



HAL
open science

Caractérisation des puroindolines, des galactolipides du blé et de leurs interactions : mesures physiques aux interfaces

Celine Bottier

► **To cite this version:**

Celine Bottier. Caractérisation des puroindolines, des galactolipides du blé et de leurs interactions : mesures physiques aux interfaces. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Rennes 1, 2006. Français. NNT : . tel-00148405

HAL Id: tel-00148405

<https://theses.hal.science/tel-00148405>

Submitted on 22 May 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'Ordre : 3345

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention Physique

par

Céline Bottier

Groupe Matière Condensée et Matériaux – Equipe Biophysique

École Doctorale Sciences de la Matière

U.F.R. Structure et Propriétés de la Matière

TITRE DE LA THÈSE :

**CARACTERISATION DES PUROINDOLINES, DES
GALACTOLIPIDES DU BLE ET DE LEURS INTERACTIONS :
MESURES PHYSIQUES AUX INTERFACES**

Soutenue le 8 décembre 2006 devant la Commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY :

| | | | |
|-----|--------------|--|------------------------|
| M. | S. PÉREZ | Directeur de recherche, CERMAV, Grenoble | Rapporteur |
| M. | P.E. MILHIET | Directeur de recherche, INSERM, Montpellier | Rapporteur |
| M. | B. FABRE | Chargé de recherche CNRS, Université de Rennes 1 | Examinateur |
| M. | D. MARION | Directeur de recherche, INRA, Nantes | Examinateur |
| Mme | A. RENAULT | Directrice de recherche, Université Rennes 1 | Co-directrice de thèse |
| Mme | V. VIÉ | Maître de conférences, Université Rennes 1 | Co-directrice de thèse |

*À Morgan,
À ma famille*

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Groupe Matière Condensée et Matériaux (UMR CNRS 6626) de l'Université de Rennes 1, dirigé par Anne RENAULT. Je tiens à lui exprimer ici toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au laboratoire. Je lui adresse mes sincères remerciements pour m'avoir acceptée dans l'équipe Biophysique et pour avoir co-dirigé cette thèse en suivant mes travaux avec autant d'intérêt. Je la remercie également pour ses précieux conseils et son aide dynamique.

Je remercie vivement les membres du Jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail : Monsieur Bruno FABRE qui a présidé la soutenance, Messieurs Serge PÉREZ et Pierre-Emmanuel MILHIET qui ont accepté d'être rapporteurs ainsi que les examinateurs, Monsieur Didier MARION et Mesdames Anne RENAULT et Véronique VIÉ.

Mes plus vifs remerciements vont à Véronique VIÉ, Maître de Conférences à l'Université de Rennes 1, qui a dirigé et encadré cette thèse, et qui a su me guider et me soutenir durant ces trois années. Merci pour ta disponibilité, tes conseils, tant dans le domaine de la recherche qu'au niveau de l'enseignement, ta sympathie et ta bonne humeur. Ce fut un véritable plaisir de travailler à tes côtés !

Un grand merci à Didier MARION, Directeur de Recherche à l'INRA de Nantes, qui m'a formée aux techniques d'extraction et de purification des lipides et des protéines. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour son aide indispensable qu'il a su m'accorder tout au long de ces trois années.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec d'autres laboratoires. Je tiens à remercier ici toutes les personnes qui y ont contribué : Bernard DESBAT et Julie GÉAN, Directeur de Recherche au CNRS et Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux 1, ainsi que Michel PÉZOLET, Professeur à l'Université de Laval à Québec. Je vous remercie pour votre aide précieuse lors des expériences et lors de l'analyse des résultats. Un grand merci aussi pour votre sympathie et votre accueil.

Je n'oublie pas tous les membres permanents de l'équipe Biophysique du GMCM qui ont su rendre ces trois années très agréables et très enrichissantes autant d'un point de vue scientifique que personnel : Franck ARTZNER, Sylvie BEAUFILS, Vincent BURGAUD, Vincent FLEURY, Zohar GUEROUI, Yann LEGRAND, Christophe ODIN, Pascal PANIZZA et Denis ROUÈDE. Mentions spéciales à Franck pour son aide précieuse en diffraction des rayons X, à Vincent B. pour toutes les fois où il a résolu des problèmes techniques sur les manip, à Sylvie pour son aide en ellipsométrie et à Vincent F. pour avoir partagé son bureau avec moi et m'avoir fait découvrir ses romans.

Je tiens aussi à exprimer mes sentiments les meilleurs envers les personnes des équipes moléculaire et granulaire/mousse ainsi qu'aux personnels du secrétariat et du service technique. Je pense en particulier à Michelle HALOPEAU, Christelle VIEL, Valérie FERRI, Françoise DESBOIS, Françoise

PELLET, Alain MORÉAC (merci pour le Raman), Jérôme LAMBERT (merci pour tes BD !), Janine ÉMILE qui a accepté de juger mes travaux à mi-parcours, Jérémy OHANA, Denis MORINEAU et Ronan LEFORT pour les manip sur l'ellipsomètre.

Je remercie vivement tous les membres non-permanents de l'équipe et du laboratoire, thésards ou post-doctorants, sans qui cette thèse n'aurait pas été aussi agréable : Émilie POUGET, Emmanuel TERRIAC, Mathieu UNBEKANDT, Aymeric LERAY, Loïc LEROY, Étienne HENRY, Anne FOUTEL-RICHARD, Annemieck CORNELISSEN, Cécile LEFLOCH-FOUÈRE, Alia AL-KILANI, Ophélie NICOLLE, Lionel CHIEZE, Mathieu PINOT, Samira ELAZZOZI, Christophe TARABOUT, Franck LOMINÉ, Marco MANCINI, Jean-François MÉTAYER, Régis GUÉGAN, Rémi BUSSELEZ, Yvelin GIRET, Johan HEBERT et Nicolas MOISAN. Merci d'avoir rendu les pauses agréables et drôles et bon vent à tous ! Mention spéciale à Émilie, ma super collègue de bureau, Manu, Mathieu, Aymeric et Zohar pour toutes ces bonnes soirées et ces bonnes rigolades !

Je pense aussi très fort à mes amis qui ont su écouter mes doutes, mes joies, mes petits problèmes : Sophie et Laurent, Aude et Régis, Nolwenn et Fred, Aurélie et François, Virginie et Romain, Céline, Katell, Mat, Marie L., Marie D., Bérengère et Vincent, Beber, Twin, Ced, Vince, Tony, Vat et tous les autres. Merci pour ce que vous êtes !

J'approche de la fin de ces remerciements. Je remercie évidemment mes parents sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, ma sœur Anne-Sophie, ainsi que Franck. Merci de m'avoir souvent conseillée sans m'influencer et merci d'avoir su écouter mes doutes et mes interrogations par rapport à l'avenir. Merci aux deux p'tits rayons de soleil, Louis et Jeanne, ils ne s'en rendront compte que plus tard, qui ont toujours égayé mon quotidien. Merci aussi à toute ma famille : mes grands-parents, Norbert, Rosemarie, Michel, Régine et Marie.

Et le meilleur pour la fin, un énorme merci à Morgan qui m'a supportée pendant ces trois années, chose qui n'a sûrement pas du être drôle tous les jours ! Merci d'avoir partagé cette aventure avec moi, d'avoir supporté autant mes joies que mes angoisses. Merci à toi !

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
| | |
| CHAPITRE 1 : MOLECULES BIOLOGIQUES | |
| I - Les lipides | |
| I.1 – Les acides gras..... | 9 |
| I.2 – Les principaux lipides membranaires | |
| I.2.1 – Les phospholipides..... | 10 |
| I.2.2 – Les glycolipides..... | 12 |
| I.2.3 – Le cholestérol..... | 13 |
| I.3 – Etats physiques | |
| I.3.1 – Lipides aux interfaces eau/air..... | 14 |
| I.3.2 – Polymorphisme dans les systèmes eau/lipide..... | 15 |
| II - Les protéines | |
| II.1 – Les acides aminés..... | 18 |
| II.2 – Structure des protéines | |
| II.2.1 – Structure primaire..... | 20 |
| II.2.2 – Structure secondaire..... | 21 |
| II.2.3 – Structure tertiaire..... | 23 |
| II.2.4 – Structure quaternaire..... | 24 |
| III – Le grain de blé | |
| III.1 – Morphologie du grain de blé..... | 25 |
| III.2 – Les lipides du grain de blé | |
| III.2.1 – Composition lipidique du grain de blé..... | 27 |
| III.2.2 – Rôle des lipides en panification..... | 28 |
| III.2.3 – Les galactolipides MGDG et DGDG..... | 28 |
| III.3 – Les puroindolines | |
| III.3.1 – Analyse structurale..... | 30 |
| III.3.2 – Activités biologiques et interactions avec les membranes..... | 31 |
| III.3.3 – Autres propriétés..... | 32 |
| Bibliographie du chapitre 1..... | 35 |

CHAPITRE 2 : EXTRACTION ET PURIFICATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

I – Purification des puroindolines : isoformes a et b

| | |
|---|----|
| I.1 – Principe général | 43 |
| I.2 – Mode opératoire détaillé | |
| I.2.1 – Extraction dans un tampon à base de Triton X-114..... | 43 |
| I.2.2 – Chromatographie sur résine échangeuse d’ions..... | 44 |
| I.2.3 – Electrophorèse en conditions dénaturantes : SDS-PAGE..... | 45 |
| I.2.4 – Dialyse..... | 47 |
| I.2.5 – Purification par chromatographie HPLC en phase inverse..... | 47 |
| I.2.6 – Spectrométrie de masse : Electrospray Ionisation (ESI)..... | 49 |
| II – Purification des galactolipides du blé : MGDG et DGDG | 52 |
| Bibliographie du chapitre 2 | 55 |

CHAPITRE 3 : TECHNIQUES EXPERIMENTALES

| | |
|---|----|
| I - Etude sur la cuve de Langmuir | 59 |
| I.1 – Tensiométrie | |
| I.1.1 – Principe..... | 60 |
| I.1.2 – Isotherme de compression..... | 61 |
| I.1.3 – Technique de prélèvement de Langmuir-Blodgett..... | 62 |
| I.2 – Ellipsométrie et microscopie à l’angle de Brewster | |
| I.2.1 – Réflectivité de la lumière par une interface..... | 63 |
| I.2.2 – Coefficients de réflexion et transmission..... | 64 |
| I.2.3 – Angle de Brewster..... | 64 |
| I.2.4 – Principe de l’ellipsométrie..... | 65 |
| I.2.5 – Sensibilité de la mesure..... | 66 |
| I.2.6 – Dispositif expérimental..... | 67 |
| I.2.7 – Relation entre angle ellipsométrique et concentration de surface..... | 67 |
| I.2.8 – Microscopie à l’angle de Brewster..... | 68 |
| I.3 – Rhéologie de surface | |
| I.3.1 – Principe..... | 69 |
| I.3.2 – Dispositif expérimental..... | 69 |
| I.3.3 – Détermination de la constante élastique de cisaillement..... | 70 |

II – Etudes spectroscopiques

| | |
|---|----|
| II.1 – La spectroscopie PM-IRRAS | 72 |
| II.1.1 – Principe de la spectroscopie PM-IRRAS..... | 73 |
| II.1.2 – Le montage optique..... | 73 |
| II.1.3 – Règles de sélection à l’interface eau/air..... | 74 |
| II.1.4 – Spectroscopie infrarouge des protéines..... | 76 |
| II.1.4.A – Modes de vibration de la liaison peptidique..... | 76 |
| II.1.4.B – Modes de vibration en fonction de la conformation des protéines..... | 77 |
| II.2 – La spectroscopie de réflexion totale atténuée (ATR) | 79 |
| II.3 – La spectroscopie Raman | |
| II.3.1 – Principe..... | 81 |
| II.3.2 – Règles de sélection..... | 83 |
| II.3.3 – Montage expérimental..... | 83 |

