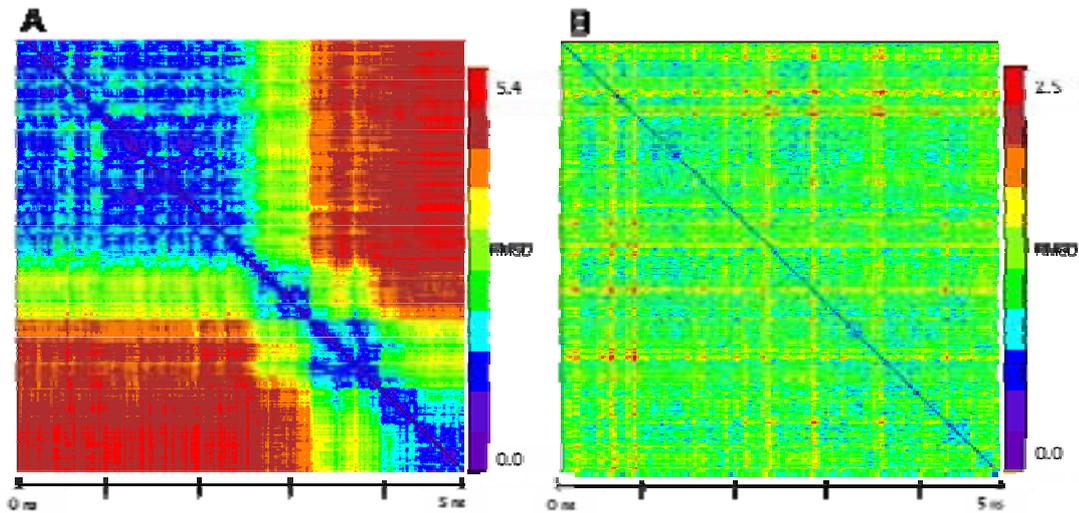


Figure 17. Représentation des différents « clusters » de : A) KV₂₀K dans l'eau en configuration de départ hélice α et B) KV₂₀K dans l'eau en configuration de départ hélice π . L'échelle du RMSD est en Angström et l'échelle du temps en ns.

Le peptide, KV₂₀K, donne des résultats très intéressants. En effet dans l'eau le peptide est stable en configuration π . Ce peptide est un bon candidat pour notre référence de l'hélice π . De plus ce peptide possède la propriété de "plasticité", c'est-à-dire qu'on observe des transitions $\alpha \rightarrow \pi$ et réciproquement, en fonction de l'environnement (eau, chloroforme).

2.2.2.2. Modélisation en solvant implicite avec des peptides "bi-résidus"

Après avoir réalisé tous les calculs précédents, nous avons simulé la dynamique de peptides de plus de 20 résidus et possédant plus de 2 résidus hydrophobes avec des motifs différents. L'hélice π est présente dans le peptide Neu_{TM35} au niveau de la séquence ILVVVV, nous avons donc choisi comme modèle des peptides contenant des résidus valine et isoleucine ou valine et leucine. Pour le premier système, nous avons choisi deux peptides K₂I₅V₁₆K₂ avec comme itération IVVVVI et K₂I₁₀V₁₀K₂ avec comme itération IVIVIV. Pour le second système nous avons choisi

deux peptides $K_2L_5V_{16}K_2$ avec comme motif LVVVVL et $K_2L_{10}V_{10}K_2$ avec comme motif LVLVLV. Il est à noter qu'une lysine a été ajoutée de part et d'autre des peptides dans l'optique d'une éventuelle synthèse afin de diminuer l'hydrophobicité du peptide.

- $K_2L_5V_{16}K_2$ dans H_2O et chloroforme

Dans l'eau et dans le chloroforme l'hélice α est conservée. Ces deux hélices restent en configuration α pendant toute la dynamique. $K_2L_5V_{16}K_2$ dans l'eau et dans le chloroforme conserve également son hélice π . Puisqu'il n'y a pas de modification dans la configuration du peptide, le graphe représentant l'évolution des hélices n'a pas été représenté. On distingue sur le RMSD de 0 à 5 ns de $K_2L_5V_{16}K_2$ dans le chloroforme en configuration hélice π de départ une seule zone, ce qui signifie que nous avons une seule famille et que toutes les structures sont proches de la structure de départ qui est une hélice π (graphique non montré).

Comme pour le peptide $KI_{20}K$, ce peptide a la faculté de rester dans sa configuration initiale, quelle que soit cette configuration.

- $K_2L_{10}V_{10}K_2$ dans H_2O et chloroforme

$K_2L_{10}V_{10}K_2$ dans l'eau et dans le chloroforme en configuration α de départ est globalement stable. Dans le chloroforme le peptide a une très faible tendance à se déstructurer en fin de dynamique au niveau des extrémités, mais dans l'ensemble ces deux hélices restent en configuration α pendant toute la dynamique.

$K_2L_{10}V_{10}K_2$ en configuration de départ hélice π dans l'eau et dans le chloroforme est stable et on retrouve l'hélice π en fin de dynamique dans les deux cas.

De même que précédemment, les spectres montrant l'évolution des hélices n'ont pas été représentés.

Comme pour les peptide $KI_{20}K$ et $K_2L_5V_{16}K_2$, ce peptide est stable dans sa configuration initiale.

- $K_2L_5V_{16}K_2$ dans H_2O et chloroforme

Le peptide $K_2L_5V_{16}K_2$ dans l'eau et dans le chloroforme est stable en hélice α pendant toute la dynamique. Dans l'eau les extrémités du peptide se déstructurent très légèrement mais

globalement le peptide reste en hélice α . $K_2L_5V_{16}K_2$ dans le chloroforme et dans l'eau en configuration de départ hélice π est assez stable. Puisqu'il n'y a pas de modification dans la configuration du peptide, le graphe représentant l'évolution des hélices et celui représentant le RMSD n'ont pas été représentés.

Il est intéressant de noter que ce peptide est stable en hélice π , malgré la présence des 5 résidus leucine. Nous avons vu précédemment que la poly-leucine se structurait toujours en hélice α , les résidus leucine auraient pu influencer la structure de ce peptide.

- $K_2L_{10}V_{10}K_2$ dans H_2O et chloroforme

Le peptide $K_2L_{10}V_{10}K_2$ en configuration de départ hélice α dans l'eau et dans le chloroforme reste stable pendant toute la dynamique. L'hélice α est conservée à 100%.

La structure de $K_2L_5V_{16}K_2$ dans l'eau en configuration de départ hélice π est stable. A la fin de la simulation, après 5 ns, le peptide reste totalement structuré en hélice π à 100%.

En revanche, $K_2L_{10}V_{10}K_2$ en configuration de départ hélice π dans le chloroforme n'est pas stable au cours de la dynamique. En effet, l'hélice π n'est pas conservée et on observe une transition $\pi \rightarrow \alpha$. La Figure 18 représente l'évolution de la structure secondaire du peptide, nous remarquons que celui-ci perd sa structuration en hélice π et gagne en hélice α . A la fin de la dynamique, le peptide se structure totalement en hélice α .

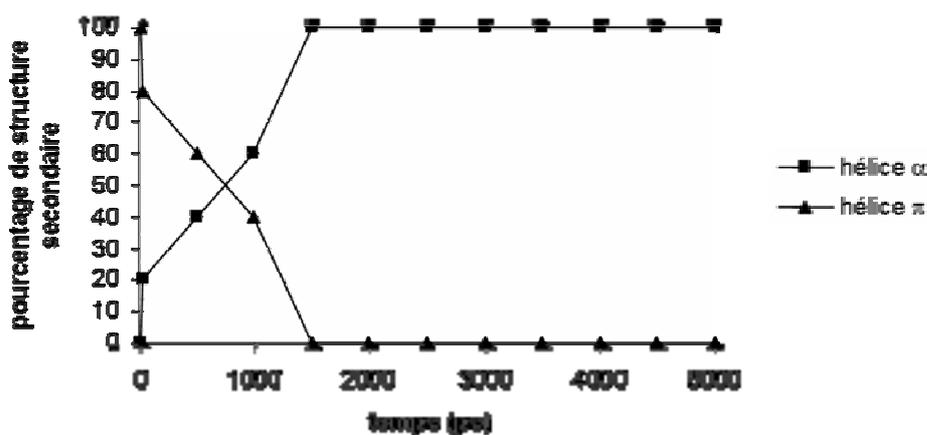


Figure 18. Evolution temporelle de l'hélicité de $K_2L_{10}V_{10}K_2$ dans le chloroforme en configuration de départ hélice π . On observe une transition $\pi \rightarrow \alpha$ après 1 ns.

En résumé, ce peptide est stable en configuration hélice α dans l'eau et dans le chloroforme. En revanche, l'hélice π est stable dans l'eau mais instable dans le chloroforme.

2.2.2.3. Modélisation en solvant explicite

- K₂V₂₀K₂ dans un système eau/chloroforme/eau

Le peptide KV₂₀K a donné de très bons résultats en solvant implicite et nous voulions connaître la dynamique de ce peptide en solvant explicite et plus particulièrement dans un système eau/chloroforme/eau afin de mimer l'interface eau/membrane. Il est plus facile et surtout plus rapide de faire un calcul dans un système eau/chloroforme/eau, car d'une part une molécule de chloroforme est plus facile à déplacer qu'un lipide puisque le coefficient de diffusion latérale du chloroforme est 300 fois plus élevé que celui du DMPC, d'autre part on élimine les interactions peptides/lipides tout en conservant un environnement moléculaire raisonnable. L'épaisseur de la bicouche entre les glycérols de DMPC est de 30 Å (Aussenac *et al.*, 2003), nous avons donc construit une couche de chloroforme de 30 Å. De part et d'autre de cette couche, nous avons introduit des molécules d'eau, les couches d'eau ont une épaisseur de 13.5 Å (dimension de la boîte : 45 x 57 x 45 Å³). On a rajouté au peptide précédent (KV₂₀K) des résidus lysines de part et d'autre de la chaîne peptidique afin qu'il ait la longueur désirée. Le peptide choisi est donc K₂V₂₀K₂. Cette simulation a été effectuée pendant 4 ns. Au départ de la simulation, le peptide est en configuration hélice α .

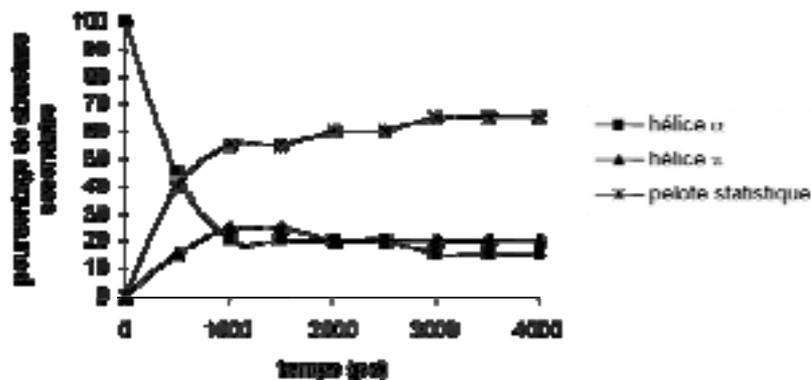


Figure 19. Evolution temporelle de la structure secondaire du peptide K₂V₂₀K₂ dans le système eau/chloroforme/eau.

La Figure 19 représente l'évolution de la structure secondaire du peptide. Au départ le peptide est en configuration α . Après 0.5 ns l'hélice α est globalement conservée mais l'hélice π et la pelote

statistique apparaissent. De plus on remarque que la fraction désordonnée augmente tout au long du calcul. Au final, le peptide est majoritairement en pelote statistique, seulement 40% est en hélices diverses (α et π).

Les calculs en système explicite eau/chloroforme/eau demandent beaucoup de temps et nous n'avons pas pu malheureusement continuer dans cette voie et par exemple étudier la dynamique de $K_2V_{20}K_2$ en configuration hélice π au départ et/ou étudier ce peptide dans un système différent (eau/octanol/eau) et/ou dans une bicouche lipidique (DMPC, POPC etc...).

2.2.2.4. Synthèse peptidique : peptide modèle $KV_{20}K$

Après avoir effectué les calculs, nous avons vu que le modèle le plus pertinent était le peptide $KV_{20}K$. Les peptides $K_{215}V_{16}K_2$ et $K_{210}V_{10}K_2$ ont des hélices π stables dans l'eau et dans le chloroforme mais les hélices α sont aussi stables. De plus ces peptides sont un peu plus longs et plus hydrophobes que $KV_{20}K$ et on peut prédire que ces synthèses seront d'autant plus difficiles. Nous avons donc décidé de synthétiser le peptide $KV_{20}K$. La synthèse et la purification sont explicitées dans le chapitre 3. Aucune méthode de purification ne nous a permis d'obtenir un gradient de séparation correct et nous n'avons pas pu à l'heure actuelle purifier ce peptide. Nous n'avons par conséquent pas pu effectuer les expériences de dichroïsme circulaire.

2.3. Discussion

Nous avons dressé un tableau récapitulatif (tableau 2) qui résume les résultats des différentes simulations en solvant implicite sur les peptides de plus de 20 résidus.

		Configuration α de départ	Configuration π de départ
$KV_{20}K$	eau	$\alpha \rightarrow \pi$	$\pi \rightarrow \pi$
	chloroforme	$\alpha \rightarrow \pi$	$\pi \rightarrow \alpha$
$KA_{20}K$	eau	Instable	Instable
	chloroforme	Instable	Instable
$KL_{20}K$	eau	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \alpha$
	chloroforme	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \alpha$
$KI_{20}K$	eau	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \pi$
	chloroforme	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \pi$

K ₂ I ₅ V ₁₆ K ₂	eau	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \pi$
	chloroforme	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \pi$
K ₂ I ₁₀ V ₁₀ K ₂	eau	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \pi$
	chloroforme	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \pi$
K ₂ L ₅ V ₁₆ K ₂	eau	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \pi$
	chloroforme	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \pi$
K ₂ L ₁₀ V ₁₀ K ₂	eau	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \pi$
	chloroforme	$\alpha \rightarrow \alpha$	$\pi \rightarrow \alpha$

Tableau 2. Bilan des simulations des peptides de plus de 20 résidus en solvant implicite (eau et chloroforme).

Ce tableau nous montre que le peptide KA₂₀K, instable dans l'eau et dans le chloroforme, est donc un mauvais modèle. Le peptide KL₂₀K est un bon modèle pour l'hélice α , en effet l'hélice α est stable et une transition $\pi \rightarrow \alpha$ est observée. Les peptides possédant des résidus isoleucine (KI₂₀K, K₂I₅V₁₆K₂ et K₂I₁₀V₁₀K₂) sont stables dans leurs configurations de départ. Dans l'eau, le peptide KV₂₀K est stable en hélice π et on observe une conversion $\alpha \rightarrow \pi$. Cette conversion est aussi observée dans le chloroforme, en revanche l'hélice π n'est pas stable dans ce solvant. Le peptide K₂L₁₀V₁₀K₂ garde les mêmes propriétés que le peptide KL₂₀K, il est un bon modèle d'hélice α . En revanche, pour le peptide K₂L₅V₁₆K₂ la transition $\pi \rightarrow \alpha$ n'est pas observée, ce peptide est stable dans ses configurations de départ.

Trois grandes informations nous ont parues importantes à l'issue de toutes ces simulations :

- le peptide KV₂₀K est stable en hélice π et présente des propriétés de "plasticité" (capacité de changer de conformation),
- le nombre de résidus est très important dans la stabilité des hélices et
- la nature du résidu hydrophobe est cruciale pour obtenir une hélice π stable. Ces différents points seront discutés par la suite.

- Le peptide KV₂₀K est stable en hélice π

Le peptide KV₂₀K est un modèle pour notre recherche de l'hélice π . Dans l'eau, l'hélice π est conservée et on observe une conversion $\alpha \rightarrow \pi$. On observe cette conversion dans le

chloroforme. En revanche, l'hélice π dans le chloroforme n'est pas stable. Dans le chloroforme, environnement lipophile, le peptide est dans un milieu extrêmement favorable et à tendance à "s'étendre" : l'hélice π n'est pas donc stable. En revanche dans l'eau, le peptide n'est pas dans un milieu favorable, il va essayer d'offrir le minimum de surface au contact du liquide, il va donc se structurer en hélice π qui est la plus courte et offre une surface moindre : l'hélice π est donc stable dans cet environnement.

Une propriété intéressante a pu être observée. Le peptide KV₂₀K dans l'eau est stable en hélice π et on observe une conversion $\alpha \rightarrow \pi$. Cette conversion est aussi observée dans le chloroforme. Ce peptide posséderait donc la faculté de changer de configuration quelle que soit le milieu (eau et chloroforme) et de passer d'une configuration α à une configuration π et réciproquement. Ce peptide aurait un pouvoir de "plasticité" et/ou "d'élasticité". Cette propriété est très intéressante, comme nous l'avons vu plusieurs fois, le peptide Neu_{TM35} possède 17% d'hélice π et ceci au niveau des résidus valine. Nous savons aussi que les dimères, présent dans la membrane, déclencheraient l'autophosphorylation par changement d'orientation ou de configuration (Ullrich et Schlessinger, 1990 ; Schlessinger, 2000). Une question se pose maintenant à nous : est ce que l'hélice π est un réservoir "d'élasticité" et/ou de "plasticité" et joue le rôle d'un ressort capable de changer de configuration ? Afin de répondre à cette question, nous avons décidé d'incorporer une polyvaline dans une membrane afin d'analyser le comportement du peptide en milieu membranaire.

- Le nombre de résidus

Nos résultats de modélisation nous montrent que le peptide KV₁₂K n'est pas stable en hélice. Une hypothèse est de penser que ce peptide serait trop court et donc incapable de se structurer en hélice. Castano *et al.* ont montré que les peptides LiK_i amphipatiques ($i=2j$) se structurent en hélice α lorsque $i+j > 15$ résidus (Castano *et al.*, 1999). De plus Low et Baybutt (Low et Baybutt, 1952) ont montré qu'il fallait un minimum de 14 acides aminés pour former une hélice α . Notre peptide possède 14 résidus, il est possible qu'il soit un peu court et inapte à se structurer en hélice, malgré la présence de 12 résidus valine. Les peptides de 22 ou 24 résidus, à l'exception de la polyalanine, sont tous stable en hélice. Il est donc nécessaire pour stabiliser une hélice de choisir un peptide de plus de 15 résidus.

- La nature des résidus hydrophobes

Lors de ces simulations, nous avons travaillé avec des peptides possédant des résidus différents, et nous avons remarqué que chaque résidu possède des propriétés particulières. La Figure 20 donne la représentation CPK des peptides en hélice α . Le tableau 3 donne l'indice d'hydrophobicité des quatre résidus, d'après l'échelle de Kyte-Doolittle (Kyte et Doolittle, 1982), de Wimley et White (Wimley et White, 1996) et de Hessa (Hessa *et al.*, 2005).

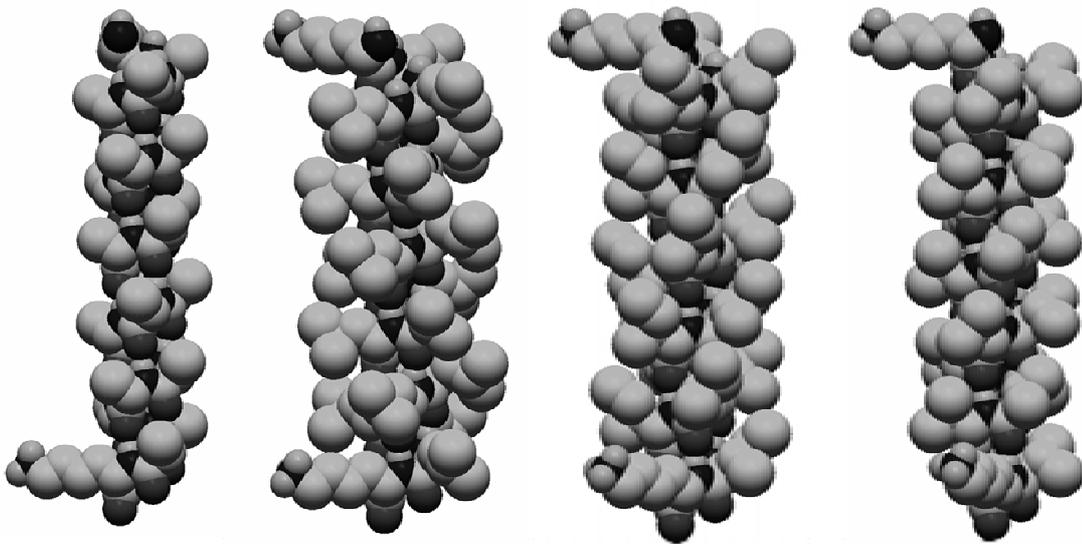


Figure 20. Figure représentant les différentes structures des peptides de gauche à droite : KA₂₀L, KL₂₀K, KI₂₀K et KV₂₀K en CPK.

L'indice d'hydrophobicité d'un acide aminé peut être déterminé par diverses approches. L'approche statistique est basée sur la connaissance de la localisation des chaînes latérales dans un grand nombre de protéines globulaires solubles, dont la structure a été déterminée par diffraction de rayons X. Une chaîne latérale est, soit entièrement en contact avec le milieu extérieur aqueux, soit entièrement enfouie dans le milieu hydrophobe à l'intérieur de la protéine, soit localisée en surface en contact partiel avec l'intérieur et l'extérieur. On peut déterminer pour chacun des 20 acides aminés la fréquence d'exposition dans le milieu extérieur (ou intérieur). Plus la fréquence d'apparition à l'intérieur est grande, plus l'acide aminé a un caractère hydrophobe. Cette approche a permis d'établir l'échelle d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle (Kyte et Doolittle, 1982). Dans cette échelle normalisée, on assigne à l'acide aminé le plus hydrophobe (isoleucine) un indice

d'hydrophobicité de +4.5 et l'acide aminé le plus hydrophile (arginine) un indice d'hydrophobicité de -4.5. On peut alors considérer en première approximation qu'un acide aminé à indice positif est plutôt hydrophobe alors qu'un acide aminé à indice négatif est plutôt hydrophile.

L'approche thermodynamique consiste à mesurer le coefficient de partage d'un acide aminé entre un solvant aqueux et un solvant apolaire. Plus ce partage est en faveur du solvant apolaire, plus l'acide aminé a un caractère hydrophobe. Ce coefficient de partage peut également s'exprimer en terme d'énergie de transfert de l'eau au solvant apolaire ($\Delta G = -RT \ln K$). Plus celle-ci est négative, plus l'acide aminé est hydrophobe. Wimley et White présentent une échelle d'hydrophobicité pour les 20 acides aminés par mesure de coefficient de partage de 2 familles de petits peptides dans des membranes de LUV formées de POPC (Wimley et White, 1996a ; 1996b et 1999). La première famille est formée de pentapeptides Ac-WL-X-LL-OH où X est un des 20 acides aminés et la deuxième famille est constituée des peptides Ac-WL_m (m=1 à 6). Hessa propose une échelle d'hydrophobicité par mesure de coefficient de partage des peptides GGPG-X₁₉-GPGG où X est un des 20 acides aminés dans une interface eau/octanol.

On remarque que les différentes échelles ne conduisent pas exactement aux mêmes résultats. Ce qui est logique, puisque ces échelles ont été déterminées par des approches différentes (statistique et thermodynamique). Néanmoins, on peut clairement noter que le résidu alanine est le moins hydrophobe des quatre. Le résidu valine est intermédiaire. L'isoleucine est le plus hydrophobe d'après les échelles de Kyte-Doolittle et Hessa. D'après l'échelle de Wimley-White, c'est le résidu leucine, le plus hydrophobe.

Résidu	Chaînes latérales	Indice ^a	ΔG (kcal/mol) ^{b1}	ΔG (kcal/mol) ^{b2}	ΔG (kcal/mol) ^c
Alanine	CH ₃	1.80	0.17 ± 0.06	0.33 ± 0.12	0.15
Leucine	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	3.80	-0.56 ± 0.04	-0.69 ± 0.12	-0.50
Isoleucine	CHCH ₃ CH ₂ CH ₃	4.50	-0.31 ± 0.06	-0.81 ± 0.13	-0.55
Valine	CH(CH ₃) ₂	4.20	0.07 ± 0.05	-0.53 ± 0.12	-0.25

Tableau 3. Echelle d'hydrophobicité d'après a) Kyte et Doolittle, 1982 (calcul par approche statistique), b1) Wimley et White, 1996a (calcul par approche thermodynamique en membrane, b2) Wimley et White, 1996ab et 1999 (calcul par approche thermodynamique dans une interface eau/octanol) et c) Hessa et al., 2005 (calcul par approche thermodynamique dans une interface eau/octanol) pour les résidus Alanine, Leucine, Isoleucine et Valine.

Les premiers calculs ont été effectués avec une polyalanine, résidu peu encombré stériquement et peu hydrophobe. Nous avons ainsi pu remarquer que les peptides possédant des résidus alanine sont instables. Ce résidu n'est pas un bon résidu pour obtenir un peptide stable en hélice α ou en hélice π . Ceci est conforme avec la littérature. Beaucoup de simulations ont été effectuées avec des peptides contenant des résidus alanines. Le groupe de Sudha (Sudha *et al.*, 2004) a travaillé sur des peptides contenant le motif AG, les groupes de Shirley (Shirley et Brooks, 1997) et de Armen (Armen *et al.*, 2003) ont modélisé des peptides possédant le motif (AAQAA)₃ ou (AADAA)₃. Ces différents groupes ont montré que pour former un peptide possédant des alanines en hélice π il fallait ajouter des résidus lysines ou glutamines pour stabiliser le peptide et permettre la formation de l'hélice π . De plus le groupe de Shirley a modélisé les peptides suivants (AAXAA)₃ avec X= Gln, Asn, Glu, Asp, Arg, Lys et a montré que tous ces peptides se structuraient en hélice π mais que la fraction de cette hélice ne dépassait pas 20%. Avec le peptide (AAQAA)₃ ils ont obtenu un maximum de 23% d'hélice π . Notre peptide KA₂₀K ne possédait pas de résidu chargé ou polaire non chargé pour stabiliser l'hélice, excepté les résidus lysine des extrémités, et nos résultats montrent que dans nos différents milieux, ce peptide se déstructure.

Notre deuxième modèle est KL₂₀K. Nous avons choisi la leucine, qui est plus hydrophobe et possède un encombrement stérique plus important que l'alanine. Nos résultats ont montré que ce peptide était très stable en hélice α et très instable en hélice π . La leucine est un excellent candidat pour obtenir des hélices α , c'est un promoteur d'hélice α . En revanche, les hélices π ne sont pas stables, peut-être est-ce dû à l'encombrement stérique trop important ? Par ailleurs, nous avons vu précédemment que l'indice d'hydrophobicité calculé avec l'échelle de Kyte-Doolittle du résidu leucine est de 3.8, peut-être ce résidu n'est-il pas assez hydrophobe ?

Notre modèle suivant est le peptide KI₂₀K. Nous avons remplacé la leucine par l'isoleucine qui a un encombrement stérique plus important et qui est plus hydrophobe. Les simulations ont montré que l'hélice π et l'hélice α sont bien conservées pendant les dynamiques. Ce résidu aurait la fonction de "bloquer" la structure, c'est à dire qu'il garderait la conformation initiale tout au long de la dynamique quelle qu'elle soit (hélice α , hélice π). En revanche, ce peptide n'a pas été

considéré comme peptide modèle, car nous ne pouvons pas être sûr que ce peptide se structure en hélice π . En effet le peptide en hélice π est peut-être piégé dans un état métastable et il n'a pas assez d'énergie pour se déstabiliser et donc pour se restructurer. Ce peptide n'a pas de configuration préférentielle marquée, il reste structuré selon sa configuration de départ.

Le dernier résidu est la valine, moins encombré que la leucine et plus encombré que l'alanine. Les simulations sur KV₂₀K donnent de bons résultats. Dans l'eau, en configuration hélice π de départ, on a vu que l'hélice π était conservée, par ailleurs on observe une conversion $\alpha \rightarrow \pi$. Dans le chloroforme on observe une conversion $\alpha \rightarrow \pi$ en configuration hélice α de départ et $\pi \rightarrow \alpha$ en configuration hélice π de départ. Dans ce milieu l'hélice se comporte comme un ressort ou un yo-yo et est capable de changer de configuration. On peut émettre l'hypothèse que l'hélice π n'est pas stable dans le chloroforme car le peptide est dans un milieu extrêmement favorable, en revanche dans l'eau, l'hélice π est stable car le peptide est dans un milieu très défavorable, il va donc essayer d'offrir le minimum de surface au contact du liquide. La surface du peptide KV₂₀K en configuration hélice α est de 1615.3 Å² et en configuration hélice π est de 1216.2 Å² (calcul effectué à l'aide du logiciel InsightII). L'hélice π étant la plus courte et offrant une surface moindre, elle est donc la plus stable dans cet environnement.

3. Hélice π : réservoir d'élasticité lors du processus d'activation des RTK ?

D'après nos données précédentes, le peptide KV₂₀K est capable de se structurer en hélice π . Nous avons donc choisi de travailler avec une polyvaline, plus particulièrement le peptide K₂V₃₂K₂ incorporé dans une bicouche de DMPC. Les 32 résidus valines ont une longueur de 30.7 Å (calcul effectué avec MacroModel) en configuration hélice π et une longueur de 51 Å en configuration hélice α . L'épaisseur hydrophobe de la membrane de DMPC est de 30 Å (Léonard *et al.*, 2001). Ce peptide possède donc une longueur hydrophobe trop importante lorsqu'il est en configuration α alors que la longueur hydrophobe est voisine de l'épaisseur de la bicouche lorsque le peptide est en configuration π . Les extrémités chargées du peptide sont idéales pour interagir avec la partie hydrophile de la membrane. En effet les acides aminés chargés positivement, comme la lysine, peuvent se trouver à l'interface membrane-eau car ils ont une longue chaîne aliphatique flexible terminée par un groupe chargé amine. Le peptide est en configuration hélice α au début du

calcul et nous allons observer le comportement du peptide au cours du temps. Chaque système se compose d'un peptide plus 30 lipides/monocouche (60 lipides au total). Le rapport molaire est peptide/lipide est de 1:60. La bicouche a été équilibrée en phase fluide et le calcul a été réalisé à $T=300K$.

3.1. Résultats des simulations de $K_2V_{32}K_2$ en membrane

3.1.1. Dynamique moléculaire à volume constant

Le premier calcul a été effectué à volume constant pendant une nanoseconde. A volume constant, le volume de la boîte ne change pas et une pression latérale de membrane est introduite pour maintenir l'équilibre du système. La Figure 21 montre d'une part une rupture des deux couches de phospholipides et d'autre part la déstructuration de quelques résidus du peptide. L'hélice α est conservée à environ 40%, au niveau des résidus V18 à V32.

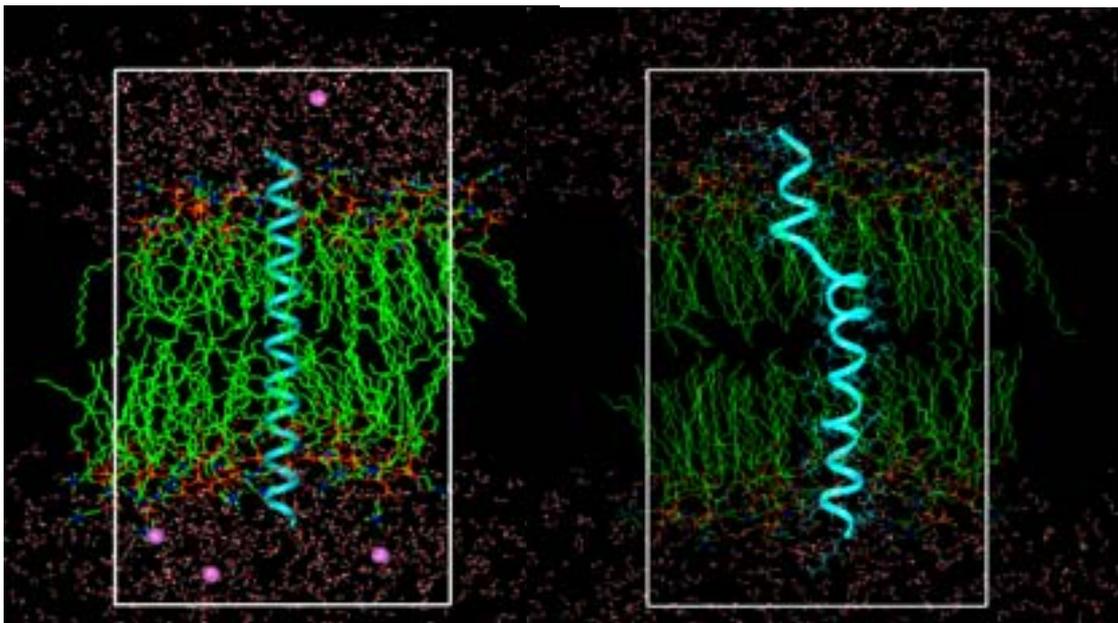


Figure 21. Cliché du système peptide dans eau-bicouche DMPC au départ de la simulation (à gauche) et à 1 ns (à droite). Le peptide est en bleu turquoise, seul le squelette est représenté. Les phospholipides en vert (azote en bleu, phosphore en orange et les oxygènes des carbonyles des esters des chaînes d'acides gras en rouge). Pour simplifier l'image, les atomes d'hydrogènes attachés aux molécules de DMPC n'apparaissent pas. Les molécules d'eau sont en rouge (oxygènes) et blanc (hydrogènes) et les contre ions sont en rose.

Nous pouvons noter que le détachement est plus important près du peptide. L'épaisseur initiale de la membrane est de 30 Å (distance entre les glycérols). En fin de simulation, la distance est de 36 Å pour les lipides à proximité du peptide et de 31.2 Å pour les lipides les plus éloignés du peptide. Le peptide a donc emporté avec lui tous les lipides proches afin d'avoir la même épaisseur.

Le prochain calcul sera effectué à pression constante afin d'éviter la séparation de la bicouche membranaire. A pression constante, le volume de la boîte peut changer pendant la dynamique et aucune pression latérale n'est introduite.

3.1.2. Dynamique moléculaire à pression constante

Ce deuxième calcul a été effectué à pression constante pendant 2 nanosecondes. La Figure 22 nous montre l'évolution du peptide en fonction du temps. Tout d'abord on remarque que la bicouche ne se sépare pas. En revanche le peptide n'opte pas pour la conformation hélice π . Après 1 ns on remarque que le peptide se déstructure au niveau de ces extrémités. Après 2 ns, les extrémités du peptide sont complètement désordonnées, le cœur du peptide est toujours en hélice α et il est un peu incliné dans la bicouche. L'hélice α n'a pas basculé en hélice π , le peptide est incliné dans la membrane et ses extrémités se sont déstructurées. L'hélice α est conservée à environ 30%.

Le calcul à pression constante montre que le peptide s'est incliné et se déstructure en partie. En s'inclinant, le peptide a diminué sa surface hydrophobe exposée au solvant aqueux et a pu compenser de ce fait le mésappariement positif. Cette inclinaison implique un coût énergétique important, qui peut être dû à une perturbation des lipides adjacents au peptide "tilté", et/ou à une orientation défavorable des chaînes latérales du peptide "tilté" près de l'interface de lipide/eau. Il est à noter qu'on ne se trouve probablement pas dans une structuration stable à la fin de la dynamique.

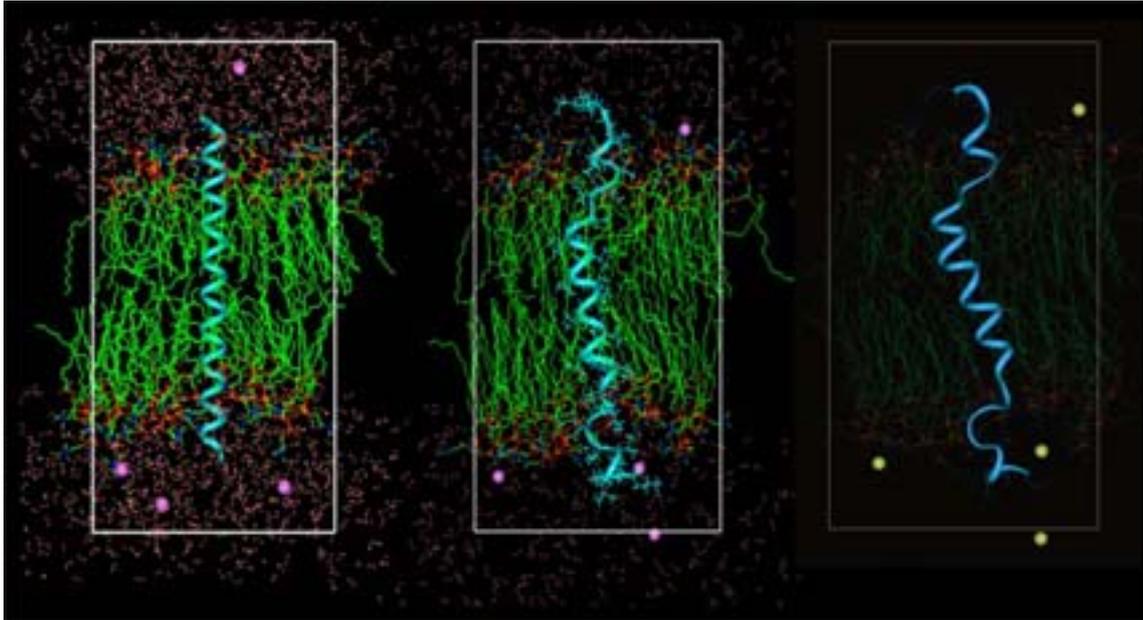


Figure 22. Cliché du système peptide dans eau-bicouche DMPC au début de la simulation (à gauche) à 1 ns (au milieu) et à 2 ns (à droite). Le peptide est en bleu turquoise, seul le squelette est représenté. Les phospholipides en vert (azote en bleu, phosphore en orange et les oxygènes des carbonyles des esters des chaînes d'acides gras en rouge). Pour simplifier l'image, les atomes d'hydrogènes attachés aux molécules de DMPC n'apparaissent pas. Les molécules d'eau sont en rouge (oxygènes) et blanc (hydrogènes) et les contre ions sont en rose et en jaune.

3.2. Discussions

Deux points ont été observés lors de ces calculs. A volume constant (présence de pression latérale), la membrane s'est globalement adaptée au peptide. A pression constante, le peptide s'est globalement adapté à la membrane. Ces deux résultats seront discutés ci-dessous. Il est important de noter que les calculs ont été réalisés pendant 1 et 2 ns, ce qui est très court et les conclusions ne sont certainement pas décisives. La dernière partie de cette discussion rend compte des limitations de la modélisation moléculaire dans l'étude du mésappariement hydrophobe.

- Adaptation de la membrane à volume constant

Le calcul à volume constant ne reflète pas la réalité, en effet lorsque la membrane s'adapte au peptide, nous observons un étirement important des chaînes acétylés des lipides situés près du peptide. Or nous observons un détachement complet des deux bicouches, ce qui est peu probable dans la réalité. L'interaction électrostatique stabilise l'interface eau/membrane, et l'interaction

hydrophobe due au CH_3 terminaux des lipides ne stabilise presque pas le système. Le système n'est pas à l'équilibre au début de la simulation, en effet il y a une interaction hydrophobe/hydrophile très défavorable due à la présence des résidus valines à l'interface. De plus l'interaction électrostatique est plus forte que l'interaction hydrophobe, c'est donc au niveau des CH_3 que la membrane se casse. Le fait d'être à volume constant a forcé la membrane à s'adapter et les bicouches se sont totalement détachées. L'épaisseur de la bicouche a augmenté de façon très importante. Cet effet est peut-être dû au manque de contraintes dans la boîte mais certains travaux ont déjà prouvé que l'épaisseur d'une membrane était capable de s'adapter à la longueur hydrophobe d'un peptide inséré. P. Aller a étudié la stabilité conformationnelle des dimères Neu^{TM35} des domaines transmembranaires des récepteurs à tyrosine kinase dans des bicouches de DMPC et de POPC et a observé des changements d'épaisseur des bicouches. L'insertion du dimère dans la membrane a été réalisée de façon à ce que la partie hydrophobe de la séquence de 25 résidus (Val6-Ile30) soit située dans la partie hydrophobe de la membrane. Les calculs ont été effectués pendant 6 ns. L'épaisseur initiale des bicouches est de 34 Å pour le DMPC et 38 Å pour le POPC. En fin de simulation, la membrane s'est épaissie pour atteindre une valeur moyenne d'environ 35.6 Å, l'épaisseur de la membrane de POPC a diminué pour atteindre une valeur de 35.8 Å. Ces variations montrent que la bicouche s'est adaptée à la longueur hydrophobe du peptide inséré (Aller, 2004). Leur étude a montré que les bicouches se sont adaptées au peptide et que les hélices se sont un peu inclinées.

- Adaptation du peptide à pression constante

A pression constante, nous avons observé une inclinaison du peptide dans la membrane et une déstructuration des extrémités du peptide. Théoriquement le squelette peptidique aurait pu s'adapter à un mésappariement positif, en passant d'une hélice α vers une hélice π . Cependant, ceci ne semble pas être une réponse favorable, puisque le peptide $\text{K}_2\text{V}_{32}\text{K}_2$ montre une hélice α stable mais dont le pourcentage diminue (à 2 ns, environ 50% du peptide est en hélice α). Le groupe de Petrache a beaucoup travaillé sur la modélisation de peptides synthétiques pour étudier le mécanisme de mésappariement hydrophobe (Woolf *et al.*, 2002). Ces études ont été effectuées sur les peptides polyleucine-alanine WALP (séquence : A-W-W-(L-A) n -L-W-W-A avec n variant de 4 à 8) incorporés dans des bicouches de DMPC et de DPPC. Ils observent eux aussi une stabilité

des hélices α et une inclinaison permanente des peptides. Les angles d'inclinaisons sont compris entre 10° et 20° . Les résultats de simulation sont proches des données de FTIR mais montrent clairement que l'angle d'inclinaison dépend plus des paramètres que de la longueur des peptides uniquement (nature des résidus en extrémités, nature des résidus dans le cœur etc.). Tout comme nous, ils n'ont pas encore observé une transition $\alpha \rightarrow \pi$ lors de leurs études.

- Les limitations de la modélisation moléculaire

La modélisation connaît quelques limitations dans l'étude du mésappariement hydrophobe. Les systèmes simulés de membrane sont limités dans le temps et en taille. Les vraies membranes disposent d'un plus grand choix de dynamique. Le domaine de temps des mouvements des membrane lipidiques s'étend de la nanoseconde à la microseconde (diffusion des lipides) et à la seconde (phénomène de flip-flop), or les temps de simulations sont de quelques nanosecondes et sont donc trop courts pour observer ces mouvements. Il est de plus impossible d'observer toutes les possibilités de mésappariement positif, plus particulièrement l'oligomérisation du peptide et la non interaction du peptide avec la membrane.

4. Conclusions

Après avoir effectué tous ces calculs, nous avons pu répondre partiellement à nos deux questions initiales.

Les résultats en solvant implicite, nous ont permis d'observer une hélice π stable. Le peptide KV₂₀K présente toutes les caractéristiques du bon candidat. De plus nos analyses ont montré que ce peptide a la faculté de plasticité. En effet des transitions $\alpha \rightarrow \pi$ et réciproquement sont observables dans les deux milieux. Nous avons donc décidé de synthétiser ce peptide sur support solide. Les conditions de purifications ne nous ont pas encore permis d'obtenir un peptide pur et malheureusement nous n'avons pas encore pu prouver par DC et/ou par RMN que le peptide KV₂₀K était le modèle idéal. Dès que les conditions de purification de ce peptide seront au point, nous pourrons aussitôt effectuer les expériences de dichroïsme circulaire et vérifier si l'expérience va dans le sens des calculs. Il serait de plus intéressant de réaliser des simulations de KV₂₀K en solvant explicite (eau et octanol) en configuration de départ hélice α et hélice π .

Nous noterons aussi que pour obtenir un peptide relativement stable en hélice, il faut un minimum de 20 résidus. La plupart des peptides de plus de 20 résidus étaient stables (excepté KA₂₀K) en hélice (α ou π). KV₁₂K possède 14 résidus et toutes les hélices se sont déstabilisées. Comme nous l'avons vu le choix du résidu est crucial, chaque résidu possède des propriétés particulières (les polyalanines sont instables, les polyleucines sont très stable en hélice α , les polyisoleucines conservent toujours leur configuration initiale et les polyvalines sont stables en hélice π).

Les simulations en bicouche de DMPC ont montré que la membrane s'adaptait au peptide à volume constant et que le peptide s'adaptait à la membrane à pression constante. En revanche, le peptide ne se structure pas en hélice π et il a donc été impossible de vérifier notre hypothèse sur l'élasticité de l'hélice π en milieu membranaire. Nos résultats actuels ne prouvent pas que l'hélice π puisse s'adapter à une épaisseur de membrane donnée. Il aurait été intéressant de pouvoir observer une transition $\alpha \rightarrow \pi$ mais pour cela il aurait fallu réaliser beaucoup plus de simulations avec des durées de calculs plus longs et malheureusement, ces expériences coûtent très cher en temps. Pour examiner la stabilité conformationnelle dans le temps de ce peptide en milieu membranaire pendant 10 nanosecondes, on a besoin de plus d'un mois de calcul réparti sur 8 processeurs.

BIBLIOGRAPHIE

- Aller P, Voiry L, Garnier N, Genest M. Molecular dynamics (MD) investigations of preformed structures of the transmembrane domain of the oncogenic Neu receptor dimer in a DMPC bilayer. *Biopolymers*. 2005; **77**: 184-197.
- Aller P. Etude du domaine transmembranaire de récepteur à tyrosine kinase dans un environnement membranaire. Aspects structuraux et mécanistiques explorés par modélisation moléculaire. Thèse de l'université d'Orléans. 2004.
- Armen R, Alonso DOV, Dagget V. The role of α -, 3_{10} - and π -helix in helix coil transitions. *Protein Science*. 2003; **12**: 1145-1157.
- Aussenac F, Laguerre M, Schmitter JM, Dufourc EJ. Detailed Structure and Dynamics of Bicelle Phospholipids using selectively Deuterated and Perdeuterated Labels. ^2H -NMR and Molecular Mechanics Study. *Langmuir*. 2003; **19**: 10468-10479.
- Baker EN, Hubbard RE. Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1984; **44**, 97-179.
- Barlow DJ, Thornton JM. Helix geometry in proteins. *J. Mol. Biol.* 1988; **201**:601-619.
- Burkhart BM, Li N, Langs DA, Pangborn WA, Duax WL. The conducting form of gramicidin A is a right-handed double-stranded double helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; **95**: 12950-12955.
- Burkhart BM, Gassman RM, Langs DA, Pangborn WA, Duax WL, Pletnev V. Gramicidin D conformation, dynamics and Membrane ion Transport. *Peptide Science*. 1999; **51**: 129-144.
- Castano S, Desbat B, Laguerre M, Dufourcq J. Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic LiKj ($i=2j$) peptides. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1999; **1416**: 176-194.
- Creighton TE. *Proteins. Structures and Molecular Properties*. Second edition. 1993; 182-188. W. H. Freeman and Co. New York.
- De Planque MRR, Killian JA. Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides : role of hydrophobic matching and interfacial anchoring (review). *Molecular Membrane Biology*. 2003; **20**: 271-284.
- Garnier N, Crouzy S, Genest M. Molecular dynamics simulations of the transmembrane domain of the oncogenic ErbB2 receptor dimer in a DMPC bilayer. *J Biomol Struct Dyn*. 2003; **2**: 179-200.
- Goetz M, Carlotti C, Bontemps F, Dufourc EJ. Evidence for an α -helix \rightarrow π bulge helicity modulation for the neu/erbB-2 membrane-spanning segment. A ^1H NMR and circular dichroism study. *Biochemistry*. 2001; **40**: 6534-6540.

- Hasemann C, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Hasemann CA, Peterson JA, Deisenhofer J. Structure and function of cytochromes P-450---a comparative analysis of 3 crystal structures. *Structure*. 1995; **3**: 41-62.
- Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995; **80**: 213-223.
- Hessa T, Kim H, Bihlmaier K, Lundin C, Boekel J, Andersson H, Nilsson I, White SH, von Heijne G. Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon. *Nature*. 2005; **433**: 377-381.
- Houliston RS, Hodges RS, Sharom FJ, Davis JH. Characterization of the proto-oncogenic and mutant forms of the transmembrane region of Neu in micelles. *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 24073-24080.
- Kaiser ET, Kézdy FJ. Secondary structures of proteins and peptides in amphiphilic environments. (A review). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983; **80**: 1137-1143.
- Kyte J, Doolittle R. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 1982; **157**: 105-132.
- Léonard A, Escrive C, Laguerre M, Pebay-Peyroula E, Neri W, Pott T, Katsaras J, Dufourc EJ. Location of Cholesterol in DPMC Membranes. A Comparative Study by neutron Diffraction and Molecular Mechanics Simulation. *Langmuir*. 2001; **17**: 2019-2030.
- Low BW, Baybutt RB. The π -helix: a hydrogen bonded configuration of the polypeptide chain. *J. Am. Chem. Soc.* 1952; **74**: 5806-5807.
- Low BW, Greenville-Wells HJ. Generalized mathematical relationships for polypeptide chain helices. The coordinates of the π -helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1953; **39**: 785-801.
- Musso GF, Patthi S, Ryskamp TC, Provow S, Kaiser ET, Velicelebi G. Development of helix-based vasoactive intestinal peptide analogues: identification of residues required for receptor interaction. *Biochemistry*. 1988; **27**: 8174-8181.
- Padyana AK, Ramakumar S, Mathur P, Jagannathan NR, Chauhan VS. Role of a two-residue spacer in an alpha,beta-Didehydrophenylalanine containing hexapeptide: crystal and solution structure of Boc-val-deltaPhe-Leu-Ala- deltaPhe-Ala-OMe. *J Pept Sci.* 2003; **9**: 54-63.
- Petrache HI, Zuckerman DM, Sachs JN, Killian JA, Koeppe RE II, Woolf TB. Hydrophobic Matching Mechanism Investigated by Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir*. 2002; **18**: 1340-1351.
- Rabanal F, Ludevid MD, Pons M, Giralt E. CD of proline-rich polypeptides: application to the study of the repetitive domain of maize glutelin-2. *Biopolymers*. 1993; **33**: 1019-1028.
- Ramachandran, G, Sasisekharan H. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* 1968; **23**: 284-438.
- Sajot N, Genest M. Structure prediction of the dimeric neu/ErbB-2 transmembrane domain from multi-nanosecond molecular dynamics simulation. *Eur. Biophys. J.* 2000; **28**: 648-662.

- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinase. *Cell*. 2000; **103**: 211-225.
- Shirley WA, Brooks CL. Curious structure in "canonical" alanine based peptides. *Proteins*. 1997; **28**: 59–71.
- Sudha R, Kohtani M, Breaux GA, Jarrold MF. Pi-helix preference in unsolvated peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 2004; **126**: 2777-84.
- Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptor with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990; **61**: 203-12.
- Urry DW. The Gramicidin A Transmembrane Channel: A Proposed $\pi_{(L,D)}$ Helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1971; **68**: 672-676.
- Vainshtein BK, Melik-Adamyant WR, Barynin VV, Vagin AA, Grebenko AI, Borisov VV, Bartels KS, Fita IM, Rossmann G. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1986; **188**: 49-61.
- Weaver T, Banaszak L. Crystallographic Studies of the Catalytic and a Second Site in Fumarase C from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1996; **35**: 13955-13965.
- Weinman S, Méhul P. *Biochimie: Structure et fonction des protéines*. Dunod Edition. 2000.
- Wimley WC, White SH. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat. Struct. Biol.* 1996a; **3**: 842-848.
- Wimley WC, Creamer TP, White SH. Solvation Energies of Amino Acid Residues and Backbone in a Family of Host Guest Pentapeptides. *Biochemistry*. 1996b; **35**: 5109-5124.
- White SH, Wimley WC. Membrane protein folding and stability: Physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1999; **28**: 319–365.

Chapitre 6

Etude structurale de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} en solution et en milieu membranaire par dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire constitue une étape pour l'étude de la structure secondaire des peptides. Le spectre obtenu donne des informations sur la proportion de feuillet β , d'hélice α , d'hélice de type II, de pelote statistique et d'autres structures secondaires (cf. Chapitre 2). De plus l'analyse de certaines intensités permet d'obtenir des informations sur l'état agrégé des peptides.

Dans un premier temps, nous avons étudié la structure secondaire des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35}. Cette étude a été réalisée dans différents environnements. Les analyses ont tout d'abord été effectuées en solvant organique trifluoroéthanol (TFE) puis dans des bicouches de membranes modèles (bicelles).

Dans un second temps, nous avons voulu étudier le processus d'agrégation de ces peptides et déterminer s'il dépendait de la géométrie de l'interface membranaire sous forme micelles sphériques ou bicouches planes. Pour cela nous avons incorporé les peptides dans des bicouches lipidiques de type bicelles (constituées de DMPC/DCPC) pour ensuite analyser les ellipticités aux longueurs d'ondes 208 et 220 nm.

1. Introduction

Depuis quelques années, plusieurs groupes cherchent d'une part à connaître la structure des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} et d'autre part à comprendre les paramètres qui stabiliseraient les dimères des récepteurs ErbB2.

La structure du peptide Neu_{TM35} a déjà été étudiée par CD en solution (TFE) et en modèle de membranes (micelles de SDS, micelles de DPC, bicelles) (Goetz *et al.*, 2001; Houliston *et al.*, 2004). Ces résultats montrent que le peptide Neu_{TM35} se structure majoritairement en hélice α . Il est intéressant de noter que des études en RMN ont montré que le peptide Neu_{TM35} possédait 74% d'hélice α , 17% d'hélice π et les 9% restant ne sont pas structurés (Goetz *et al.*, 2001). Pour le peptide Neu*_{TM35}, seules les études par CD en TFE et en micelles ont été effectuées, les études en bicelles n'ont pas encore été réalisées. De même que pour le peptide sauvage, il a été montré que le peptide muté se structure majoritairement en hélice α (Houliston *et al.*, 2004). Ce groupe a déterminé le pourcentage de structure secondaire des peptides par la méthode d'analyse des intensités des longueurs d'onde à 208 et 220 nm et à l'aide du programme de déconvolution CDNN (Bohm *et al.*, 1992). Avec la première méthode, ils trouvent entre 75% et 85% d'hélice α et avec la deuxième méthode entre 60 et 65%. Goetz a utilisé la méthode de Manavalan et Johnson (Manavalan et Johnson, 1987) et trouve 80% d'hélice α pour le peptide Neu_{TM35} (Goetz *et al.*, 2001). Ces résultats ne sont pas toujours en accord, ceci est dû aux différences des méthodes d'analyse des données DC. C'est pour cela que nous avons décidé de tester plusieurs programmes de déconvolution afin de trouver lequel était le mieux adapté à l'étude de nos peptides. Les données structurales de Neu_{TM35} obtenues par RMN-¹H nous ont servi pour comparer les résultats des différents programmes (Goetz *et al.*, 2001). Il existe à l'heure actuelle plusieurs programmes de déconvolution (CDPro2, CDNN etc...). Ces programmes permettent de connaître la structure secondaire d'un peptide ou d'une protéine à partir de leurs spectres expérimentaux dichroïques. Les programmes ne sont pas tous identiques, en effet ils possèdent des bases de données différentes et ne comprennent pas tous les mêmes structures secondaires. Comme nous l'avons vu au Chapitre 2, ils renferment beaucoup de structures canoniques. De plus l'ajustement des courbes modèles avec le spectre expérimental n'est pas toujours correct, car les courbes modèles contiennent un mélange de structures secondaires. Parce que nous estimons que ce programme n'est pas adapté aux peptides, nous avons décidé de créer un nouveau programme de déconvolution au laboratoire CDFriend, qui comprend les 4 structures canoniques principales. La déconvolution des spectres de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} avec ce programme a donné de bons résultats. Il est important de noter que tous ces programmes possèdent tous l'inconvénient de ne pas contenir l'hélice π . Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, aucun peptide

ne se structure complètement en hélice π et par conséquent aucun de ces programmes ne peut donner un résultat exact quant à la structuration de nos peptides.

Nous avons vu lors du chapitre 1 que la mutation (Val→Glu) permet l'activation spontanée du récepteur, par stabilisation de l'interface dimérique. Le domaine transmembranaire contribue à la dimérisation des récepteurs et l'hélice transmembranaire a un rôle très important dans ce processus. Il est donc très important d'étudier la dimérisation des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} en milieu membranaire. Sourgen a montré qu'on pouvait caractériser l'état agrégé (forme dimère) d'un peptide en étudiant la variation du rapport des intensités aux longueurs d'onde 208 nm et 220 nm en fonction de la température ou de la concentration (Sourgen *et al.*, 1996). Nous allons donc utiliser cette méthode afin de connaître l'état d'agrégation de nos peptides.

La première section de ce chapitre est consacrée à la structure des peptides dans le TFE. Nous allons étudier tout d'abord leurs structures secondaires puis l'influence de la concentration sur leurs structures. Les différents résultats seront exposés, puis discutés et nous présenterons de plus une étude comparative entre les différents programmes de déconvolution dont nous disposons. Nous détaillerons dans la deuxième section les résultats concernant la structure des peptides en membranes avec des interfaces de différentes géométries après avoir expliciter notre choix sur le modèle de membrane. Nos résultats seront ensuite discutés. Lors de la troisième et dernière section, nous présenterons l'étude du processus d'oligomérisation des peptides afin de mieux comprendre le mécanisme de dimérisation.

2. Matériaux et Méthodes

Au cours de nos expériences de dichroïsme circulaire, nous avons utilisé plusieurs types de modèles de membranes : des SUV (petites vésicules unilamellaires), des LUV (grandes vésicules unilamellaires), des bicelles formées de DMPC/DCPC et des bicelles formées de TBBPC/DCPC. La préparation de ces modèles de membranes ainsi que l'incorporation des peptides dans ces modèles sont explicitées en Annexe 2.

3. Résultats et Discussions

3.1. Etude structurale de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} en solution dans le TFE

La première étape de notre étude est de déterminer la structure secondaire de nos peptides en solvant organique, nous avons choisi le TFE qui "mime" la membrane.

Sur la Figure 1 sont représentés les spectres dichroïques des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} et de l'hélice α de référence. On remarque immédiatement que la forme des spectres des peptides est proche du spectre de l'hélice α de référence. Bien qu'il y ait des différences entre les courbes de l'hélice α de référence et celles des peptides, on observe sur les courbes des peptides les bandes d'absorption négatives à 208 et 220 nm et la bande d'absorption positive à 190 nm caractéristiques de l'hélice α . On remarque aussi que les intensités des maxima sont différentes. En effet, le spectre de l'hélice α de référence a une plus grande intensité que ceux des peptides. De plus le maximum à 190 nm de Neu_{TM35} est plus important que le maximum de Neu*_{TM35}. Ceci nous amènerait à penser que le peptide Neu_{TM35} a un pourcentage d'hélice α plus important que pour le peptide Neu*_{TM35}. Nous verrons le résultat des déconvolutions par la suite.

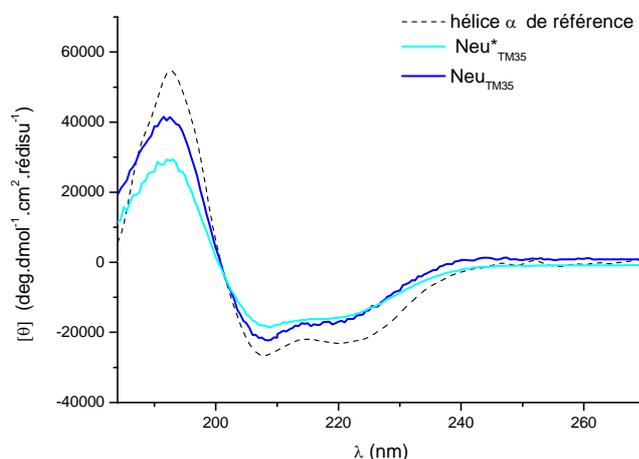


Figure 1 . Spectres dichroïques des fragments transmembranaires Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans le TFE à température ambiante et à une concentration de 500 μ M. Le spectre de l'hélice α de référence est représenté en pointillé.

Sur la Figure 2 sont représentés les spectres du peptide Neu*_{TM35} et des peptides Neu*_{TM35}¹⁵N₄ et Neu*_{TM35}¹⁵N₂. On notera que ces spectres sont proches du spectre de Neu*_{TM35}.

Les différences observées ne sont pas significatives, en effet l'erreur expérimentale est de l'ordre de 5% et pourrait être à l'origine de ces différences.

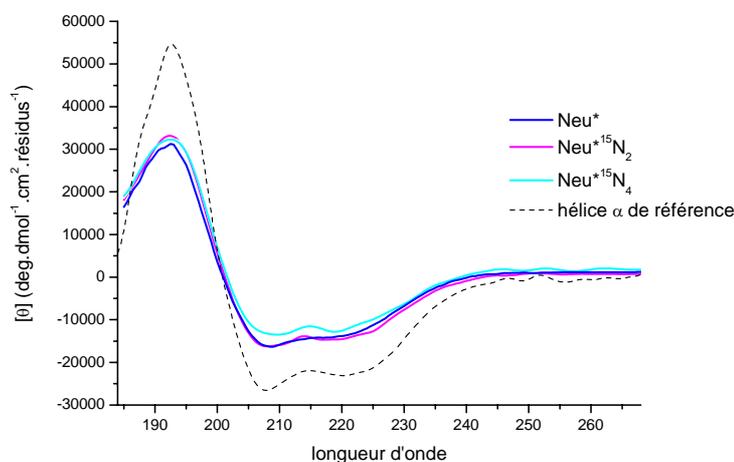


Figure 2. Spectres dichroïques du fragment transmembranaire Neu*_{TM35} et des fragments transmembranaires Neu*_{TM35}¹⁵N₄ et Neu*_{TM35}¹⁵N₂ dans le TFE, à température ambiante et à une concentration $c=500 \mu\text{M}$. L'hélice α de référence est représentée en pointillé.

Afin de mettre en évidence l'influence de la concentration en peptide sur sa propre structure secondaire, nous avons suivi l'évolution des spectres en fonction de différentes concentrations en peptide (de $100 \mu\text{M}$ à 2mM).

La Figure 3 rend compte de l'homogénéité des spectres de Neu*_{TM35} qui ne sont pas modifiés après normalisation par la concentration. Par souci de clarté, seuls les spectres des concentrations $200, 400, 600$ et $800 \mu\text{M}$ sont représentés. Les spectres des concentrations $1000, 1500$ et $2000 \mu\text{M}$ n'ont pas été représentés mais il est intéressant de noter qu'il y a une saturation du signal dichroïque de 180 à 194nm . La concentration peptidique est élevée et l'absorbance résultante est donc trop importante, ce qui amène à une saturation. Cependant, il est à noter que la zone non saturée (entre 194 et 270nm) se superpose aux courbes de la Figure 3. Nous remarquons que ces quatre spectres sont très proches, il y a une légère différence au niveau des minima, mais ceci est probablement dû à l'erreur expérimentale. Cette observation nous conduit à penser que le peptide Neu*_{TM35} conserve un seul et même état de structuration dans le solvant TFE pour les différentes concentrations étudiées.

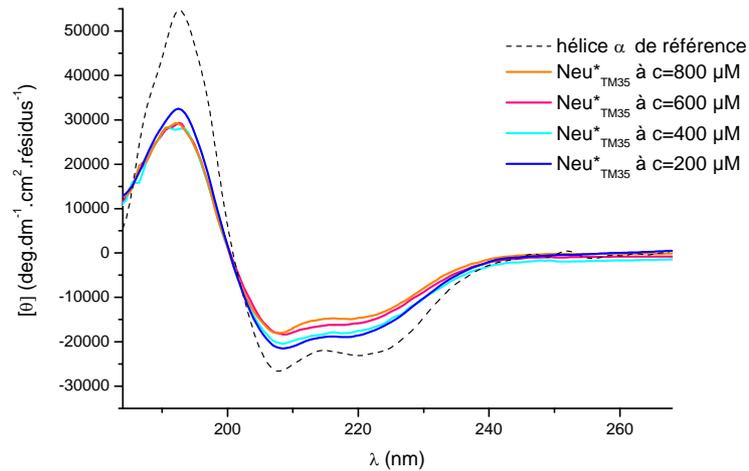


Figure 3. Spectres dichroïques du fragment transmembranaire Neu*_{TM35} à température ambiante et à différentes concentrations : $c=200 \mu\text{M}$ (en bleu), $c=400 \mu\text{M}$ (spectre en cyan), $c=600 \mu\text{M}$ (en rose) et $c=800 \mu\text{M}$ (en orange). Le spectre de référence de l'hélice α est indiqué en pointillé.

La même étude a été réalisée sur le peptide Neu_{TM35}. La Figure 4 rend compte de l'homogénéité des spectres de Neu_{TM35} qui ne sont pas modifiés après normalisation par la concentration. De même que précédemment, par souci de clarté, seuls les spectres des concentrations 200, 400, 500, 620 et 850 μM sont représentés. Les concentrations au-delà de 1000 μM ne sont pas représentées pour les mêmes raisons que précédemment (saturation entre 180 et 194 nm).

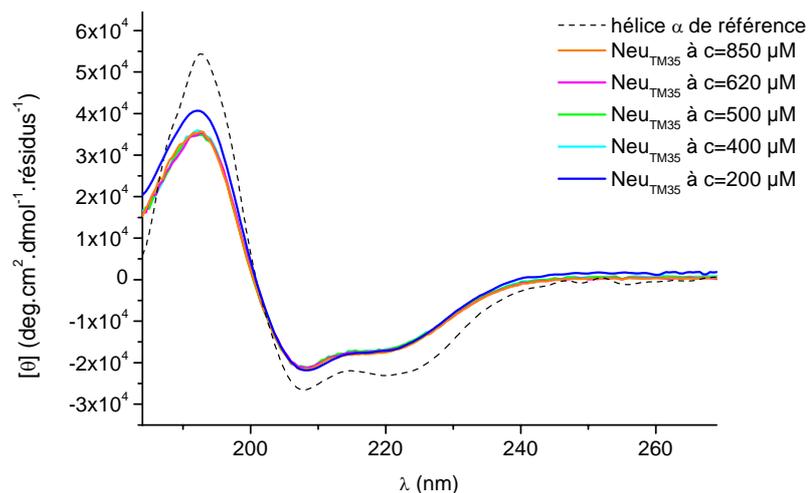


Figure 4. Spectres dichroïques du fragment transmembranaire Neu_{TM35} à température ambiante et à différentes concentrations : $c=400 \mu\text{M}$ (spectre en rouge), $c=500 \mu\text{M}$ (en rose), $c=620 \mu\text{M}$ (en cyan) et $c=850 \mu\text{M}$ (en bleu). Le spectre de référence de l'hélice α est indiqué en noir.

Nos résultats montrent donc que les peptides conservent un seul état de structuration. Il n'y aurait donc pas de phénomène d'auto-association ou d'agrégation observés dans la gamme de concentration (de 100 μM à 2000 μM) dans ce solvant. Une variation en température a aussi été réalisée entre 10 et 40°C (Aussenac, 2002). Les résultats montrent que la température n'a aucune influence sur la structure du peptide (entre 10 et 40°C).

- Choix du programme de déconvolution

Pour estimer la structure secondaire des peptides, l'analyse des spectres expérimentaux a été effectuée en utilisant les logiciels de CDPro2 (Sreerama et Woody, 1993) et CDFriend (Sébastien Buchoux, non publié). Comme nous l'avons vu au Chapitre 2, le logiciel CDPro2 possède 10 bases. Les bases notées de 1 à 8 possèdent entre 22 et 48 structures de protéines solubles. Les bases 9 et 10 comprennent en plus des structures des protéines solubles, 13 structures de protéines membranaires. Nous avons choisi d'utiliser les bases 10 et 5 (Sreerama et al., 2000 ; Johnson, 1999 ; Yang et al., 1986) avec la méthode CONTILL (Sreerama et Woody, 2000). Dans un premier temps, nous avons choisi une des deux bases qui possèdent des structures de protéines membranaires. La base 10 comprend plus de structures que la base 9. C'est pour ces raisons que nous avons dans un premier temps choisi la base 10. En revanche les structures secondaires incluses dans cette base sont hélice régulière, hélice distordue, feuillet régulier, feuillet distordu, coude et pelote statistique. La base 5 renferme l'hélice α et 4 autres structures secondaires dont le feuillet β , l'hélice de type II, le coude et la pelote statistique. C'est cette base que nous avons choisie dans un second temps. Néanmoins, il faut noter que cette base contient 37 structures de protéines toutes solubles.

Le programme CDFriend donne un résultat comprenant les structures secondaires suivantes : hélice α , feuillet β , hélice de type II et pelote statistique. A l'inverse de CDPro2, ce programme se base sur la structure de peptides qui sont à 100% dans l'une des sous structures canoniques principales. Ces peptides sont constitués de motifs répétés de lysine et leucine (peptide LK) et présentent soit une structure en hélice α soit en feuillet β pour l'ensemble de leurs résidus, les structures ont été déterminées par des expériences en spectroscopie Infra-Rouge (Castano et al., 1999a ; Castano et al. 1999b). Le spectre dichroïque caractérisant l'hélice de type II (hélice

gauche avec 3 résidus par tour) a été effectué avec la poly-L-proline de Sigma. Le spectre caractérisant la pelote statistique a été réalisé avec une poly-lysine à pH neutre (Shibata *et al.*, 1992).

Le programme CDNN possède 33 structures secondaires de protéines, mais n'est actuellement pas disponible. Ce programme n'a donc pas été testé.

La structure tridimensionnelle du peptide Neu_{TM35} a été résolue par RMN en solvant organique (TFE) (Goetz *et al.*, 2001). Les données de RMN donnent 74% d'hélice α , 17% d'hélice π et 9% de pelote statistique. Ces données vont nous servir pour comparer les résultats de déconvolution des programmes. Il est bon de rappeler que l'hélice de type π n'existe dans aucun des programmes.

Nous avons donc réalisé un spectre dichroïque témoin de Neu_{TM35} et nous l'avons déconvolué avec les deux programmes afin de choisir le mieux adapté. Les résultats sont donnés dans le tableau 1.

	Hélice α §	Pelote statistique	Feuillet β §	Hélice de type II	
CDFriend §	76	19	0	5	
CDPro2 base 5 §	50	28	18	4	
	Hélice régulière et distordue #	Pelote statistique	Feuillet régulier et distordu #		
CDPro2 base 10 #	58	26	16		
	Hélice α	Pelote statistique	Feuillet β	Hélice de type II	Hélice π
Données RMN*	74	9	0	0	17

Tableau 1. Résultats des déconvolutions avec les programmes CDFriend et CDPro2 des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35}. Les résultats sont exprimés en pourcentage. Les bases 5 et 10 et la méthode CONTILL de CDPro2 ont été choisies. § L'hélice α et le feuillet β sont contenus dans la base de CDFriend et dans la base 5 de CDPro2, # la base 10 de CDPro2 donne le résultat en fonction des hélices régulières et distordues et des feuillets réguliers et distordus. La précision est de l'ordre de 5% pour ces deux méthodes. *d'après Goetz *et al.*, 2001.

Comme nous pouvons le constater le programme CDFriend est le mieux adapté pour le peptide Neu_{TM35}. En effet, ce programme trouve 76% d'hélice α et 19% de pelote statistique et d'après les données de RMN, le peptide se structure à 74% en hélice α et 9% en pelote statistique. La différence au niveau de la pelote statistique est probablement due au fait qu'il n'y ait pas d'hélice π dans le programme.

Le résultat des déconvolutions avec le logiciel CDPro2 n'est pas en adéquation avec les résultats de RMN. En effet, ce programme trouve 50% d'hélice α avec la base 5 et 58% d'hélice régulière et distordue avec la base 10. Ce programme donne un faible pourcentage d'hélicité par rapport aux données RMN. Par ailleurs, il trouve entre 16 et 18% de feuillet β , or d'après les données de RMN, ce peptide ne se structure pas en feuillet β .

En considérant ces résultats, le programme CDPro2 n'a pas été choisi, c'est donc le programme CDFriend que nous avons utilisé pour toutes les analyses de déconvolution qui suivent.

- Déconvolution des peptides

La déconvolution a été effectuée sur des spectres expérimentaux des peptides. Les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} ont été synthétisés plusieurs fois et à chaque nouvelle synthèse, un spectre dichroïque a été enregistré puis déconvolué. Une moyenne a donc été calculée pour déterminer la structure secondaire de ces deux peptides. Les synthèses des peptides marqués n'ont été effectuées qu'une seule fois et la déconvolution a donc été calculée à partir d'un seul spectre expérimental. Le Tableau 2 nous donne les résultats de la déconvolution pour les peptides.

	Neu	Neu ¹⁵ N ₂	Neu ¹⁵ N ₄	Neu*	Neu* ¹⁵ N ₄	Neu* ¹⁵ N ₂
Hélice α	76	73	75	63	61	65
Hélice de type II	5	5	3	10	14	9
Feuillet β	0	2	0	5	0	0
Pelote statistique	19	20	22	22	25	26

Tableau 2. Résultats des déconvolutions des peptides Neu_{TM35}, Neu_{TM35}¹⁵N₂, Neu_{TM35}¹⁵N₄, Neu*_{TM35}, Neu*_{TM35}¹⁵N₂ et Neu*_{TM35}¹⁵N₄ en solvant organique (TFE) à température ambiante réalisés avec le programme CDFriend (les données sont exprimées en pourcentage).

Après déconvolution des différents spectres expérimentaux, on obtient pour le peptide Neu_{TM35} $74\% \pm 3$ d'hélice α et pour le peptide Neu*_{TM35} $63\% \pm 3$ d'hélice α . Les peptides marqués à l'azote 15 possèdent la même structuration que les peptides non marqués.

- Discussion

Trois grandes informations nous ont parus importantes à l'issue de toutes ces analyses : i) nos résultats de déconvolution vont dans le sens des résultats de Houlston et Goetz mais sont plus précis (Houlston *et al.*, 2004 ; Goetz *et al.*, 2001), le nouveau programme CDFriend élaboré au Laboratoire donne de bons résultats quant à la structuration de nos peptides, ii) les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} se structurent majoritairement en hélice α , en revanche le peptide Neu*_{TM35} a un pourcentage d'hélicité plus faible que le peptide Neu_{TM35} et iii) les peptides conservent un seul et même état de structuration dans le TFE. Nous allons discuter les trois différents points ci-dessous.

Beaucoup de méthodes et de programmes de déconvolution sont disponibles pour déterminer les structures des peptides et des protéines (CDNN, CDPro, CDFriend...). Houlston a déterminé le pourcentage d'hélicité du peptide Neu_{TM36} grâce à deux méthodes (Houlston *et al.*, 2004). Lors de sa première méthode il a estimé le pourcentage d'hélice en utilisant un algorithme de déconvolution à l'aide du programme CDNN (Bohm *et al.*, 1992). Ce programme possède 33 structures secondaires de protéines et comprend les structures secondaires suivantes : hélice α , feuillet parallèle, feuillet anti-parallèle, coude et pelote statistique. Avec cette méthode, il trouve pour le peptide Neu_{TM36} entre 60% et 65% d'hélice α . Sa deuxième méthode est basée sur la valeur molaire d'ellipticité à 222 nm ($[\theta]_{222}$) comme décrit par Chang (Chang *et al.*, 1978). Avec cette méthode il trouve entre 75% et 85% d'hélice α . Goetz a utilisé la méthode décrite par Manavalan et Johnson (Manavalan et Johnson, 1987) pour déterminer le pourcentage d'hélicité dans le peptide Neu_{TM35}. Cette méthode donne 80% d'hélice α pour la structure du peptide Neu_{TM35}. Toutes ces méthodes donnent entre 60 et 85% d'hélicité pour le peptide Neu_{TM35}. Il est intéressant de noter que pour ces différents programmes, l'erreur est d'environ 5%. Malgré cette erreur, la déconvolution avec le programme CDNN donne un pourcentage trop faible d'hélicité (60-65%) et n'est donc pas adaptée. La méthode décrite par Chang donne entre 75 et 85%

d'hélice α et celle décrite par Manavalan et Johnson trouve 80%. Ces programmes sont mieux ajustés que le précédent. Avec le programme CDFriend, on obtient 76% d'hélice α et d'après les données de RMN, il y a 74% d'hélice α . Notre méthode, récemment mise au point au Laboratoire nous a permis d'obtenir un résultat plus proche du résultat de la RMN.