III – Microscopie à force atomique

| | |
|--|----|
| III.1 – Instrumentation | 85 |
| III.2 – Modes de fonctionnement | |
| III.2.1 – Mode contact..... | 87 |
| III.2.2 – Mode contact oscillant (Tapping mode)..... | 89 |
| III.2.3 – Mode non-contact..... | 89 |

| | |
|--|----|
| IV – Diffraction des rayons X | 89 |
| Bibliographie du chapitre 3 | 92 |

CHAPITRE 4 : ETUDE STRUCTURALE DES GALACTOLIPIDES DU BLE

I - Etude des monocouches lipidiques aux interfaces liquide/air et solide/air

| | |
|--|-----|
| I.1 – Isothermes de compression | 98 |
| I.2 – Ellipsométrie et microscopie à l’angle de Brewster | 100 |
| I.3 – Spectroscopie PM-IRRAS | 103 |
| I.4 – Observations par microscopie à force atomique (AFM) | 105 |
| I.5 – Rhéologie de surface | 107 |

II - Etude des mésophase liquide-cristallines en milieu aqueux

| | |
|---|-----|
| II.1 – Diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) | |
| II.1.1 – Phase formée par le système DGDG/eau..... | 109 |
| II.1.2 – Phase formée par le système MGDG/eau..... | 114 |
| II.1.3 – Phase formée par le système MGDG/DGDG/eau..... | 117 |
| II.2 – Microscopie à l’angle de Brewster au-delà du collapse | 120 |

| | |
|---|-----|
| II.3 – Spectroscopies Raman et infrarouge à transformée de Fourier | 122 |
| Conclusion et discussion relatives au chapitre 4 | 125 |
| Bibliographie du chapitre 4 | 128 |

CHAPITRE 5 : CARACTERISATION DES PUROINDOLINES

I - Etude aux interfaces liquide/air et solide/air

I.1 – Adsorption des protéines à l’interface liquide/air

| | |
|---|-----|
| I.1.1 – Suivi d’une cinétique d’adsorption par tensiométrie et ellipsométrie..... | 135 |
| I.1.2 – Calcul du coefficient de diffusion..... | 137 |
| I.1.3 – Effet de la concentration sur l’adsorption de la pin-a et la pin-b..... | 138 |

I.2 – Dépôt des protéines à la surface : isothermes et ellipsométrie 140 |

I.3 – Morphologie des films de protéines à différentes échelles

| | |
|--|-----|
| I.3.1 – Microscopie à l’angle de Brewster..... | 142 |
| I.3.2 – Microscopie à force atomique..... | 145 |

I.4 – Spectroscopie PM-IRRAS..... 147 |

II - Etude en solution

II.1 – Spectroscopie Raman..... 150 |

II.2 – Diffusion des rayons X aux petits angles sur une solution de pin-a..... 151 |

Conclusion et discussion relatives au chapitre 5..... 153 |

Bibliographie du chapitre 5..... 154 |

CHAPITRE 6 : ETUDE DES INTERACTIONS PUROINDOLINE/GALACTOLIPIDE

I – Etude aux interfaces liquide/air et solide/air

I.1 – Mesure de tensiométrie lors de l’adsorption des puroindolines dans des monocouches de galactolipides..... 159 |

I.2 – Rhéologie de surface sur des films mixtes à l’interface liquide/air..... 162 |

I.3 – Morphologie des films mixtes puroindoline/galactolipide

I.3.1 – Suivi des cinétiques d’adsorption par ellipsométrie et BAM..... 163 |

I.3.2 – Observation par AFM des films de Langmuir-Blodgett

I.3.2.A – Paramètres influençant l’organisation des protéines dans les films lipidiques..... 166 |

I.3.2.B – Observation par AFM de l’organisation des puroindolines dans les films lipidiques..... 169 |

I.4 – Mesure de PM-IRRAS sur des films mixtes déposés à l’interface..... 172 |

I.5 – Isothermes réalisées sur des films mixtes à l’interface..... 175 |

| | |
|---|-----|
| II – Etude en solution des systèmes pin-a/galactolipide | |
| II.1 – Spectroscopie Raman | 178 |
| II.2 – Diffusion des rayons X aux petits angles | 180 |
| II.3 – Microscopie à l’angle de Brewster au-delà du collapse | 181 |
| Conclusion et discussion relatives au chapitre 6 | 184 |
| Bibliographie du chapitre 6 | 186 |
| | |
| CONCLUSION GENERALE | 191 |
| | |
| ANNEXES | 195 |
| Annexe 1 : composition des tampons et des gels utilisés pour la purification des puroidolines..... | 197 |
| Annexe 2 : procédures expérimentales relatives au chapitre 4..... | 199 |
| Annexe 3 : mesures d’ellipsométrie sur des solutions de saccharose..... | 205 |
| Annexe 4 : mesure du coefficient d’absorption des protéines..... | 207 |
| Annexe 5 : procédures expérimentales relatives au chapitre 5..... | 209 |
| Annexe 6 : procédures expérimentales relatives au chapitre 6..... | 213 |

« C'est grâce à leur capacité de former, avec d'autres molécules, des complexes stéréospécifiques et non covalents, que les protéines exercent leurs fonctions "démoniaques" »

Jacques Monod, Le hasard et la nécessité, Essai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne, 1970.

Malgré les avancées méthodologiques et cognitives exceptionnelles faites au 20^{ème} siècle dans le domaine de la biologie et de la biochimie, il reste aujourd'hui à élucider et préciser de nombreux phénomènes. Un des objectifs de la recherche actuelle consiste à appréhender dans sa globalité le fonctionnement de la cellule, l'unité fondamentale du vivant, à l'origine du bon ou du mauvais fonctionnement de l'organisme. Dans ce contexte de biologie intégrative, de nombreuses recherches s'intéressent notamment à la membrane, barrière contrôlant les échanges et les communications intra et extracellulaires. Ces propriétés reposent sur un assemblage extrêmement performant de lipides et de protéines dont la construction et la dynamique intéressent autant les biologistes que les physiciens. Le biologiste s'intéressera surtout à ses fonctions d'échanges (perméabilité, transport) et de réception des signaux cellulaires et extracellulaires. Le physicien quant à lui, cherchera à mesurer ses propriétés physiques, élastiques ou thermodynamiques, à les modéliser et éventuellement les prédire : comment va-t-elle réagir si on applique une déformation ? Comment des objets s'insèrent-ils spécifiquement dans la membrane et comment modifient-ils les propriétés ? D'une manière générale la fonction biologique d'une membrane repose sur ces propriétés physiques. C'est sur ce concept que repose notre étude. Une meilleure connaissance de la structure des macromolécules, de leurs interactions et associations statiques et dynamiques, ouvre généralement des voies quant à la compréhension de leur rôle biologique. Malgré l'extrême complexité des structures biologiques, on y retrouve quelques éléments simples. Par exemple, les liaisons hydrogène guident la formation de structures locales en hélice chez les protéines comme dans l'ADN ou l'ARN. La faible solubilité dans l'eau des chaînes latérales des acides aminés dits « hydrophobes » favorise le repliement des protéines en structure globulaire. S'il faut connaître la structure pour comprendre la fonction, la relation structure/fonction n'est pas biunivoque. On voit souvent la cellule ou l'organisme utiliser des structures très comparables à des fins différentes. Ce travail de thèse a porté sur l'étude des interactions entre une protéine du blé, la puroindoline, et des constituants indispensables des membranes, les lipides. L'histoire de la puroindoline commence en 1993 lorsqu'une équipe de l'INRA de Nantes isole de l'albumen du blé une protéine basique et riche en cystéine, jusque là inconnue [1]. Elle est nommée puroindoline de par sa présence

dans le blé, du grec « *puros* », et par la présence d'un domaine unique, riche en tryptophane (noyau *indole*), dans sa séquence primaire. Sa forte interaction avec les lipides est rapidement envisagée car cette protéine est isolée par un procédé souvent utilisé pour extraire les protéines fortement associées aux lipides membranaires [2]. Par ailleurs ces protéines ont révélé des propriétés de surface exceptionnelles (propriétés moussantes) et semblent intervenir sur l'organisation de la matrice amylo-protéique de l'albumen du grain de blé [3, 4]. Ces propriétés sont essentielles pour la transformation du blé en farine et produits de cuisson (pains, biscuits, pâtes alimentaires...). Les propriétés de la puroindoline qui ont orienté ce sujet de thèse sont leurs fortes capacités moussantes, même en présence de lipides, et leur relation avec la dureté des blés qui dépend de la cohésion plus ou moins forte de l'albumen. Il est très probable que la cohésion entre les granules d'amidon et la matrice protéique de l'albumen puisse être due à la formation de complexes lipoprotéiques dans lesquels le rôle des puroindolines nécessite d'être précisé. Néanmoins, même si on lui reconnaît des effets d'intérêt majeur pour les technologies céréalières, sa fonction biologique reste inconnue à jour. Nous ne prétendons pas répondre à cette question dans ce manuscrit mais nous verrons que les résultats obtenus permettent d'ouvrir des pistes d'investigation.

Pour étudier un problème de biologie, par essence très complexe de par la structure, l'organisation et la composition des systèmes réels ; la physique cherche à séparer les contributions de chaque composant. Ainsi, l'objet de l'étude est souvent un système moléculaire modèle plus simple. Aujourd'hui, pour mimer la membrane biologique, les principaux modèles sont les monocouches ou bicouches de Langmuir, les multicouches supportées et les vésicules. Les monocouches de Langmuir sont des films monomoléculaires de molécules tensioactives à l'interface eau/air [5, 6]. Pour étudier certaines de leurs propriétés physiques, il est nécessaire de les transférer sur un substrat solide, c'est la technique de Langmuir-Blodgett [7] (figure 1). Ce procédé permet d'obtenir une simple monocouche, une bicouche ou des multicouches.

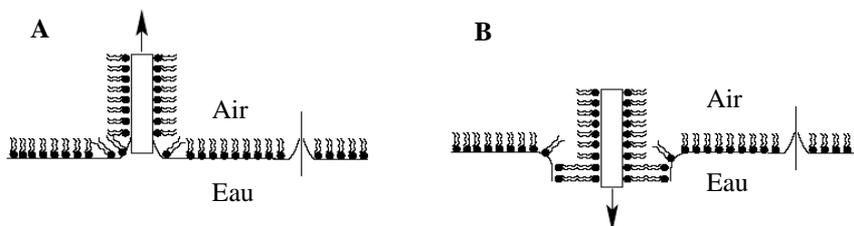


Figure 1 : méthode de dépôt de Langmuir-Blodgett. Un substrat hydrophile passe à travers un film de lipides à l'interface eau/air. A : après un passage se dépose une monocouche, B : après un second passage une bicouche.

La méthode de Langmuir-Schaefer [8] est une alternative à celle de Langmuir-Blodgett qui permet de former des bicouches supportées par approche horizontale du substrat hydrophobe près de l'interface. Un autre moyen d'obtenir des bicouches supportées est l'éclatement de vésicules. La bicouche supportée par rapport à une bicouche classique permet de sonder les propriétés d'une bicouche qui n'est pas directement au contact du substrat qui peut éventuellement perturber le comportement des molécules. Un autre type de modèle, dont la forme sphérique se rapproche de la géométrie des cellules, est la vésicule (figure 2).