Les résultats préliminaires dans le TFE n'indiquent pas de grandes différences entre la structure du peptide sauvage Neu_{TM35} et muté Neu*_{TM35}. La structure majoritaire de ces deux peptides est l'hélice α mais on notera toutefois que le peptide Neu_{TM35} a un pourcentage un peu plus important d'hélicité (un peu plus de 10%). Notre étude indique clairement que moins d'hélice α est trouvée dans Neu*_{TM35}, un résultat qui pourrait être attribué à la présence de l'acide glutamique (en position 15) au milieu de la séquence hydrophobe de Neu*_{TM35} et qui pourrait perturber voire rompre l'hélicité. On aurait alors une rupture de l'hélicité au milieu de la séquence due à la présence de l'acide glutamique, et donc une diminution du pourcentage d'hélice α lors de la déconvolution. On remarque aussi que les peptides marqués à l'azote 15 se structurent comme les peptides non marqués. Les pourcentages d'hélicité sont très proches. Nos résultats vont dans le sens des résultats de Houliston et de Goetz, ils montrent que les peptides se structurent majoritairement en hélice α (Houliston *et al.*, 2004 ; Goetz *et al.*, 2001). Comme nous avons vu précédemment, Goetz trouve 80% d'hélice α et Houliston entre 60 et 85%. Il est à noter que la précision est de l'ordre de 20% avec leurs méthodes et de 5% avec la nôtre. Nos résultats sont donc plus précis. Nous remarquons d'autre part qu'il y a une légère différence avec les résultats de Houliston, néanmoins il faut mentionner que Houliston a étudié le peptide Neu_{TM36} (²QRASPVTFIATVVGVLFLILVVVVGILIKRRRQK³⁶) et nous avons étudié le peptide Neu_{TM35} (¹EQRASPVTFIATVVGVLFLILVVVVGILIKRRR³⁵). Comme nous pouvons le constater, ces deux séquences possèdent quelques divergences au niveau de 3 acides aminés (en fin et en début de séquence) et il est fort probable que cela soit à l'origine des petites différences des résultats de déconvolution.

Les études sur l'influence de la concentration sur la structure des peptides montrent que la forme des spectres est indépendante de la concentration et donc que les peptides conservent un seul état de structuration dans le solvant TFE. Il n'y a donc pas de phénomène d'auto-association

ou d'agrégation observé dans la gamme de concentration étudiée (de 100 μM à 2000 μM). Lorsque des peptides s'oligomérisent ou se dimérisent, le spectre dichroïque montre d'une part une intensité plus grande à 190 nm et d'autre part des intensités de valeurs très proches pour les minima à 208 et 220 nm. Ce type d'analyse a été réalisé par Sourgen (Sourgen *et al.*, 1996) pour caractériser l'état agrégé d'un peptide de 28 résidus. Lorsque le rapport $\Delta\epsilon_{220\text{nm}}/\Delta\epsilon_{208\text{nm}}$ est de 0.8, le peptide est sous forme monomère, en revanche lorsque le rapport est proche de 1.0 le peptide est sous forme agrégée (Lau *et al.*, 1984 ; Cooper et Woody, 1990). Nous remarquons que nos spectres ont tous la même intensité à 190 nm et que les intensités des minima ne sont pas identiques, le rapport des intensités n'est donc pas de 1.0. Nos peptides sont donc sous forme monomère dans ce milieu. Goetz a étudié l'influence de la concentration sur la structure du peptide Neu_{TM35} (Goetz *et al.*, 2001). Il a suivi l'évolution des spectres de Neu_{TM35} en TFE allant de 200 μM à 2 mM. Ces spectres ont tous la même intensité à 190 nm. De plus il a tracé le rapport des intensités à 208 et 220 nm en fonction de la concentration peptidique et il a montré que ce rapport est 0.8 pour toutes les concentrations, le peptide est donc sous forme monomère. Nos résultats sont donc en accord avec les siens.

3.2. Etude structurale de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} insérés dans des membranes

La deuxième étape de cette étude nous a amené à modifier l'environnement du peptide hydrophobe afin de se rapprocher d'une membrane biologique.

- Choix du modèle de membranes

Plusieurs modèles de membranes ont été testés afin de savoir quel était le modèle le plus approprié. Nous avons choisi comme modèles des SUV de DMPC (diamètre moyen de 50 nm), des LUV de DMPC (diamètre moyen de 200 nm), des bicelles formées de DMPC/DCPC et des nouvelles bicelles formées de TBBPC/DCPC (récemment développé au Laboratoire par Cécile Loudet). Nous rappelons que la préparation de ces modèles de membranes est explicitée en Annexe 2. Les Figure 5 et Figure 6 montrent l'ellipticité $\Delta\epsilon$ des différents systèmes à 10°C et à 40°C. L'unité utilisée est $\Delta\epsilon$ pour les spectres de lipides, la normalisation par le nombre de résidus n'est évidemment pas possible et dans ce cas l'unité $[\theta]$ n'est pas adéquate.

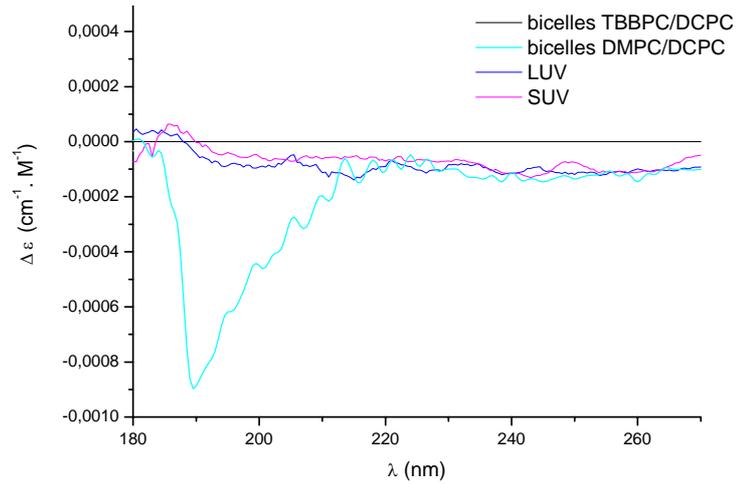


Figure 5. Spectres dichroïques des bicelles de DMPC/DCPC (en cyan), des bicelles de TBBPC/DCPC (en noir), des LUV de DMPC (en bleu) et des SUV de DMPC (en magenta) à T=40°C. (concentration en lipides totaux pour bicelles DMPC/DCPC 200 mM, bicelles TBBPC/DCPC 190 mM, LUV de DMPC 180 mM et SUV de DMPC 180 mM).

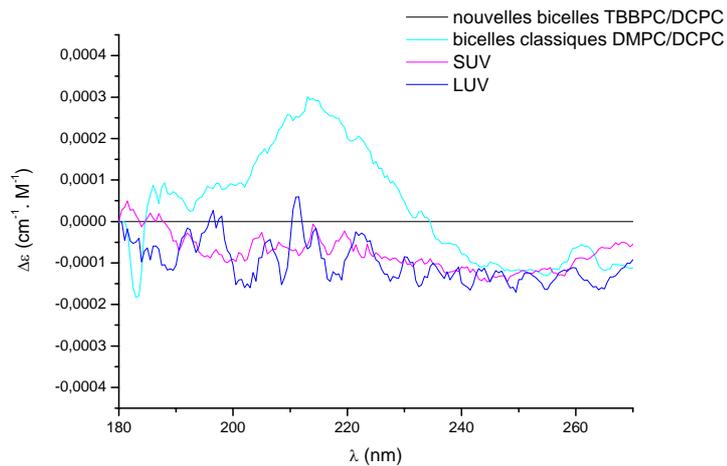


Figure 6. Spectres dichroïques des bicelles de DMPC/DCPC (en cyan), des bicelles de TBBPC/DCPC (en noir), des LUV de DMPC (en bleu) et des SUV de DMPC (en magenta) à T=10°C (concentration en lipides totaux pour bicelles DMPC/DCPC 200 mM, bicelles TBBPC/DCPC 190 mM, LUV de DMPC 180 mM et SUV de DMPC 180 mM).

Les bicelles formées de TBBPC/DCPC, d'aspect laiteux, mènent à une saturation du détecteur du CD dû à une forte diffusion de la lumière et à l'absorption des cycles phényles. Les bicelles formées de DMPC/DCPC, les SUV et les LUV montrent un signal dichroïque très faible. En comparaison, le $\Delta\epsilon$ à 190 nm d'un peptide (pour une concentration $c=200 \mu\text{M}$) est compris entre 300 et 500 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, tandis que celui des SUV, LUV et des bicelles de DMPC/DCPC est

compris entre 0.0002 et 0.0003 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. Les trois systèmes sont de bons candidats pour des spectroscopies optiques parce qu'ils produisent un spectre résiduel très faible. En revanche, les bicelles de TBBPC/DCPC ne peuvent pas être employées pour cette spectroscopie.

Les bicelles formées de DMPC/DCPC sont plus intéressantes que les SUV et les LUV parce que leur morphologie change en fonction de la température (Raffard *et al.*, 2000). Le domaine d'existence des bicelles pour une hydratation de 80% en masse s'étend de 65% à 88% de DMPC par mole et pour des températures comprises entre 25 et 45°C. Au-dessous de 25°C une phase isotrope est détectée (micelles mixtes ou bicelles de petites tailles), tandis qu'une phase lamellaire et une phase isotrope apparaissent à haute température. Lorsqu'on utilise ce système entre 10 et 40°C, nous avons un changement de morphologie, on passe de petites micelles aux objets discoïdes de diamètre de 50 nm. C'est pour toutes ces raisons que nous avons choisi d'incorporer nos peptides dans ces bicelles.

Nous avons incorporé les peptides dans des bicelles formées de DMPC/DCPC. Nous nous sommes placé à 90% d'hydratation et à 80% de DMPC en mole. Pour cette composition particulière, les bicelles adoptent la forme d'une bicouche discoïdale d'un diamètre de 500 Å et les bicelles sont formées entre 35 et 43°C (Raffard *et al.*, 2000). Nous avons réalisé une variation thermique sur ce système. La Figure 7 représente les spectres dichroïques des bicelles à différentes températures.

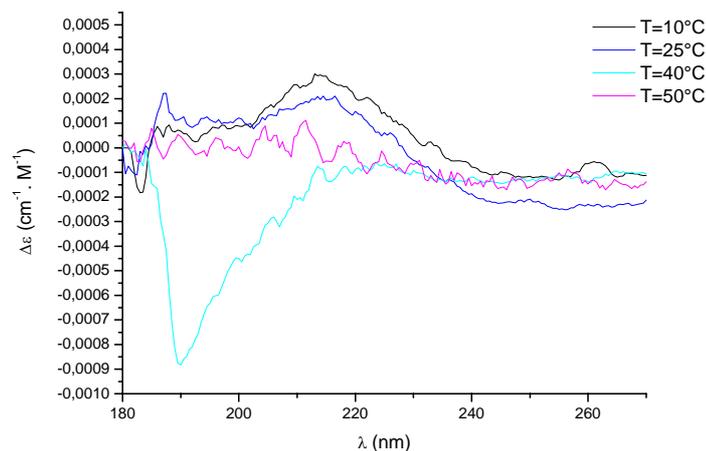


Figure 7. Spectres dichroïques de bicelles (X=80% mole de DMPC, 90% d'hydratation) en fonction de la température (concentration lipidiques 200 mM). Le spectre en noir et le spectre en bleu correspondent aux températures de 10 et de 25°C. Le spectre en cyan correspond à T=40°C et le spectre en magenta à T=50°C.

Nous constatons que le signal dichroïque résiduel provenant de la matrice lipidique est très faible, comparé au $\Delta\epsilon$ d'un peptide. Ce signal est cependant soustrait pour l'analyse en réalisant un "blanc" pour toutes les expériences avec le peptide.

- Analyse de la structure secondaire de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans des bicelles de DMPC/DCPC

La Figure 8 représente le spectre dichroïque du peptide Neu_{TM35} à T = 10 et T = 40°C dans des bicelles de DMPC/DCPC. Le signal de la membrane a été soustrait. Pour les basses températures (entre 10 et 30°C), notre échantillon présente une phase isotrope de type micelles mixtes. Le spectre dichroïque enregistré est assez proche du spectre en solvant TFE. Le maximum à 190 nm est un petit plus élevé ($[\theta] = 42000 \text{ deg.dmol}^{-1}.\text{cm}^2.\text{résidus}^{-1}$) que celui du spectre en TFE ($[\theta] = 35000 \text{ deg.dmol}^{-1}.\text{cm}^2.\text{résidus}^{-1}$). Pour des températures comprises entre 35 et 43°C, notre échantillon est en phase bicellaire. Le spectre dichroïque du peptide en bicelles est principalement le même que celui en solvant TFE. On notera toutefois un changement important de l'intensité du spectre. Le maximum à 190 nm est beaucoup plus intense ($[\theta] = 86000 \text{ deg.dmol}^{-1}.\text{cm}^2.\text{résidus}^{-1}$) et les intensités des minima à 208 et 220 nm sont approximativement identiques. On remarque que le signal dichroïque du peptide à 10 et 40°C, en milieu bicellaire, est saturé de 184 à 190 nm.

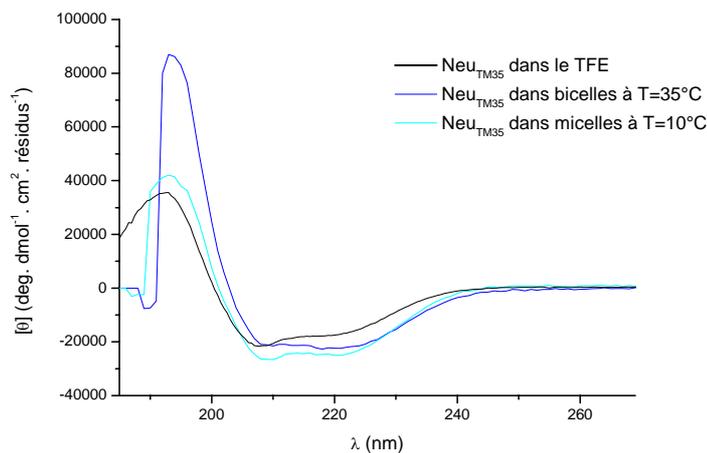


Figure 8. Spectres dichroïques de Neu_{TM35} dans des bicelles isotropes (micelles) à T = 10°C (en cyan) et dans des bicelles à T = 40°C (en bleu). Le spectre dichroïque de Neu_{TM35} dans le TFE à température ambiante est représenté en noir. La concentration de Neu_{TM35} est $c = 600 \mu\text{M}$ (ratio molaire peptide/lipide 1/900).

La Figure 9 représente le spectre dichroïque du peptide Neu*_{TM35} dans des bicelles de DMPC/DCPC à T= 10 et T=40°C. Le signal de la matrice lipidique a été soustrait. Les spectres enregistrés sont proches du spectre en solvant TFE. On remarque que les intensités du maximum à 190 nm à T=10°C en bicelle ($[\theta] \approx 33000 \text{ deg.dmol}^{-1}.\text{cm}^2.\text{résidus}^{-1}$) et en solvant TFE ($[\theta] \approx 28000 \text{ deg.dmol}^{-1}.\text{cm}^2.\text{résidus}^{-1}$) sont proches. De plus on voit que le maximum à 190 nm est plus intense à T= 40°C, c'est-à-dire en phase bicellaire, qu'à T=10°C. En effet l'intensité de ce maximum est de 45000 deg.dmol⁻¹.cm².résidus⁻¹. De même que pour Neu_{TM35}, on remarque que les intensités des minima à 208 et 220 nm sont approximativement identiques.

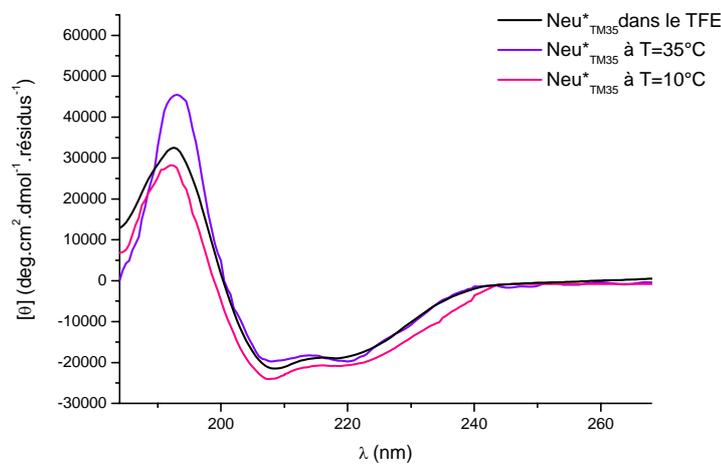


Figure 9. Spectres dichroïques de Neu*_{TM35} dans des bicelles à T= 10°C (en rose) et à T= 40°C (en mauve). Le spectre dichroïque de Neu_{TM35} dans le TFE à température ambiante est représenté en noir. La concentration de Neu_{TM35} est c=650 μM (ratio molaire peptide/lipide 1/900).

- Déconvolution des peptides

Des essais de déconvolution ont été effectués à l'aide du programme CDFriend. En bicelles les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} se structurent majoritairement en hélice α . A T=10°C, le peptide Neu_{TM35} se structure à 72% en hélice α et le peptide Neu*_{TM35} à 62%. A T=40°C en phase bicellaire, le peptide Neu_{TM35} se structure à 84% en hélice α et le peptide Neu*_{TM35} à 73%. Cependant nous avons obtenu des coefficients de corrélation de déconvolution très faibles (compris entre 0.85 et 0.95), or pour une déconvolution classique ce coefficient est de l'ordre de 0.99. Ce qui signifie que les courbes ne sont pas bien ajustées. En effet nous avons vu que l'intensité du maximum à 190 nm est plus importante dans le cas de Neu_{TM35} que de l'hélice α de référence.

L'ajustement entre les spectres de référence (notamment l'hélice α) et les spectres des peptides n'est donc pas correct. Le programme n'est pas adapté dans ce cas là.

- Discussion

Trois résultats nous ont paru importants à l'issue de toutes ces analyses : i) les LUV, les SUV et les bicelles de DMPC/DCPC sont de bons candidats pour la spectroscopie optique, ii) le programme de déconvolution CDFriend n'est pas adapté pour déterminer la structure secondaire des peptides lorsqu'ils se dimérisent ou s'oligomérisent et iii) les spectres de DC de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} en membrane sont proches des spectres en TFE. Nous allons discuter ces points dans ce qui suit.

Les spectres dichroïques des modèles de membranes ont montré que les SUV, les LUV et les bicelles formées de DMPC/DCPC sont de bons candidats pour la spectroscopie optique. En effet le signal dichroïque issu de ces matrices lipidiques est très faible et ne va par conséquent pas cacher le signal peptidique. En revanche, les nouvelles bicelles formées de TBBPC/DCPC ne sont pas utilisables pour ce type d'analyse. Cette matrice va dissimuler le spectre issu du peptide.

Le programme de déconvolution CDFriend n'est pas adapté pour l'étude structurale de peptides qui se dimérisent ou s'oligomérisent. Lorsque les peptides se dimérisent en solution ou en membrane, l'intensité de leurs maxima ou de leurs minima peut être supérieure à l'intensité de l'hélice α de référence. Dans ce cas l'ajustement, entre les courbes du peptide et des peptides standard, réalisé lors de la déconvolution n'est pas juste et le résultat ne sera pas bon. Dans notre cas, nous avons vu que la courbe du peptide Neu_{TM35} dépasse la courbe de l'hélice α de référence. La courbe du peptide n'est donc pas bien ajustée par rapport aux courbes des peptides standard (plus particulièrement l'hélice α). Pour ces raisons le coefficient de corrélation de déconvolution que nous obtenons, est très faible et nos résultats ne sont pas corrects.

Les résultats préliminaires montrent que dans les bicelles à T = 10°C et en solvant TFE, les spectres dichroïques sont assez proches. La forme des spectres est toujours caractéristique d'un peptide principalement structuré en hélice α . On notera toutefois deux changements lorsqu'on est

en membrane : i) l'intensité du maximum à 190 nm est plus importante en phase bicellaire qu'en TFE ou qu'en phase micellaire (isotrope) et ii) les intensités des minima changent lorsqu'on se situe en phase bicellaire, en effet les intensités à 208 et à 220 nm sont dans ce cas égales. Le rapport des ellipticités pour les longueurs d'onde à 208 et 220 nm nous permet de caractériser l'état agrégé (forme dimère ou oligomère) de peptides. Ces analyses ont été réalisées pour connaître l'état agrégé des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} et nous verrons les résultats dans la section 3.3. Des travaux ont déjà été effectués par Goetz (Goetz *et al.*, 2000) pour connaître la structure du peptide Neu_{TM35} à une concentration $c = 900 \mu\text{M}$ dans des bicelles de DMPC/DCPC (ratio molaire 1/600). Il note d'une part que l'intensité des maxima à 190 nm est plus importante dans les bicelles que dans le TFE et d'autre part les minima à 208 et 220 sont presque identiques. Ces résultats sont similaires aux nôtres. La forme des spectres est identique et les deux remarques faites précédemment (intensités) ont été observées. Houlston a étudié le comportement du peptide Neu_{TM36} et Neu*_{TM36} dans des micelles de DPC. Dans cet environnement, les peptides se structurent majoritairement en hélice α . Nous noterons que l'intensité à 190 nm est plus importante dans le cas de Neu_{TM35} que Neu*_{TM35}. De plus, cette intensité est plus importante que l'intensité de l'hélice α . Ce qui signifie que nous avons une structure dont l'asymétrie résultante est plus importante qu'une simple hélice α .

3.3. Etude détaillé du processus de dimérisation/oligomérisation de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans une membrane

Le paragraphe précédent nous indique qu'un changement d'état d'association se produit quand on passe de micelles à bicelles.

Nous avons étudié le rapport des intensités à 208 et 220 nm en utilisant les spectres effectués précédemment. Les peptides ont été incorporés dans des bicelles formées de DMPC/DCPC. Nous nous sommes placés à 90% d'hydratation et à 80% de DMPC en mole. Pour cette composition particulière les bicelles sont formées entre 35°C et 44°C (Figure 10).

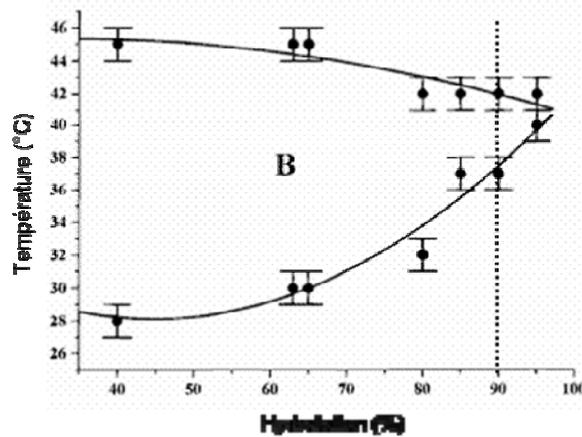


Figure 10. Domaine d'existence des bicelles en fonction de la température et de l'hydratation (X=78%, 100 mM KCl). B représente la région où les bicelles ont été observées par ³¹P-RMN. La ligne en pointillé représente le domaine d'existence pour une hydratation de 90% (d'après Raffard et al., 2000) .

Deux analyses ont été réalisées en parallèle, d'un côté nous avons étudié le processus d'oligomérisation des peptides par DC et d'un autre côté, nous avons déterminé les phases lipidiques dans lesquelles se trouve l'échantillon (isotrope, non orientée ou bicelles) par RMN-³¹P. L'échantillon est placé dans l'aimant pour les expériences de RMN et dans la cuve pour les expériences de DC à la température désirée (régulée à $\pm 1^\circ\text{C}$ pour la RMN et $\pm 2^\circ\text{C}$ pour le DC), cette situation est maintenue pendant 30 minutes pour permettre à l'échantillon d'atteindre l'équilibre thermique. Ces expériences de DC ont été réalisées pour les températures suivantes T=15, 20, 25, 30, 35 et 40°C et les expériences de RMN pour les températures suivantes T=25, 35 et 40°C. D'après le diagramme de phase établi à l'aide de RMN-³¹P par Raffard (Raffard et al., 2000), pour une hydratation de 80% et à 80% de DMPC en mole, à basse température (de 5°C à 20°C) on observe une phase isotrope, puis de 20°C à 25°C, on a un mélange de phase isotrope et de phase non orientée, ensuite entre 25°C et 35°C, la phase bicellaire apparaît. Au dessus de 35°C, on observe de nouveau un mélange de phase isotrope et non orientée et enfin à haute température (à partir de 55°C), on observe une phase lamellaire. Nous avons travaillé à une hydratation de 90% et pour cette hydratation, le diagramme température-composition n'a pas été établi. A basse température, la phase isotrope est présente. Nous savons de plus que la phase bicellaire est observée entre 35 et 44°C. On suppose qu'entre

les basses températures et 35°C, nous avons un mélange de phase isotrope et de phase non orientée.

La Figure 11A représente les spectres de RMN-³¹P du système Neu_{TM35} dans des bicelles de DMPC/DCPC et la Figure 11B représente les spectres dichroïques du système Neu_{TM35} dans des bicelles de DMPC/DCPC. A T=25°C, on observe un mélange de phase isotrope et de phase non orientée. A T=40°C (phase bicellaire), on obtient alors deux raies fines, correspondant au DCPC et DMPC, avec un déplacement chimique d'environ -2 ppm et -10 ppm. Ces deux raies sont caractéristiques des bicelles.

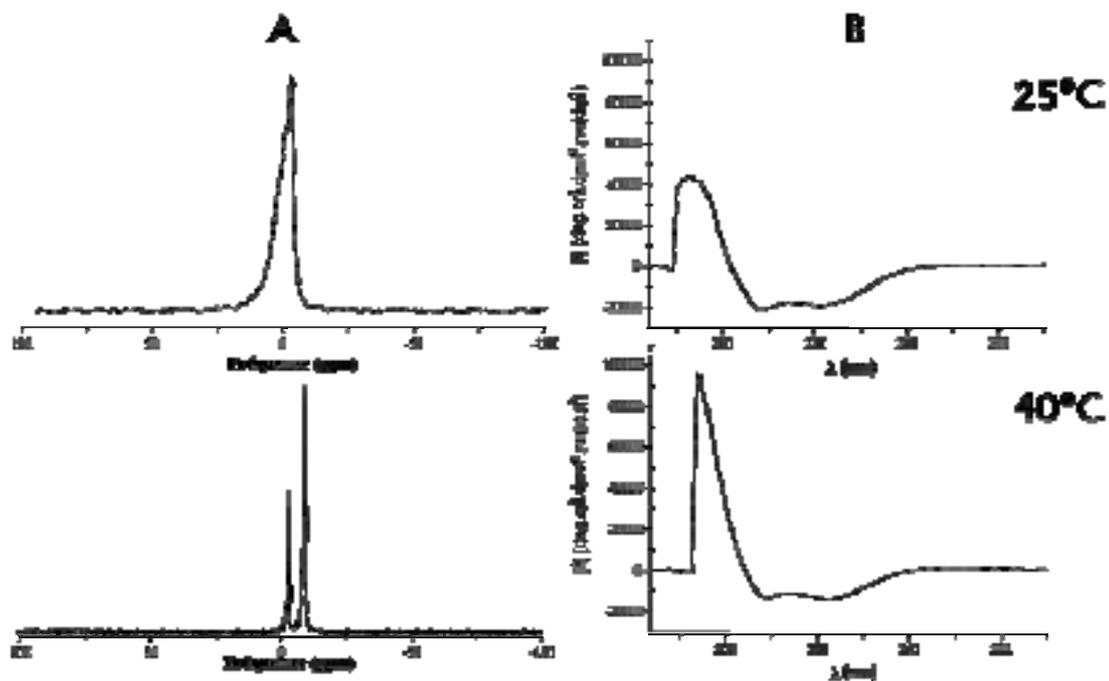


Figure 11. A) Spectre de RMN-³¹P du système Neu_{TM35} incorporé dans des bicelles à T=25°C (phase isotrope et phase non orientée) et 40°C (phase bicellaire). A 40 °C, les deux raies fines à -2 ppm et à -10 ppm sont caractéristiques du DCPC et du DMPC dans des bicelles. B) spectre dichroïque du système Neu_{TM35} incorporé dans des bicelles à T=25°C et 40°C (concentration $c_{\text{NeuTM35}} = 600 \mu\text{M}$, ratio molaire peptide/lipide 1/900).

La Figure 12 A représente la variation du rapport des intensités (208 et 220 nm) en fonction de la température. Les expériences DC montrent que pour le peptide Neu_{TM35}, le rapport $\Delta\epsilon_{220\text{nm}}/\Delta\epsilon_{208\text{nm}}$ est de 0.9 ± 0.05 pour des températures comprises entre 15°C et 30°C, le rapport est de 1.05 ± 0.05 pour T=35°C et T=40°C. Pour le peptide Neu*_{TM35}, ce rapport est

de 0.8 ± 0.05 pour des températures comprises entre 15°C et 30°C, le rapport est de 1.00 ± 0.05 pour T=35°C et T=40°C. Le rapport $\Delta\epsilon_{220nm}/\Delta\epsilon_{208nm}$ varie donc de 0.8 (pour le peptide Neu*_{TM35}) et de 0.9 (pour le peptide Neu_{TM35}) à 1 quand on passe de micelles à bicelles.

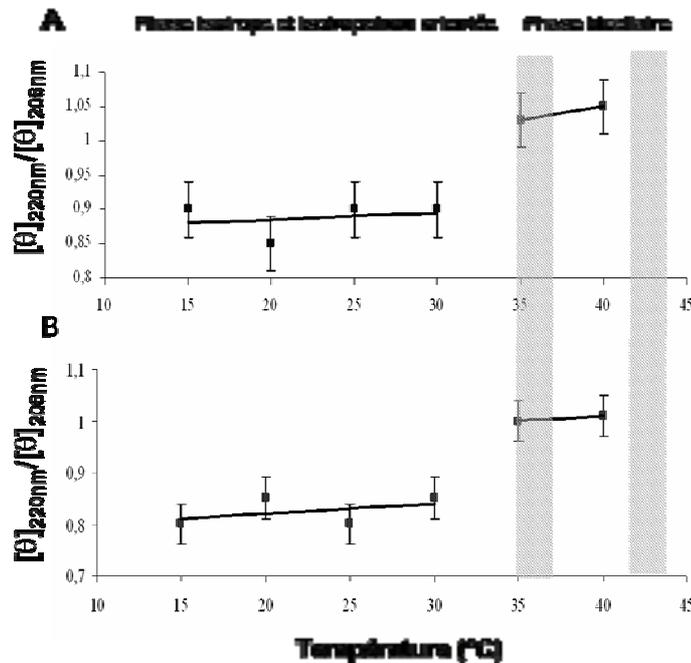


Figure 12 . Rapport des ellipticités relatives des deux longueurs d'onde (208 et 220 nm) pour A) le peptide Neu_{TM35} (600 μM, Ri= 1/900) et B) le peptide Neu*_{TM35} (650 μM, Ri= 1/900). La zone entre les 2 barres hachurée représente la phase bicellaire (d'après Raffard *et al.*, 2001).

- Discussion

Le rapport $\Delta\epsilon_{220nm}/\Delta\epsilon_{208nm}$ varie de 0.8/0.9 à 1 pour les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} quand on passe de micelles à bicelles. Nous pouvons donc conclure à une transition entre forme monomérique vers une forme dimérique ou oligomérique. La bicouche, membrane plane, favoriserait la dimérisation des peptides. On notera que cette dimérisation ou oligomérisation est indépendante de la mutation.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Grant (Jones *et al.*, 1998 ; Jones *et al.*, 1997 ; Sharpe *et al.*, 2000 ; Sharpe *et al.*, 2001). En effet l'équipe de Grant a démontré par RMN du deutérium que des peptides de la même famille de Neu s'agrégeaient dans des vésicules de POPC (avec et sans cholestérol). De plus nos résultats confirment l'hypothèse de Moriki et

Smith. Ils ont montré l'existence de dimères préformés en l'absence de ligand modèle d'activation du récepteur à la surface de la cellule (Moriki *et al.*, 2001). Nos résultats vont dans le sens des travaux de Schlessinger (Schlessinger, 2000), qui a émis l'hypothèse de l'existence de dimères (inactifs) même en l'absence de fixation de ligand.

Tous ces résultats montrent que les dimères sont présents dans la membrane mais pas sous leur forme active et qu'un réarrangement structural est nécessaire pour l'autophosphorylation des tyrosines. Nos expériences de DC nous ont permis d'observer la dimérisation des peptides dans une membrane modèle, qui est indépendant de la mutation. Il est intéressant de noter que l'hélice π , présente dans les peptides (au niveau notamment des 4 résidus valine) peut jouer un rôle en renforçant les interactions hydrophobes et par conséquent induire l'association des monomères.

4. Conclusion et perspectives

Nos études ont montré que les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} sont majoritairement structurés en hélice α dans nos différents milieux (TFE, bicelles). Nos résultats montrent aussi qu'en solvant TFE, les peptides conservent un seul état de structuration. Il n'y a donc pas de phénomènes d'auto-association ou d'agrégation observés. Nos travaux sur l'étude de l'oligomérisation ont montré que la membrane plane, favorise la dimérisation des peptides indépendamment de la mutation. Le dimère Neu*_{TM35} ne serait donc pas plus stable que le dimère Neu_{TM35}.

Les dimères sont préformés et le déclencheur de la multiplication cellulaire (via l'autophosphorylation des tyrosines) passe par un réarrangement structural des monomères. Il est à noter que l'hélice π pourrait consolider les dimères grâce aux interactions hydrophobes.

Il serait bien évidemment intéressant d'étudier l'orientation de ces peptides dans une bicouche. Ces expériences peuvent être réalisées par RMN soit en marquant les peptides à l'azote 15, soit en deutérant les liaisons peptidiques (échange chimique de liaison N-H en liaison N-D). Ces deux méthodes possèdent des avantages et des inconvénients. Néanmoins, nous avons choisi la première solution pour nos études. Les peptides ont été marqués à l'azote 15 (Chapitre 3) et l'étude de la topologie n'a malheureusement pas été réalisée par manque de temps mais sera effectuée par Cécile Loudet lors de son travail de thèse.

BIBLIOGRAPHIE

- Aussenac F. Thèse de l'université de Bordeaux 1. Les bicelles et les rafts : de nouvelles membranes biomimétiques pour l'étude de protéine membranaires par RMN des solides. 2002.
- Bohm G, Muhr R, Jaenicke R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng.* 1992; **5**:191–195.
- Castano S, Cornut I, Büttner K, Dasseux JL, Dufourcq J. The amphipathic helix concept: length effects on ideally amphipathic LiKj (i=2j) peptides to acquire optimal hemolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999a; **1416**: 161-175.
- Castano S, Desbat B, Laguerre M, Dufourcq J. Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic LiKj (i=2j) peptides. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999b; **1416**: 176-194.
- Chang CT, Wu CS, Yang JT. Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the beta-turns. *Anal. Biochem.* 1978; **91**: 13–31.
- Cooper TM, Woody RW. The effect of conformation on the CD of interacting helices: a theoretical study of tropomyosin. *Biopolymers.* 1990; **30**: 657-676.
- Goetz M, Carlotti C, Bontemps F, Dufourcq EJ. Evidence for an α -helix- π bulge helicity modulation for the neu/erbB-2 membrane-spanning segment. A ¹H NMR and circular dichroism study. *Biochemistry.* 2001; **40**: 6534-6540.
- Houliston RS, Hodges RS, Sharom FJ, Davis JH. Characterization of the proto-oncogenic and mutant forms of the transmembrane region of Neu in micelles. *J.Biol.Chem.* 2004; **279**: 24073-24080.
- Johnson Jr. WC. Analyzing protein CD for accurate secondary structures. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1999; **35**: 307–312.
- Jones DH, Rigby AC, Barber KR, Grant CWM. Oligomerization of the EGF receptor transmembrane domain: a ²H NMR study in lipid bilayer. *Biochemistry.* 1997; **36**: 12616-12624.
- Jones DH, Barber KR, VanDerLoo AW, Grant CWM. Epidermal growth factor receptor transmembrane domain: ²H NMR implications for orientation and motion in a bilayer environment. *Biochemistry.* 1998b; **37**: 16780-16787.
- Lau SYM, Taneja AK, Hodges RS. Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 1984; **259**: 13253-13261.
- Manavalan P, Johnson WC Jr. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Analytical Biochemistry.* 1987; **167**: 76-85.

- Moriki T, Maruyama H, Maruyama IN. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J. Mol. Biol.* 2001; **311**: 1011-1026.
- Raffard G, Steinbruckner S., Arnold A., Davis JH, Dufourc EJ. Temperature-composition Diagram of Dimyristoylphosphatidylcholine-Dicaproylphosphatidylcholine "Bicelles" Self-Orienting in the Magnetic Field. A solid State 2H and 31P NMR Study. *Langmuir.* 2000; **16**: 7655-7662.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinase. *Cell.* 2000; **103**: 211-225.
- Sharpe S, Barber KR, Grant CWM. Val659-Glu mutation within the transmembrane domain of ErbB-2: effects measured by 2H NMR in fluid phospholipids bilayers. *Biochemistry.* 2000; **29**: 6572-6580.
- Sharpe S, Grant CWM, Barber KR, Giusti J, Morrow MR. Structural implications of a Val-Glu mutation in transmembrane peptides from the EGF receptor. *Biophys J.* 2001; **81**: 3231-3239.
- Shibata A, Yamamoto M, Yamashita T, Chiou JS, Kamaya H, Ueda I. Biphasic effects of alcohols on the phase transition of Poly(L-Lysine) between α -Helix and β -sheet conformations. *Biochemistry.* 1992; **31**: 5728-5733.
- Sourgen F, Maroun RG, Frère V, Bouziane M, Auclair C, Troalen F, Fermandjian S. A synthetic peptide from the human immunodeficiency virus type-1 integrase exhibits coiled-coil properties and interferes with the in vitro integration activity of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 199 6; **240**: 765-773.
- Sreerama N, Woody RW. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* 1993; **209**: 32-44.
- Sreerama N, Venyaminov SY, Woody RW. Estimation of peptide secondary structure from circular dichroism spectra: Inclusion of denatured peptides with native peptides in the analysis. *Anal. Biochem.* 2000; **287**: 243-251.
- Sreerama N, Woody RW. Estimation of peptide secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 2000; **287**: 252-260.
- Yang JT, Wu CSC, Martinez HM. Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 1986; **130**: 208–269.

Chapitre 7

Etude de l'influence des peptides Neu_{TM35} et

Neu*_{TM35} sur des membranes modèles par RMN

des solides

Nous venons de voir l'interaction du point de vue des peptides, nous allons suivre les perturbations produites sur la membrane et en particulier, dans quelle mesure une hélice hydrophobe peut moduler l'épaisseur membranaire. Dans ce chapitre, nous avons utilisé la résonance magnétique nucléaire pour caractériser la dynamique des lipides en présence ou en absence de peptide. Cette dynamique sera décrite du point de vue des chaînes hydrocarbonées (RMN-²H). La RMN du phosphore a été utilisée uniquement dans le but de connaître la phase dans laquelle se trouve l'échantillon. Les expériences ont été réalisées avec les deux peptides transmembranaires Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} en fonction de la température. Les membranes sont constituées d'un seul lipide (DMPC, DPPC ou DSPC) dont la longueur de la chaîne aliphatique varie de 14 à 18 carbones.