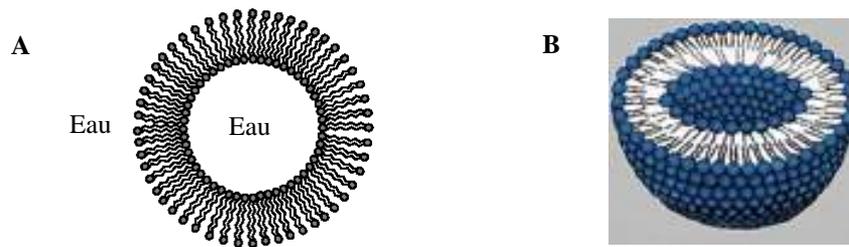


Figure 2 : A : coupe bidimensionnelle d'une vésicule dont le cœur est constitué d'une bicouche sphérique. B : vision tridimensionnelle.

La vésicule comme la cellule est un objet à trois dimensions où l'on conserve la notion de compartimentalisation de la membrane. De plus, par rapport aux systèmes précédents, un paramètre supplémentaire entre en jeu, la courbure de la bicouche. Malgré la simplicité de ces systèmes, chacun de ces trois modèles présente une alternative intéressante pour l'étude des membranes cellulaires et apporte des informations complémentaires sur l'organisation, l'orientation des molécules dans la membrane et la nature des interactions développées avec des protéines membranaires.

Au début de cette thèse s'est posée la question du système modèle utilisé pour sonder les interactions entre la puuroindoline et les lipides. Notre choix s'est porté sur le modèle le plus simple, la monocouche, pour plusieurs raisons. La première concerne le mode d'interaction des puuroindolines. Des recherches réalisées *in vitro* avec des protéines isolées ont démontré qu'elles ont besoin de la présence d'une interface pour exercer pleinement leur pouvoir moussant. Par exemple, les interactions entre les puuroindolines et des phospholipides n'ont été possibles qu'au-dessus de la concentration micellaire critique [9]. De plus, les monocouches de lipides ou lipide/protéine ont été largement utilisées pour explorer un certain nombre de mécanismes ayant lieu dans les membranes biologiques et sont pertinentes pour mimer les films qui stabilisent les bulles de gaz (interface liquide/air) [10, 11]. Un point non négligeable est le contrôle facilité de la composition et de l'état physique de la monocouche.

Enfin, de par sa petite taille, il semble que la puroindoline n'interagisse qu'avec un seul feuillet de la membrane, autrement dit une monocouche.

La puroindoline se décline en deux isoformes, la pin-a et la pin-b dont les structures primaires présentent 60% d'homologie [12, 13]. Nous avons choisi de les étudier en parallèle de manière à mettre en évidence d'éventuelles différences de comportement. Enfin, le point crucial a été de travailler avec des lipides naturels du blé. Notre choix s'est porté sur les galactolipides MGDG et DGDG car, dans le grain de blé, ils sont majoritaires par rapport aux phospholipides [14]. De plus, ils composent les membranes de l'amyloplaste [15], principal constituant de l'albumen du blé, dont la texture pourrait dépendre du mode d'interaction de la puroindoline.

Ce travail s'articulera en six chapitres. Dans un premier temps nous décrirons les deux classes de molécules biologiques avec lesquelles nous avons travaillé : les lipides et les protéines. A la fin de ce premier chapitre, nous nous intéresserons aux protéines et lipides du blé ainsi qu'à leur rôle en panification notamment. Notre choix a été de travailler avec des protéines et lipides naturels, ainsi le second chapitre décrira les procédés d'extraction et de purification du matériel biologique. Le troisième chapitre sera consacré à la description des techniques utilisées pour caractériser les systèmes dans leurs deux dimensions aux interfaces liquide/air (tensiométrie, ellipsométrie et microscopie à l'angle de Brewster, rhéologie de surface, spectroscopie PM-IRRAS) ou solide/air (microscopie à force atomique). Quelques techniques permettant d'explorer les propriétés tridimensionnelles ont également été utilisées (spectroscopies infrarouge de réflexion totale atténuée et Raman, diffraction des rayons X). Pour étudier les propriétés des mélanges protéine/lipide, nous avons dû au préalable caractériser les composés seuls. Ainsi les trois derniers chapitres consacrés aux résultats expérimentaux s'articuleront de la façon suivante : le quatrième chapitre traitera des propriétés physiques des lipides. Dans le cinquième, une étude comparative sera menée entre les deux isoformes des puroindolines tandis que le dernier chapitre sera consacré à l'étude des systèmes mixtes protéine/lipide. Pour alléger le manuscrit, nous avons choisi de décrire les procédures expérimentales en annexe. A la fin de ces trois chapitres nous mènerons les discussions relatives à chacun d'eux et terminerons par une conclusion générale faisant le lien entre tous les résultats.

Bibliographie

1. Blochet, J.-E., C. Chevalier, E. Forest, E. Pebay-Peyroula, M.-F. Gautier, P. Joudrier, M. Pérolet, and D. Marion. 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Letters*. 329:336-340.
2. Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 25:1604-1607.
3. Dubreil, L., J.-P. Compoin, and D. Marion. 1997. Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45:108-116.
4. Dubreil, L., S. Méliande, H. Chiron, J.P. Compoin, L. Quillien, G. Branlard, and D. Marion. 1998. Effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour. *Cereal Chem.* 75:222-229.
5. Blodgett, K.B. 1935. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *JACS*. 57:1007-1022.
6. Blodgett, K.B. and I. Langmuir. 1937. Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Phys. Rev.* 51:964-982.
7. Tredgold, R.H. 1994. Order in thin organic films. *Cambridge University Press*.
8. Ulman, A. 1991. An introduction to ultrathin organic films: from Langmuir-Blodgett to self-assembly. *Academic Press, Inc.*
9. Husband, F., P.J. Wilde, D. Marion, and D.C. Clark. 1995. A comparison of the foaming and interfacial properties of two related lipid binding proteins from wheat in the presence of a competitive surfactant. In *Food Macromolecules and Colloids*. E. Dickinson, and D. Lorient, editors. *Royal Society of Chemistry, London, UK*. 285-296.
10. Brockman, H. 1999. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:438-443.
11. Maget-Dana, R. 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1462:109-140.
12. Blochet, J.-E. 1991. Isolement, caractérisation et études structurales de protéines de blé effectrices des lipides amphiphiles. *Thèse de doctorat de l'université de Nantes*.

13. Gautier, M.-F., M.-E. Aleman, A. Guirao, D. Marion, and P. Joudrier. 1994. Triticum aestivum puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol. Biol.* 25:43-57.
14. Hargin, K.D. and W.R. Morrison. 1980. The distribution of acyl lipids in the germ, aleurone, starch and non-starch endosperm of four wheat flour varieties. *J. Sci. Food Agric.* 31:877-888.
15. Fishwick, M.J. and A.J. Wright. 1980. Isolation and characterization of amyloplast envelope membranes from Solanum tuberosum. *Phytochemistry.* 19:55-59.

CHAPITRE 1 MOLECULES BIOLOGIQUES

| | |
|---|----|
| I - Les lipides | |
| I.1 – Les acides gras | 9 |
| I.2 – Les principaux lipides membranaires | |
| I.2.1 – Les phospholipides..... | 10 |
| I.2.2 – Les glycolipides..... | 12 |
| I.2.3 – Le cholestérol..... | 13 |
| I.3 – Etats physiques | |
| I.3.1 – Lipides aux interfaces eau/air..... | 14 |
| I.3.2 – Polymorphisme dans les systèmes eau/lipide..... | 15 |
| II - Les protéines | |
| II.1 – Les acides aminés | 18 |
| II.2 – Structure des protéines | |
| II.2.1 – Structure primaire..... | 20 |
| II.2.2 – Structure secondaire..... | 21 |
| II.2.3 – Structure tertiaire..... | 23 |
| II.2.4 – Structure quaternaire..... | 24 |
| III – Le grain de blé | |
| III.1 – Morphologie du grain de blé | 25 |
| III.2 – Les lipides du grain de blé | |
| III.2.1 – Composition lipidique du grain de blé..... | 27 |
| III.2.2 – Rôle des lipides en panification..... | 28 |
| III.2.3 – Les galactolipides MGDG et DGDG..... | 28 |
| III.3 – Les puroindolines | |
| III.3.1 – Analyse structurale..... | 30 |
| III.3.2 – Activités biologiques et interactions avec les membranes..... | 31 |
| III.3.3 – Autres propriétés..... | 32 |
| Bibliographie | 35 |

CHAPITRE 1

MOLECULES BIOLOGIQUES

Ce chapitre s'articule autour de trois parties. Dans un premier temps, nous décrirons les lipides en général : structure des acides gras, principaux lipides membranaires, états physiques à l'interface liquide/air et polymorphisme en solution. Puis, nous poursuivrons par la description des protéines en commençant par les briques fondamentales qui les composent : les acides aminés. Nous présenterons ensuite les différents niveaux d'organisation des protéines, de la structure primaire à quaternaire. La dernière partie sera plus particulièrement consacrée au grain de blé. Nous aborderons en premier lieu des points tels que les enjeux économiques, l'histoire et la morphologie du grain. Puis nous nous attacherons à présenter les propriétés des molécules d'intérêt dans le blé, à savoir les galactolipides et les puroindolines.

I – Les lipides

Les lipides membranaires sont des molécules possédant à la fois une partie hydrophile (tête polaire) et une partie hydrophobe (chaîne carbonée). De telles molécules sont dites amphiphiles de par cette dualité (molécules amphotères). Une de leurs propriétés biologiques la plus significative est leur hydrophobie. Cette propriété est essentiellement assurée par un constituant particulier des lipides : les acides gras.

I.1 – Les acides gras

Les acides gras sont des chaînes hydrocarbonées de longueur et de degré d'insaturation divers qui se terminent par un groupe acide carboxylique. Le nom systématique d'un acide gras dérive du nom de l'hydrocarbure apparenté par substitution de *oïque* à la lettre finale *e*. Par exemple, l'acide gras saturé en C₁₈ est appelé octadécanoïque car l'hydrocarbure apparenté est l'octadécane. Un acide gras en C₁₈ avec une double liaison est appelé acide octadécénoïque ; avec deux doubles liaisons, acide octadécadiénoïque ; avec trois doubles liaisons, acide octadécatriénoïque. Le symbole 18:0 indique un acide gras en C₁₈ sans double liaison, tandis que 18:2 signifie qu'il y a deux doubles liaisons. La position d'une double liaison est représentée par le symbole Δ suivi d'un nombre en exposant. Par exemple, *cis*-Δ⁹ signifie qu'il y a une double liaison *cis* entre les atomes de carbone 9 et 10. La formule d'un acide gras est présentée à la figure 1.1.

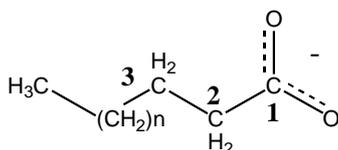


Figure 1.1 : formule d'un acide gras.