Les premières sections sont consacrées à l'introduction et à la description des matériaux et méthodes. Lors de la troisième section, nous donnerons les résultats quant à la dynamique des lipides avec ou sans peptide puis la dernière section est consacrée à la discussion.

1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, il existe des interactions spécifiques entre les lipides et les protéines membranaires. Un modèle thermodynamique a été proposé pour décrire les interactions des mélanges de bicouches lipidiques et de peptides (Mouritsen et Bloom, 1984). Le concept de "hydrophobic mismatch" ou mésappariement des régions hydrophobes des lipides et des peptides est un élément important du modèle. Le mésappariement hydrophobe peut-être

négatif lorsque le segment hydrophobe du peptide est plus court que la partie hydrophobe de la membrane ou positif lorsque le segment hydrophobe du peptide est plus long que la partie hydrophobe de la membrane (cf. Chapitre 1). Du point de vue moléculaire, on peut s'attendre à voir le peptide et les lipides interagir dans une situation de mésappariement. Beaucoup de possibilités sont alors envisageables, cela dépend de la nature des lipides et des peptides. Du côté peptidique, les peptides peuvent s'incliner ou se contracter lorsqu'ils possèdent une longueur hydrophobe trop grande. L'hélice transmembranaire est capable de réduire sa longueur hydrophobe en préférant une conformation possédant une partie hélicoïdale plus fine, comme dans le cas de l'hélice 3_{10} (Zhang *et al.*, 1995a ; Zhang *et al.*, 1995b). Les peptides peuvent aussi s'oligomériser, en effet lorsqu'il y a une agrégation cela réduit les nombres de contacts défavorables entre le peptide et les lipides sans exiger de changements cruciaux (Ryba et Marsh, 1992). Du côté lipidique, les lipides peuvent répondre aux mésappariements positif et négatif par l'ordre ou le désordre de leurs chaînes acétylés, comme décrit dans le modèle du "matelas" exposé par Mouritsen et Bloom (Mouritsen et Bloom, 1981). Tous ces réarrangements moléculaires peuvent avoir des conséquences sur les caractéristiques de la membrane et l'activité des protéines membranaires (Johannsson *et al.*, 1981 ; Montecucco *et al.*, 1982), amener à la formation de microdomaines lipidiques, à la ségrégation latérale des protéines dans les biomembranes (Sperotto *et al.*, 1993 ; Marsh, 1995 ; Lehtonen et Kinnunen, 1997) et pourrait assurer l'acheminement des protéines dans la voie de sécrétion (Pelham et Munro, 1993).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le mécanisme de dimérisation/activation des récepteurs à tyrosine kinase est très complexe. Nous savons que l'activation des récepteurs à tyrosine kinase passe par le mécanisme crucial de la dimérisation des récepteurs (Ullrich et Schlessinger, 1990, Heldin, 1995) et que des dimères inactifs existent même en l'absence de fixation de ligand (Schlessinger, 2000). Les dimères actifs sont présent dans la membrane et déclencheraient l'autophosphorylation par changement d'orientation ou de configuration. Le domaine transmembranaire a une place très importante dans ce mécanisme. Nous avons voulu savoir si les peptides transmembranaires hydrophobes Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} étaient capables de changer d'orientation ou de conformation pour s'adapter à une membrane. Nous avons donc incorporé ces peptides dans des liposomes de constitution lipidiques différentes, afin de voir si ces peptides pouvaient s'adapter à une épaisseur de membrane donnée ou inversement si la membrane pouvait s'adapter aux peptides.

Pour comprendre les effets possibles sur le mésappariement, il est nécessaire d'étudier des systèmes lipides/peptides connus. Pour cela, nous avons choisi de travailler avec des modèles de membranes composées d'un seul lipide de différentes longueurs. En phase fluide, les longueurs hydrophobes (chaîne+glycérol) sont estimées à 30 Å pour le DMPC (Léonard *et al.*, 2001), 33 Å pour le DPPC et 36 Å (Lewis et Engelman, 1983) pour le DSPC (Lewis et Engelman, 1983). Le peptide Neu_{TM35} a une longueur de 39 Å (déterminé par RMN-¹H dans le TFE, Goetz *et al.*, 2001), la longueur de la partie hydrophobe de ce peptide (Ala⁴-Ile³¹) est évaluée à environ 32 Å (calcul effectué avec MacroModel). Comme nous pouvons le constater, la partie hydrophobe des peptides a approximativement la même épaisseur que la membrane de DPPC, a une longueur plus grande que la membrane de DMPC et une épaisseur plus courte que la membrane de DSPC.

Dans ce chapitre, nous focaliserons notre travail en l'étude de la réduction ou de l'étirement des chaînes acétylées des lipides induites par l'insertion des peptides transmembranaires Neu_{TM35} et Neu*_{TM35}. Les informations sur les longueurs de chaînes acétylées lipidiques sont obtenues grâce à la RMN-²H, les mesures des moments spectraux et des éclatements quadrupolaires. Nous présenterons tout d'abord les résultats concernant le système DMPC+ peptides, puis le système le DPPC+ peptides et enfin le système DSPC+ peptides. Une discussion sera finalement proposée, elle aura pour objectif de dégager les informations obtenues par RMN-²H et de répondre à notre question quant à l'adaptation des peptides par rapport à la bicouche ou l'adaptation de la membrane par rapport aux peptides.

2. Matériaux et méthodes

2.1. Préparation des systèmes membranaires

Les lipides (DMPC, DPPC et DSPC) proviennent de Avanti Polar Lipids. Leur pureté (déterminée par le fournisseur >99%) n'a pas été contrôlée et ils ont été utilisés tels quels. Les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} ont été synthétisés au Laboratoire (cf. Chapitres 3). La préparation des liposomes ainsi que l'incorporation des peptides dans ces modèles sont décrites en Annexe 2.

2.2. RMN du deutérium et du phosphore

La RMN du deutérium a été réalisée à l'aide de membranes modèles marquées au deutérium sur les chaînes d'acides gras des lipides : DMPC-d₅₄, DPPC-d₆₂ et DSPC-d₇₀ en

fonction de la température et du rapport molaire lipide-peptide, R_i . Une expérience type peut être décrite de la manière suivante : l'échantillon est placé dans l'aimant à la température désirée (régulée à $\pm 1^\circ\text{C}$), cette situation est maintenue pendant 30 minutes pour permettre à l'échantillon d'atteindre l'équilibre thermique. L'acquisition des signaux de précession libre s'effectue à l'aide d'une séquence d'écho solide puis les données sont traitées avec le logiciel Origin (cf. Chapitre 2).

La RMN du phosphore nous a permis de confirmer la phase dans laquelle se trouve l'échantillon. De même que pour la RMN du deutérium, l'échantillon est placé dans l'aimant à la température désirée pendant 30 minutes pour permettre à l'échantillon d'atteindre l'équilibre thermique puis l'acquisition s'effectue à l'aide de la séquence d'écho de Hahn avec découplage des protons (cf. Chapitre 2).

Pour le noyau phosphore, nous avons utilisé la séquence d'écho de Hahn (Rance et Byrd, 1983) et pour le deutérium, la séquence d'écho quadrupolaire (Davis *et al.*, 1976) (cf. Chapitre 2). Les moments spectraux et les paramètres d'ordre ont été calculés selon les équations respectives 4.24 et 4.23 (cf. Chapitre 2).

3. Résultats

3.1. Système DMPC + peptides

3.1.1. Les spectres des bicouches en présence et en absence des peptides

La Figure 1 montre des spectres de liposomes de DMPC-d54 en présence et en absence de peptides lors d'une évolution thermique. Le spectre qu'on obtient à 293 K, sans peptide, est caractéristique d'une phase lipidique lamellaire de type gel, c'est-à-dire les segments méthyléniques des chaînes acyles sont dans une configuration totalement trans (Davis, 1983) et figés, le seul mouvement subsistant étant la rotation lente de la molécule autour de son grand axe. En phase $L\beta'$, les molécules étant inclinées par rapport à la normale à la bicouche, ce mouvement ne possède pas la symétrie axiale. Les spectres, sans peptide, à 296 K et 324 K sont caractéristiques d'une phase fluide, c'est-à-dire de lipides animés de rapides mouvements à symétrie axiale au sein d'une phase lamellaire de type $L\alpha$. Il est à noter que le groupe terminal CD_3 en position 14 possède un degré

de liberté de plus que tous les autres groupes méthylènes de la chaîne : la rotation rapide autour de l'axe (liaison C13-C14).

Les spectres de poudres, en présence de peptides, à T=293K sont caractéristiques de phase multilamellaires gel. A T=296K, la forme des spectres en présence de peptides est très différente de la forme des spectres en absence de peptides. La forme du spectre est caractéristique de la présence de deux phases : gel et fluide. A T=324K, le spectre est caractéristique d'une phase fluide. Il est à noter toutefois qu'à 324K, le spectre sans peptide et les spectres avec peptides sont différents.

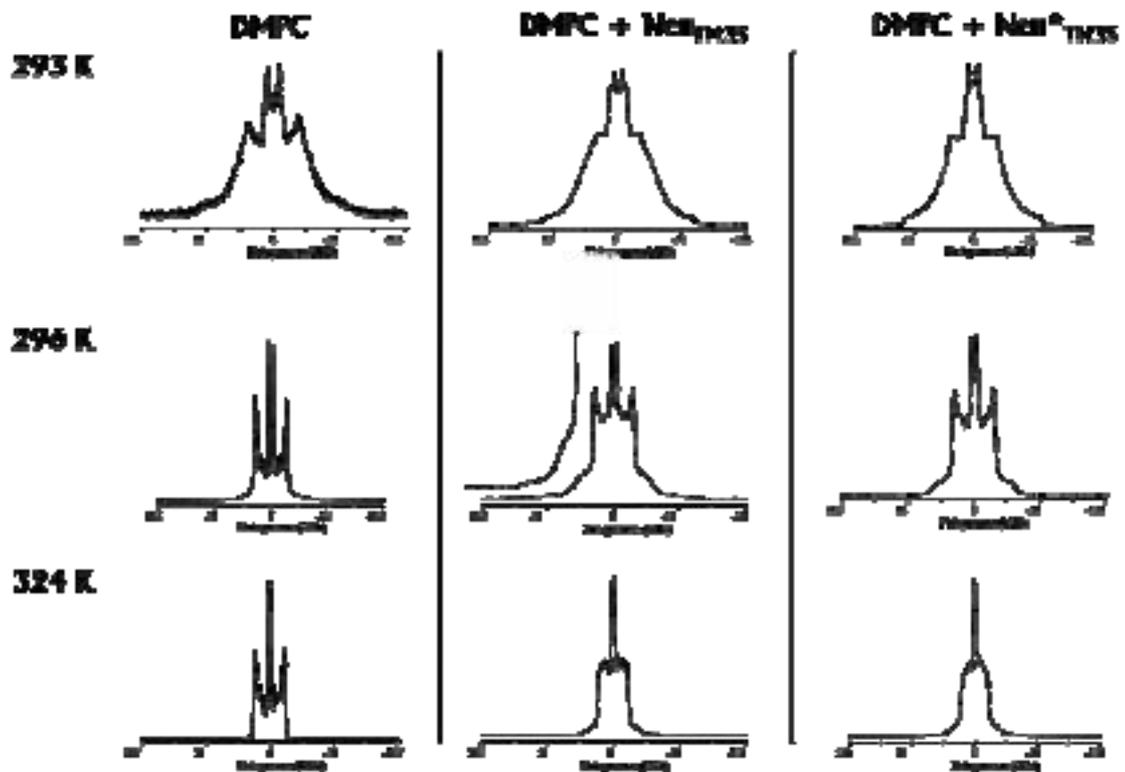


Figure 1. Spectres en RMN-²H de liposomes de DMPC pour trois températures en absence de peptide, en présence de Neu_{TM35} et en présence de Neu*_{TM35} (ratio peptide/lipide 1/100, 3072 acquisitions, filtrage du bruit par multiplication exponentielle du FID, LB=100 Hz). Pour le spectre à 296K de DMPC+Neu_{TM35}, un zoom a été réalisé (x2) pour mieux voir la coexistence des phases.

Ces affirmations sont confirmées par les spectres de RMN-³¹P enregistrés pour les compositions précédentes (spectres non montrés). Il n'y a pas de formation de nouvelle phase lipidique en présence des fragments transmembranaires, on ne détecte pas par exemple de raie isotrope correspondant à la formation de petites vésicules. Globalement, on peut dire que les peptides

transmembranaires s'insèrent dans la membrane sans impliquer de grandes modifications macroscopiques des systèmes modèles. Contrairement à des peptides amphiphiles d'une taille équivalente, comme la mélittine (Pott et Dufourc, 1995 ; Pott *et al.*, 1998), les fragments Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} s'insèrent dans la membrane sans modifier considérablement sa morphologie, on reste en bicouche étendue (liposomes).

3.1.2. Les moments spectraux des bicouches de DMPC en présence et en absence des peptides

L'évolution du spectre de liposomes de DMPC-d54, en fonction de la température peut être caractérisée quantitativement par le calcul des moments spectraux. En RMN-²H, si l'on s'intéresse non plus à une position marquée mais à un ensemble de positions deutérées, le calcul de M_{1s}, premier moment symétrique représente la moyenne des M_{1s} relatifs à chaque position (comme nous l'avons vu dans le Chapitre 2, dans le cas de spectre symétrique, les moments de rangs impairs sont nuls, on prend la valeur absolue). Le M_{1s} des lipides en présence ou en absence de peptides est représenté sur la Figure 2.

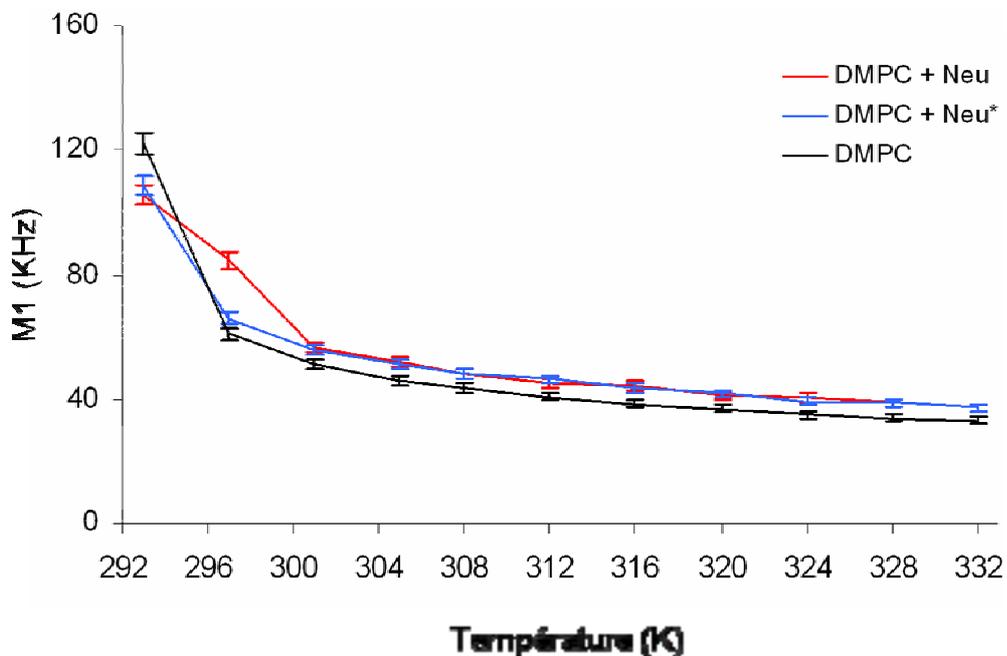


Figure 2 . Variation thermique du premier moment spectral, M_{1s}, calculé à partir de spectres de RMN-²H de liposomes de DMPC-d54 (noir) en présence de Neu*_{TM35} (bleu) ou de Neu_{TM35} (rouge). L'erreur expérimentale est de 3%.

Cette information apporte moins de détails que le profil d'ordre mais donne néanmoins une mesure de l'ordre global de la bicouche pour une température déterminée.

Il est bon de noter qu'il y a un décalage de 2 degrés entre la température de transition de phase du DMPC protoné et du DMPC perdeutéié. Ce décalage est attribué à l'encombrement stérique apporté par la perdeutéiation (Davis, 1983 ; Aussenac, 2003). Sur l'ensemble de la Figure 2, on remarque que les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} provoquent une augmentation de M_{1s} . Ce qui signifie que les systèmes peptides/lipides sont plus ordonnés que les lipides seuls. On remarque sur le graphe que ΔT , l'intervalle de transition, est plus important en présence des peptides, plus particulièrement avec le peptide Neu_{TM35}. Nous avons vu au paragraphe précédent qu'il y avait une coexistence de phase (gel et fluide) en présence de peptides à 296K, l'intervalle de transition sera donc plus important. On peut aussi noter que la température de transition en présence des peptides sera un petit peu plus élevée qu'en absence de peptides. Malheureusement, la température de transition n'a pas pu être exactement déterminée pour ces systèmes, en effet le spectre enregistré avec la plus basse température est de 293 K, or la transition du DMPC-d54 a lieu entre 292 K et 294 K. Aucun spectre n'a été enregistré pour des températures inférieures à 293 K. Afin de détailler les effets observés, nous avons déconvolué les spectres et calculé les paramètres d'ordres.

3.1.3. Le profil d'ordre des bicouches en présence et en absence des peptides

Les spectres RMN-²H de DMPC seul et avec les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} ont été déconvolués. La technique de déconvolution spectrale "de-pake-ing" a été utilisée pour obtenir des spectres semblables à ceux provenant d'échantillons dont la normale à la bicouche serait orientée à 90° par rapport à B_0 .

Sur la Figure 3 sont représentés les spectres déconvolués de DMPC seul et avec le peptide Neu_{TM35} à 300K. On constate sur cette Figure que les éclatements quadrupolaires sont plus grands en présence de peptide, ce qui signifie que le système peptide/lipide est plus ordonné que le système lipide seul. Le peptide Neu_{TM35} induit une augmentation de Δ_{VQ} pour toutes les positions marquées. Il est aisé de constater que l'on peut mesurer dix éclatements quadrupolaires différents pour le DMPCd54. Pour le système peptide/lipide, on a pu mesurer seulement neuf éclatements

quadrupolaires différents. On pourrait mesurer théoriquement jusqu'à treize éclatements quadrupolaires par chaîne si les CD_2 étaient tous inéquivalents du point de vue dynamique.

Lorsqu'on se place en phase fluide, on obtient des spectres beaucoup plus étroits. Ces spectres sont caractéristiques de lipides animés de mouvements rapides à symétrie axiale.

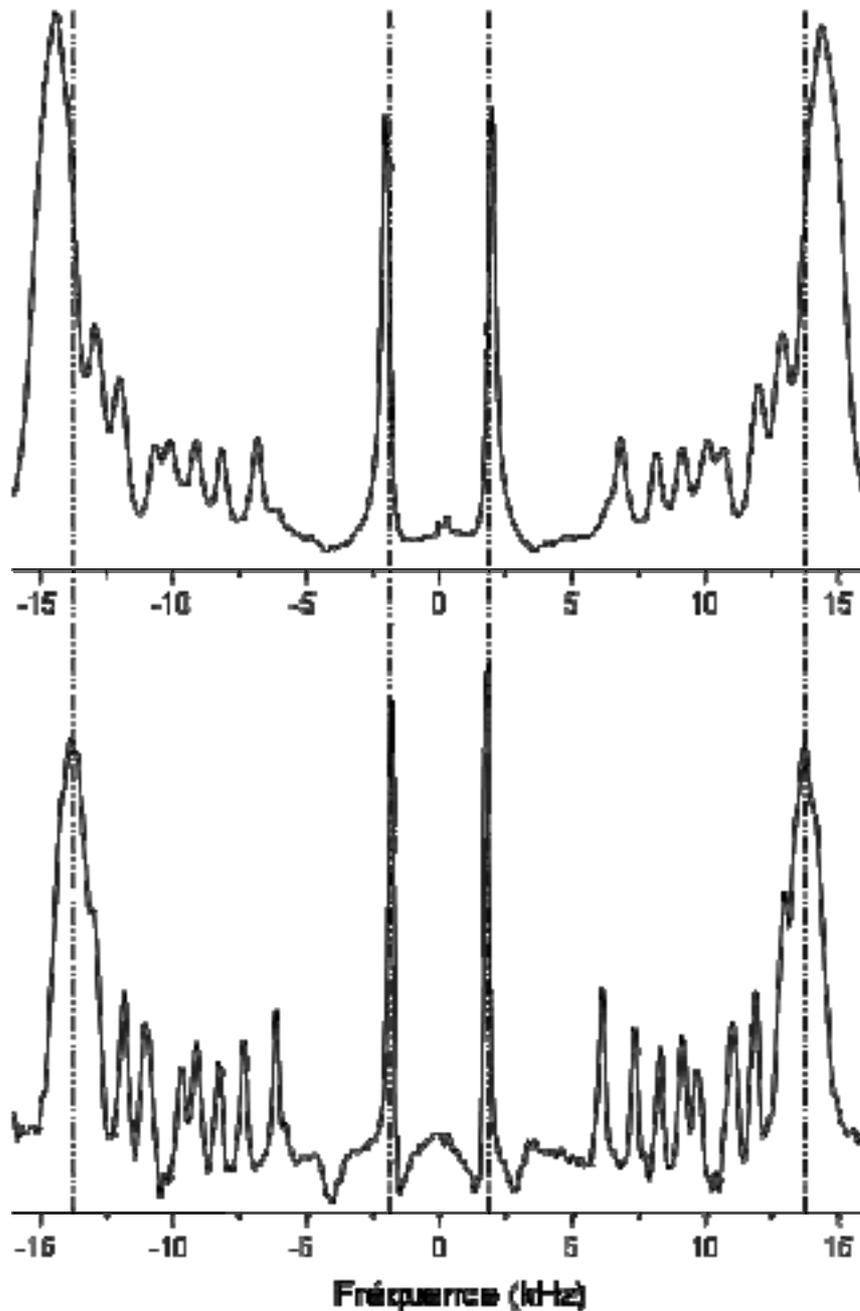


Figure 3 . Spectres déconvolués de Neu ($R_1=1/100$) inséré dans des liposomes de DMPC-d54 (en haut) et liposomes de DMPC-d54 seul (bas) à 300K. Les lignes verticales en pointillés soulignent les différences des éclatements quadrupolaires.

La déconvolution spectrale de tels spectres permet d'accéder très facilement aux éclatements quadrupolaires de chaque groupe CD₂ (Bloom *et al.*, 1981). Le paramètre d'ordre orientationnel S^{CD} peut être alors aisément calculé (cf. Chapitre 2).

Le tableau 1 donne le paramètre d'ordre, S^{CD}, du DMPC-d54 dans des liposomes en l'absence et en présence des peptides transmembranaires Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} pour la chaîne 1 (A) et 2 (B). L'attribution a été réalisée à partir de l'intensité des doublets et par analogie avec des résultats antérieurs (Douliez *et al.*, 1995). Nous observons une augmentation des valeurs de S^{CD} pour l'ensemble des positions marquées des chaînes aliphatiques du DMPC après insertion des peptides.

Position marquée	S ^{CD}	S ^{CD} (Neu) Ri 1/100	ΔS/S (%)	S ^{CD} (Neu*) Ri 1/100	ΔS/S (%)
2, 2'	*	*	*	*	*
3, 3'	0.207	*	*	*	*
4, 4'	0.220	0.230	4.5	0.224	2.0
5, 5'	0.220	0.230	4.5	0.224	2.0
6, 6'	0.220	0.230	4.5	0.224	2.0
7, 7'	0.220	0.230	4.5	0.224	2.0
8, 8'	0.220	0.230	4.5	0.224	2.0
9, 9'	0.220	0.230	4.5	0.224	2.0
10, 10'	0.190	0.207	8.9	0.200	5.3
11	0.155	0.171	9.9	0.165	6.5
11'	0.176	0.192	9.2	0.186	5.7
12	0.132	0.146	10.7	0.141	6.8
12'	0.146	0.161	10.8	0.155	6.2
13	0.098	0.109	11.3	0.105	7.1
13'	0.117	0.130	11.0	0.126	7.7
14, 14'	0.029	0.032	12.8	0.031	6.9

Tableau 1. Paramètre d'ordre, S^{CD}, du DMPC-d54, en l'absence et en présence des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} pour la chaîne 1 et la chaîne 2 (position '). Les mesures sont réalisées à T=300 K pour une hydratation de 90%, Ri=100. * position non résolue. ΔS/S = ((S_{DMPC+peptide} - S_{DMPC})/S_{DMPC})*100. L'erreur expérimentale est de 3% pour les positions "plateau" et de 2% pour les autres positions.

Nous remarquons aussi que le peptide Neu_{TM35} implique une augmentation plus importante que le peptide Neu*_{TM35}. Cette augmentation est de 4.5% et de 2% pour les positions "plateau" après insertion des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35}; comprise entre 9 et 13% pour les positions 10 à 14

après insertion du peptide Neu_{TM35}; comprise entre 5.3 et 7.7% pour les positions 10 à 14 après insertion du peptide Neu*_{TM35}. Ces mesures nous montrent clairement que les liposomes de DMPC-d54 en présence de peptides sont plus ordonnés que les liposomes de DMPC-d54 seul.

Les éclatements quadrupolaires à 300K de DMPC seul et avec Neu_{TM35} des chaînes 1 et 2 ont été reportés sur la Figure 4 en fonction de la position du carbone marqué à T=300K. Par souci de clarté, seul les éclatements quadrupolaires du peptide Neu_{TM35} ont été reportés. Ce type de représentation permet d'avoir une vision fine du gradient d'ordre au sein de la bicouche à une température donnée.

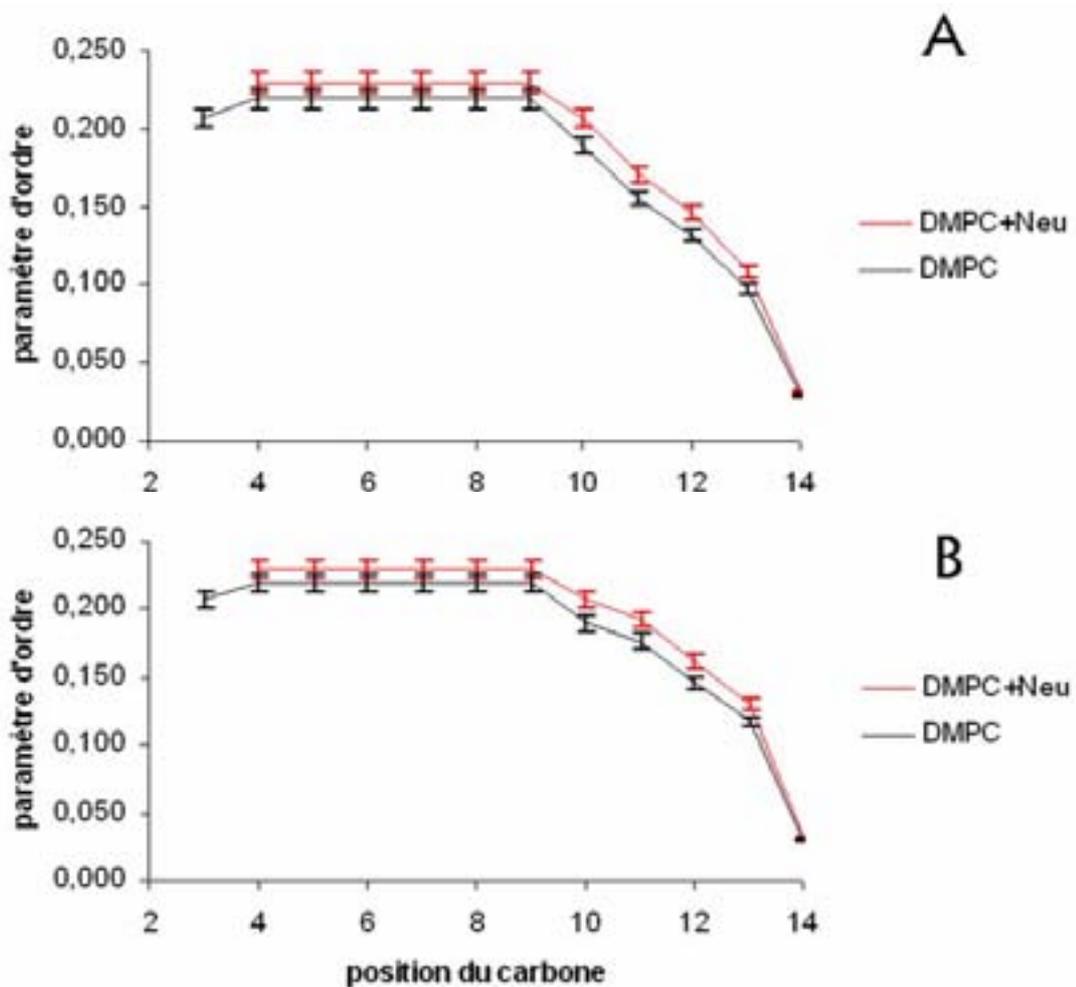


Figure 4. Variation du paramètre d'ordre en fonction de la position du carbone marqué au deutérium en présence (rouge) et en absence de Neu_{TM35} (noir) à T=300 K. Le graphe A représente l'éclatement quadrupolaire de la chaîne 1 et le graphe B de la chaîne 2. L'erreur expérimentale est de 3% pour la position plateau et de 2% pour les autres positions.

Ce type de profil est caractérisé par une dynamique constante de la région "plateau" (de la position 3, proche du carbonyle, à la position 9), suivi d'une décroissance graduelle du paramètre d'ordre orientationnel S^{CD} lorsqu'on se rapproche du bout de la chaîne (position 14). Ce comportement a été expliqué, pour les phosphatidylcholines, par l'augmentation de la probabilité d'existence des conformères "gauche", en allant vers le centre de la bicouche (Seelig, 1977).

Cet effet apparaît plus important pour les positions marquées au niveau des positions 10 à 14. Pour les positions "plateau", cet effet est moins marqué. La position 2', pour laquelle les deutériums ne sont pas équivalents n'a pas pu être attribuée car elle conduit à des doublets de faible intensité. Le peptide Neu_{TM35} induit un ordre global à haute température (au dessus de la température de transition).

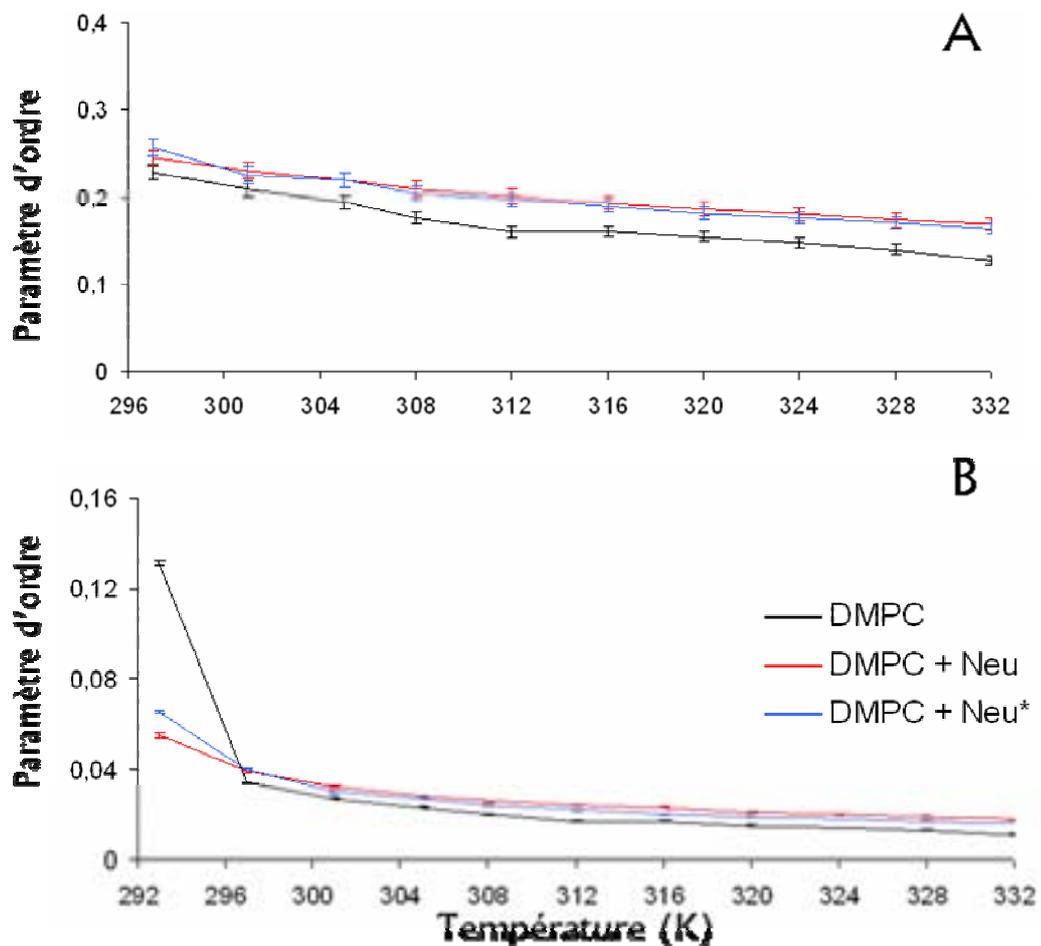


Figure 5. Variation thermique de S^{CD} , calculé à partir des spectres déconvolués de RMN 2H de liposomes de DMPC (noir) en présence de Neu*_{TM35} (bleu) ou de Neu_{TM35} (rouge), des positions "plateaux" (A) et des groupements méthyles terminaux (B). L'erreur expérimentale est de 3% pour les positions "plateau" et de 2% pour les autres positions.

Nous avons décidé d'étudier plus en détail cet effet et nous avons donc calculé le paramètre d'ordre pour toutes les températures en présence et en absence de peptides. La Figure 5 représente la variation thermique de S^{CD} des positions plateaux et des groupements méthyles terminaux en absence et en présence des peptides en fonction de la température. Sur l'ensemble de la Figure 5, on remarque que les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} provoque une augmentation de S^{CD} . Ceci est en accord avec nos résultats précédent : les peptides engendrent de l'ordre dans la bicouche en phase fluide.

Les mesures des moments spectraux, des paramètres d'ordre pour la position "plateau" et pour les groupements méthyles terminaux aux différentes températures ainsi que les mesures des paramètres d'ordre de toutes les positions marquées à T=300 K en absence et en présence de peptides, nous montrent que la dynamique des lipides n'est pas la même avec ou sans peptides. Il a été démontré que les lipides sont plus ordonnés en présence de peptide. L'étirement des chaînes acétylées des lipides est induit par l'insertion des peptides transmembranaires. Nous avons aussi vu qu'après insertion des peptides, la température de transition est légèrement plus élevée et l'intervalle de transition est plus important du fait de la coexistence de phase gel et fluide à 296K.

Dans cette section, nous avons étudié l'effet de l'insertion d'un peptide de longueur hydrophobe plus grande que la membrane, nous allons maintenant étudier les effets de l'insertion d'un peptide dont la longueur hydrophobe est approximativement celle de la membrane. Pour cela, nous avons incorporé Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans des liposomes de DPPC-d62.

3.2. Système DPPC + peptides

3.2.1. Les spectres des bicouches en présence et en absence des peptides

La Figure 6 montre des spectres de liposomes de DPPC-d62 en présence et en absence de peptides lors d'une évolution thermique. En absence de peptides, les spectres à 293, 305 et 308 K sont caractéristiques d'une phase lipidique lamellaire de type gel. Le spectre à 312 K est caractéristique d'une phase fluide majoritaire avec un peu de phase gel. Le spectre à 324 K est caractéristique d'une phase fluide. Avec les peptides, les spectres à 293 et à 324K sont respectivement caractéristiques d'une phase gel et d'une phase fluide. De 305K à 312K, on

observe une superposition de spectres en phase gel et phase fluide, dont la proportion varie avec la température.

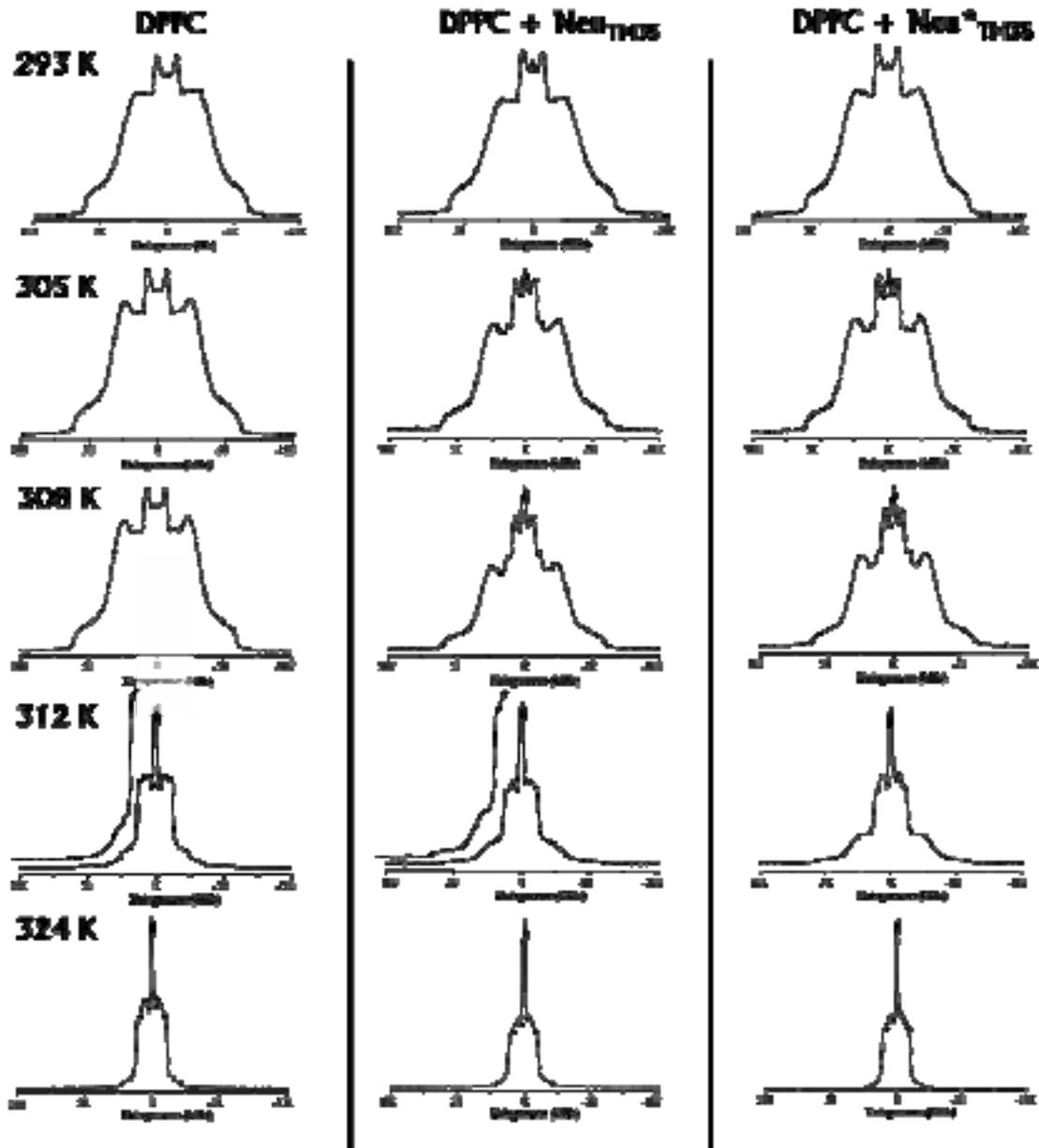


Figure 6 . Spectres en RMN-2H de liposomes de DPPC pour cinq températures en absence de peptide, en présence de Neu_{TM35} et en présence de Neu*_{TM35} ($R_1=1/100$, 3072 acquisitions, filtrage du bruit par multiplication exponentielle du FID, LB=100 Hz). Pour les spectres à 312K de DSPC en absence et en présence de Neu_{TM35}, un zoom a été réalisé (x2) pour mieux voir la coexistence des phases.