Les acides gras sont ionisés au pH physiologique et il convient donc de les écrire sous leur forme carboxylate. Ils contiennent habituellement un nombre pair d'atomes de carbones (tableau 1.1). Les acides gras des lipides végétaux ont généralement 16 et 18 carbones. Les propriétés des acides gras et des lipides qui en dérivent dépendent largement de leur degré d'insaturation et de la longueur de leur chaîne. Les acides gras insaturés ont un point de fusion plus bas que les acides gras saturés de même longueur, comme observé pour l'acide stéarique saturé (69.6 °C) et l'acide oléique contenant une double liaisons *cis* (13.4 °C). La longueur de la chaîne affecte également le point de fusion : la température de fusion de l'acide palmitique (C₁₆) est plus basse de 6.5 °C que celle de l'acide stéarique (C₁₈). Ainsi, une courte longueur de chaîne et la présence d'insaturation augmentent la fluidité des acides gras [1].

| Nombre de carbones | Nombre de doubles liaisons | Nom commun systématique | Nom | Formule |
|--------------------|----------------------------|-------------------------|--|---|
| 12 | 0 | Laurate | <i>n</i> -Dodécanoate | CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COO ⁻ |
| 14 | 0 | Myristate | <i>n</i> -Tétradécanoate | CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COO ⁻ |
| 16 | 0 | Palmitate | <i>n</i> -Hexadécanoate | CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COO ⁻ |
| 18 | 0 | Stéarate | <i>n</i> -Octadécanoate | CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COO ⁻ |
| 20 | 0 | Arachidate | <i>n</i> -Eicosanoate | CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COO ⁻ |
| 22 | 0 | Béhénate | <i>n</i> -Docosanoate | CH ₃ (CH ₂) ₂₀ COO ⁻ |
| 24 | 0 | Lignocérate | <i>n</i> -Tétracosanoate | CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COO ⁻ |
| 16 | 1 | Palmitoléate | <i>cis</i> -Δ ⁹ -Hexadécénoate | CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COO ⁻ |
| 18 | 1 | Oléate | <i>cis</i> -Δ ⁹ -Octadécénoate | CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COO ⁻ |
| 18 | 2 | Linoléate | <i>cis, cis</i> -Δ ⁹ , Δ ¹² -Octadécadiénoate | CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COO ⁻ |
| 18 | 3 | Linoléate | <i>all-cis</i> -Δ ⁹ , Δ ¹² , Δ ¹⁵ -Octadécatriénoate | CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COO ⁻ |
| 20 | 4 | Arachidonate | <i>all-cis</i> -Δ ⁵ , Δ ⁸ , Δ ¹¹ , Δ ¹⁴ -Eicosatétraénoate | CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COO ⁻ |

Tableau 1.1 : quelques acides gras naturels.

I.2 – Les principaux lipides membranaires

Dans ce paragraphe, nous allons décrire les trois principaux types de lipides membranaires, à savoir, les phospholipides, les glycolipides et le cholestérol [1].

I.2.1 – Les phospholipides

Les phospholipides sont abondants dans toutes les membranes biologiques. Ils sont constitués de quatre parties : les acides gras, une plate-forme sur laquelle sont fixés les acides gras, un phosphate et un alcool lié au phosphate. La plate-forme sur laquelle les phospholipides sont construits peut être le glycérol, alcool à trois carbones, ou la sphingosine, alcool plus complexe. Les phospholipides dérivés du glycérol sont appelés phosphoglycérides (figure 1.2).

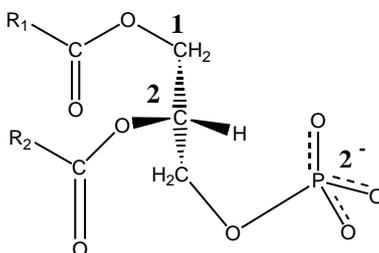


Figure 1.2 : structure du phosphoglycéride le plus simple : le phosphatidate (diacyl glycérol 3-phosphate). La configuration absolue du carbone central (C-2) est représentée.

Les principaux phosphoglycérides dérivent du phosphatidate par la formation d'une liaison ester entre le groupe phosphate et le groupe hydroxyle de divers alcools. Les alcools habituels des phosphoglycérides sont l'acide aminé sérine, l'éthanolamine, la choline et le glycérol (figure 1.3).

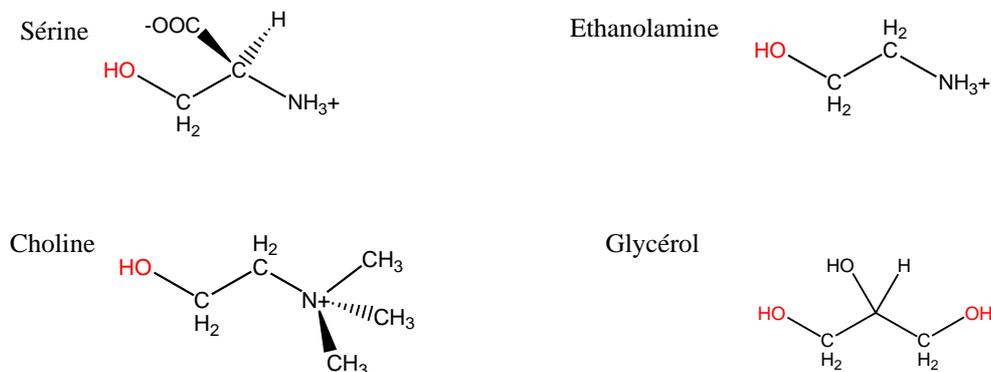


Figure 1.3 : principaux alcools des phosphoglycérides.

De ces alcools dérivent la phosphatidyl sérine (PS), la phosphatidyl éthanolamine (PE), la phosphatidyl choline (PC) et le phosphatidyl glycérol (PG), respectivement. La formule structurale de la phosphatidyl choline est présentée en exemple à la figure 1.4.

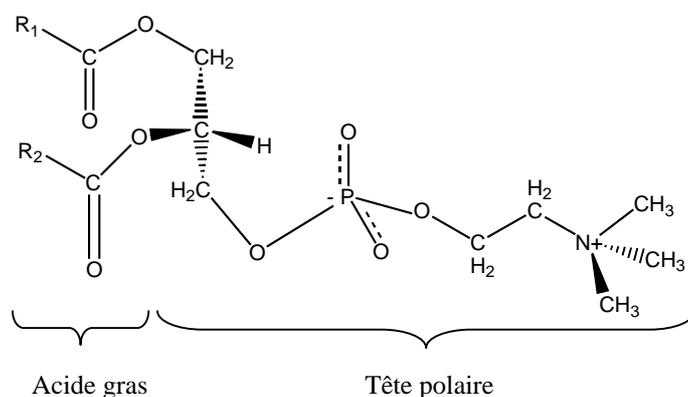


Figure 1.4 : formule structurale de la phosphatidyl choline et mise en évidence des parties hydrophile et hydrophobe du lipide.

La sphingomyéline est un phospholipide membranaire qui ne dérive pas du glycérol. En fait, la colonne vertébrale de la sphingomyéline est la sphingosine, alcool aminé possédant une longue chaîne hydrocarbonée insaturée (figure 1.5). Dans la sphingomyéline, le groupe amine du squelette sphingosine est uni à un acide gras par une liaison amide. De plus, le groupe hydroxyle primaire de la sphingosine est estérifié par la phosphorylcholine.

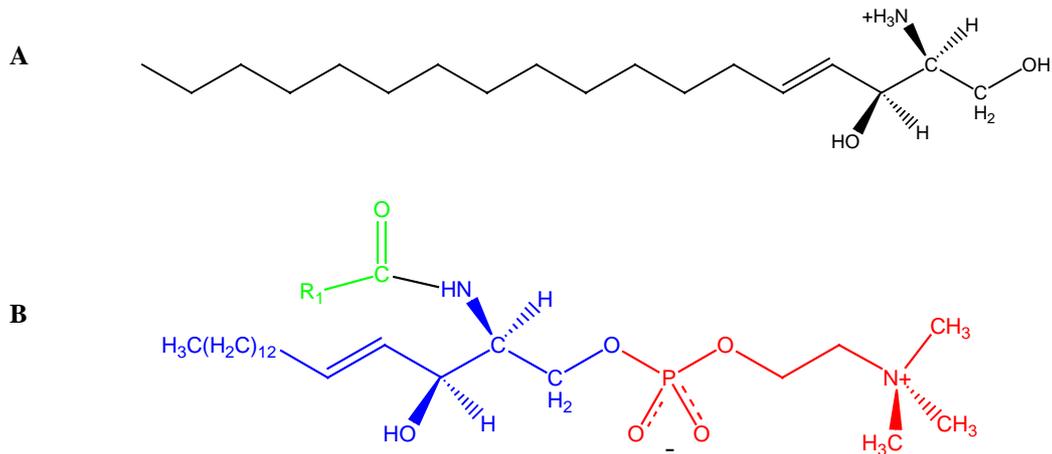


Figure 1.5 : structures de la sphingosine (A) et de la sphingomyéline (B). B : la partie sphingosine est mise en évidence en bleu, l'acide gras en vert et la phosphorylcholine en rouge.

I.2.2 – Les glycolipides

Les glycolipides sont des lipides qui contiennent des oses. Dans les cellules animales, les glycolipides dérivent, comme la sphingomyéline, de la sphingosine. Chez les végétaux, celle-ci est remplacée par la phytosphingosine. Le groupe amine du squelette de la sphingosine est acylé par un acide gras et un ou plusieurs oses sont attachés au groupe hydroxyle primaire de la sphingosine. Le glycolipide le plus simple est le cérébroside, dans lequel il y a un seul résidu osidique soit le glucosyl, soit le galactosyl (figure 1.6). D'autres glycolipides plus complexes, tels que les gangliosides, contiennent une chaîne ramifiée pouvant contenir jusqu'à sept résidus osidiques.

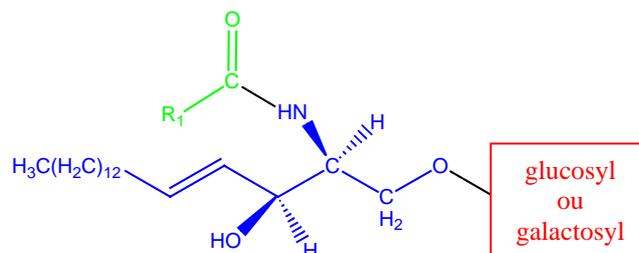


Figure 1.6 : structure d'un cérébroside. La sphingosine et l'acide gras sont indiqués en bleu et vert, respectivement.

Deux galactolipides majoritaires sont présents dans les cellules végétales : le MGDG et le DGDG qui possèdent respectivement, un et deux groupes galactosyl. Ils possèdent deux acides gras accrochés à un groupe glycérol lui même estérifié par le groupement osidique. La partie glycosidique confère à ces lipides un caractère d'autant plus polaire qu'elle est importante. Les formules du MGDG et DGDG sont présentées à la figure 1.7.

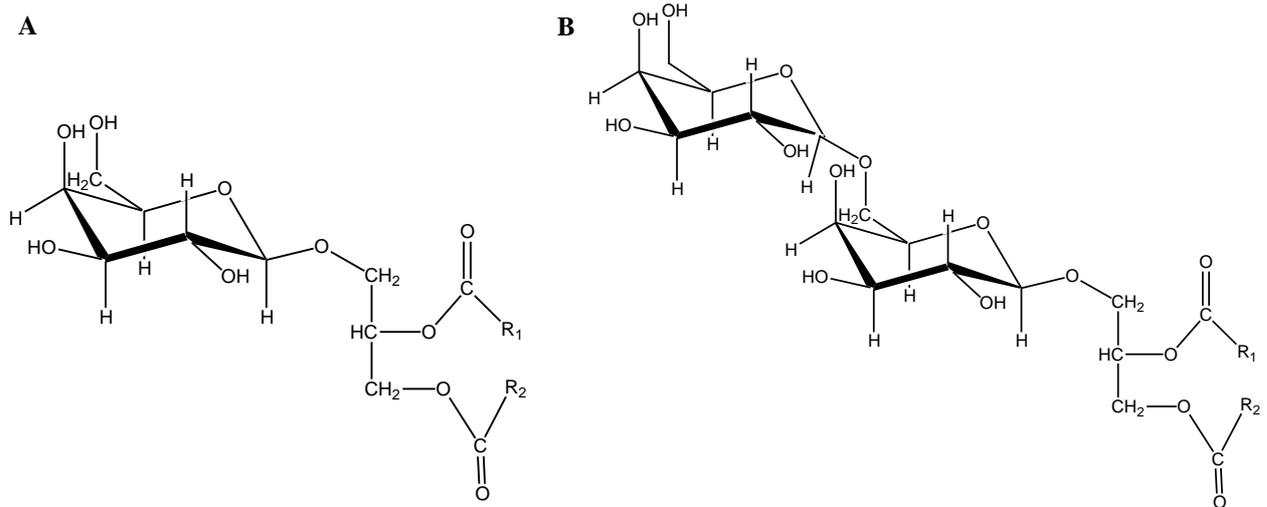


Figure 1.7 : structures du MGDG (A) et du DGDG (B). Les groupes galactosyl sont reliés aux chaînes acyl via une liaison β -glycosidique.

I.2.3 – Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide dont la structure est très différente de celle des phospholipides. C'est un stéroïde, construit à partir de l'union de quatre cycles hydrocarbonés. Une queue hydrocarbonée est fixée à l'une des extrémités du stéroïde et un groupe hydroxyle à l'autre extrémité (figure 1.8). Dans les membranes, le cholestérol est orienté parallèlement aux chaînes des acides gras des phospholipides et le groupe hydroxyle entre en interaction avec les groupes des têtes phospholipidiques environnantes [1]. Chez les végétaux, le cholestérol est remplacé par des phytostérols (stigmastérol, sytostérol...) qui peuvent être glycosylés et/ou acylés.

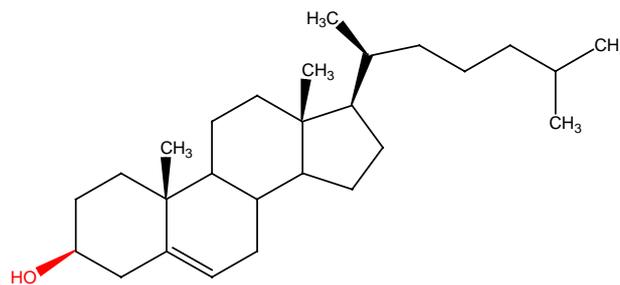


Figure 1.8 : structure du cholestérol.

I.3 – Etats physiques

Dans ce paragraphe, nous décrivons les états physiques des lipides aux interfaces liquide/air (cas à deux dimensions) et en dispersion dans l'eau (cas à trois dimensions).

I.3.1 – Lipides aux interfaces eau/air

Les propriétés amphiphiles des lipides leur permettent de s'organiser spontanément à l'interface liquide/air, tête polaire plongée dans le liquide et chaînes carbonées orientées vers l'air. La détermination de leur état physique est obtenue par le suivi de la pression superficielle en fonction de l'aire de la cuve de Langmuir (chapitre 3).

Pour des molécules couramment utilisées en biologie, on considère que le nombre d'états physiques définis en deux dimensions sont au nombre de quatre (figure 1.9). Les notations employées sont celles utilisées par Dervichian et Gaines [2, 3]. Toutefois, des diagrammes de phases complexes (pression, température) regroupant toutes les transitions de phases théoriques et expérimentales en monocouche sont rencontrés dans la littérature [4].

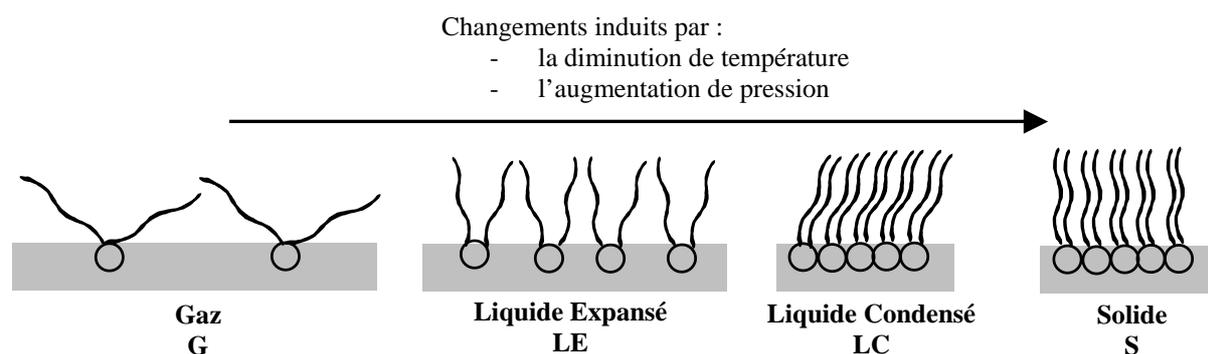


Figure 1.9 : les différentes phases rencontrées aux interfaces liquide/air.

L'état gazeux, noté G, correspond à l'absence d'interaction entre molécules. Les chaînes aliphatiques sont complètement désorganisées à la surface de l'eau. L'état liquide expansé, noté LE, définit l'état pour lequel les têtes hydrophiles sont organisées en réseau bi-dimensionnel parallèlement à la surface et les chaînes aliphatiques restent mobiles. L'état liquide condensé, noté LC, décrit l'état où toutes les chaînes aliphatiques sont en conformation *trans* ; elles occupent une aire minimale et les têtes polaires se rapprochent. Une légère inclinaison des chaînes peut être observée. L'état solide, noté S, se différencie du liquide condensé par un alignement normal des chaînes aliphatiques.

Les paramètres importants et quantifiables sont la pression latérale et l'aire moléculaire moyenne (aire accessible par molécule). Lorsqu'on réalise une isotherme de compression, on enregistre la pression latérale en fonction de l'aire moléculaire à température ambiante. La pression latérale π , encore appelée pression de surface, est calculée à partir des mesures de la tension superficielle de l'eau pure γ_0 ou plus généralement de la sous-phase et de la tension superficielle en présence de molécules amphiphiles γ_1 [5]:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma_1 \quad (\text{eq. 1.1})$$

L'allure des diagrammes de phase ainsi que la méthode de mesure de la pression de surface seront décrites au chapitre 3.

I.3.2 – Polymorphisme dans les systèmes eau/lipide

En phase aqueuse, les lipides ont une forte tendance à s'auto-associer formant ainsi différentes phases qui peuvent être déterminées par des techniques de calorimétrie, microscopie électronique par cryofracture, diffraction des rayons X ou spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du deutérium ou du phosphore-31. Les différentes phases rencontrées résultent d'une combinaison entre les interactions hydrophobes intra et extra moléculaires et des contraintes géométriques de compactage. Le concept de forme [6] basé sur l'importance relative des parties hydrophobes et hydrophiles des lipides permet de déterminer la préférence de phase adoptée par un lipide particulier. La concentration qui induit une première agrégation est appelée concentration micellaire critique (CMC).

Avant d'énumérer les différentes phases lipidiques, nous allons apporter quelques précisions sur la notation adoptée qui a été introduite par Luzzati [7].

- Le type de réseau est noté en lettre capitale : L pour lamellaire, Q pour cubique, H pour hexagonale.
- Les indices I ou II font référence au milieu continu. L'indice I ou « direct » signifie que les lipides se trouvent dans le milieu aqueux continu (huile dans eau), tandis que l'indice II ou « inverse » signifie que les têtes polaires s'organisent dans une matrice non polaire continue formée par les chaînes aliphatiques (eau dans huile).
- Les indices α et β permettent de préciser l'état de conformation des chaînes aliphatiques : β correspond à un état gel, les chaînes étant ordonnées et α à un état fluide où les chaînes sont désordonnées. Le tableau 1.2 récapitule les phases les plus rencontrées chez les lipides.

| Phase | Description | Figure |
|------------------------|------------------------------|-------------|
| L_{β} | phase gel lamellaire droit | Fig. 1.11.A |
| $L_{\beta'}$ | phase gel lamellaire incliné | Fig. 1.11.B |
| $L_{\beta I}$ | phase gel interdigité | Fig. 1.11.C |
| $P_{\beta'}$ | phase gel ondulé | Fig. 1.11.D |
| L_{α} (I ou II) | phase lamellaire fluide | Fig. 1.10.B |
| H (I ou II) | phase hexagonale | Fig. 1.13 |
| Q | phase cubique | Fig. 1.14 |

Tableau 1.2 : les phases généralement rencontrées pour les lipides et les figures correspondantes.

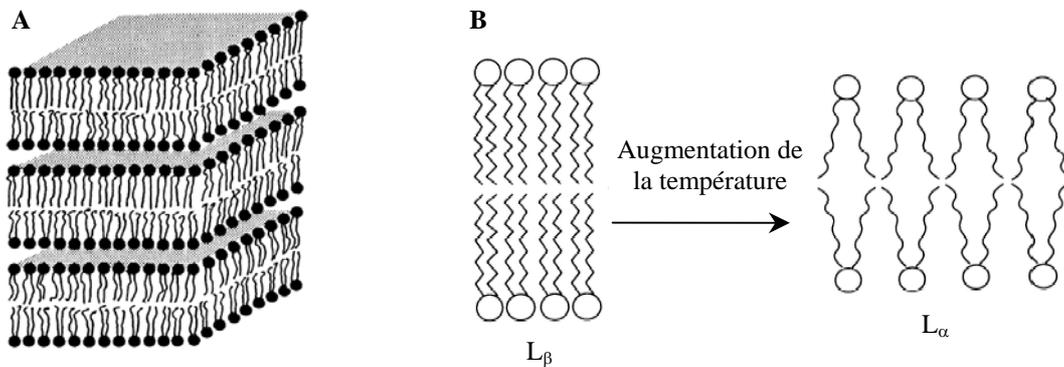


Figure 1.10 : A : structure d'une phase lamellaire, B : transition entre les phases lamellaires gel et fluide [7].

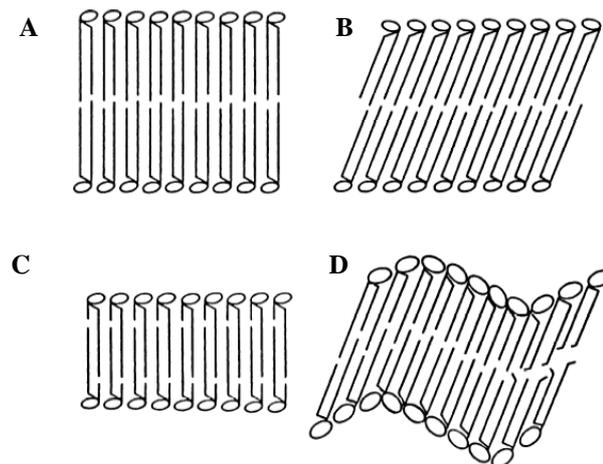


Figure 1.11 : structures gel lamellaire, A : L_{β} gel lamellaire droit [8], B : $L_{\beta'}$ gel lamellaire incliné [8], C : $L_{\beta I}$ gel lamellaire interpénétré [9], D : $P_{\beta'}$ gel lamellaire ondulé [8].