On notera qu'à 312K, la proportion de phase gel en présence de peptides est plus importante qu'en absence de peptide.

Les spectres de RMN-³¹P enregistrés pour les compositions précédentes et pour six températures différentes ne montrent pas de formation de nouvelle phase lipidique en présence des fragments transmembranaires (spectres non montrés).

3.2.2. Les moments spectraux des bicouches de DPPC en présence et en absence des peptides

Lorsqu'on est situé en phase gel, il est impossible de calculer les paramètres d'ordre (du fait de l'absence de mouvement à symétrie axiale), on se contente alors de calculer les moments spectraux pour caractériser l'organisation de la phase lipidique gel. La transition de phase gel-fluide est aisément détectée, sa température est déterminée grâce à la discontinuité dans la variation de M_1 .

La Figure 7 représente la variation du premier moment M_1 , calculé à partir des spectre de liposomes de DPPC-d62 en absence et en présence de peptides.

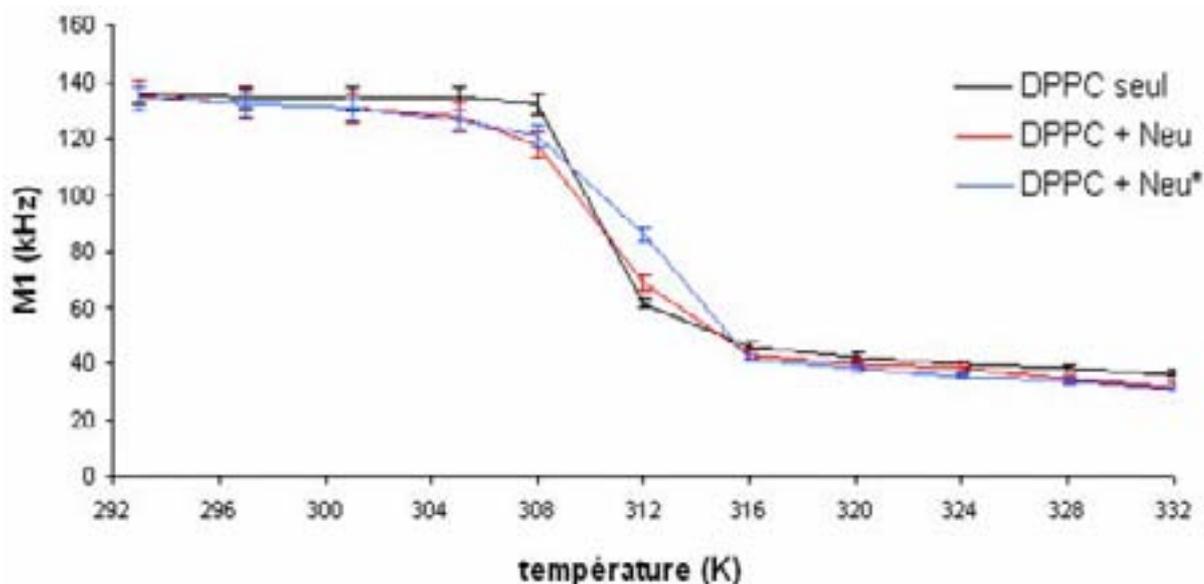


Figure 7. Variation thermique du premier moment spectral, M_1 , calculé à partir de spectres de RMN-²H de liposomes de DPPC (en marine) en présence de Neu*_{TM35} (en bleu) ou de Neu_{TM35} (en cyan). L'erreur expérimentale est de 3%.

On remarque une valeur élevée de M_{15} en phase gel qui décroît peu avec la température. En phase fluide, M_{15} est beaucoup plus faible et décroît lentement lorsque la température augmente. On remarque que les moments sont très proches, les peptides ont une faible influence

sur ce système. On notera toutefois qu'à 305 K et 308 K, M_{15} est un peu plus faible en présence des peptides, ce qui signifie qu'à ces températures le système est moins ordonné et donc plus fluide. Ceci est en accord avec nos résultats précédents (Figure 6) où nous observons la coexistence de phase gel et phase fluide à ces températures. L'insertion des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} fluidifie une partie de la membrane en phase gel et implique donc un léger désordre.

On remarque aussi que l'intervalle de transition de phase en présence des peptides est plus grand qu'en absence de peptide. La température de transition en absence et en présence de peptides est en petit peu différente. Il est à mentionner que nous trouvons $T_c = 38 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les liposomes de DPPC-d62, ce résultat est en accord avec la littérature, Davis a trouvé $T_c = 37.5^\circ\text{C}$ (Davis, 1979) et $T_c = 39 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les liposomes de DPPC-d62 en présence du peptide Neu_{TM35}.

3.2.3. Le profil d'ordre des bicouches en présence et en absence des peptides

Les spectres de DPPC-d62 en absence et en présence de peptides ont été déconvolués. La Figure 8 représente les spectres déconvolués de DPPC-d62 seul et en présence de Neu_{TM35} à 324K. On constate sur la Figure 8, les éclatements quadrupolaires sont proches en absence et en présence de peptide, ce qui signifie qu'il n'y a peu de différence dans l'ordre entre le système peptide/lipide et le système lipide seul. L'insertion du peptide Neu_{TM35} induit peu de changement dans l'organisation de la bicouche.

On peut constater que l'on a pu mesurer douze éclatements quadrupolaires différents pour le DPPCd62. Pour le système peptide/lipide, plusieurs éclatements quadrupolaires n'ont pas pu être mesurés, seulement cinq ont été mesurés. On pourrait mesurer théoriquement jusqu'à quinze éclatements quadrupolaires par chaîne si les CD₂ avaient des dynamiques très distinctes les uns des autres.

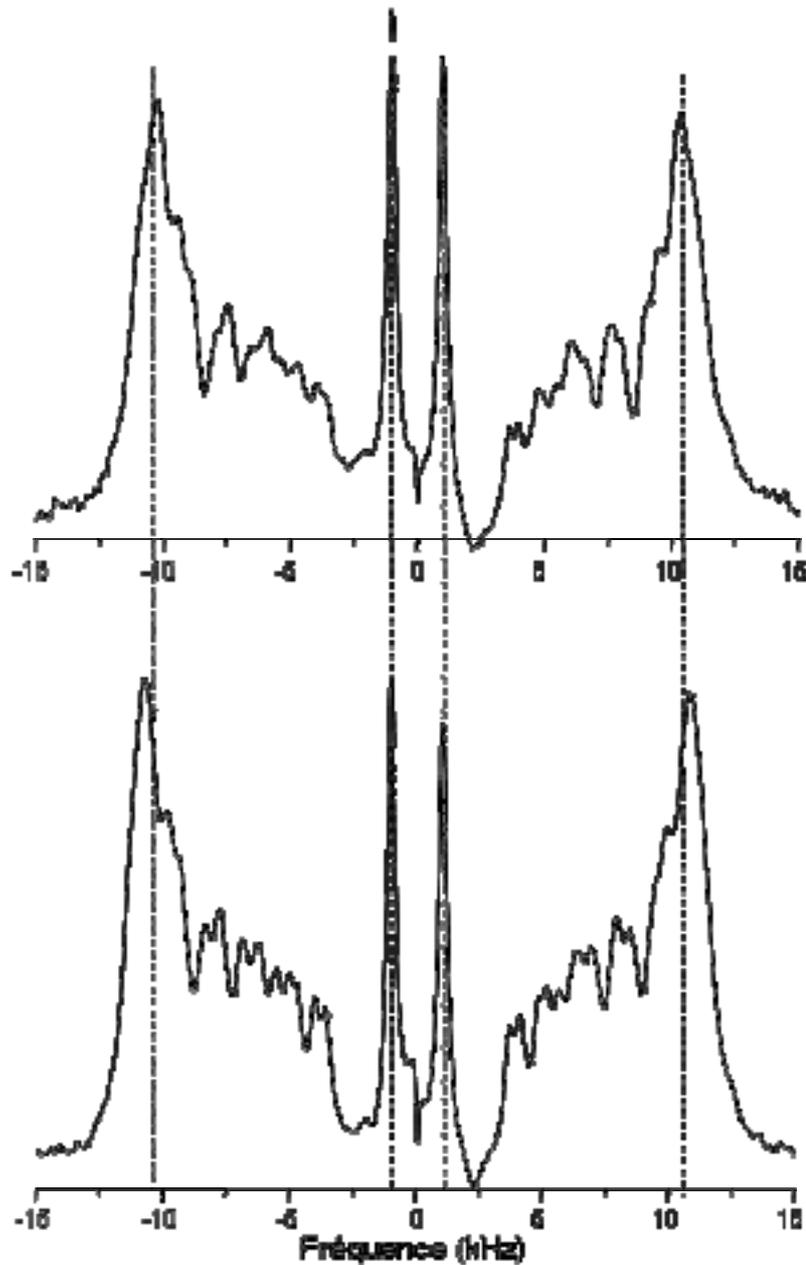


Figure 8. Spectres déconvolués de Neu inséré ($R_i=1/100$) dans des liposomes de DPPC-d62 seul (haut) et de liposomes DPPC-d62 seul (en bas) à 324 K. Les lignes verticales en pointillés soulignent les différences des éclatements quadrupolaires.

Le tableau 2 donne le paramètre d'ordre, S^{CD} , du DPPC-d62 dans des liposomes en l'absence et en présence des peptides transmembranaires Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} pour la chaîne 1 (A) et 2 (B). L'attribution a été réalisée à partir de l'intensité des doublets et par analogie avec des résultats antérieurs (Davis, 1979). Nous observons une très faible différence entre les valeurs de S^{CD} pour l'ensemble des positions marquées des chaînes aliphatiques du DPPC avant et après

insertion du peptide Neu_{TM35}. Pour les positions "plateau" et 15, cette différence est de 2.7%, en revanche pour les autres positions cette différence est inférieure à 2% et donc comprise dans l'erreur expérimentale. La différence entre les valeurs de S^{CD} du DPPC avant et après insertion du peptide Neu*_{TM35} est plus importante. Pour les positions "plateau", cette différence est de 6.1% et pour la position 13 de 2.8%, en revanche pour les autres positions cette différence est inférieure à 2% et donc comprise dans l'erreur. Globalement, l'incorporation du peptide perturbe peu la phase lipidique, la dynamique des chaînes aliphatiques du DPPC étant peu affectée, excepté pour la position plateau où nous observons une perturbation faible mais significative. Il est à noter que Neu*_{TM35} perturbe plus le système que Neu_{TM35}.

Position marquée	S ^{CD}	S ^{CD} (Neu) Ri 1/100	ΔS/S (%)	S ^{CD} (Neu*) Ri 1/100	ΔS/S (%)
2, 2'	*	*	*	*	*
3, 3'	0.179	*	*	*	*
4, 4'	0.179	0.174	-2.7	0.169	-6.1
5, 5'	0.179	0.174	-2.7	0.169	-6.1
6, 6'	0.179	0.174	-2.7	0.169	-6.1
7, 7'	0.179	0.174	-2.7	0.169	-6.1
8, 8'	0.179	0.174	-2.7	0.169	-6.1
9, 9'	0.165	*	*	*	*
10	0.142	*	*	0.144	1.4
10'	0.165	*	*	*	*
11	0.133	0.132	-0.8	*	*
11'	0.142	*	*	0.144	1.4
12	0.118	*	*	0.120	1.7
12'	0.133	0.132	-0.8	*	*
13	0.108	0.106	-1.9	0.105	-2.8
13'	0.118	*	*	0.120	1.7
14	0.088	*	*	0.087	-1.1
14'	0.095	*	*	0.096	1.1
15	0.062	0.068	-2.8	0.063	1.6
15'	0.070	0.068	-2.8	*	*
16, 16'	0.017	0.017	0.0	0.017	0.0

Tableau 2. Paramètre d'ordre, S^{CD}, du DPPC-d62, en l'absence et en présence des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} pour les chaîne 1 et chaîne 2. Les mesures sont réalisées à T=324 K pour une hydratation de 90%. * position non résolue. $\Delta S/S = ((S_{DPPC+peptide} - S_{DPPC}) / S_{DPPC}) * 100$. L'erreur expérimentale est de 3% pour les positions "plateau" et de 2% pour les autres positions.

Les éclatements quadrupolaires à 324K de DPPC seul et avec les peptides des chaînes 1 et 2 ont été reportés sur la Figure 9 en fonction de la position du carbone marqué. Globalement, on remarque que les peptides influencent peu l'organisation de la bicouche. Au niveau de la région "plateau", les peptides induisent un désordre un peu plus prononcé, plus particulièrement pour le peptide Neu*_{TM35}.

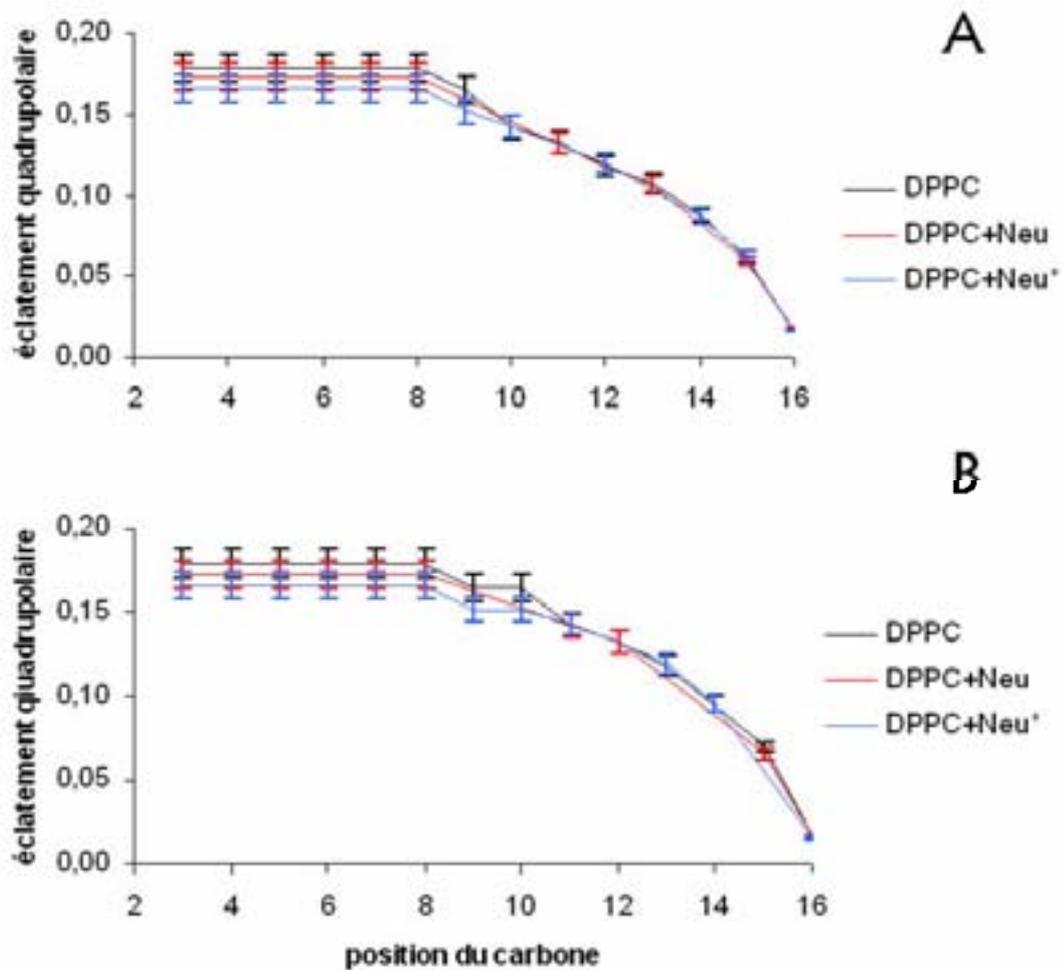


Figure 9 . Variation du paramètre d'ordre en fonction de la position du carbone marqué au deutérium en présence et en absence de peptides à T=324 K. Le graphe A représente l'éclatement quadrupolaire de la chaîne 1 et le graphe B de la chaîne 2. L'erreur expérimentale est de 3% pour les positions "plateau" et de 2% pour les autres positions.

Nous avons par la suite étudié plus en détail l'influence des peptides sur l'organisation de la bicouche et nous avons donc calculé le paramètre d'ordre pour toutes les températures en présence et en absence de peptides. Pour les positions "plateau" la variation a été réalisée pour des

températures supérieures à T_c , soit supérieur à 308K. La Figure 10 représente la variation thermique de S^{CD} des positions "plateau" et des groupements méthyles terminaux en absence et en présence des peptides en fonction de la température. Sur l'ensemble de la Figure 10, on remarque peu de différence entre les paramètres d'ordre en absence et en présence de peptides. Les peptides provoquent peu de diminution de S^{CD} . On remarque toutefois sur la Figure 10A (région "plateau") que S^{CD} de Neu*_{TM35} est un peu plus faible que pour les lipides seuls. Cela correspond à ce qu'on avait observé avec la Figure 9 ou avec les premiers moments.

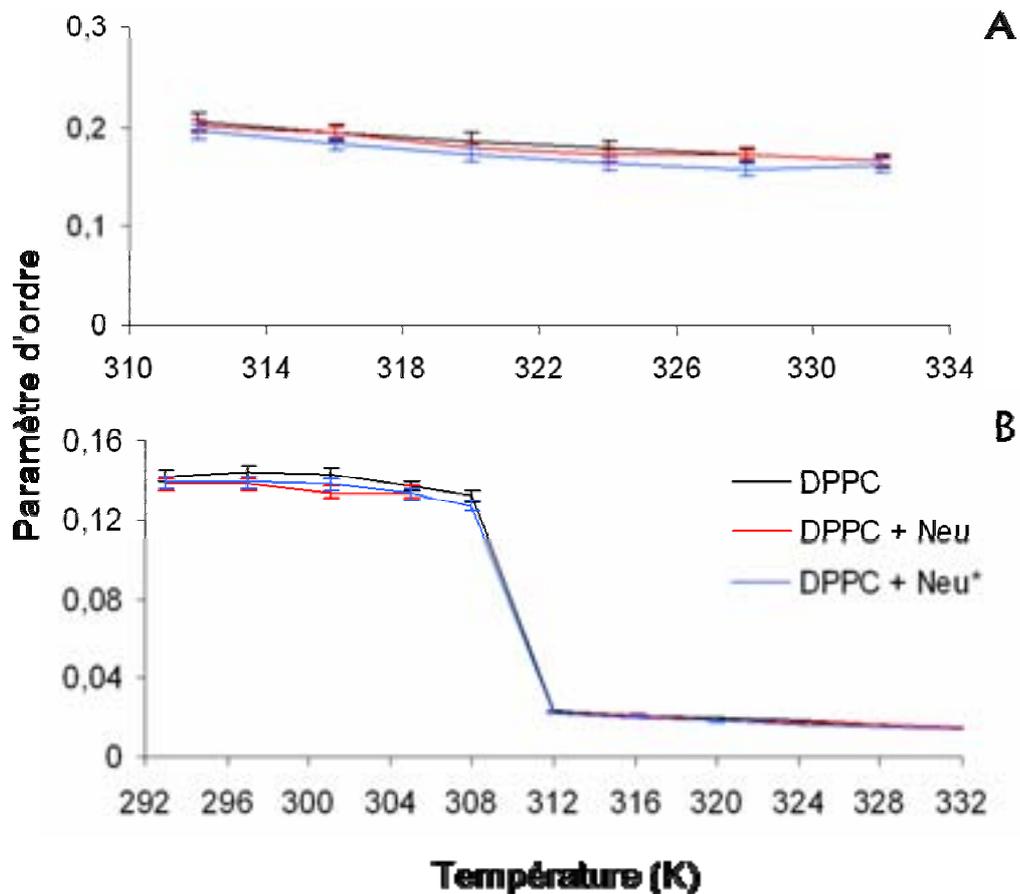


Figure 10. Variation thermique de S^{CD} , calculé à partir des spectres de RMN 2H de liposomes de DPPC (noir) en présence de Neu*_{TM35} (bleu) ou de Neu_{TM35} (orange), des positions "plateaux" (A) et des groupements méthyles terminaux (B). L'erreur expérimentale est de 3% pour la position plateau et de 2% pour les autres positions.

Toutes ces analyses nous montrent que la dynamique des lipides est pratiquement inchangée avec ou sans peptides. Toutefois un effet dans la position "plateau" est observé. Les

peptides induisent un faible désordre au niveau des positions 4 à 8. Il est aussi intéressant de noter que le peptide Neu*_{TM35} implique plus de désordre que le peptide Neu_{TM35}. Comme pour le système précédent, après insertion des peptides, la température de transition est légèrement plus élevée et l'intervalle de transition est plus important.

Dans la dernière section, nous allons étudier l'effet de l'insertion d'un peptide de longueur hydrophobe plus petite que la membrane, nous avons donc incorporé les peptides dans des liposomes de DSPC-d70.

3.3. Système DSPC + peptides

3.3.1. Les spectres des bicouches en présence et en absence des peptides

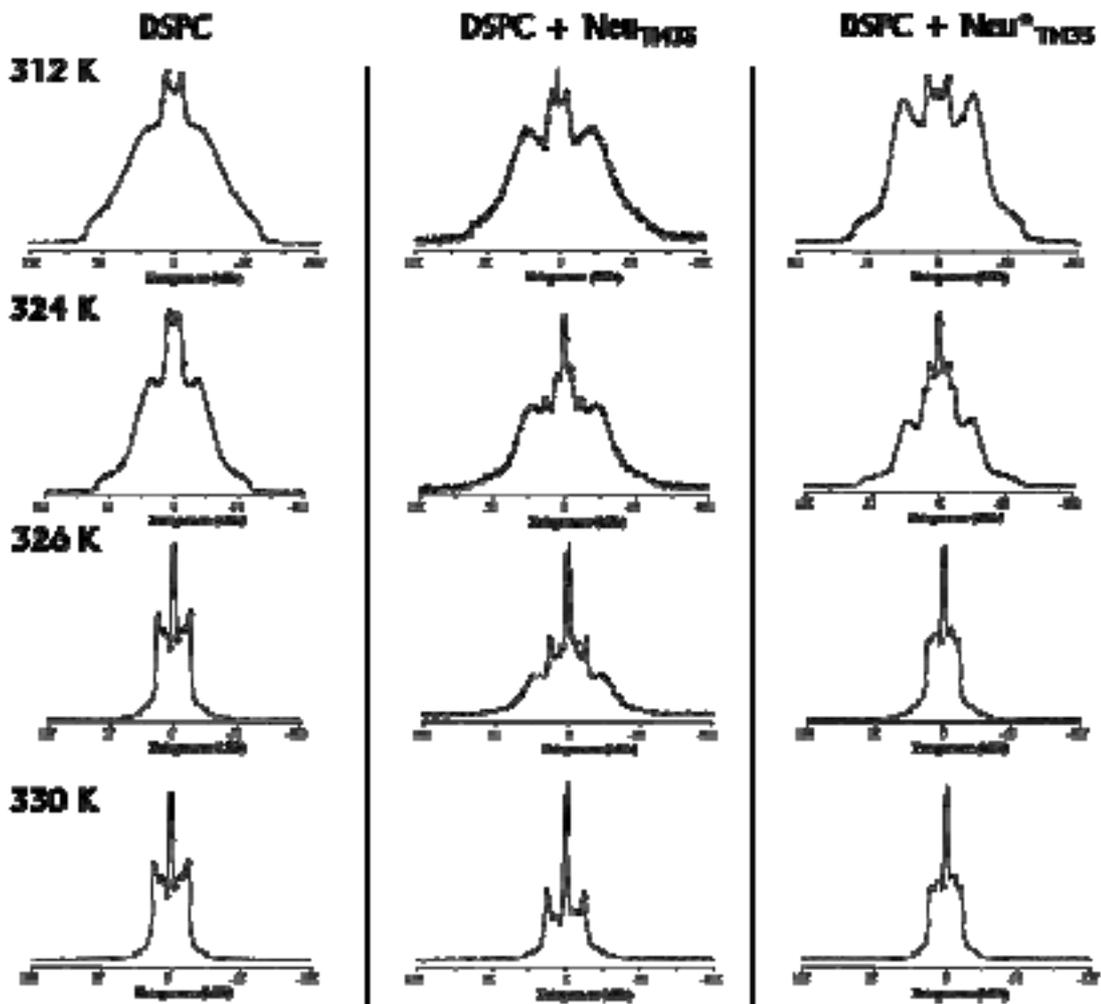


Figure 11. Spectres en RMN-2H de liposomes de DSPC pour quatre températures en absence de peptide, en présence de Neu_{TM35} et en présence de Neu*_{TM35} (R₁ = 1/100, 3076 acquisitions, filtrage du bruit par multiplication exponentielle du FID, LB = 100 Hz).

La Figure 11 montre des spectres de liposomes de DSPC-d70 en présence et en absence de peptides lors d'une évolution thermique.

Les spectres des liposomes seuls et des liposomes en présence des peptides à 312 K sont caractéristiques d'une phase lipidique lamellaire de type gel. A 330 K, avec et sans peptide, les spectres sont caractéristiques d'une phase fluide. Les spectres de liposomes en absence de peptide à 324 K et 326 K sont respectivement caractéristiques d'une phase gel et d'une phase fluide. En présence des peptides, à 324 et 326 K, la phase gel ordonnée est maintenue et nous avons la coexistence d'une phase fluide. A 326 K, la phase gel est plus importante avec Neu_{TM35} qu'avec Neu*_{TM35}.

Des spectres de RMN-³¹P ont été enregistrés pour les compositions précédentes et pour des températures différentes, on obtient des spectres de poudres caractéristiques d'une phase lamellaire.

3.3.2. Les moments spectraux des bicouches de DSPC en présence et en absence des peptides

La Figure 12 représente la variation du premier moment M_1 , calculé à partir des spectres de liposomes de DSPC-d70 en absence et en présence de peptides.

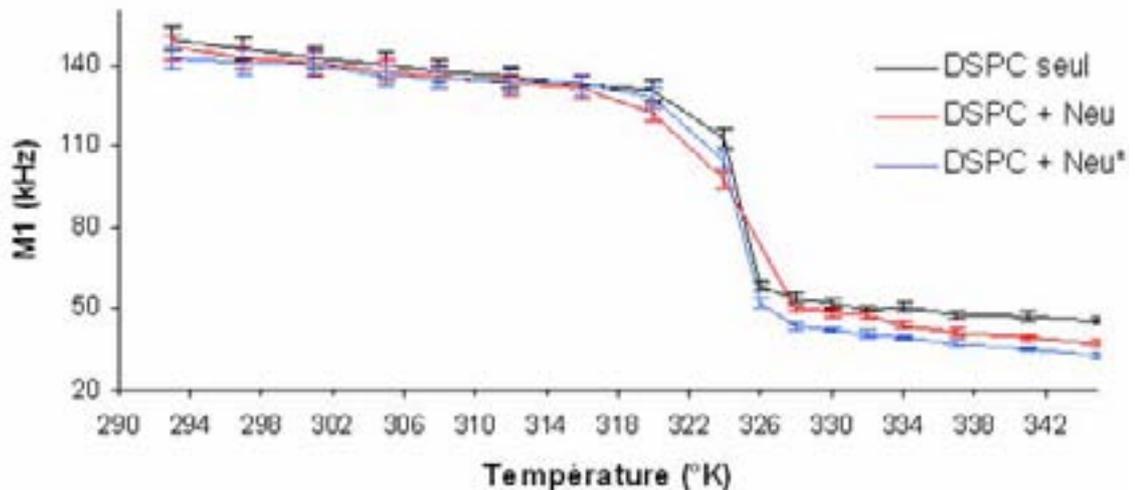


Figure 12. Variation thermique du premier moment spectral, M_1 , calculé à partir de spectres de RMN-²H de liposomes de DSPC (noir) en présence de Neu*_{TM35} (bleu) ou de Neu_{TM35} (rouge). L'erreur expérimentale est de 3%.

On remarque que ces moments sont assez proches dans la phase gel. En revanche dans la phase fluide, le premier moment, M_{1S} est plus petit en présence des peptides. La différence entre M_{1S} , calculé à partir des spectres de liposomes de DSPC-d70 seul et de liposomes de DSPC-d70 avec les peptides, est significative, ce qui traduit le fait que les systèmes peptides/lipides sont moins ordonnés que les lipides seuls en phase fluide. Afin de détailler ces effets observés, nous avons déconvolué les spectres et calculé les paramètres d'ordres. Il est à noter que l'intervalle de transition de phase en présence des peptides est plus grand qu'en absence de peptide. La température de transition en absence et en présence de peptides est un petit peu différente.

3.3.3. Le profil d'ordre des bicouches en présence et en absence des peptides

Les spectres RMN- 2H ont été déconvolués. La Figure 13 représente les spectres déconvolués à 324 K de DSPC seul et avec le peptide Neu*_{TM35}.

On constate que les éclatements quadrupolaires sont plus petits en présence de peptide, ce qui signifie que le système peptide/lipide est moins ordonné que le système lipide seul. Le peptide Neu*_{TM35} induit une diminution de Δ_{VQ} pour toutes les positions marquées.

On peut constater que l'on a pu mesurer douze éclatements quadrupolaires différents pour le DSPC-d72 et 10 pour le système peptide/lipide. Certaines positions n'ont pas pu être mesurées pour le système peptide/lipide.

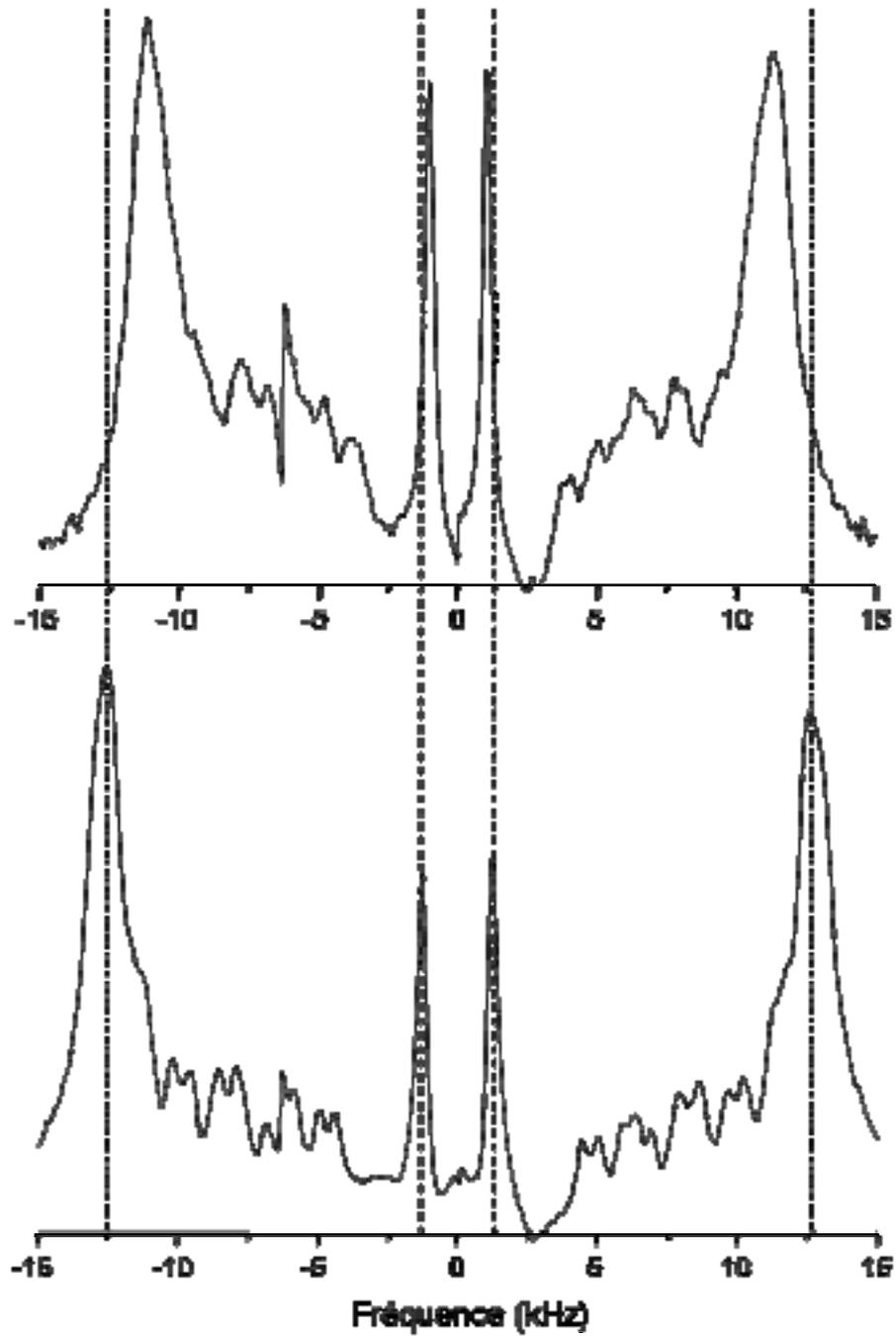


Figure 13. Spectres déconvolués des liposomes de DSPS-d70 en présence de Neu*_{TM35} ($R_1=1/100$) (en haut) et liposomes de DSPC-d70 seul (bas) à 330 K. Les lignes verticales en pointillés soulignent les différences des éclatements quadrupolaires.

Le tableau 3 donne le paramètre d'ordre, S^{CD} , du DSPC-d70 dans des liposomes en l'absence et en présence de Neu*_{TM35} et de Neu*_{TM35} pour les chaînes 1 et 2.

Position marquée	S^{CD}	S^{CD} (Neu) Ri 1/100	$\Delta S/S$ (%)	S^{CD} (Neu*) Ri 1/100	$\Delta S/S$ (%)
2, 2'	*			*	*
3, 3'	0.183	0.165	-11.5	0.151	-17.5
4, 4'	0.200	0.179	-10.5	0.179	-10.5
5, 5'	0.200	0.179	-10.5	0.179	-10.5
6, 6'	0.200	0.179	-10.5	0.179	-10.5
7, 7'	0.200	0.179	-10.5	0.179	-10.5
8, 8'	0.200	0.179	-10.5	0.179	-10.5
9, 9'	0.200	0.179	-10.5	0.179	-10.5
10, 10'	0.200	0.179	-10.5	0.179	-10.5
11, 11'	0.162	0.156	-3.7	0.128	-20.9
12	0.153	0.139	-9.2	0.122	-20.3
12'	0.162	0.156	-3.8	0.128	-20.9
13	0.136	0.125	-8.1	0.110	-19.1
13'	0.153	0.139	-9.2	0.122	-20.3
14	0.126	0.109	-13.5	0.102	-19.0
14'	0.136	0.125	-8.1	0.110	-19.1
15	0.110	0.101	-8.2	*	*
15'	0.126	0.109	-13.5	0.102	-19.0
16	0.094	0.089	-5.3	0.076	-19.1
16'	0.101	*	*	*	*
17	0.071	*	*	0.058	-18.3
17'	0.077	*	*	0.064	-16.9
18, 18'	0.020	0.020	0.0	0.016	-20.0

Tableau 3. Paramètre d'ordre, S^{CD} , du DSPC-d70, en l'absence et en présence des peptides pour A) chaîne 1 et B) chaîne 2. Les mesures sont réalisées à $T=330$ K pour une hydratation de 90%. * position non résolue. $\Delta S/S = ((S_{DSPC+peptide} - S_{DSPC})/S_{DSPC}) * 100$. L'erreur expérimentale est de 3% pour les positions "plateau" et de 2% pour les autres positions.

Nous observons une diminution des valeurs de S^{CD} pour l'ensemble des positions marquées des chaînes aliphatiques du DSPC après insertion des peptides. Cette diminution est de 10.5% pour les positions "plateau" en présence des peptides. En présence du peptide Neu_{TM35}, la diminution est comprise entre 3.7 et 11.5% pour les positions 3 et de 11 à 17. Il est à noter qu'aucune diminution n'a été détectée pour la position 18. En présence du peptide Neu*_{TM35}, la

diminution est plus importante et est comprise entre 16 et 21% pour les positions 10 à 18. Ces mesures nous montrent que les liposomes de DSPC-d70 en présence de peptides sont moins ordonnés que les liposomes de DSPC-d70 seul.

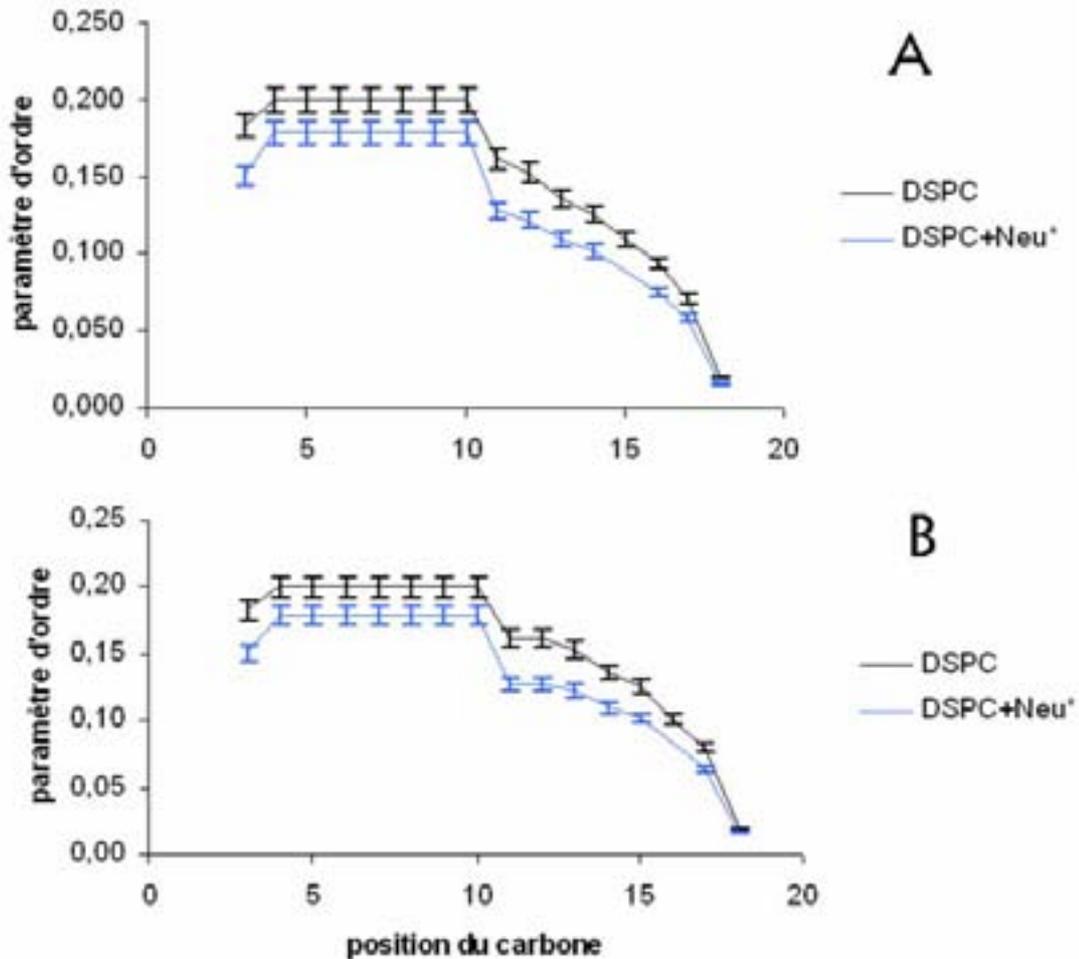


Figure 14. Variation du paramètre d'ordre en fonction de la position du carbone marqué au deutérium en présence et en absence du peptide Neu*_{TM35} à T=330 K. Le graphe A représente l'éclatement quadrupolaire de la chaîne 1 et le graphe B de la chaîne 2. L'erreur expérimentale est de 3% pour les positions "plateau" et de 2% pour les autres positions.

Les éclatements quadrupolaires à 330K de DSPC-d70 seul et avec le peptide Neu*_{TM35} des chaînes 1 et 2 ont été reportés sur la Figure 14 en fonction de la position du carbone marqué à T=330K. Par souci de clarté seuls les éclatements du peptide Neu*_{TM35} ont été représentés. Nous avons de plus choisi ce peptide car il perturbe plus l'organisation de la bicouche que le peptide Neu_{TM35}. Cet effet apparaît plus important pour les positions marquées au niveau des positions 10

à 14. Pour les positions "plateau", cet effet est moins marqué. Le peptide Neu*_{TM35} induit un désordre global à hautes températures.

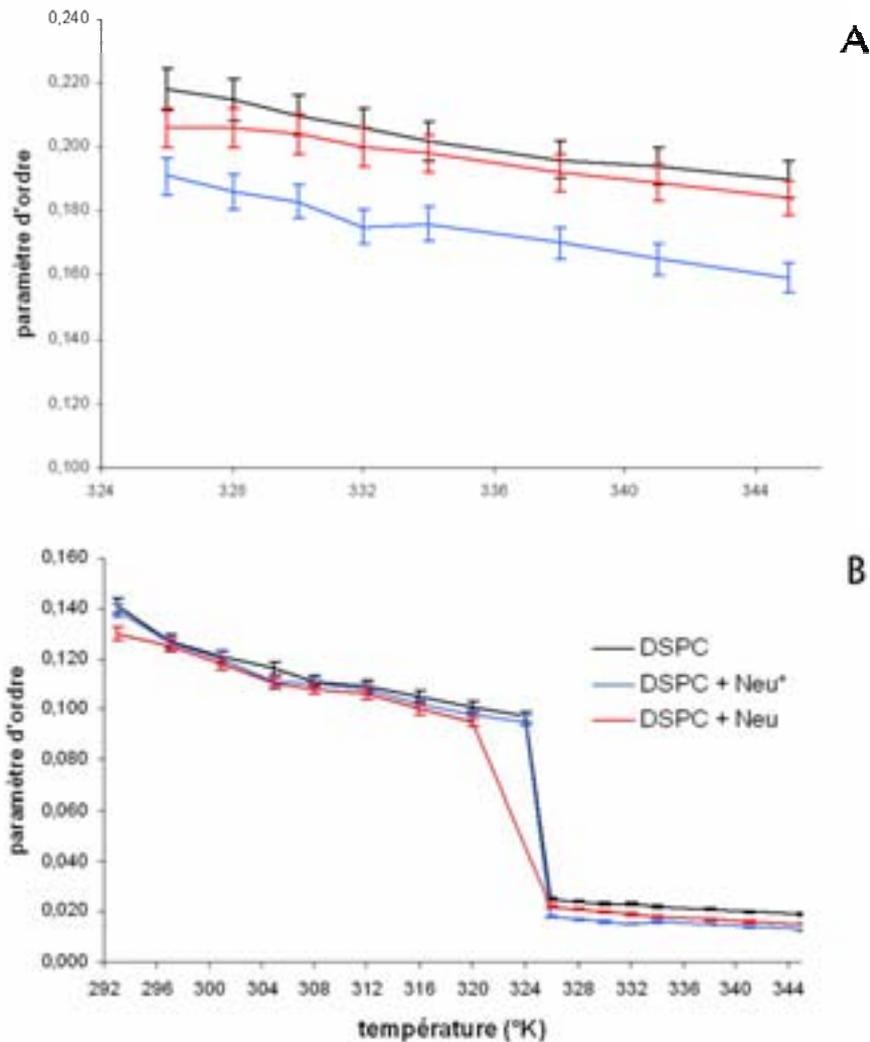


Figure 15 . Variation thermique de S^{CD} , calculé à partir des spectre de RMN 2H de liposomes de DSPC (noir) en présence de Neu*_{TM35} (bleu) ou de Neu_{TM35} (rouge), des positions "plateaux" (A) et des groupements méthyles terminaux (B). L'erreur expérimentale est de 3% pour les positions "plateau" et de 2% pour les autres positions.

Nous avons finalement étudié plus en détail l'influence des peptides sur l'organisation de la bicouche et nous avons donc calculé le paramètre d'ordre pour toutes les températures en présence et en absence de peptides.

La Figure 15 représente la variation thermique de S^{CD} des positions plateaux et des groupements méthyles terminaux en absence et en présence des peptides en fonction de la

température. La Figure 15A montre clairement que les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} provoquent une diminution de S^{CD} , plus particulièrement le peptide Neu*_{TM35} (comme nous venons de le voir). La Figure 15B montre qu'en phase gel il y a une légère différence entre les paramètres d'ordre en absence et en présence de peptides. En revanche en phase fluide, les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} provoquent une diminution plus prononcée de S^{CD} . Ceci est en accord avec nos résultats précédent (Tableau 3). Les peptides engendrent du désordre dans la bicouche en phase fluide.

Les mesures des moments spectraux, des paramètres d'ordre pour la position "plateau" et pour les groupements méthyles terminaux aux différentes températures ainsi que les mesures des paramètres d'ordre de toutes les positions marquées à $T = 330$ K en absence et en présence de peptides, nous montrent que la dynamique des lipides n'est pas la même avec ou sans peptides. Il a été démontré que les lipides sont moins ordonnés en présence de peptide. De plus, nous avons observé que l'intervalle de transition de phase en présence des peptides était plus grand qu'en absence de peptide.

4. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons suivi les perturbations produites sur la membrane en présence des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} et en particulier, nous avons essayé de voir dans quelle mesure une hélice hydrophobe peut moduler l'épaisseur membranaire. Nos résultats démontrent clairement que i) les peptides induisent un changement dans le thermotropisme de la membrane et que ii) les peptides impliquent une modification locale de la dynamique des lipides, en effet il existe une nette différence entre les S^{CD} des lipides purs et des lipides avec les peptides. Dans une première section, nous allons discuter nos résultats sur le thermotropisme puis dans une seconde section, nous allons voir comment l'épaisseur de la bicouche s'est adaptée aux peptides, pour mieux observer ce phénomène, nous avons calculé la longueur hydrophobe de la bicouche en absence et en présence des peptides à partir des profils d'ordres et finalement nous allons voir les effets de mésappariement dans les mécanismes biologiques tels que la formation de microdomaines lipidiques ou l'acheminement des protéines dans la voie de sécrétion.

4.1. Le thermotropisme

A basse température, toutes les chaînes des lipides membranaires ont une configuration tout-trans. Une élévation de température entraîne une mobilité accrue autour des liaisons C-C. La probabilité d'une isomérisation trans \rightarrow gauche augmente avec la température et au-delà d'une température donnée (température de transition) on observe une transition coopérative, ce qui signifie que toutes les chaînes sont passées en même temps d'une conformation ordonnée à une conformation désordonnée. Ce phénomène peut-être observé sur les graphiques représentant les M_{1s} . La transition de phase gel-fluide est aisément détectée, sa température est déterminée grâce à la discontinuité dans la variation de M_{1s} . Nous avons pu constater lors de notre étude que la température de transition en présence des peptides était un petit peu plus élevée qu'en absence de peptides. De même, nous avons vu clairement que l'intervalle de transition était plus important en présence de peptides (Figure 16).

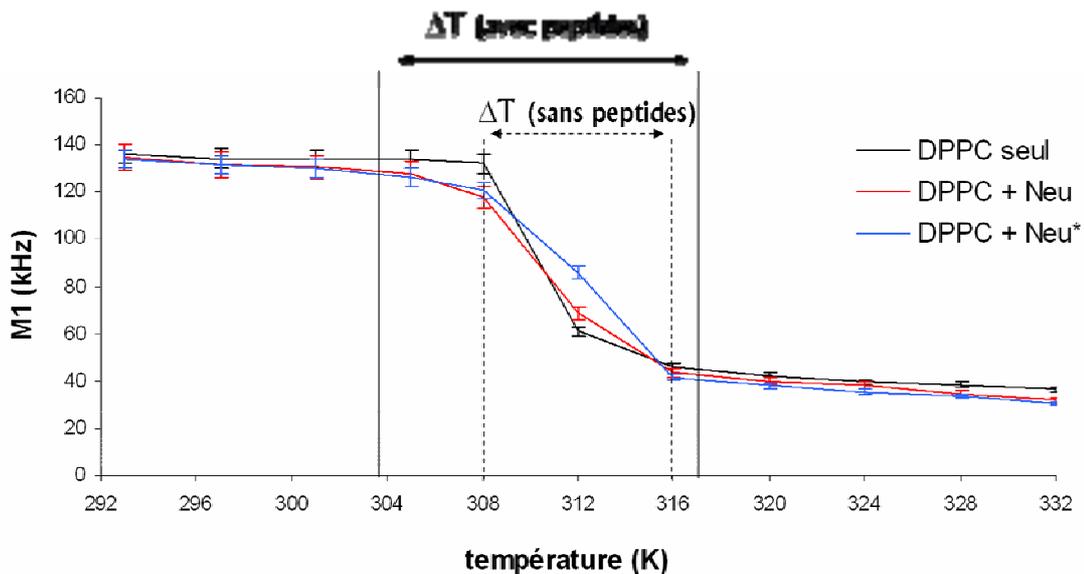


Figure 16. Variation thermique du moment M_{1s} de DPPC en présence et en absence des peptides. Les lignes verticales pleines représentent l'intervalle de transition en présence des peptides et les lignes verticales en pointillées représentent l'intervalle de transition en absence des peptides.

Nous avons observé une coexistence de phase gel et phase fluide autour de la température de transition. En présence des peptides, la phase gel ordonnée était maintenue et la phase fluide est apparue. Ce qui signifie que la transition n'a pas été coopérative en présence des peptides. Les

chaînes ne sont pas toutes passées d'une configuration ordonnée à une configuration désordonnée en même temps. Les peptides ont perturbé le thermotropisme de la bicouche.

4.2. Fluidification de la membrane

- Paramètre d'ordre

Les paramètres d'ordre ont été déterminés en phase fluide dans nos trois systèmes en présence et en absence de peptides. Dans un premier temps, nous avons étudié le système DMPC + peptides. Comme nous l'avons vu précédemment, la longueur hydrophobe du peptide est plus grande que l'épaisseur hydrophobe de la bicouche. Nous avons observé une augmentation des valeurs de S^{CD} pour l'ensemble des positions marquées des chaînes aliphatiques du DMPC après insertion du peptide. Les peptides induisent de l'ordre dans la bicouche. Dans un second temps, nous avons travaillé avec le système DPPC + peptides. Dans ce cas, la longueur hydrophobe du peptide est approximativement celle de la membrane. Les paramètres d'ordre en présence et en absence de peptides étaient très peu différents. Pour la position "plateau", une diminution était observée, en revanche pour les autres positions, la différence n'était pas significative (< 2%). Les peptides ont peu influencé la membrane. Dans un troisième temps, nous avons étudié le système DSPC + peptides. La longueur hydrophobe du peptide est plus petite que celle de la membrane. Les paramètres d'ordre en présence des peptides étaient plus petits qu'en absence de peptides. Ces mesures montrent que les peptides induisent du désordre dans la bicouche. Il est à noter que le peptide Neu*_{TM35} perturbe plus la membrane que le peptide Neu_{TM35}. Toutes les mesures des paramètres d'ordre montrent que les peptides induisent un ordre ou un désordre dans les membranes et cet effet est fonction de la longueur de la chaîne lipidique. Ce qui se traduit par un étirement ou par une contraction des chaînes lipidiques (*vide infra*).

- Effet de moyenne

Il est important de noter que les différences observées sur les paramètres d'ordre représentent un effet de moyenne. Le calcul des paramètres d'ordre est réalisé pour tous les lipides présents dans la bicouche. Nous pourrions supposer que les lipides loin du peptide seront influencés à un moindre degré que les lipides qui sont en contact direct avec lui (Mouritsen et Bloom, 1984 ; Mouritsen et Bloom, 1993 ; Fattal et Ben-Shaul, 1993 ; Pikhova *et al.*, 1993). Le paramètre

d'ordre déterminé est donc une moyenne des paramètres d'ordre de tous les lipides (Figure 17). Plus la concentration peptidique est importante, plus de lipides seront alors perturbés, c'est ce que nous allons voir dans la section suivante.

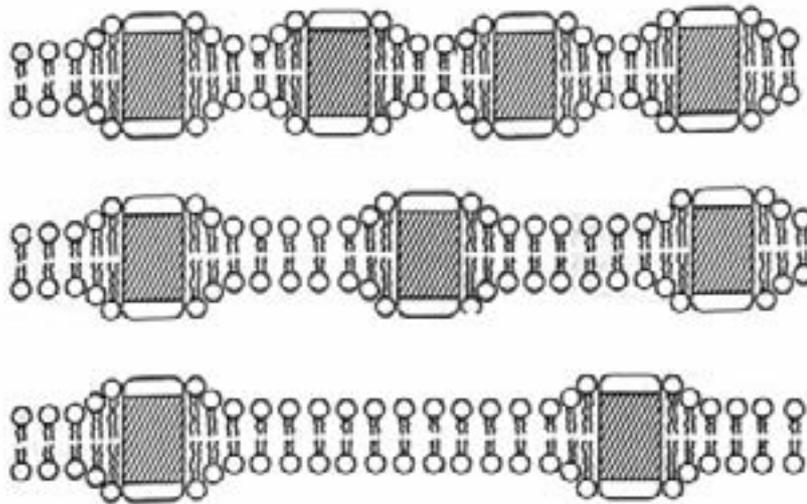


Figure 17. Représentation schématique de la perturbation des lipides à proximité des peptides. (d'après Mouritsen et Bloom, 1984).

- Effet de la concentration

Des expériences de RMN-²H antérieures ont été réalisées au Laboratoire pour étudier l'influence du peptide Neu_{TM35} dans des liposomes multilamellaires de DMPC-d27 (hydratation 80%) avec des rapports peptide/lipide 1/1800 et 1/600 (Aussenac, 2002). Nous avons réalisé les expériences avec un rapport peptide/lipide 1/100. Nous allons pouvoir analyser l'effet de la concentration sur la perturbation des lipides. Tous les spectres enregistrés sont caractéristiques de phases multilamellaires fluides. Les paramètres d'ordre des liaisons carbone-deutérium, S^{CD} , ont été directement mesurés sur les spectres déconvolués pour chacune des positions marquées de la chaîne aliphatique. Ces valeurs ont été comparées aux paramètres d'ordre mesurés pour les modèles membranaires en l'absence de peptide. Pour les rapports 1/600 et 1/1800, une très faible augmentation des valeurs de S^{CD} est observée pour l'ensemble des positions marquées de la chaîne aliphatique. Ces variations sont de l'ordre de 1 à 4%. L'incorporation du peptide Neu_{TM35} perturbe donc très faiblement la phase lipidique multilamellaire. Pour le rapport 1/100, nous avons observé une augmentation plus importante (de 4 à 13% pour le peptide Neu_{TM35} et de 2 à

8% pour le peptide Neu*_{TM35}). La perturbation est plus importante avec le rapport 1/100 qu'avec les rapports 1/600 et 1/1800. Dans notre échantillon, la concentration peptidique est plus importante, la perturbation sera donc plus importante de même que l'augmentation des paramètres d'ordre.

- Changement d'épaisseur de la bicouche

Une estimation de l'épaisseur hydrophobe des chaînes la bicouche en présence et en absence de peptides a pu être calculée selon la méthode décrite par Douliez (Douliez *et al.*, 1995). L'épaisseur hydrophobe dans les membranes peut être calculé à partir des paramètres d'ordre S^{CD} . Pour une chaîne avec un nombre pair de carbone (DMPC, DPPC et DSPC), l'épaisseur hydrophobe s'écrit sous la forme :

$$\langle L_{chaîne} \rangle = \frac{1 + \sqrt{1 + 8S_{mol}}}{4} \left[\langle l_{C_n-D} \rangle + 1.25 \left(\frac{1}{2} + \frac{S_n^{CC}}{S_{mol}} + \sum_{m=1}^{n/2-1} \left(1 + \frac{S_{2m}^{CD}}{S_{mol}} \right) \right) \right]$$

où S_{mol} est le paramètre d'ordre moléculaire ; $\langle l_{C_n-D} \rangle$ représente la contribution de la liaison C_n-D du méthyl terminal qui est estimée à $1.09 \cos(35.25^\circ) \text{ \AA}$; S_n^{CC} est le paramètre d'ordre de la liaison $C_{n-1}-C_n$, il peut être aisément 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 $C_{n-1}-C_n$:

$$S_n^{CD} = \frac{3 \cos^2 111^\circ - 1}{2} S_n^{CC}$$

Pour calculer la longueur hydrophobe, nous avons pris $S_{mol} = 1$, en effet il a été montré que cette approximation ne conduit qu'à une faible erreur (Douliez, 1995). Les positions 2S et 2R n'ont pas été résolues, nous avons donc pris les valeurs données par la littérature (Dufourc *et al.*, 1984 ; Douliez *et al.*, 1995). Certaines positions n'ont pas été résolues en présence des peptides et dans ces cas, nous avons extrapolé la valeur du paramètre d'ordre.

Le Tableau 3 renseigne sur les longueurs hydrophobes (avec et sans le groupement glycérol) calculées sur nos échantillons en absence et en présence de lipides.

	Epaisseur hydrophobe sans peptide	Epaisseur hydrophobe avec peptide Neu _{TM35}	Epaisseur hydrophobe avec peptide Neu* _{TM35}
Membrane de DMPC	23.3 Å (29.8 Å)	23.6 Å (30.1 Å)	23.5 Å (30.0 Å)
Membrane de DPPC	25.6 Å (32.1 Å)	25.6 Å (32.1 Å)	25.5 Å (32.0 Å)
Membrane de DSPC	31.3 Å (37.8 Å)	31.0 Å (37.5 Å)	30.8 Å (37.3 Å)

Tableau 4. Estimation de la longueur hydrophobe de la bicouche (en Å) en absence et en présence de peptides (rapport peptide/lipides 1/100, calcul effectué avec les paramètres d'ordres calculés en phase fluide). Le chiffre entre parenthèse représente l'épaisseur de la bicouche (chaîne + glycérol). Ce calcul a été réalisé avec l'approximation que l'épaisseur du glycérol ne varie pas (Léonard *et al.*, 2001 ; Aussenac *et al.*, 2003). La précision est de 0.1 Å.

Ce Tableau montre clairement que la membrane s'est adaptée au peptide. Dans le cas du mésappariement positif (peptides dans liposomes de DMPC), les lipides se sont adaptés au peptide en étirant les chaînes. Ce qui signifie que la membrane possède une épaisseur plus grande après insertion des peptides. C'est ce que nous observons dans le tableau. La membrane a une épaisseur de 29.8 Å sans les peptides et en présence des peptides, l'épaisseur est de 30.1 et 30.0 Å. Dans le cas où les peptides sont insérés dans une membrane de DPPC, les épaisseurs de la membrane en absence et en présence de peptides n'ont quasiment pas changé (32.1 sans peptide et 32.1 et 32.0 Å avec peptide). Ni le peptide, ni la membrane n'a eu besoin de s'adapter. Dans le cas du mésappariement négatif (peptides dans liposomes de DSPC), les lipides se sont adaptés au peptide, comme nous l'avons vu précédemment et les chaînes lipidiques se sont réduites. C'est ce qu'on observe dans le tableau, sans peptide la membrane a une épaisseur de 37.8 Å et après insertion du peptide l'épaisseur a réduit pour atteindre 37.5 et 37.3 Å. Les estimations de l'épaisseur des membranes en présence et en absence de peptides vont dans le sens de nos résultats. La membrane lipidique et donc l'épaisseur de la membrane s'est adaptée au peptide. Cette variation est faible mais significative. Nous pouvons relier cette variation à la constante d'élasticité de courbure, qui varie en $1/d^2$ (où d est l'épaisseur de la membrane lipidique) ce qui signifie que plus la membrane est épaisse, plus son élasticité de courbure est faible et inversement plus la membrane est fine et plus son élasticité est importante. Dans notre cas, après incorporation des peptides dans les bicouches de DSPC, nous observons une diminution de l'épaisseur de la membrane, ce qui signifie que la membrane possède une constante d'élasticité de courbure plus importante. Inversement dans le cas du DMPC, la constante de courbure est moins importante en présence des peptides. Ce

phénomène a déjà été observé sur des liposomes géants en présence et en absence de cholestérol (Meleard *et al.*, 1997).

Nos expériences de RMN-²H ont donc prouvé que les peptides induisent des effets clairs sur l'épaisseur de la bicouche et que ces effets sont directement corrélés avec l'ampleur du mésappariement hydrophobe. Le peptide a forcé la membrane à s'adapter. Nous avons vu que la concentration peptidique joue un rôle sur la perturbation. Nous avons travaillé malheureusement avec un seul rapport peptide/lipide (1/100), pour conforter cette hypothèse, il aurait été intéressant de réaliser des expériences avec des rapports peptide/lipides plus important en concentration peptidique (1/60 ou 1/30).

- Modèle du "matelas"

Nous venons de voir que l'incorporation des peptides impliquait un changement de la longueur hydrophobe de la bicouche. Ce changement peut s'expliquer par le modèle du "matelas", décrit par Mouritsen et Bloom (Mouritsen et Bloom, 1984). Comme nous l'avons vu au Chapitre 1, le modèle du "matelas" est un modèle thermodynamique qui décrit les interactions des mélanges de bicouches lipidiques et de protéines ou peptides. Ce modèle peut être visualisé schématiquement comme un matelas (constitué de lipides) possédant des ressorts (peptides ou protéines). Lorsque la membrane et le peptide ne possèdent pas la même longueur hydrophobe, une adaptation des lipides et/ou du peptide est probable afin de réduire les contraintes énergétiques imposées par le mésappariement. Diverses possibilités sont alors envisageables : adaptation de la chaîne lipides, déformation du peptide, inclinaison du peptide, agrégation etc. (cf. Chapitre 1). Ce modèle permet de connaître les perturbations produites par l'insertion de peptides ou de protéines dans des modèles de membranes.

Dans notre étude, nous avons incorporé les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans des liposomes de longueurs hydrophobes différentes. Dans le premier cas, les peptides ont été incorporés dans des bicouches de DMPC, et possèdent donc une longueur hydrophobe plus importante que la membrane. On se situe dans le cas du mésappariement positif (Figure 18). Afin de réduire les contraintes énergétiques, les lipides doivent s'adapter au peptide ou inversement, le peptide doit s'adapter à la membrane. Nos résultats nous montrent que les lipides sont plus

ordonnés en présence de peptide. Ce qui signifie que la membrane s'est adaptée au peptide. L'étirement des chaînes acétylées des lipides est induit par l'insertion des peptides transmembranaires. Dans le second cas, les peptides ont été insérés dans des bicouches de DPPC et aucun effet de mésappariement n'a lieu. Les deux composants possèdent la même épaisseur hydrophobe, le système est stable dans cette configuration et ni le peptide ni la membrane n'a besoin de s'adapter. Les études des paramètres d'ordre ont montré que la membrane est peu ou pas influencée par l'incorporation des peptides. Dans le dernier cas, les peptides ont été introduits dans une bicouche de DSPC. Ils possèdent donc une longueur hydrophobe plus faible que la membrane. On se situe dans le cas du mésappariement négatif (Figure 18). Afin de réduire les contraintes énergétiques, une adaptation des lipides ou du peptide doit avoir lieu. Nos résultats ont démontré que les lipides sont moins ordonnés en présence de peptide. Ce qui signifie que la membrane s'est adaptée au peptide. La réduction des chaînes acétylées des lipides est induite par l'insertion des peptides transmembranaires.

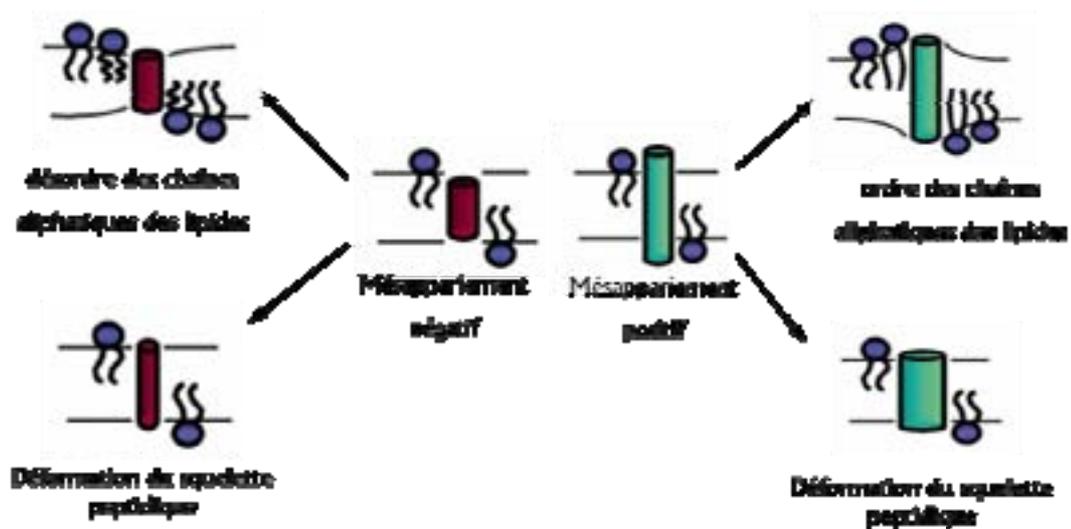


Figure 18. Schéma représentant deux effets possibles du mésappariement négatif et positif. la réduction des chaînes acétylées des lipides après insertion d'un peptide de longueur hydrophobe plus petite que l'épaisseur de la bicouche (d'après Killian, 1998).

- Différence entre Neu_{TM35} et Neu*_{TM35}

Lors de cette étude, nous avons remarqué que les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} ne perturbaient pas la membrane avec la même intensité. En effet après incorporation des peptides

dans de liposomes de DMPC, nous avons vu que le peptide Neu_{TM35} perturbait plus la membrane que le peptide Neu*_{TM35}, il produisait un ordre plus important. Dans les bicouches de DPPC, la perturbation due à la présence des peptides était très faible, toutefois il est à noter que le peptide Neu*_{TM35} induisait un désordre plus important que Neu_{TM35} au niveau de la position "plateau". Dans la membrane de DSPC, il est apparu clairement que Neu*_{TM35} impliquait un désordre plus important que Neu_{TM35} sur l'ensemble des positions marquées. Il est évident que ces deux peptides n'ont pas la même influence sur la membrane. Il est clair que Neu*_{TM35} induit un désordre plus important que Neu_{TM35}. Il est intéressant de rappeler que le peptide Neu*_{TM35} est le peptide muté qui engendre la prolifération cellulaire. Nous pouvons donc nous poser la question du rôle du domaine transmembranaire Neu*_{TM35} dans la membrane lors de la dimérisation, est ce que l'augmentation du désordre implique une plus grande mobilité des monomères et donc un réarrangement structural plus facile ? Malheureusement nous ne pourrions pas répondre à ces questions pour le moment.

4.3. Effets du mésappariement hydrophobe dans les biomembranes et ses conséquences dans les processus biologiques

Des études ont clairement prouvé que le mésappariement hydrophobe peut affecter les protéines et le comportement des lipides dans les systèmes de membrane modèles, plus particulièrement sur la formation de microdomaines et sur l'acheminement des protéines dans la voie de sécrétion. Dans les bicouches liquidiqes se composant de plusieurs lipides de longueurs différentes, il a été montré que le mésappariement hydrophobe peut induire des interactions préférentielles protéine-lipide ou peptide-lipide, qui peuvent avoir comme conséquence la formation de microdomaines (Tocanne *et al.*, 1994 ; Sperotto et Mouritsen, 1993).

Nous avons vu que l'insertion des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans nos modèles de membranes perturbait ces dernières. En effet, le thermotropisme de la bicouche est changé, nous avons une coexistence de phase gel et phase fluide. Nous pouvons donc nous poser la question de l'existence d'un ou de plusieurs domaine(s) lipidique(s) et d'interactions peptides-lipides préférentielles. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'activation et la dimérisation des récepteurs induit un changement de la bicouche (épaisseur, élasticité, composition etc.), qui conduirait à la formation de microdomaines lipidiques. La dimérisation aurait lieu dans ces domaines. De plus, nous avons vu que Neu*_{TM35} induisait un désordre plus important que le peptide Neu_{TM35}, nous pourrions donc

penser que ce peptide à une plus grande aptitude à la formation des microdomaines lipidiques, ce qui amène à une dimérisation et par la suite une activation plus aisée.

5. Conclusion et Perspectives

Nos études ont montré que les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} perturbaient la membrane. Cette perturbation dépend de la longueur hydrophobe de la bicouche. Nous avons vu que ces peptides pouvaient moduler l'épaisseur membranaire, en effet la membrane s'est adaptée aux longueurs hydrophobes des peptides transmembranaires. De plus, nous avons montré que le peptide Neu*_{TM35} induisait un désordre plus important que le peptide Neu_{TM35}.

Ces études réalisées dans des membranes modèles composées d'un seul lipidique sont bien entendu des études préliminaires. Afin de mieux approfondir notre étude, il serait très intéressant de compliquer le système membranaire, plus particulièrement d'ajouter à la composition initiale du cholestérol et/ou de la sphingomyéline et/ou du POPC. Le cholestérol et la sphingomyéline rigidifient la membrane et sont présents dans les microdomaines. Grâce à l'addition de ces lipides, la composition de notre membrane modèle sera plus proche de la composition d'une membrane naturelle.

Les études de RMN-²H ont montré que les lipides se sont adaptés au peptide, mais aucune expérience n'a été réalisée afin d'observer le comportement du peptide. Pour vérifier nos résultats, il serait intéressant de faire des expériences de DC de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans des membranes afin de voir l'évolution de l'hélice transmembranaire, si évolution il y a. Ces données nous permettront de savoir si le squelette peptidique a subi une déformation.

De plus, il serait intéressant de faire des expériences avec des rapports peptide/lipide plus important (1/60 ou 1/30) afin de voir si l'effet de mésappariement est plus important. En effet, la concentration peptidique sera plus importante et un grand nombre de lipides sera proche des peptides. On pourra alors estimer l'augmentation des paramètres d'ordre.

BIBLIOGRAPHIE

- Aussenac F. Thèse de l'université de Bordeaux 1. Les bicelles et les rafts : de nouvelles membranes biomimétiques pour l'étude de protéine membranaires par RMN des solides. 2002.
- Aussenac F, Laguerre M, Schmitter JM, Dufourc EJ. Detailed Structure and Dynamics of Bicelle Phospholipids Using Selectively Deuterated and Perdeuterated Labels. ²H NMR and Molecular Mechanics Study. *Langmuir*. 2003; **19**: 10468-10479.
- Bloom M, Davis JH, MacKay AL. Direct determination of the oriented sample NMR spectrum from the powder spectrum for systems with local axial symmetry. *Chem. Phys. Lett.* 1981; **80**: 198-202.
- Davis JH, Jeffrey KR, Bloom M, Valic MI, Higgs TP. Quadrupolar echo deuteron magnetic resonance spectroscopy in ordered hydrocarbon chains. *Chem. Phys. Letters*. 1976; **42**: 390-394.
- Davis JH. Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine. *Biophys. J.* 1979; **27**: 339-358.
- Davis JH. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by 2H-NMR. *Biochim. Biophys. Acta*. 1983; **737**: 117-171.
- Douliet JP. Thèse de l'université de Bordeaux 1. Propriétés dynamiques et conformationnelles des chaînes aliphatiques des phospholipides dans les membranes modèles. 1995.
- Douliet JP, Léonard A, Dufourc EJ. Restatement of Order Parameters in Biomembranes : Calculation of C-C Bond Order Parameters from C-D Quadrupolar Splittings. *Biophys. J.* 1995; **68**: 1727-1739.
- Dufourc EJ, Parish EJ, Chitrakorn S, Smith ICP. Structural and dynamical details of cholesterol-lipid interaction as revealed by deuterium NMR. *Biochemistry*. 1984; **23**: 6063-6071.
- Fattal DR, Ben-Shaul A. A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role for hydrophobic mismatch. *Biophys. J.* 1993; **65**: 1795-1809.
- Goetz M, Carlotti C, Bontemps F, Dufourc EJ. Evidence for an α -helix- π bulge helicity modulation for the neu/erbB-2 membrane-spanning segment. A ¹H NMR and circular dichroism study. *Biochemistry*. 2001; **40**: 6534-6540.
- Heldin CH. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 1995; **80**: 213-223.
- Johannsson A, Smith GA, Metcalfe JC. The effect of bilayer thickness on the activity of (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1981; **641**: 416-421.
- Killian JA. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1998; **1376**: 401-415.

- Léonard A, Escrive C, Laguerre M, Pebay-Peyroula E, Neri W, Pott T, Katsaras J, Dufourc EJ. Location of Cholesterol in DPMC Membranes. A Comparative Study by neutron Diffraction and Molecular Mechanics Simulation. *Langmuir*. 2001; **17**: 2019-2030.
- Lehtonen JYA, Kinnunen PKJ. Evidence for phospholipid microdomain formation in liquid crystalline liposomes reconstituted with Escherichia coli lactose permease. *Biophys. J.* 1997; **72**: 1247-1257.
- Lewis BA, Engelman DM. Lipid bilayer thickness varies linearly with acyl chain length in fluid phosphatidylcholine vesicles. *J. Mol. Biol.* 1983; **166**: 211-217.
- Marsh D. Lipid-protein interactions and heterogeneous lipid distribution in membranes. *Mol. Membr. Biol.* 1995; **12**: 59-64.
- Meleard P, Gerbeaud C, Pott T, Fernandez-Puente L, Bivas I, Mitov MD, Dufourcq J, Bothorel P. Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content. *Bioph. J.* 1997; **72**: 2616-2629.
- Montecucco C, Smith GA, Dabbeni-sala F, Johansson A, Galante YM, Bisson R. Bilayer thickness and enzymatic activity in the mitochondrial cytochrome c oxidase and ATPase complex. *FEBS Lett.* 1982; **144**: 145-148.
- Mouritsen OG, and Bloom M. Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. *Biophys. J.* 1984; **46**: 141-153.
- Mouritsen OG, Bloom M. Models of lipid-protein interactions in membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1993; **22**: 145-171.
- Pelham HR, Munro S. Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell.* 1993; **75**: 603-605.
- Piknova B, Perochon E, Tocanne JF. Hydrophobic mismatch and long-range protein/lipid interactions in bacteriorhodopsin/phosphatidylcholine vesicles. *Eur. J. Biochem.* 1993; **218**: 385-396.
- Pott T, Dufourc EJ. Action of melittin on the DPPC-Cholesterol liquid-orderd phase: a solid state ²H and ³¹P-²NMR study. *Biophys. J.* 1995; **68**: 965-977.
- Pott T, Paternostre M, Dufourc EJ. A comparative study of the action of melittin on sphingomyéline and phosphatidylcholine bilayers. *Eur. Biophys. J.* 1998; **27**: 237-245.
- Rance M, Byrd RA. Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropoc media: phase-cycled Hahn echo spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 1983; **52**: 221-240.
- Ryba NJP, Marsh D. Protein rotational diffusion and lipid/protein interactions in recombinants of bovine rhodopsin with saturated diacylphosphatidylcholines of different chain lengths studied by conventional and saturation-transfer electron spin resonance. *Biochemistry.* 1992; **31**: 7511-7518.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinase. *Cell.* 2000; **103**: 211-225.
- Seelig J. Deuterium Magnetic Resonance: Theory and Applications to Lipid Membranes. *Quart. Rev. Biophys.* 1977; **10**: 353.