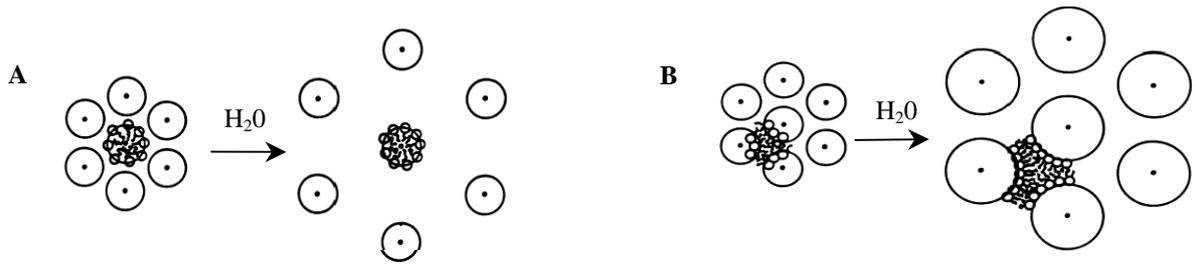


Figure 1.12 : gonflement des phases H sous l'influence d'un excès d'eau, A : phase hexagonale directe H_I , B : phase hexagonale inverse H_{II} , à partir d'une certaine proportion d'eau, la phase H_{II} ne peut plus gonfler, d'après [10].

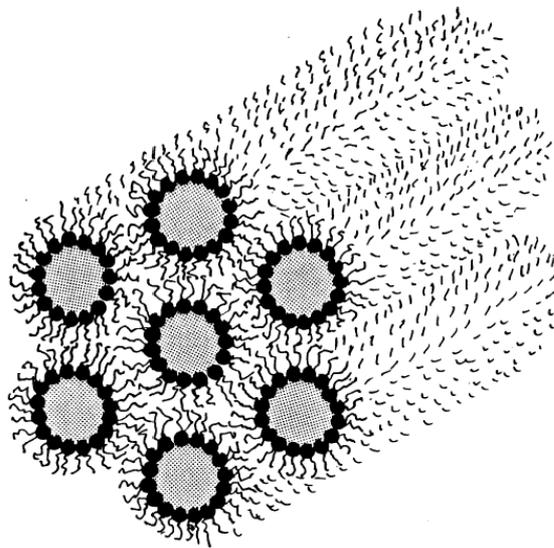


Figure 1.13 : structure détaillée de la phase hexagonale inverse H_{II} [11].

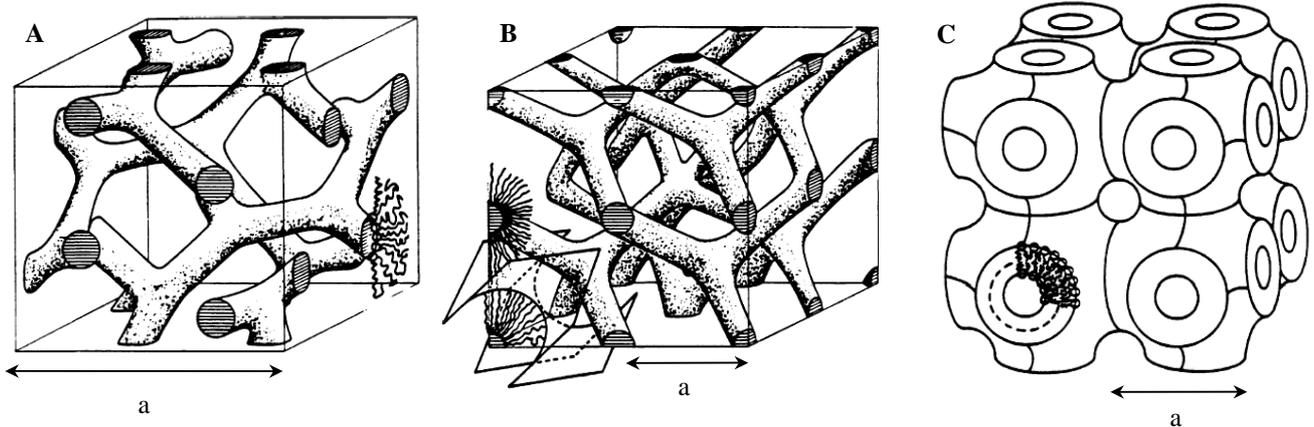


Figure 1.14 : structures cubiques [12], a représente le paramètre de maille. A : $Ia3d (Q^{230})$, B : $Pn3m (Q^{224})$, C : $Im3m (Q^{229})$.

II – Les protéines

Les protéines sont des macromolécules naturelles formées par un enchaînement ordonné d'acides α -aminés codé par le génome et dont le nombre de résidus est parfaitement défini à la différence des polymères. En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient plus de 100 acides aminés, bien que la notion de repliement entre également en compte (les thionines avec 50 acides aminées sont des protéines car elles possèdent un repliement induisant une forme tridimensionnelle). Dans le cas contraire, on parle de peptides et de polypeptides. On exprime parfois la masse molaire des polypeptides ou des protéines en Dalton (1 Da = 1 g/mol).

II.1 – Les acides aminés

Un α -aminoacide est constitué d'un atome de carbone central, appelé carbone α , lié à un groupe amine primaire, un groupe acide carboxylique, un atome d'hydrogène et un groupe R caractéristique appelé chaîne latérale (figure 1.15.A). Les aminoacides en solution à pH neutre se trouvent essentiellement sous forme de molécules dipolaires, ou zwitterioniques, le groupe amine étant protoné (NH_3^+) et le groupe carboxyle déprotoné (COO^-) (figure 1.15.B).



Figure 1.15 : formule chimique d'un acide aminé. A : forme non dissociée. B : forme zwitterionique.

On dénombre environ 500 acides aminés connus mais seuls 20 participent à la synthèse des protéines naturelles. Parmi eux, le corps humain en synthétise 12, les 8 autres, appelés acides aminés essentiels, sont apportés par l'alimentation. Les 20 acides aminés constituant des protéines sont classés dans le tableau 1.3 en fonction des propriétés physico-chimiques de la chaîne latérale, et dans le tableau 1.4, en fonction de leur hydrophobie selon l'échelle d'Eisenberg et al [13]. Avec quatre groupes différents connectés à l'atome de carbone α tétraédrique, les acides α -aminés sont des molécules chirales, à l'exception de la glycine. Seuls les aminoacides L (projection de Fischer) sont des constituants des protéines (configuration absolue S). Aucune explication satisfaisante n'a été proposée concernant cette

observation. Il semble plausible que la sélection de L par rapport à D ait été arbitraire, mais qu'une fois faite, elle soit demeurée constante très tôt dans l'histoire de l'Evolution [1].

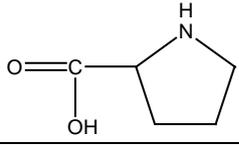
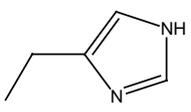
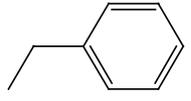
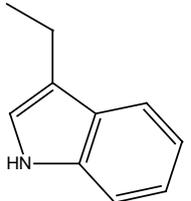
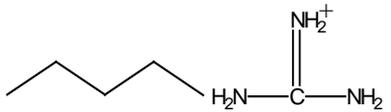
| Caractère de la chaîne | Acide Aminé | Symbole | | Chaînes latérale R |
|------------------------|----------------|---------|---|---|
| Aliphatique | Glycine | Gly | G | H |
| | Alanine | Ala | A | CH ₃ |
| | Valine* | Val | V | CH(CH ₃) ₂ |
| | Leucine* | Leu | L | CH ₂ -CH(CH ₃) ₂ |
| | Isoleucine*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

Tableau 1.3 : les 20 acides aminés constituant des protéines. * : acides aminés essentiels, d'après [14]. † : on présente ici la formule entière de la proline car cet acide aminé diffère des autres par le fait que la chaîne latérale est liée à la fois à l'atome d'azote et à l'atome de carbone.

| Résidus | Symbole | Indice |
|---------------|---------|--------|
| Arginine | R | -1.8 |
| Lysine | K | -1.1 |
| Aspartate | D | -0.72 |
| Glutamine | Q | -0.69 |
| Asparagine | N | -0.64 |
| Glutamate | E | -0.62 |
| Histidine | H | -0.4 |
| Sérine | S | -0.26 |
| Thréonine | T | -0.18 |
| Proline | P | -0.07 |
| Tyrosine | Y | 0.02 |
| Cystéine | C | 0.04 |
| Glycine | G | 0.16 |
| Alanine | A | 0.25 |
| Méthionine | M | 0.26 |
| Tryptophane | W | 0.37 |
| Leucine | L | 0.53 |
| Valine | V | 0.54 |
| Phénylalanine | F | 0.61 |
| Isoleucine | I | 0.73 |

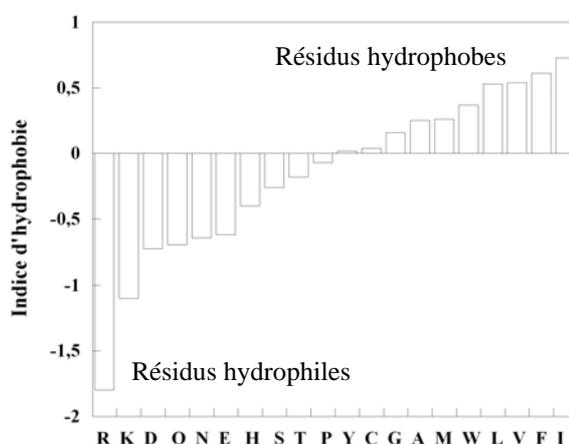


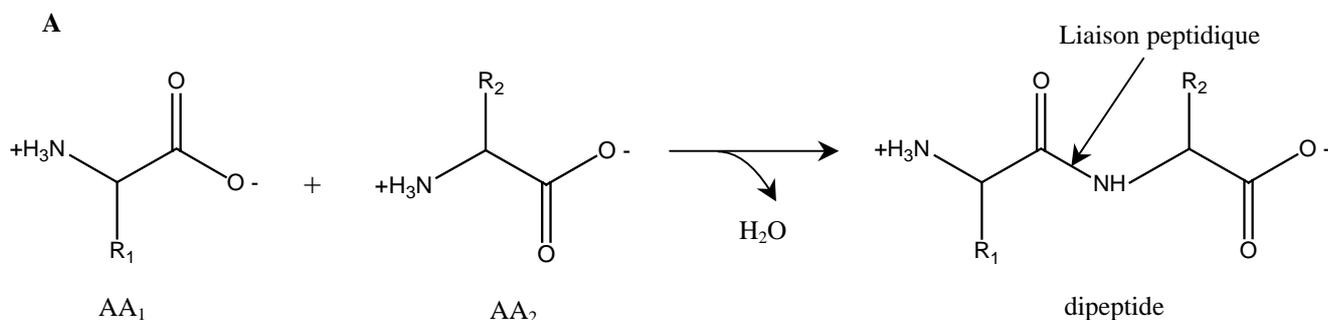
Tableau 1.4 : classement des acides α -aminés selon l'échelle d'hydrophobie d'Eisenberg [13].

II.2 – Structure des protéines

On distingue plusieurs niveaux d'organisation des protéines : la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire. Nous allons les décrire brièvement.

II.2.1 – Structure primaire

La structure primaire, ou séquence, d'une protéine correspond à la succession linéaire des acides aminés (ou résidus) la constituant. Plus précisément, les protéines sont des polymères linéaires formés par l'union du groupe α -carboxyle d'un aminoacide au groupe α -amine d'un autre aminoacide par une liaison peptidique. La formation d'un dipeptide à partir de deux acides aminés s'accompagne de la perte d'une molécule d'eau (figure 1.16).