- Sperotto MM, Mouritsen OG. Lipid enrichment and selectivity of integral membrane proteins in two-component lipid bilayers. *Eur. Biophys. J.* 1993; **22**: 323-328.
- Tocanne JF, Cézanne L, Lopez A, Piknova B, Schram V, Tournier JF, Welby M. Lipid domains and lipid/protein interactions in biological membranes. *Chem. Phys. Lipids.* 1994; **73**: 139–158.
- Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptor with tyrosine kinase activity. *Cell.* 1990; **61**: 203-12.
- Zhang YP, Lewis RNAH, Henry GD, Sykes BD, Hodges RS, McElhaney RN. Peptide models of helical hydrophobic transmembrane segments of membrane proteins. 1. Studies of the conformation, intrabilayer orientation, and amide hydrogen exchangeability of Ac-K2-(LA)12-K2-amide. *Biochemistry.* 1995a; **34**: 2348-2361.
- Zhang YP, Lewis RNAH, Hodges RS, McElhaney RN. Peptide models of helical hydrophobic transmembrane segments of membrane proteins. 2. Differential scanning calorimetric and FTIR spectroscopic studies of the interaction of Ac-K2-(LA)12-K2-amide with phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry.* 1995b; **34**: 2362-2371.

Chapitre 8

Conclusions et Perspectives

L'objectif de ce travail était de synthétiser puis d'étudier la structure et la dynamique de peptides membranaires impliqués dans le cancer et dans l'apoptose. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux domaines transmembranaires du récepteur à tyrosine kinase et au domaine BH4 de la protéine anti-apoptotique Bcl2. Les peptides Neu_{TM35}, Neu*_{TM35} et BH4 ont été synthétisés sur support solide, puis les analyses par DC et RMN des solides nous ont permis de caractériser la structure et la dynamique des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans un milieu membranaire.

1. Conclusions

La première partie de cette thèse a été de synthétiser et purifier les peptides. Pour cela nous avons tout d'abord synthétisé le peptide transmembranaire natif neu/erbB-2, le peptide muté neu*/erbB-2 et le peptide BH4, domaine spécifique de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Ces synthèses représentaient notre premier challenge, en effet la synthèse et la purification de peptides hydrophobes sont des étapes difficiles, longues et fastidieuses. Néanmoins, après optimisation des conditions de synthèse et de purifications, nous avons réussi à obtenir les peptides avec grande pureté (toujours supérieur à 95%) et de bons rendements. Par la suite, ces peptides ont aussi été sélectivement marqués avec un isotope d'intérêt pour l'étude par RMN (¹⁵N). Le développement de ces méthodes et leur optimisation nous ont permis de renouveler ces synthèses de manière quasi-routinière, aussi bien pour les peptides non-marqués que pour les peptides incorporant des traceurs isotopiques.

Lors de la deuxième partie, nous avons développé pour la première fois une méthode d'extraction afin de récupérer quantitativement les peptides après formation d'un système membranaire. Aucune méthode de récupération des peptides n'avait été proposée à ce jour. La méthode mise au point est une méthode d'extraction en phase solide (SPE). Cette nouvelle

méthode a été testée sur plusieurs systèmes (peptides hydrophobes et amphiphiles, lipides chargés ou zwitterion). Elle fonctionne bien, donne de bons rendements et possède l'avantage d'être très rapide : seulement 1 à 2 injections sont nécessaires et la séparation la plus longue dure 32 minutes. Il est à noter que cette méthode peut être adaptée à plusieurs types de systèmes, peptide hydrophobe, hydrophile ou chargé, lipides zwitterion ou chargés possédant des longueurs de chaînes aliphatiques différentes etc...

Dans un troisième temps, nous sommes partis à la recherche de l'hélice π . Nous souhaitons comprendre le rôle de cette hélice, présente dans le domaine transmembranaire du récepteur à tyrosine kinase afin de mieux appréhender les mécanismes de dimérisation et d'activation du récepteur. Les résultats de modélisation moléculaire nous ont permis d'observer une hélice π stable. Le peptide KV₂₀K présente en effet toutes les caractéristiques du bon candidat. De plus nos analyses ont montré que ce peptide a la faculté de "plasticité". En effet des transitions $\alpha \rightarrow \pi$ et $\pi \rightarrow \alpha$ sont observables dans différents milieux. Les simulations en bicouche de DMPC nous ont montré que la membrane s'adapte au peptide à volume constant et le peptide s'adapte à la membrane à pression constante. En revanche, le peptide ne se structure pas en hélice π et il a donc été impossible de vérifier notre hypothèse sur l'élasticité de l'hélice π en milieu membranaire.

La quatrième partie relate des résultats de l'étude structurale des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} par dichroïsme circulaire. Les résultats dans le TFE indiquent que les peptides se structurent majoritairement en l'hélice α mais on notera toutefois que le peptide Neu_{TM35} a un pourcentage un peu plus important d'hélicité que le peptide Neu*_{TM35} (un peu plus de 10%). Nos résultats montrent aussi qu'en solvant TFE, les peptides conservent un seul état de structuration dans notre gamme de concentration. Les études réalisées en membrane montrent que les peptides se structurent toujours en hélice α (Neu_{TM35} a un pourcentage plus élevé que Neu*_{TM35}) et que la membrane plane, favorise la dimérisation des peptides indépendamment de la mutation. Le dimère Neu*_{TM35} ne serait donc pas plus stable que le dimère Neu_{TM35}. Les dimères sont préformés et le déclencheur de la multiplication cellulaire (via l'autophosphorylation des tyrosines) passerait par un réarrangement structural des monomères. Il est à noter que l'hélice π pourrait consolider les dimères grâce aux interactions hydrophobes.

La dernière partie décrit l'influence des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} sur des membranes modèles par RMN des solides. Nous avons suivi les perturbations produites sur la membrane et en particulier, nous avons cherché à comprendre dans quelle mesure une hélice hydrophobe peut moduler l'épaisseur membranaire. Les études ont montré d'une part que les peptides perturbaient la membrane. Il est à noter qu'en présence de peptides, la transition n'est plus coopérative, l'intervalle de transition a nettement augmenté. Il est aussi intéressant de mentionner que les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} ne perturbent pas la membrane avec la même intensité. D'autre part, nous avons vu que l'épaisseur de la bicouche lipidique s'est adaptée à la longueur hydrophobe des peptides. Nous avons pu observer un étirement et une contraction des chaînes lipidiques, ce qui a impliqué un ordre ou un désordre de la membrane. Nous avons vu que cet effet dépendait de la concentration peptidique, plus il y a de peptides présents dans la bicouche, plus l'effet est important. De plus une estimation de la longueur de la bicouche a été effectuée et montre que la membrane s'est allongée ou rétrécie après insertion des peptides.

2. Perspectives

Les résultats de modélisation en solvant implicite ont montré que KV_{20K} est un bon candidat pour la recherche de l'hélice π . Il serait intéressant de purifier ce peptide afin d'étudier sa structure par des expériences de dichroïsme circulaire et vérifier si l'expérience va dans le sens des calculs. Les résultats de modélisation en membrane n'ont pas été décisifs. Nos résultats actuels ne prouvent pas que l'hélice π puisse s'adapter à une épaisseur de membrane donnée. Il est donc intéressant de continuer ces études et plus particulièrement de modéliser pendant des temps plus longs afin d'observer une transition $\alpha \rightarrow \pi$.

L'hypothèse que le déclencheur de la multiplication cellulaire passe par un réarrangement structural des monomères a été émise. Il serait donc intéressant d'étudier la topologie des fragments transmembranaires Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans une bicouche. Ces expériences peuvent être réalisées par RMN-¹⁵N, les peptides ont été synthétisés avec des marqueurs ¹⁵N et la RMN va nous permettre d'observer le comportement de ces peptides.

La RMN-²H a démontré que la membrane s'est adaptée aux peptides. Aucune expérience n'a été réalisée afin d'observer le comportement du peptide. Il serait donc intéressant de faire des

expériences de DC de Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} dans des liposomes de DMPC, DPPC et DSPC afin d'observer le comportement de l'hélice. Ces données nous permettront de savoir si le squelette peptidique a subi une déformation. De plus, des études de RMN-²H avec des rapports peptide/lipide plus important (1/60 ou 1/30) permettraient de voir si l'effet de mésappariement est plus important. Afin de mieux approfondir notre étude, nous pouvons imaginer faire évoluer le système de membrane modèle, plus particulièrement d'ajouter à la composition initiale du cholestérol et/ou de la sphingomyéline et/ou du POPC. Nous pourrions ainsi étudier l'influence de l'incorporation des peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} sur la dynamique de microdomaines membranaires de types rafts.

La compréhension des mécanismes de transduction du signal par les récepteurs Neu/ErbB2 est cruciale pour pouvoir combattre les nombreux cancers dans lesquels ces récepteurs sont impliqués. La connaissance des paramètres stabilisant les dimères oncogéniques pourrait ouvrir la voie à une intervention dans de nombreux types de cancer. Nous pouvons penser contrôler la régulation de la dimérisation de manière chimique. La synthèse des domaines transmembranaires est totalement maîtrisée, nous pourrions alors synthétiser des molécules leurres afin d'empêcher la formation des dimères. De plus, nous avons vu que la membrane plane favorisait la dimérisation, il serait intéressant d'observer le comportement des dimères après déstabilisation de la membrane, soit en changeant la composition lipidique soit en changeant la géométrie de la membrane. L'hélice π pourrait consolider les dimères grâce aux interactions hydrophobes, si nous modifions les interactions hydrophobes (ou électrostatiques) dans la membrane, nous pourrions déstabiliser les dimères. Le contrôle de la régulation de la dimérisation pourrait aussi être réalisé sur un plan physique par variation des conditions de température, d'acidité-basicité, de teneur en ions, ou de fluidité des membranes. Toutes ces expériences pourraient être réalisées lorsque le récepteur muté Neu*/ErbB2 est présent dans la cellule pour empêcher la formation du dimère et éviter la prolifération cellulaire incontrôlée.

Annexes

1. Annexe 1 - Synthèse peptidique

Les séquences des onze peptides synthétisés sont données dans le tableau ci-dessous, les résidus hydrophobes sont représentés en rouge, l'acide aminé muté pour le peptide Neu* a une *. Les acides aminés ¹⁵N sont doublement surlignés et en gris, le pourcentage d'hydrophobicité est indiqué dans la colonne de droite :

Peptide	Séquence	% d'hydrophobicité
Neu _{TM35}	'EQRASPVTFIATVVG VLLFLILVVVV GILIKRRR ³⁵	68%
Neu _{TM35}	'EQRASPVTFIATVVG VLLFLILVV <u>V</u> GILIKRRR ³⁵	68%
Neu _{TM35}	'EQRASP <u>V</u> TFIATVVG <u>V</u> LFLILVV <u>V</u> GILIKRRR ³⁵	68%
Neu* _{TM35}	'EQRASPVTFIATVE*GVLLFLILVVVVGILIKRRR ³⁵	65%
Neu* _{TM35}	'EQRASPVTFIATVE*GVLLFLILVV <u>V</u> GILIKRRR ³⁵	65%
Neu* _{TM35}	'EQRASP <u>V</u> TFIATVE*GV <u>L</u> LFLILVV <u>V</u> GILIKRRR ³⁵	65%
KV ₁₂ K	'K VVVVVVVVVVVVV K ¹⁴	85%
KV ₂₀ K	'K VVVVVVVVVVVVVVVVVVVVV K ²⁴	91%
BH4 (6-30)	'RTGYDNREI VMKYIHYKLS QRGYEW ³⁰	33%
BH4 (6-31)	'RTGYDNREI VMKYIHYKLS QRGYEW ³¹	32%
BH4 (6-31)	'RTGYDNREI <u>V</u> VMKYIHYK <u>L</u> SQRGYEW ³¹	32%

Tableau 1. Séquence des peptides. Les acides aminés hydrophobes sont en rouge, les acides aminés marqués ¹⁵N sont doublement soulignés et en gris, le lieu de la mutation est marqué par *.

1.1. Matériels et Méthodes

La synthèse peptidique a été réalisée à l'aide d'un synthétiseur de peptide semi-automatique Applied Biosystems Synthesiser 433A (PE Biosystem, Courtaboeuf, France - Figure 1). La méthode de chimie choisie est la stratégie FastMoc, appelée FastMoc-CondMonPrevPeak par le fabricant.

Les différentes résines, les acides aminés comportant des groupements réactifs protégés sur leurs chaînes latérales, les activateurs HOBt et HBTU proviennent de la compagnie NovasynTGABiochem (Läufelfingen, Suisse). La pipéridine, l'anhydride acétique, le dichlorométhane et la DIEA proviennent de SDS (Peypin, France). La NMP vient de Accros (Geel, Belgique). Le TFA provient de Applied Biosystems (Nieuwerkerk A-D IJssel, Pays-Bas).



Figure 1 . Synthétiseur de peptide 433A (Applied Biosystems).

Les solvants et réactifs sont délivrés au synthétiseur sous une pression de 66 psi, soit 4.5 bars d'azote. La composition des bouteilles, numérotées par le fabricant, est détaillée ci-dessous :

Bouteille 1 : *déprotection* : pipéridine.

Bouteille 4 : *capping* : anhydride acétique/DIEA/HOBt (19 ml/9 ml/0.8 g, v/v/v)
dans 400 ml de NMP.

Bouteille 5 : *activation* : HBTU/HOBt (37.9 g/13.6 g) dans 200 ml de DMF.

Bouteille 7 : *activation et couplage* : 35% de DIEA dans NMP.

Bouteille 9 : *lavage* : DCM.

Bouteille 10 : *lavage* : NMP.

1.2. Synthèse et clivage

Toutes les synthèses ont été réalisées en suivant la déprotection par mesure de conductivité avec la chimie FastMoc. Au niveau du synthétiseur, chaque étape de la synthèse est représentée par un module qui consiste en une série de commandes. Pour toutes les synthèses nous avons choisi le

programme suivant : BADEFCD, c'est-à-dire déprotection : activation, lavage, transfert, couplage, capping, lavage. Les clivages des peptides ont été réalisés selon les protocoles décrits ci-dessous.

- Clivages de Neu, Neu¹⁵N₂, Neu¹⁵N₄, Neu*, Neu*¹⁵N₂ et Neu*¹⁵N₄

0,1 mmol de résine NovasynTGA[®] préchargée avec une arginine substituée à 0.21 mmol.g⁻¹ ont été utilisées. Les acides aminés libres sont présentés en excès de 10 par rapport à la résine. A la fin de la synthèse, la résine portant le peptide fixé à son support solide est récupérée. Le clivage de la liaison peptide-résine ainsi que des groupements protecteurs des chaînes latérales du peptide Neu* est réalisé simultanément en milieu acide. Le clivage de la résine et des groupements protecteurs a été réalisé à 0°C avec la solution TFA/thioanisole/TIS/EDT/cristaux de phénol (84/4/2/4/6, v/v/v/v/m). Le mélange contenant le peptide est placé dans un erlenmeyer (10 ml pour environ 0.6 g de peptide-résine) à température ambiante sous agitation (non magnétique, pour ne pas broyer la résine). Après 2 heures la résine est séparée du mélange de peptides libres et des groupements protecteurs par filtration sur un verre fritté de porosité 4. L'ensemble est ensuite lavé avec du TFA puis du DCM. Le peptide brut est précipité dans environ 100 mL d'éther froid. Les solvants sont ensuite piégés par filtration et le peptide est enfin solubilisé dans 75:25 H₂O/ACN (0.1% TFA) puis lyophilisé.

Les clivages de Neu¹⁵N₂, Neu¹⁵N₄, Neu*¹⁵N₂ et Neu*¹⁵N₄ ont été effectués de manière similaire. En revanche 0,25 mmol de résine NovasynTGA[®] ont été utilisés, les acides aminés libres ont été présentés en excès de 4 par rapport à la résine. De plus le clivage de ces peptides a été réalisé en deux fois compte tenu de la quantité importante de peptide-résine récupérée. La solution de clivage a été modifiée : TFA/TIS/thioanisole/EDT/cristaux de phénol (84/4/2/4/6, v/v/v/v/m). De la même façon, la solution de clivage a été utilisée à 0°C, pendant 2 heures (15 mL pour environ 1 g de peptide-résine). Le peptide brut a été précipité dans 200 mL d'éther froid avant solubilisation dans 75:25 H₂O/ACN (0.1% TFA) et lyophilisation.

- Clivages de polyvalines : KV₁₂K et KV₂₀K

Le peptide KV₁₂K a été synthétisé en partant de 0.1 mmol, avec la résine Fmoc-Lys (Boc) Wang substituée à 0.57 mmol.g⁻¹. La solution de clivage TFA/EDT/H₂O (95/2.5/2.5, v/v/v) a

été préparée à 0°C puis versée dans l'erenmeyer contenant le peptide (15 ml pour 0.3 g de peptide-résine). Après 2 heures, la résine a été séparée du mélange de peptides libres et des groupements protecteurs par filtration sur un verre fritté de porosité 4. Le brut de synthèse est récupéré par une extraction au diéthyléther froid/H₂O (10/10, v/v) répétée deux fois pour chaque phase. Le peptide étant soluble dans l'eau, seuls les réactifs de clivage se retrouvent dans la phase étherée assurant ainsi une première élimination des groupements protecteurs. La phase aqueuse contenant le peptide a ensuite été lyophilisée.

Le peptide KV₂₀K a été synthétisé deux fois. La première synthèse a été réalisée à l'échelle 0,1 mmol, avec la résine Fmoc-Lys (Boc) Wang substituée à 0.57 mmol.g⁻¹, et la deuxième synthèse à l'échelle 0.1 mmol avec la résine Fmoc-Lys (Boc) NovasynTGA[®] substituée à 0.19 mmol.g⁻¹. Le clivage de ces peptides a été effectué suivant le même protocole. La solution de clivage TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5 ; v/v/v) a été préparée à 0°C puis versée dans l'erenmeyer contenant le peptide (15 ml pour 0.2 g de peptide-résine pendant 2 heures). La résine a été séparée du mélange de peptides libres et des groupements protecteurs par filtration sur un verre fritté de porosité 4. L'ensemble est ensuite lavé avec du TFA puis du DCM. Le peptide brut est précipité dans environ 80 mL d'éther froid. Les solvants sont ensuite éliminés par filtration et le peptide est enfin solubilisé dans 75/25 H₂O/ACN (0.1% TFA) puis lyophilisé.

- Clivages de BH4(6-30), BH4(6-31) et BH4¹⁵N₂

La synthèse de BH4 (6-30) a été effectuée en partant de 0,1 mmol de résine NovasynTGA[®] préchargées avec un tryptophane (taux de substitution à 0.18 mmol.g⁻¹) et la synthèse de BH4 (6-31) en partant de 0,1 mmol de résine NovasynTGA[®] préchargées avec un acide aspartique (taux de substitution à 0.22 mmol.g⁻¹). La solution de clivage TFA/TIS/EDT/H₂O (94/1/2.5/2.5, v/v/v/v) a été utilisée à 0°C. On verse ensuite le mélange dans l'erenmeyer contenant le peptide, soit 10 mL pour environ 0.4 g de peptide-résine. Après 2 heures la résine est séparée du mélange de peptides libres et des groupements protecteurs par filtration sur un verre fritté de porosité 4. L'ensemble est ensuite lavé avec du TFA puis du DCM. Le peptide brut est précipité dans environ 100 mL d'éther froid. On récupère la phase aqueuse et on centrifuge à

8000 rot.min⁻¹ durant 10 min. Après avoir enlevé le surnageant, 5 mL d'eau ont été ajoutés et l'échantillon est ensuite lyophilisé.

Le clivage de BH4¹⁵N₂ a été réalisé selon le même protocole que le clivage de BH4 (6-30). En revanche 0,25 mmol de résine NovasynTGA® préchargée avec un acide aspartique substituée à 0.22 mmol.g⁻¹ ont été utilisées au lieu de 0.1 mmol.

1.3. Purification par chromatographie en phase liquide

1.3.1. Matériels et Méthodes

L'analyse et la purification des protéines ont été effectuées par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) sur un appareil WATERS (Saint-Quentin en Yvelines, France). Le détecteur à barrette de photodiodes permet de suivre l'absorption UV de 210 nm à 394.5 nm. Pour tous les peptides excepté BH4, nous avons suivi l'absorption à 214 nm. La purification de BH4 a été suivie à 225 nm et à 280 nm, qui sont les longueurs d'onde les mieux adaptées pour ce peptide, par suite de la présence de groupements aromatiques (tryptophane et tyrosine).

Les solvants (acétonitrile et isopropanol de qualité HPLC) proviennent de chez Fisher (Gell Belgium). Les solvants 1-butanol et 1-propanol viennent de chez Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le TFA provient de Applied Biosystems (Nieuwerkerk A-D Ijssel, Pays-Bas). L'eau ultra pure est préparée à l'aide d'un appareil Elga (Mandres-les-Roses, France) ou milli-Q (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France). Les solvants d'élution sont en A de l'eau à 0,1 % de TFA et en B un mélange acétonitrile/isopropanol (60/40, v/v) avec 0.1% de TFA pour les purifications de Neu et Neu*. Pour les purifications de BH4 le solvant B est de l'acétonitrile à 0,1 % de TFA. Pour la purification de KV₁₂K, le solvant B est un mélange 1-propanol/1-butanol (2/1, v/v).

Les colonnes analytiques C4 (300 Å, 5 μm, 150 x 10 mm) et semi-préparatives C4 (300 Å, 5 μm, 250 x 10 mm) proviennent de chez Vydac (Hesperia, USA). La colonne analytique C1 Spherisorb (80Å, 10 μm, 4.6 x 150 mm) et la colonne SepPack C2 viennent de chez Waters (Milford, MA, USA). La colonne échangeuse de cation MonoS 5/50 GL provient de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Angleterre). La colonne styros C4 (5μm, 50 x 2 mm) provient de CIL Cluzeau Info Labo (Saint-Foy la Grande, France). Les essais de purifications ont été effectués

avec des colonnes analytiques. Les purifications à grande échelle ont été réalisées avec les colonnes semi-préparatives et un débit de 3 mL/min.

Nous avons utilisé un couplage LC-MS (couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse) afin de déterminer les conditions idéales de séparation. Le spectromètre de masse utilisé possède une source à ionisation par électrospray (ESI) et un analyseur de type piège ionique (LCQ, Thermo). Lors de couplages avec les colonnes analytiques (300 Å, 5 µm, 150 x 10 mm) de 4 mm de diamètre intérieur, une division de flux a été mise en place en sortie de colonne, de manière à transmettre 1/10^{ème} du débit (0.1 ml/min) vers le spectromètre pour l'analyse et collecter les 9/10^{ème} restants (tubes Eppendorf, collecteur Gilson). Une optimisation du choix des colonnes et des différents gradients utilisés lors des séparations analytiques nous a permis d'obtenir des peptides purs avec des rendements allant de 15 à 22 %.

1.3.2. Purification des peptides Neu

À partir de 476 mg de résine, seulement 130 mg de peptide brut ont été obtenus après clivage (rendement de synthèse de 33 %). Le peptide brut de synthèse a été caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-ToF (Figure 2).

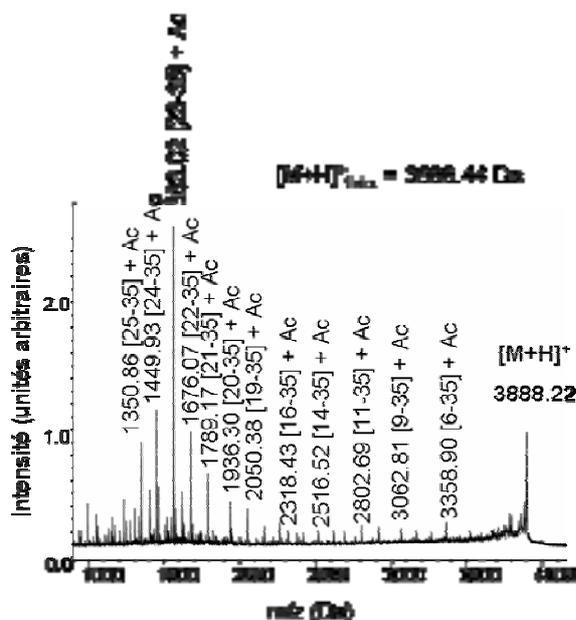


Figure 2. Spectre MALDI-ToF du peptide Neu brut. Le pic majeur de 3888.22 Da correspond au peptide Neu monoprotoné. La numérotation entre crochets [x-35] correspond aux peptides tronqués, observés sous forme acétylée à la suite de la réaction de capping.

L'ion monochargé à m/z 3888.22 correspond au peptide Neu, en accord avec la masse théorique de 3888.44 Da. D'autres pics sont observés : ils correspondent à des peptides tronqués, acétylés lors du capping à l'anhydride acétique.

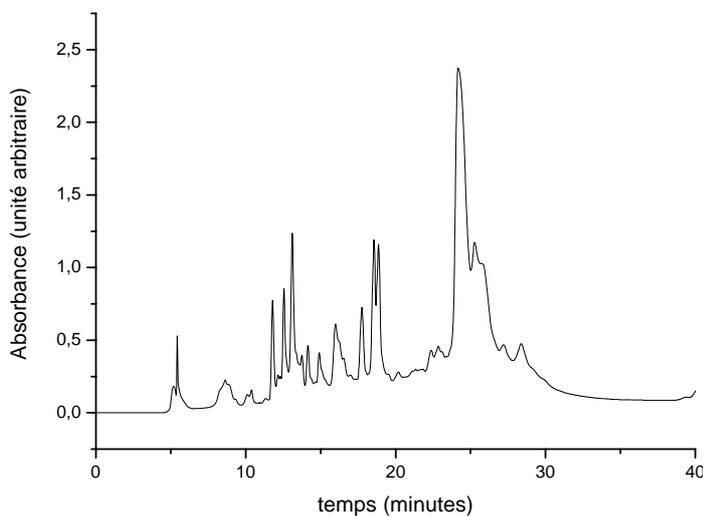


Figure 3. Chromatogramme du brut de synthèse obtenu par HPLC en phase inverse sur une colonne semi-préparative C4. Le gradient d'élution est le suivant : l'éluant A (0,1% TFA) varie de 100% à 20% en 18 minutes, puis de 20% à 0% en 14 minutes avec un palier à 100% pendant 5 minutes. La fraction majeure contenant le peptide Neu pur est éluée en 25 minutes, soit environ 93% de B (mélange 60/40 ACN/isPrOH + 0,1% TFA).

Un chromatogramme typique est montré sur la Figure 3, avec le peptide pur comme pic principal. La meilleure purification par HPLC avec une colonne semi-préparative Vydac C4 a été réalisée en utilisant un gradient linéaire, optimisé lors de l'analyse en mode LC/MS. L'éluant A varie de 100% à 20% en 18 minutes, puis de 20% à 0% en 14 minutes et finalement un palier à 100% de B a lieu pendant 5 minutes. Le temps de rétention était approximativement de 25 minutes (Figure 3). Après cette purification, nous avons obtenu 20 mg de peptide, soit un rendement de purification de 15%. Le succès de la purification est confirmé par HPLC (95% de pureté, Figure 4) et par spectrométrie de masse (Figure 5).

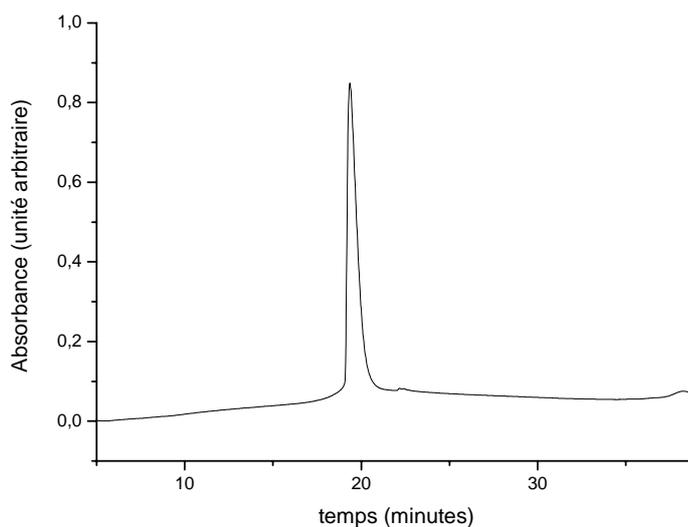


Figure 4. Chromatogramme du peptide Neu pur par HPLC en phase inverse sur une colonne analytique C4.

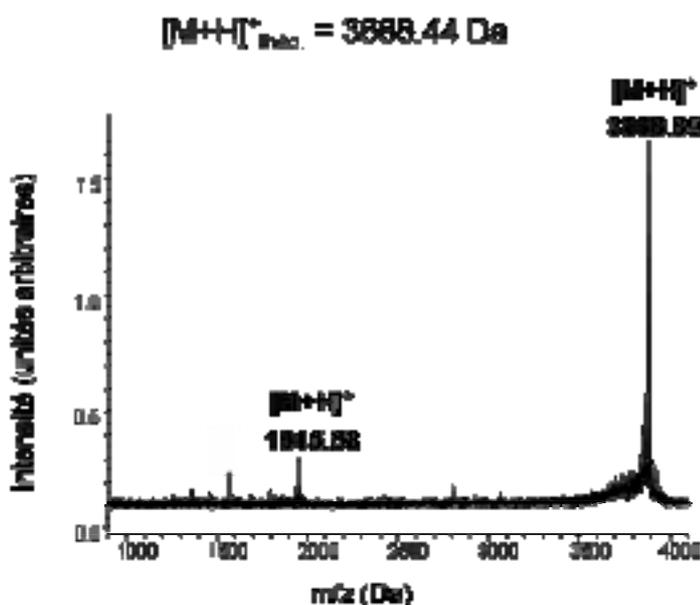


Figure 5. Spectre de masse du peptide purifié. Le pic majeur de 3888.89 Da correspond au peptide Neu monoprotomé.

Les peptides Neu¹⁵N₂ et Neu¹⁵N₄ ont été synthétisés, clivés et purifiés de la même façon que le peptide Neu. La première synthèse a été effectuée sur une échelle moyenne (2.5 mmol de résine pour 4 acides aminés), en utilisant 1.136 g de résine NovasynTGA® préchargée avec l'arginine. 486 mg de peptide brut ont été récupérés (rendement de synthèse de 60 %). La quantité de peptide pur récupérée était de 83 mg, soit un rendement de purification de 15 %. La

pureté finale vérifiée par HPLC et par spectrométrie de masse est de 95% (Figure 6). Le rendement total est de 8%.

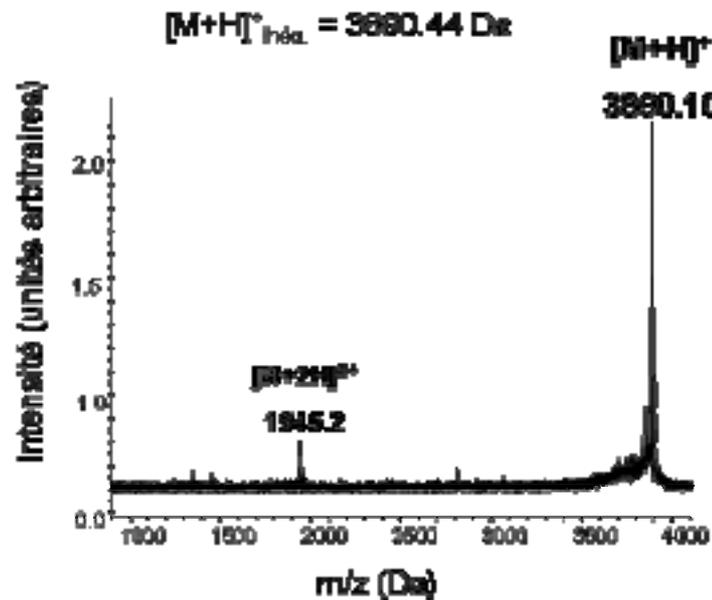


Figure 6. Spectre de masse en MALDI-ToF de la fraction purifiée par RP-HPLC. Les deux espèces présentes sont les peptides Neu¹⁵N₂ mono- et di-protonées.

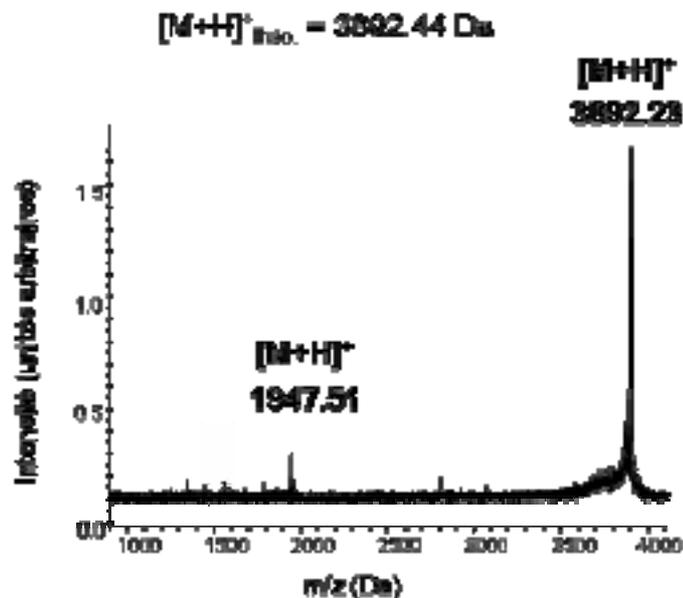


Figure 7. Spectre de masse en mode MALDI-ToF de la fraction purifiée par RP-HPLC. Les deux espèces présentes sont les peptides Neu¹⁵N₄ mono- et di-protonées.

La deuxième synthèse a aussi été effectuée sur une échelle moyenne en utilisant 1.136 g de résine NovasynTGA® préchargée avec l'arginine. 398 mg de peptide brut ont été récupérés (rendement de synthèse de 42%). La purification et la caractérisation ont été effectuées de la même façon que pour le peptide Neu non marqué. La quantité de peptide pur récupérée était de 55 mg, soit un rendement de purification de 15%. La pureté finale vérifiée par HPLC et par spectrométrie de masse est de 95% (Figure 7). Le rendement total est de 6%.

1.3.3. Purification des peptides Neu*

Le spectre de masse en mode MALDI-ToF du brut de synthèse est présenté sur la Figure 8. Le pic largement majoritaire d'un rapport masse/charge de 3918.42 Da correspond au peptide Neu* et est en accord avec la masse théorique de 3917.4 Da. Les impuretés présentes dans l'échantillon correspondent aux intermédiaires de synthèse acétylés.

À partir des 476 mg de résine, 202 mg de peptide brut ont été obtenus après clivage (rendement de synthèse de 52 %). La meilleure purification par HPLC avec une colonne semi-préparative Vydac C4 a été réalisée en utilisant un gradient linéaire, optimisé lors de l'analyse en mode LC/MS : l'éluant A (0,1% TFA) varie de 100% à 50% en 15 minutes, puis de 50% à 10% en 11 minutes, ensuite de 0% à 100% en 10 minutes. Le temps de rétention était approximativement de 28 minutes (Figure 9). La masse totale obtenue après purification est de 40 mg, soit un rendement de purification de 20 %. A l'issue de la chromatographie, le succès de la purification est confirmé par HPLC (97% de pureté, Figure 10) et par spectrométrie de masse (Figure 11).

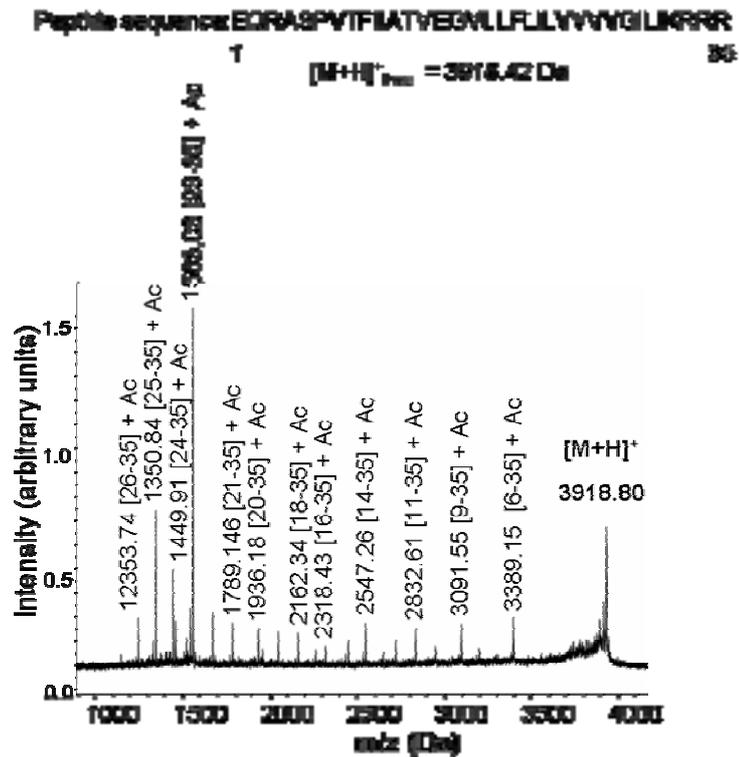


Figure 8. Spectre MALDI-ToF du peptide Neu* brut. Le pic majeur de 3918.80 Da correspond au peptide Neu* monoproté. La numérotation entre crochets [x-35] correspond aux peptides tronqués.

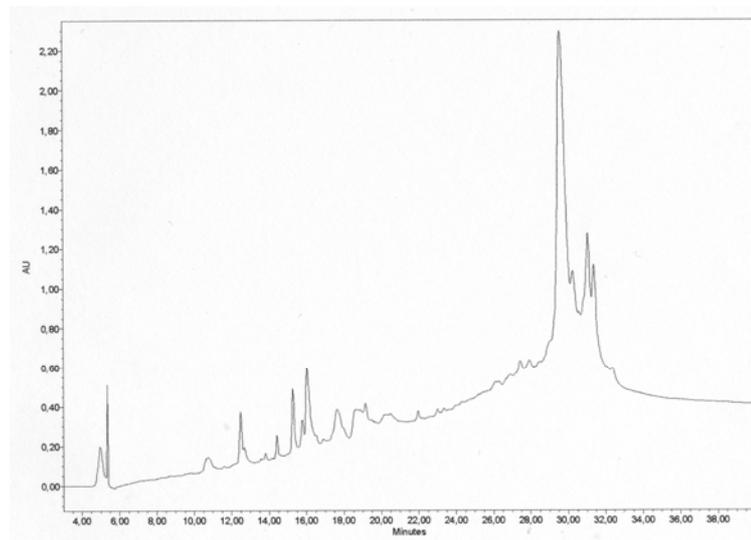


Figure 9. Chromatogramme du brut de synthèse obtenu par HPLC en phase inverse sur une colonne semi-préparative C4. La fraction majeure contenant le peptide Neu* pur est éluée à 28 minutes.