Légende page suivante

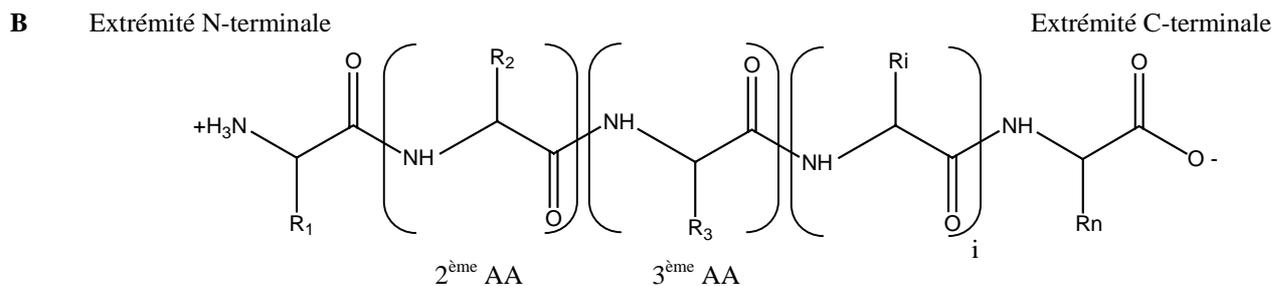


Figure 1.16 : mise en évidence d'une liaison peptidique. A : formation d'un dipeptide à partir de deux acides aminés ; B : obtention d'une chaîne polypeptidique.

Une chaîne polypeptidique a une polarité due à des extrémités différentes : un groupe α -amine à une extrémité et un groupe α -carboxyle à l'autre. Par convention, l'amine terminale (N-terminal) est prise comme origine de la chaîne polypeptidique et la séquence d'acides aminés est alors écrite à partir de ce résidu. Ainsi, dans le pentapeptide Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (YGGFL), la tyrosine est le résidu N-terminal et la leucine est le résidu C-terminal. Le peptide LFGGY sera un peptide distinct et aura ainsi des propriétés chimiques différentes.

II.2.2 – Structure secondaire

Le squelette polypeptidique précédemment décrit est riche en liaisons hydrogène potentielles. Chaque résidu contient un groupe carbonyle, bon accepteur de liaisons hydrogène et, à l'exception de la proline, un groupe NH, qui est un bon donneur de liaisons hydrogène. Ces groupes entrent en interaction les uns avec les autres ainsi qu'avec les groupes fonctionnels des chaînes latérales (cycles aromatiques, indoles) pour stabiliser des structures particulières. En 1951, deux structures périodiques sont proposées : l'hélice α et le feuillet β [15]. Par la suite le coude β et la boucle Ω ont été identifiées. Bien que non périodiques, ces structures courantes sont bien définies et contribuent, avec les hélices α et les feuillets β , à la formation de la structure finale de la protéine.

Dans une structure en hélice α (figure 1.17), la chaîne polypeptidique principale est étroitement enroulée pour former la partie interne de l'hélice tandis que les chaînes latérales se disposent à l'extérieur en un arrangement hélicoïdal. L'hélice a une forme de bâtonnet et est stabilisée par la formation de liaisons hydrogène entre les groupes CO des résidus n et les groupes NH des résidus $n + 4$. Chaque résidu est disposé par rapport au suivant selon une translation de 1.5 Å le long de l'axe de l'hélice et une rotation de 100°. Ainsi, on compte 3.6 résidus aminoacides par tour d'hélice. Les hélices α formées d'un seul brin font généralement moins de 45 Å de long.

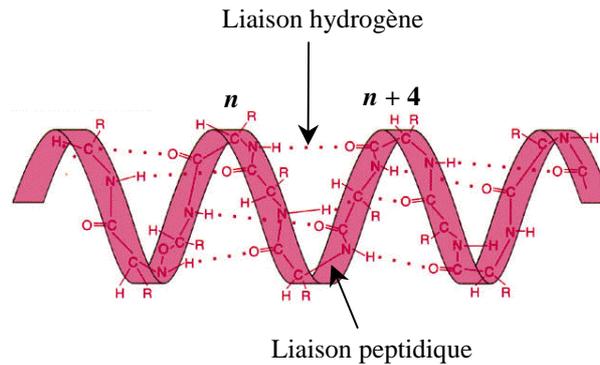


Figure 1.17 : modèle éclaté d'une hélice α .

Il existe également d'autres types de structure en hélice chez les protéines telles que l'hélice 3_{10} qui possède trois résidus par tour ou des super hélices dont nous ne parlerons pas ici.

La chaîne polypeptidique d'un feuillet β , appelé brin β , est presque totalement étirée, et il n'y a pas d'enroulement comme dans l'hélice α . La distance entre les aminoacides adjacents le long d'un brin β est approximativement de 3.5 Å comme le long d'une hélice. Les chaînes latérales des aminoacides adjacents pointent dans des directions opposées. Un feuillet β est constitué par l'union de deux ou plusieurs brins β par des liaisons hydrogène. Les chaînes adjacentes d'un feuillet β peuvent être de même sens (parallèle) ou de sens opposé (anti-parallèle). Dans l'arrangement anti-parallèle, les groupes NH et CO de chaque aminoacide sont respectivement unis par des liaisons hydrogène aux groupes CO et NH d'un partenaire de la chaîne adjacente. Dans l'arrangement parallèle, la disposition des liaisons hydrogène est plus compliquée. Pour chaque aminoacide, le groupe NH est lié au groupe CO d'un aminoacide du brin adjacent, tandis que le groupe CO est uni par liaison hydrogène au groupe NH de l'acide situé deux résidus plus loin dans la chaîne. Dans les représentations schématiques, les brins β sont habituellement représentés par de larges flèches pointant dans la direction de l'extrémité C-terminale pour indiquer le type de feuillet formé, parallèle ou anti-parallèle (figure 1.18).

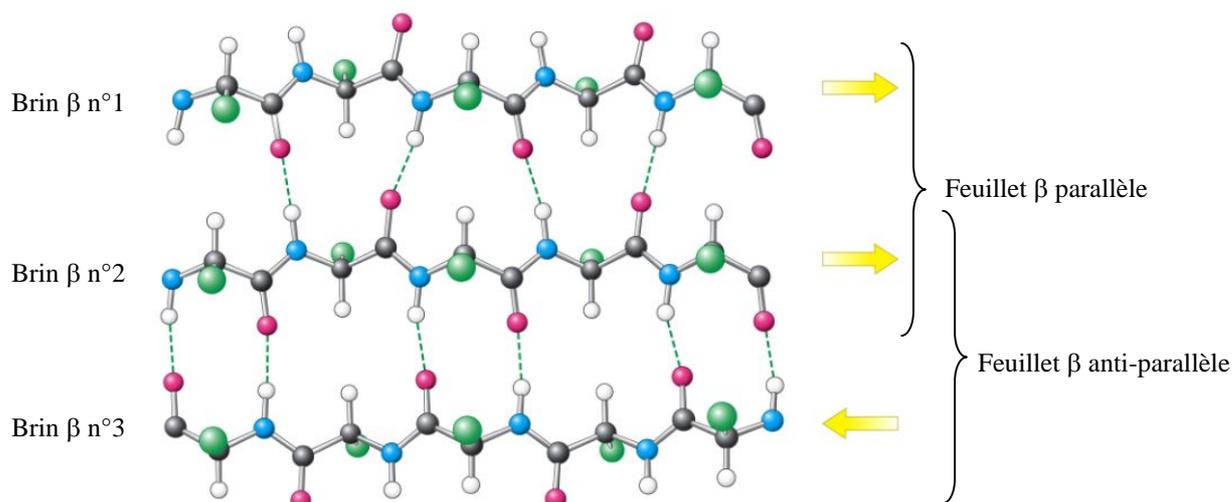


Figure 1.18 : structure d'un feuillet β mixte formé par l'assemblage d'un feuillet β parallèle (formé entre les brins n°1 et 2) et d'un feuillet β anti-parallèle (formé entre les brins n°2 et 3). La représentation schématique en forme de flèche est ajoutée au schéma.

II.2.3 – Structure tertiaire

La structure tertiaire d'une protéine correspond au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace. On parle plus couramment de structure tridimensionnelle. La structure tertiaire est intimement liée à sa fonction et elle dépend de la structure primaire et de l'environnement dans lequel se trouve la protéine. De nombreux facteurs contribuent à moduler la conformation de la protéine : solvant, force ionique, viscosité, concentration. Ainsi, les protéines solubles en milieu aqueux et les protéines membranaires auront des conformations différentes. La tendance thermodynamique conduit les groupes non polaires à éviter la phase aqueuse et les groupes polaires à rester en contact avec le solvant. Il se forme ainsi, dans le cas des protéines solubles, une sorte de noyau hydrophobe à l'intérieur de la molécule protéique, tandis que les groupes polaires sont en majorité à la surface. C'est ce que l'on appelle l'effet hydrophobe.

Un exemple de structure tridimensionnelle de protéine est présenté à la figure 1.19. Il s'agit d'une protéine de transfert de lipides du blé : la ns-LTP (non specific Lipid Transfert Protein). Cette protéine comporte 90 résidus et la structure tridimensionnelle a été résolue à partir de données de RMN [16]. Nous reviendrons à cette protéine lorsque nous aborderons le paragraphe sur les puuroindolines.

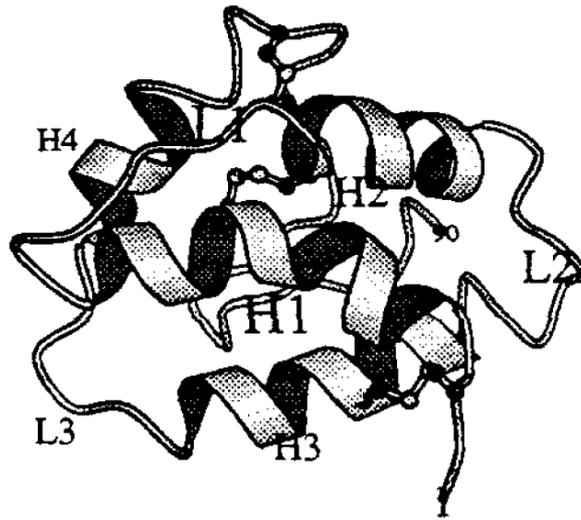


Figure 1.19 : structure tridimensionnelle des ns-LTP du blé, d'après [16]. Les lettres H et L désignent les hélices et les boucles, respectivement.

II.2.4 – Structure quaternaire

Dans le cas des complexes protéiques résultant de l'association de deux ou plusieurs structures tertiaires, la structure quaternaire désigne l'arrangement et le regroupement dans l'espace des différentes chaînes polypeptidiques. C'est le cas par exemple de l'hémoglobine constituée de quatre chaînes protéiques, de même structure tertiaire.

III – Le grain de blé

Le blé est la principale ressource alimentaire de l'humanité : il assure 15% de ses besoins énergétiques. Sa production annuelle représente 30% de la production totale de céréales, devant le maïs et le riz. On comprend les enjeux politiques et économiques qui sous-tendent la production et la commercialisation de cette céréale, quand on sait qu'elle représente à elle seule 17% des échanges internationaux de produits agricoles. Le blé, et la farine ou les semoules qui en sont extraites, se prêtent aujourd'hui à la fabrication industrielle ou artisanale d'un nombre extraordinairement diversifié d'aliments : pains, galettes, couscous, pâtes alimentaires, biscuits, pour ne citer que les plus connus. Le blé doit cette diversité d'usage à la capacité des protéines qu'il contient à former en présence d'eau un réseau viscoélastique, le gluten. Selon les propriétés de ce réseau protéique et des interactions qui se mettent en place avec l'amidon, certains blés seront particulièrement aptes à la fabrication du pain ou des biscuits (blés tendres) ; d'autres conviendront mieux à la fabrication de pâtes alimentaires (blés durs).