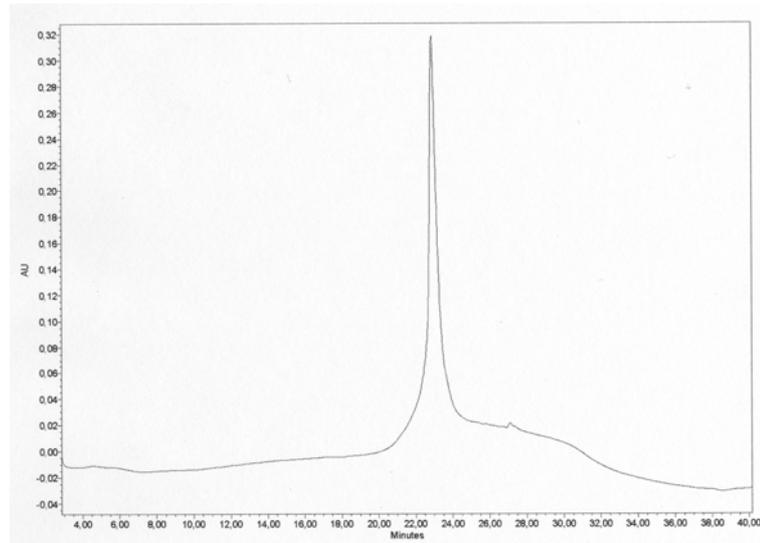


Figure 10. Chromatogramme du peptide Neu* pur par HPLC en phase inverse sur une colonne analytique C4.

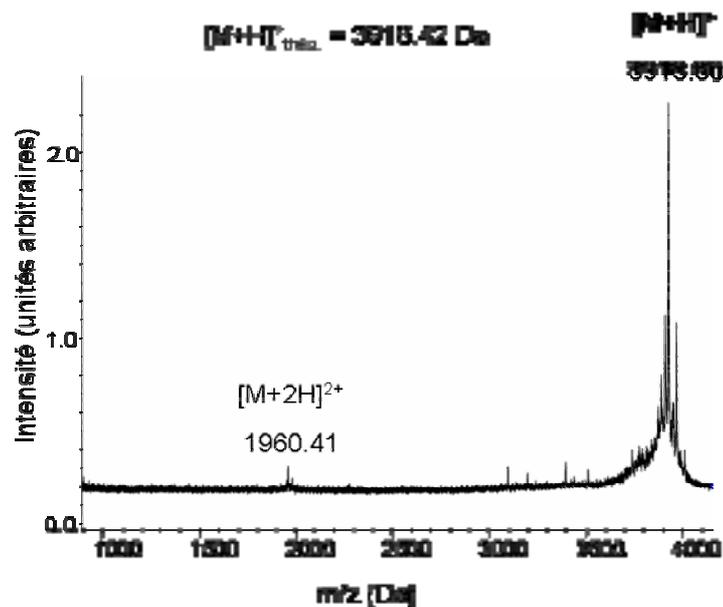


Figure 11. Spectre MALDI-ToF du peptide Neu* pur. Le pic majeur de 3918.80 Da correspond au peptide Neu* monoprotoné.

Les peptides Neu*¹⁵N₂ et Neu*¹⁵N₄ ont été synthétisés, clivés et purifiés de la même façon que pour le peptide Neu*. La première synthèse a été effectuée sur une échelle moyenne (2.5 mmol de résine pour 4 acides aminés), en utilisant 1.136 g de résine NovasynTGA[®] préchargée avec l'arginine. 425 mg de peptide brut ont été récupérés (rendement de synthèse de 44 %). La quantité de peptide pur récupérée était de 94 mg, soit un rendement de purification de

22 %. La pureté finale vérifiée par HPLC et par spectrométrie de masse est de 98% (Figure 12). Le rendement total est de 10%.

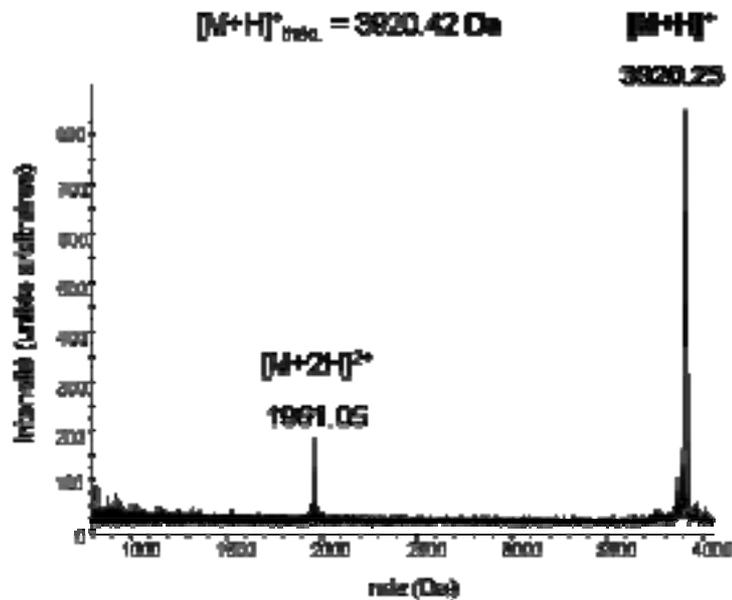


Figure 12. Spectre de masse en MALDI-ToF de la fraction purifiée par RP-HPLC. Les deux espèces présentes sont les peptides Neu*¹⁵N₂ mono- et di-protonés.

La deuxième synthèse a aussi été effectuée sur une échelle moyenne en utilisant 1.136 g de résine NovasynTGA® préchargée avec l'arginine. 541 mg de peptide brut ont été récupérés (rendement de synthèse de 55%). La purification et la caractérisation ont été effectuées de la même façon que pour le peptide Neu* non marqué. La quantité de peptide pur récupérée était de 97.7 mg, soit un rendement de purification de 18%. La pureté finale vérifiée par HPLC et par spectrométrie de masse est de 98% (Figure 13). Le rendement total est de 10%.

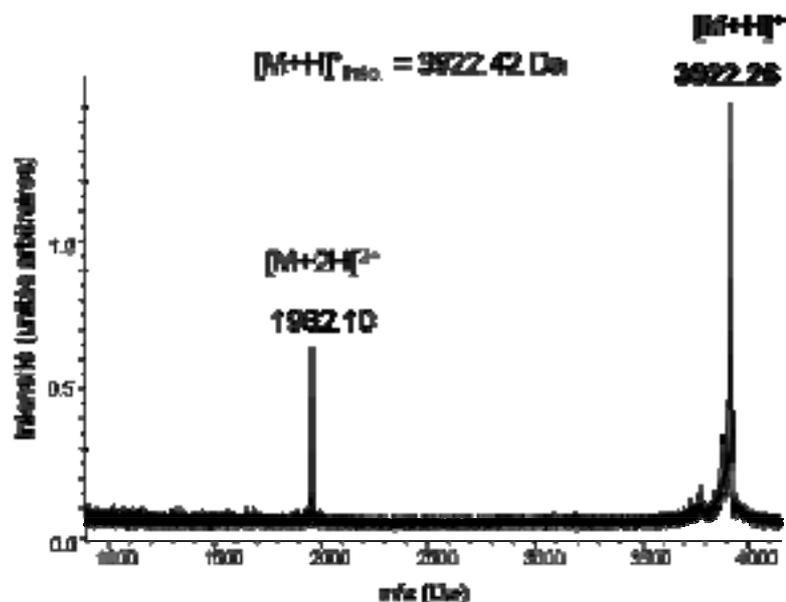


Figure 13. Spectre de masse en mode MALDI-ToF de la fraction purifiée par RP-HPLC. Les deux espèces présentes sont les peptides Neu* $^{15}\text{N}_4$ mono- et di-protonées.

1.3.4. Purification de KV₁₂K

À partir des 175 mg de résine, seulement 50 mg de peptide brut ont été obtenus après clivage (rendement de synthèse de 34 %). Le peptide a été caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-ToF : le spectre du brut de synthèse est présenté sur la Figure 14. On observe un pic à 1463.90 Da correspondant au peptide KV₁₂K en accord avec la masse théorique de 1463.02 Da.

La purification de ce peptide s'est avérée délicate en raison de son caractère très hydrophobe. 2 mg de peptide ont été dissous dans 1 mL d'un mélange H₂O/acide acétique (80/20, v/v). Le brut de synthèse a été injecté dans une colonne C1 (débit de 1mL/min) et séparé avec un gradient allant de 100% d'H₂O (0.1% TFA) vers 100% de solvant B (1-propanol/1-butanol 2/1 v/v) en 26 minutes (débit est de 1mL/min). Le contrôle par HPLC et par spectrométrie de masse MALDI-ToF a indiqué seulement 85% de pureté.

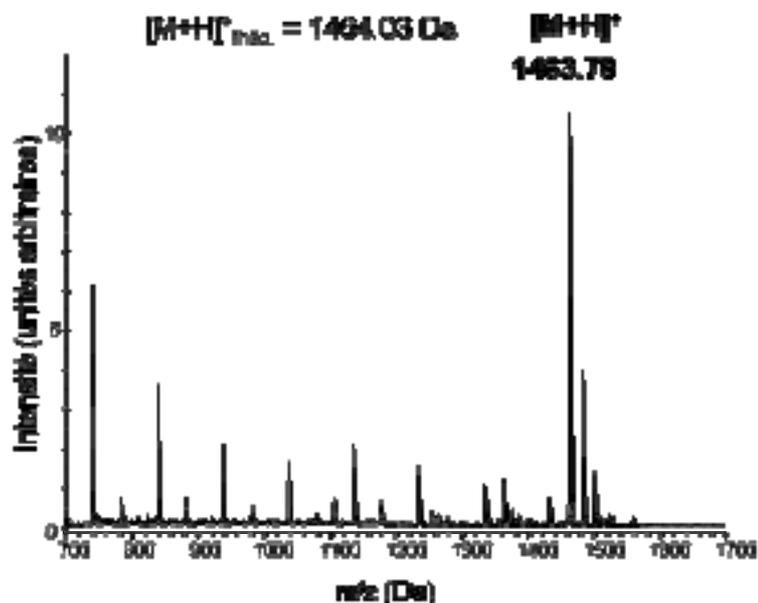


Figure 14. Spectre MALDI-ToF du peptide KV₁₂K brut. Le pic majeur de 1463.90 Da correspond au peptide monoproté.

1.3.5. Purification de KV₂₀K

Nous avons réalisé deux synthèses. La première synthèse a été effectuée avec 175 mg de résine Wang préchargée. À partir de cette quantité de résine, seulement 33 mg de peptide brut ont été obtenus après clivage (rendement de synthèse de 15 %). Le peptide a été caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-ToF avec un pic de très faible intensité à 2256.59 Da (spectre non montré) correspondant au peptide KV₂₀K, en accord avec la masse théorique de 2255.56 Da, avec présence d'autres pics intenses. Le peptide n'a pas pu être purifié. La deuxième synthèse a été réalisée avec 526 mg de résine NovasynTGA[®], qui ont conduit à seulement 50 mg de peptide brut après clivage (rendement de synthèse de 22%). Le peptide a été caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-ToF (Figure 15).

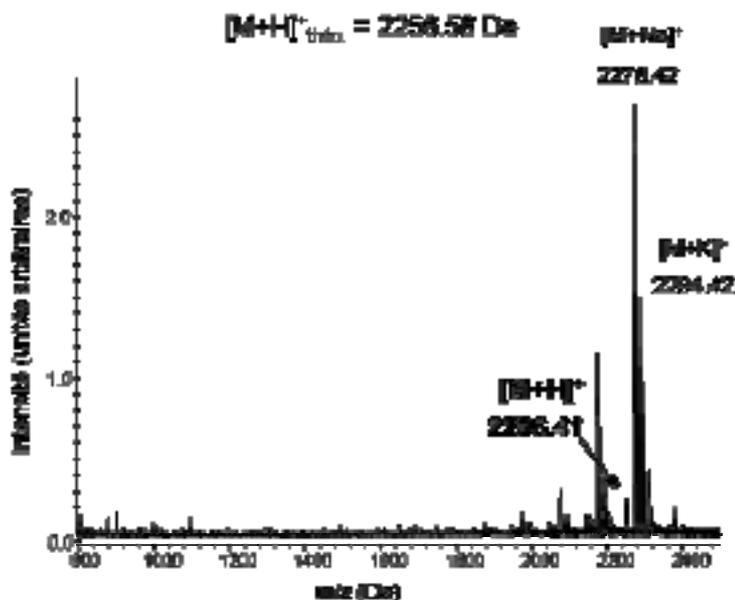


Figure 15. Spectre MALDI-ToF du peptide KV₂₀K brut. Le pic majeur à 2256.59 Da correspond au peptide monoprotoné.

1.3.6. Purification de BH4 et BH4 ¹⁵N₂

- Peptide BH4 (6-30)

La synthèse de BH4 (6-30) a été effectuée avec 555 mg de résine préchargée avec du Tryptophane non protégé. À partir des 555 mg de résine, seulement 135 mg de peptide brut ont été obtenus après clivage (rendement de synthèse de 54%). Le peptide a été caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-ToF (données non montrées). Le pic principal à m/z 3206.3 est en accord avec la masse moléculaire théorique du peptide de 25 acides aminés de 3206.6 Da. Plusieurs autres pics sont observés : l'un à m/z 3262 Da correspond au peptide avec un groupement de tBu (+56 Da), un autre à 3270 Da correspond au peptide lié au bras d'attache (linker) de la résine (+164 Da), et un pic à 3458 Da correspond au peptide modifié par un groupe pbf (+252 Da). La meilleure purification par HPLC avec une colonne semi-préparative C4 Vydac a été réalisée en utilisant le gradient linéaire suivant : l'éluant A varie de 0% à 12% en 6 min, puis de 12% à 29% en 15 minutes et finalement de 29% à 32% en 9 min. La séquence BH4 comprend 5 acides aminés aromatiques qui ont un coefficient d'extinction molaire élevé à 280 nm. En conséquence, le peptide a été détecté à 280 nm. BH4 a été élué de la colonne à un bas pourcentage d'acétonitrile (30%). Le temps de rétention était approximativement de 26

minutes. Seulement 1 mg de peptide pur (caractérisé par MALDI-ToF) a été obtenu. Le rendement total est de 0.7%.

- Peptide BH4 (6-31)

455 mg de résine préchargée avec l'acide aspartique ont été utilisés. 188 mg de peptide brut ont été obtenus après clivage de la résine (rendement de synthèse de 74%).

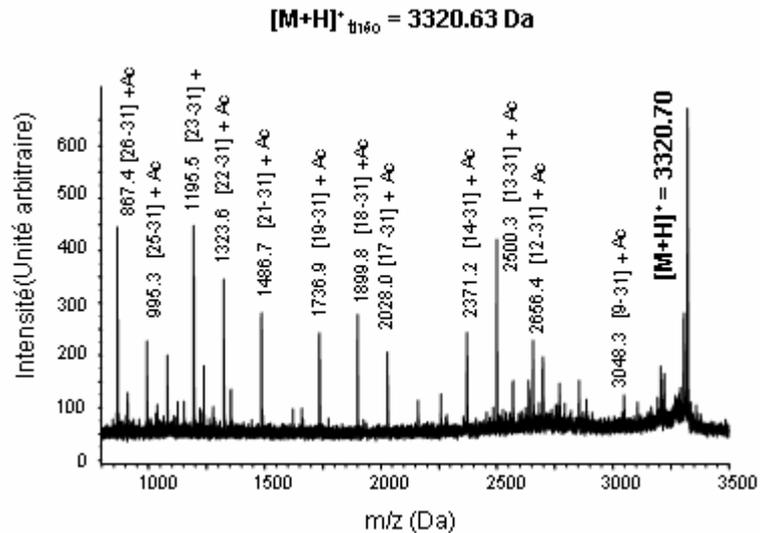


Figure 16. Spectre de masse en mode MALDI-ToF du peptide BH4 brut. La numérotation entre crochets [x-31] correspond aux peptides tronqués.

Un chromatogramme typique est montré sur la Figure 16, avec un pic principal correspondant au peptide pur. Le degré de pureté (autour de 99%) a été vérifié par HPLC et MALDI-ToF (Figure 17 et Figure 18). La masse totale obtenue après purification est de 67 mg, soit un rendement de purification de 36%. Le rendement total est de 26%.

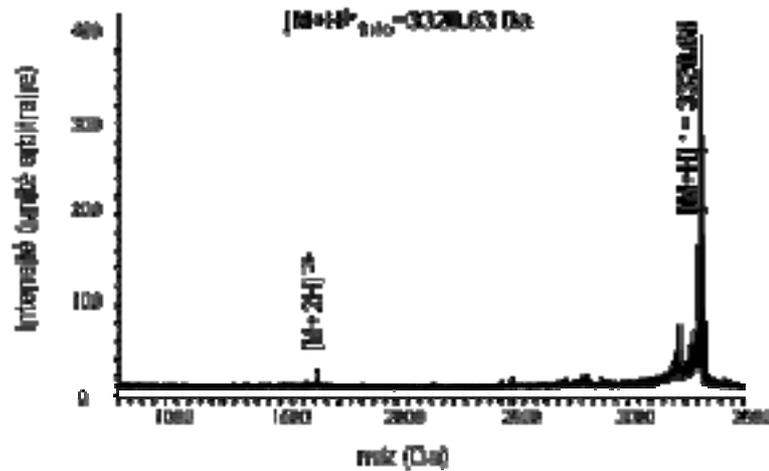


Figure 17. Spectre MALDI-ToF du peptide pur. On observe le deuxième produit d'ionisation à $(M+2H)/2$, avec un m/z de 1661. Le massif de petits pics avant la crête principale résulte de fragmentations induites par les photons lasers.

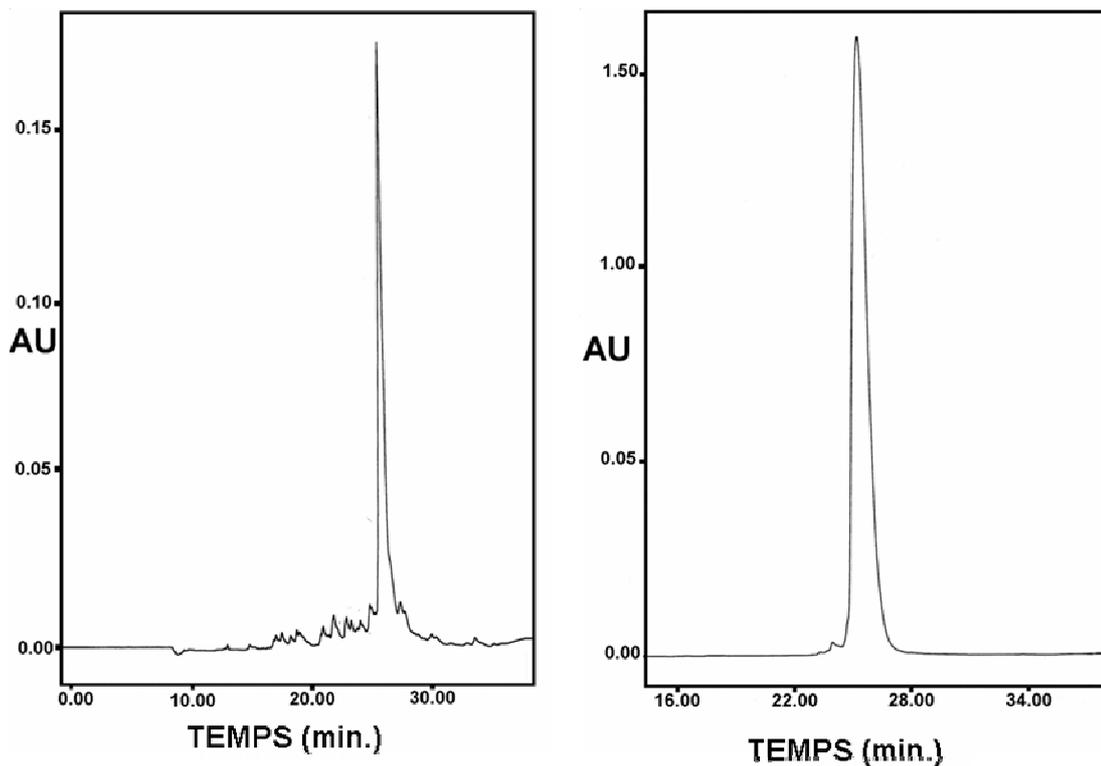


Figure 18. Chromatogrammes obtenus à 280 nm. A gauche, le peptide brut après clivage de la résine et à droite, le peptide pur. Ces deux chromatogrammes ont été obtenus avec une colonne semi-préparative et un débit de 3 mL/min. Le pic majoritaire est récolté à 26 minutes soit environ 30% d'éluant B.

- Peptide BH4 (6-31) $^{15}\text{N}_2$

1.136 mg de résine préchargée avec l'acide aspartique ont été utilisés. 615 mg de peptide brut ont été récupérés. La purification et la caractérisation ont été effectuées de la même façon que pour le peptide BH4 (6-31) non marqué. La quantité de peptide pur récupérée était de 250 mg (rendement de purification 41%). La pureté finale vérifiée par HPLC et par spectrométrie de masse est de 98% (Figure 19). Le rendement total est de 30%.

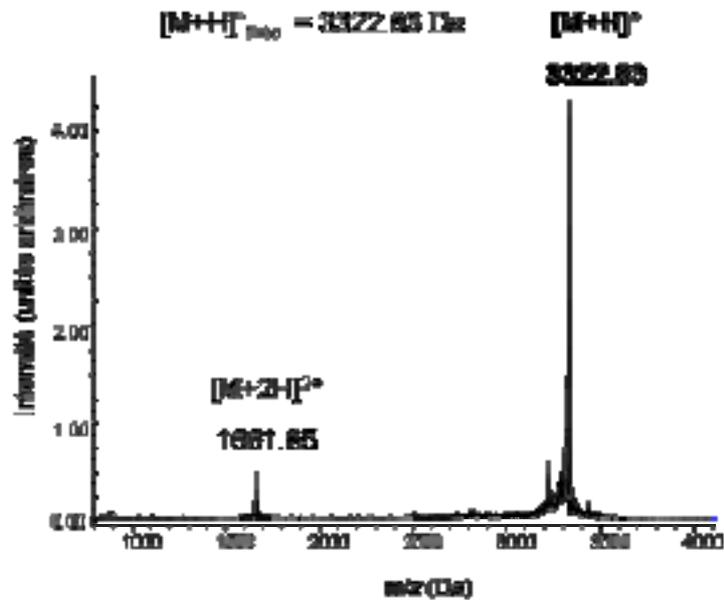


Figure 19. Spectre MALDI-ToF du peptide BH4 (6-31) $^{15}\text{N}_2$ pur. On observe le deuxième produit d'ionisation à $(M+2H)/2$, avec un m/z de 1661.85 Da. Le massif de petits pics avant la crête principale résulte de fragmentations induites par les photons lasers.

2. Annexe 2 - Préparation des modèles de membranes

2.1. Produits chimiques

Les lipides (DMPC, DMPG, DMPS, DPPC et DSPC) proviennent de Anvanti Polar Lipids (Figure 20). Leur pureté (considérés purs par le vendeur) n'a pas été contrôlée et ils ont été utilisés tels quels.

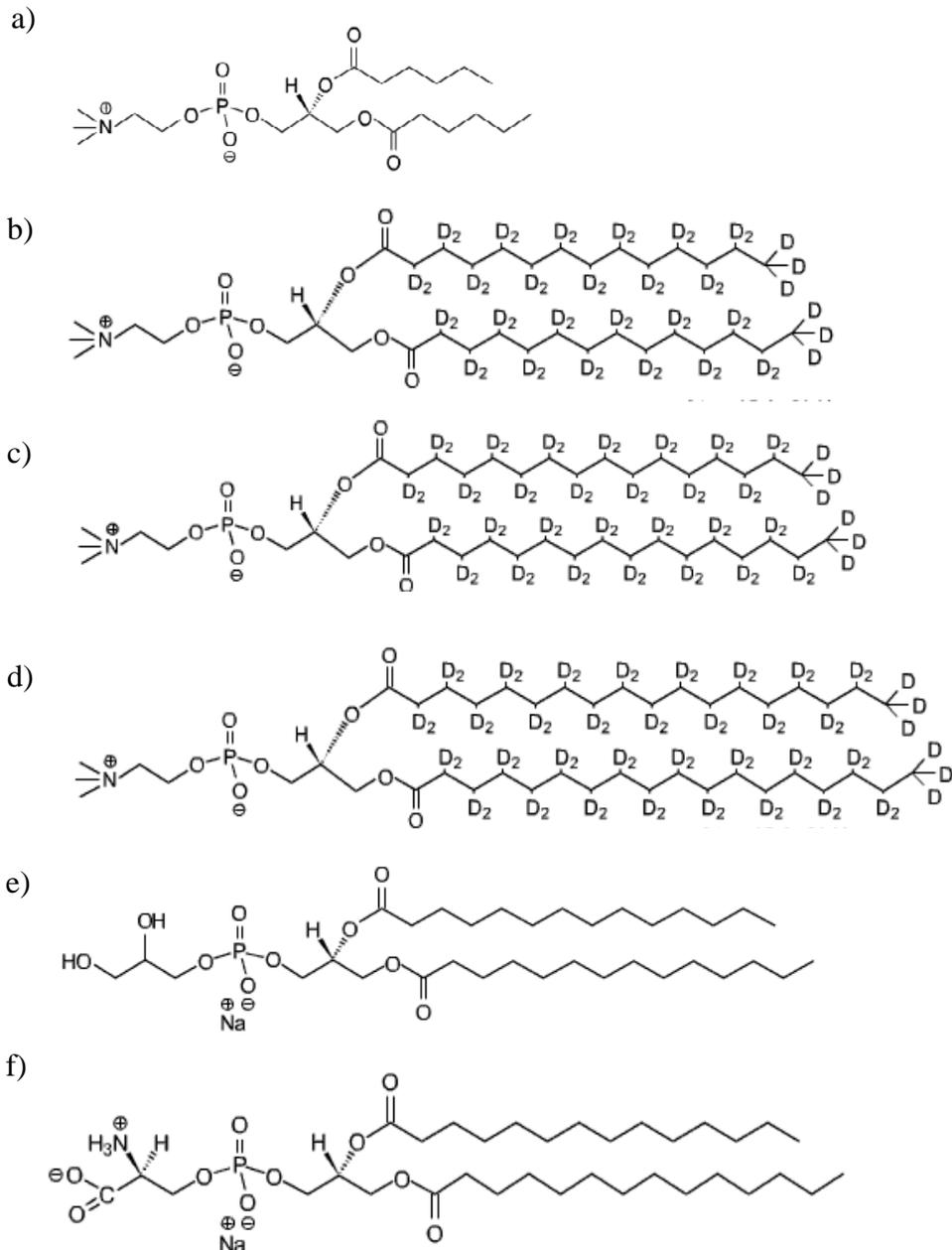


Figure 20. Structures des lipides a) DCPC, b) DMPC-d54, c) DPPC-d62, d) DSPC-d70 e) DMPG et f) DMPS.

Le lipide TBBPC a été synthétisé selon la procédure décrite par Loudet (Loudet *et al.*, 2005*) et est représenté sur la Figure 21.

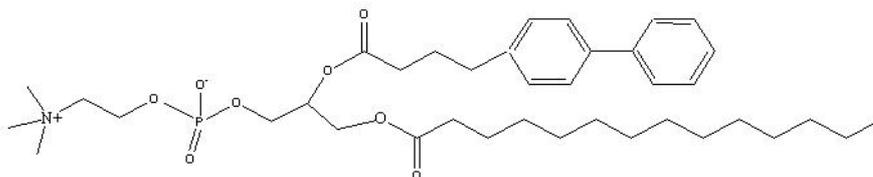


Figure 21 . Structure du lipide TBBPC : 1-Tétradécanoyl-2-(4-(4-Biphenyl)Butanoyl)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine.

Le TFE provient de Fluka (Geel, Belgium), l'eau deutériée de Eurisotop (Saint-Aubin, France) et les sels de KCl de Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France).

2.2. Préparation des liposomes

Les poudres de phospholipides deutériés sont hydratées avec un large excès d'eau deutériée (80% d'hydratation) 25 mg de phospholipides dans 100 μ L d'eau). Après agitation avec un vibreur de type «vortex», les échantillons sont soumis à trois cycles successifs de congélation dans l'azote liquide et de réchauffement (10 minutes à une température supérieure à celle de la transition de phase du lipide). Ce protocole classique permet d'obtenir des vésicules multilamellaires, de taille relativement homogène, dont le diamètre dépasse quelques microns.

Dans le cas des vésicules comprenant plusieurs constituants membranaires (DMPC et DMPG par exemple), ceux-ci sont d'abord dissous dans un solvant organique (chloroforme/méthanol, 90/10). Après évaporation du solvant, le film lipidique est repris par un large excès d'eau. Il s'ensuit trois étapes successives de lyophilisation afin d'éliminer toute trace de solvant organique. Les poudres ainsi obtenues sont hydratées et les liposomes sont formés selon la procédure décrite précédemment.

Nous avons utilisé cinq types de lipides pour former des liposomes : le DMPC (chaînes en C14), le DPPC (chaînes en C16) et le DSPC (chaînes en C18), le DMPG (chaînes en C14 avec tête glycérol) et le DMPS (chaînes en C14 avec tête sérine).

* Loudet C, Khemtémourian L, Aussenac F, Gineste S, Achard MF, Dufourc EJ. Bicelle membranes and their use for hydrophobic peptide studies by Circular Dichroism and Solid State NMR. *Biophysica Biochimica Acta*. Sous presse. 2005.

2.3. Préparation des bicelles

Deux types de bicelles ont été préparés. La préparation des bicelles se fait en mélangeant deux types de lipides, un lipide à chaînes aliphatiques longues et un lipide à chaînes aliphatiques courtes. Les bicelles classiques composées de DMPC (chaîne longue) et de DCPC (chaîne courte) sont formées selon la procédure décrite par Raffard (Figure 22) (Raffard *et al.*, 2000*). Les nouvelles bicelles constituées de TBBPC (chaîne longue) et de DCPC sont formées selon la procédure décrite par Loudet (Loudet *et al.*, 2005). Ces bicelles ont été réalisées pour les expériences de DC, avec un rapport molaire de 85% et une hydratation de 90%.

Le rapport molaire entre les lipides est important et pour notre étude nous avons travaillé entre 78% et 80% molaire de DMPC. Ce choix se fait d'après l'observation du diagramme de phase DMPC/DCPC (Figure 22). En effet pour de tels rapports (trait vertical plein sur la Figure 22), le domaine d'existence des bicelles est relativement étendu (de 30 à 40 °C).

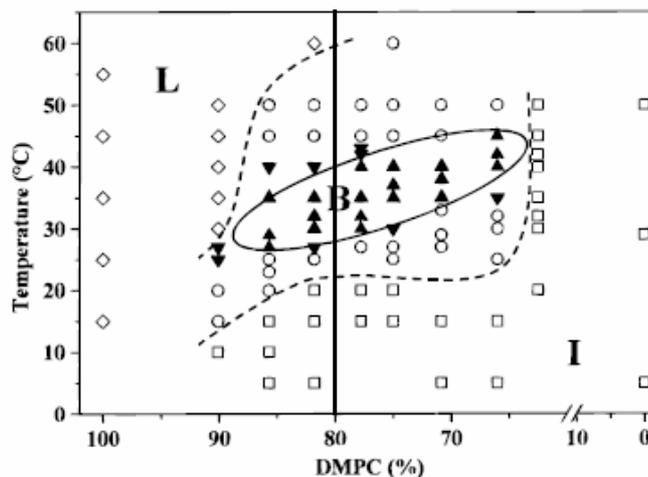


Figure 22. Diagramme de phase des bicelles composés de DMPC/DCPC en fonction de la température et de la composition en DMPC, pour une hydratation de 80%. Les lettres désignent les phases lipidiques pures : I pour isotrope, B pour bicelles et L pour lamellaire. Pour nos études, nous avons travaillé entre 78% et 80% molaire de DMPC (trait vertical plein) (d'après Raffard *et al.*, 2000).

* Raffard G, Steinbruckner S, Arnold A, David JH, Dufourc EJ. Temperature-Composition Diagram of Dimyristoylphosphatidylcholine-Dicaproylphosphatidylcholine "Bicelles" Self-Orienting in the Magnetic Field. A solid State 2H and 31P NMR Study. *Langmuir*. 2000; **16**: 7655-7662.

Le mélange lipidique est agité vigoureusement à l'aide d'un mélangeur de type "vortex" pendant quelques dizaines de secondes. Puis, il est centrifugé à 7000 tours/minutes pendant 5 minutes avant d'être plongé 30 secondes dans de l'azote liquide. Enfin, le mélange est réchauffé au bain-marie à 50°C pendant 10 minutes. Ce cycle est répété jusqu'à l'obtention d'une solution homogène, visqueuse et translucide (caractéristique de l'apparition d'objets de 20 à 60 nm de diamètre). L'existence des bicelles est vérifiée par RMN-³¹P. On obtient alors deux raies fines, correspondants aux lipides, DCPC et DMPC, avec un déplacement chimique respectif d'environ -4 ppm et -10 ppm. Pour une hydratation de 80% en masse, le domaine d'existence des bicelles s'étend de 65 à 88% de DMPC par mole et pour des températures comprises entre 25 et 45°C. Pour les basses températures, on observe une phase isotrope (micelles mixtes ou bicelles de petites tailles), tandis qu'une phase lamellaire apparaît à haute température.

2.4. Préparation des SUV et des LUV

- Préparation des LUV (diamètre d'environ 200 nm)

50 mg de DMPC sont hydratés avec 1 mL d'eau contenant 100 mM de KCl. La solution est vigoureusement agitée à l'aide d'un vibreur de type «vortex», ensuite congelée dans l'azote liquide pendant 30 secondes, puis chauffé à 50°C pendant 5 minutes dans un bain-marie et enfin à nouveau agitée à l'aide d'un vibreur de type vortex. Ce cycle est répété 5 fois jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. 700µL de cette solution sont passés dans un extrudeur (Northern Lipids, Inc. Canada) en utilisant des filtres de porosité 200 nm sous une pression de 20 bars et à une température de 40°C. 10 passages sont nécessaires pour l'obtention d'une solution homogène turbide.

- Préparation des SUV (diamètre d'environ 50 nm)

Les SUV sont obtenues en prenant 400 µL de la solution de LUV réalisée précédemment. La solution est extrudée en utilisant des filtres de porosité 50 nm sous une pression de 17 bars et à une température de 40°C. 10 passages sont nécessaires pour l'obtention d'une solution homogène translucide.

2.5. Reconstitution de peptides dans les modèles de membranes

Le TFA utilisé lors du clivage des peptides est présent sous forme de contre-ion dans les échantillons peptidiques. Le TFA peut entraîner des perturbations dans la formation du système membranaire. Le TFA est donc enlevé de tous les échantillons peptidiques. Pour cela, on effectue un lavage avec une solution d'HCl 5 mM. On mélange environ 3 mg de peptide avec 10 mL de cette solution pendant 15 minutes en utilisant un bain de glace, puis la solution est lyophilisée. On vérifie l'absence du TFA par RMN-¹⁹F en observant la suppression du signal et par spectrométrie de masse en vérifiant la non dégradation des peptides.

Les deux constituants de notre modèle biophysique, les lipides et les peptides, sont co-solubilisés dans un solvant organique : le trifluoroéthanol (TFE) pour les peptides Neu_{TM35} et Neu*_{TM35} et un mélange chloroforme/méthanol (3/1 v/v) pour BH4 et la cateslytine. Le solvant est ensuite évaporé. Un ajout d'eau est effectué et l'échantillon est lyophilisé. Ceci est réalisé deux fois afin de bien éliminer les traces de solvant organique. La poudre obtenue est ensuite hydratée par une solution aqueuse contenant 100 mM de KCl. Les cycles de formation des bicelles ou bien des liposomes, explicités précédemment, sont ensuite réalisés.

Les concentrations peptidiques sont calculées en pesant de grande quantité de matériel (entre 2 et 5 mg). Ces valeurs sont confirmées par dosage en UV des solutions (utilisation du coefficient d'extinction molaire de la polylysine, à la longueur d'onde de 225 nm, $\epsilon_{225} = 485 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Résumé :

Le récepteur Neu/ErbB2 est un dimère dont la fonction est de transmettre au sein de la cellule les signaux de croissance cellulaire. Le récepteur est à l'origine de nombreux cancers provoqués par la mutation ponctuelle Val/Glu dans le segment transmembranaire. Cette mutation stabiliserait les dimères en absence de ligand induisant ainsi la prolifération non contrôlée de cellules. La détermination de la structure et de la dynamique du récepteur natif (Neu/erbB-2) et muté (Neu*/erbB-2) représentent donc une étape capitale dans la compréhension des mécanismes de transduction du signal.

La synthèse des peptides hydrophobes transmembranaires a été entreprise. Leurs structures ont été déterminées par dichroïsme circulaire en solution et en milieu membranaire. L'hélice π , présente dans le domaine transmembranaire, a été modélisée afin de mieux appréhender les mécanismes de dimérisation. La RMN a permis de caractériser la dynamique des lipides, afin d'étudier la flexibilité des peptides ou l'adaptation de la membrane. Une méthode innovante a été développée pour extraire les peptides du milieu membranaire.

Mots clés: Synthèse de peptides membranaires, peptide marqué ^{15}N , récepteur à tyrosine kinase, Neu/ErbB2, cancer, dimérisation, mutation, membranes de phospholipides, modélisation moléculaire, dichroïsme circulaire, interaction peptides/membranes, RMN des solides.

Abstract :

The Neu/ErbB2 receptor is a dimer whose function is to transmit the signals of cell multiplication in the cell. The receptor is involved in several cancers induced by the Val to Glu point mutation in the transmembrane domain. This mutation would stabilize dimers in the absence of ligand and thus induce the non controlled proliferation of cells. Therefore the determination of the structure and the dynamics of the native (Neu/erbB-2) receptor and mutated (Neu*/erbB-2) represents a capital step in the comprehension of the mechanisms of the signal transduction.

We performed the solid phase synthesis of the transmembrane peptides. The structure was determined by circular dichroism in solution and in the membrane. The π -Helix, found in the transmembrane domain, was studied by molecular dynamics simulations to better understand the mechanism of the dimerization. The solid state NMR allowed characterizing the dynamics of the lipids, in order to study the flexibility of peptides or the adaptation of the membrane. An innovating method was developed to separate peptides from the membrane.

Key words: solid phase synthesis, transmembrane peptides, ^{15}N -labelled amino acids, tyrosine kinase receptor, Neu/ErbB2, cancer, dimerization, mutation, phospholipids membranes, molecular dynamics simulations, circular dichroism, peptides/membranes interaction, solid state NMR.