Le blé est une plante monocotylédone (l'embryon de blé contient une unique feuille rudimentaire appelée cotylédon) qui appartient au genre *Triticum* de la famille des *Gramineae*. C'est une céréale dont le grain est un fruit sec appelé caryopse et constitué d'une graine et de téguments. Les deux espèces les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) mais il existe de nombreuses autres espèces de *Triticum* qui se différencient par leur degré de ploïdie. La ploïdie est le nombre de jeux de chromosomes d'une cellule ou d'un organisme : les blés diploïdes (génomés AA, BB ou DD), tétraploïdes (génomés AABB) et hexaploïdes (génomés AABBDD) contiennent respectivement deux, quatre ou six assortiments de chromosomes semblables. Le blé tendre possède les trois génomes AA, BB et DD constitués chacun de sept paires de chromosomes homologues numérotés de 1 à 7 (A1...A7, B1...B7, D1...D2), soit 42 chromosomes ; le blé dur ne contient que les deux génomes AA et BB et 28 chromosomes [17].

Les blés cultivés sont apparus il y a une dizaine de milliers d'années en Mésopotamie et il n'est pas impossible que nos ancêtres du Néolithique soient arrivés dès cette époque à sélectionner empiriquement certaines espèces possédant plus que d'autres les caractéristiques requises pour satisfaire les besoins des nouveaux agriculteurs : maturation des épis et des grains à peu près synchrones, attachement ferme des grains à l'épi, germination non étalée dans le temps, grains gros et bien remplis. Cette sélection se poursuivra jusqu'à ce que Mendel, en 1865, jette les bases de la génétique moderne. Depuis, les caractéristiques agronomiques (rendement à l'hectare, résistance aux maladies) et technologiques (aptitudes à la panification des farines) des nouvelles variétés n'ont cessé de s'améliorer.

III.1 – Morphologie du grain de blé

Le développement des tissus dans le grain de blé a été décrit par Simmonds et O'Brien [18]. Avant la fécondation, l'ovule se compose du sac embryonnaire entouré par le nucelle et son épiderme. Lors de la fécondation, les deux noyaux haploïdes d'un grain de pollen entrent dans le sac embryonnaire et fusionnent, pour l'un avec le noyau de la cellule œuf et pour l'autre avec les deux noyaux polaires de la cellule centrale. Deux tissus, l'un diploïde, le zygote, l'autre triploïde, l'albumen, vont ainsi se développer. L'albumen est rapidement différencié en deux tissus, les cellules internes deviennent de grandes cellules contenant de l'amidon et des protéines et constituent l'albumen amylicé alors que les cellules externes donnent naissance à la couche à aleurone. La maturation des grains dure de 45 à 50 jours après la fécondation [18]. A partir du 35^{ème} jour, le grain se trouve en phase de dessiccation.

La structure du grain de blé est un aspect important à prendre en considération tant du point de vue de sa production que de son utilisation. Au cours de la mouture, le grain de blé est séparé mécaniquement en composés variés et cette séparation dépend de la structure de la graine. Le grain de blé est composé de trois parties distinctes (figure 1.20) :

- l'albumen, constitué de l'albumen amylicé et de la couche à aleurone (80 à 85 % du grain). L'albumen amylicé est constitué de cellules remplies de granules d'amidon dispersés au milieu d'une matrice protéique ;
- le péricarpe constitué par les enveloppes de la graine et du fruit (13 à 17 %) qui sont formées de six tissus différents : épiderme du nucelle, tégument séminal (enveloppe de la graine), cellules tubulaires, cellules croisées, mésocarpe et épicarpe ;
- le germe (3%) composé d'un embryon et du scutellum.

La longueur du grain est comprise entre 5 et 8 mm, sa largeur entre 2 et 4 mm, son poids entre 20 et 50 mg et sa densité entre 1.3 et 1.4.

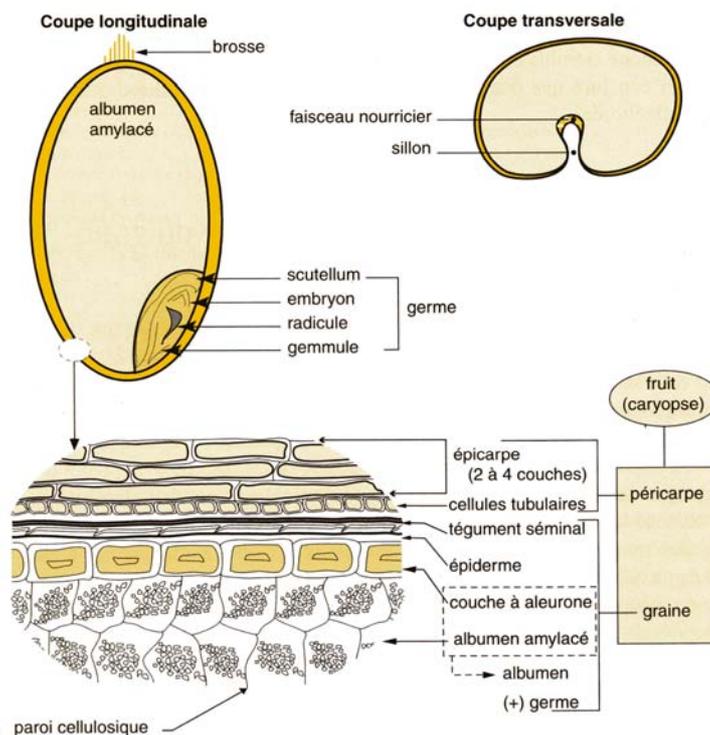


Figure 1.20 : coupe d'un grain de blé, d'après [17].

Le grain est principalement constitué d'amidon (~ 70 %), de protéines (10 à 15 % selon les variétés de culture) et de « pentosanes » (polysaccharides pariétaux composant les enveloppes du grain et la paroi des cellules du grain) (8 à 10 %) ; les autres constituants, pondéralement mineurs (quelques %), sont les lipides, la cellulose, les sucres libres, les minéraux et les vitamines.

III.2 – Les lipides du grain de blé

III.2.1 – Composition lipidique du grain de blé

Les lipides du blé qui représentent environ 2 % du poids sec du grain [19], possèdent une grande diversité structurale. Plus de 1000 espèces moléculaires différentes sont présentes dans le grain de blé si l'on considère la combinaison des têtes polaires et des acides gras. Les lipides sont inégalement distribués dans le grain de blé, les données les plus complètes sur la composition en lipides ont été fournies par Hargin et Morrison [20]. Ainsi, dans la couche à aleurone et l'embryon, plus de 70% des lipides sont des lipides non polaires, principalement des triglycérides. Plus de 70% des lipides de l'albumen amylicé sont polaires, essentiellement des glycolipides (GL) et des phospholipides (PL). Les PL sont composés majoritairement par la phosphatidyléthanolamine (PE), le N-acyl phosphatidyléthanolamine (NAPE), le N-acyl lysophosphatidyléthanolamine (NALPE), la phosphatidylcholine (PC), le phosphatidylinositol (PI) et les lysophospholipides (LPL). Les GL contiennent principalement du monogalactosyl diglycéride (MGDG) et du digalactosyl diglycéride (DGDG). Les composés mineurs des GL sont le monogalactosyl monoglycéride (MGMG) et de digalactosyl monoglycéride (DGMG).

Les lipides ne sont pas distribués au hasard dans les différents tissus mais sont présents pour assurer la formation des membranes des organelles et des cellules. Cette distribution spatiale est le fruit des événements qui se produisent au cours de la différenciation cellulaire conduisant au grain de blé mûr. Celle-ci implique à la fois des interactions entre les lipides et des interactions contractées entre les protéines et les lipides. Les triglycérides présents dans l'embryon et la couche à aleurone sont stockés sous la forme de corps lipidiques constitués d'une gouttelette lipidique entourée d'une monocouche de lipides polaires (PL et GL) et de protéines [21].

La farine contient environ 80% des lipides de l'albumen qui est constitué de granules d'amidon dispersés dans une matrice protéique. Ces lipides peuvent être classés en deux groupes distincts. Une première partie, très peu réactive en l'état, est localisée à l'intérieur des granules d'amidon sous forme de complexes d'inclusion entre l'amylose et des lipides monoacylés, la LPC notamment. L'autre partie des lipides est dispersée au sein de l'albumen (dans la matrice) et peuvent ainsi réagir avec les autres constituants de la farine ; ils sont totalement acylés (triglycérides, MGDG et DGDG). Nous avons focalisé notre attention sur les galactolipides MGDG et DGDG qui constituent l'enveloppe des granules d'amidon car ils

seraient associés à des protéines spécifiques, dont les puroindolines, et cette association pourrait déterminer le caractère friable ou résistant des variétés de blé.

III.2.2 – Rôle des lipides en panification

Bien que leur teneur dans les farines n'excède pas 2 à 3 %, les lipides jouent un rôle important en panification, du moins ceux qui ne sont pas contenus dans les granules d'amidon. On attribue à deux phénomènes physico-chimiques distincts leur mode d'action au cours du pétrissage :

- l'oxydation des acides gras poly-insaturés, catalysés par la lipoxygénase (enzyme), qui provoque un réarrangement des liaisons disulfure au sein du réseau protéique ;
- des interactions entre les lipides et les protéines à l'interface eau/air.

Le premier des phénomènes agit sur les propriétés rhéologiques de la pâte à pain, le second sur la formation et la stabilité des alvéoles de gaz dans la pâte. Selon ce second mécanisme, les lipides polaires (GL et PL) stabilisent les alvéoles gazeuses de la pâte et améliorent le volume du pain, alors que les lipides non polaires (triglycérides) exercent un effet négatif. Très bon agent moussant, les glycolipides et phospholipides très polaires contribueraient à l'accroissement du volume du pain. Les composés de polarité intermédiaire auraient, à l'inverse, un pouvoir anti-moussant [22].

Certaines protéines de faible poids moléculaire, telles que les protéines de transfert de lipides ou les puroindolines, seraient fortement impliquées dans l'ensemble de ces mécanismes, en particulier lors de la mobilisation des lipides contenues dans des vésicules dispersées au sein de la pâte vers les interfaces qui se forment entre l'air et l'eau au cours de la formation d'alvéoles de gaz dans la pâte et dans la mie [17].

III.2.3 – Les galactolipides MGDG et DGDG

Contrairement aux cellules animales, les glycolipides sont les lipides majeurs des végétaux. Ils se concentrent dans les plastes^{*}, particulièrement dans les chloroplastes, comme le MGDG et le DGDG (figure 1.7). Ces lipides sont localisés dans la membrane du thylacoïde, le système de membrane interne du chloroplaste spécialisé dans la collecte de la lumière. L'équilibre entre les quantités de MGDG et de DGDG a un impact significatif sur la fonction des protéines membranaires du thylacoïde, particulièrement sur celle des complexes de collecte de lumière du photosystème [23]. Ces galactolipides sont aussi impliqués dans le

^{*} le plaste est un organite cellulaire possédant un ADN propre. On distingue 4 types de plastes : les chloroplastes, où a lieu la photosynthèse, contiennent la chlorophylle ; les chromoplastes contiennent un pigment coloré autre que la chlorophylle ; les leucoplastes, sans pigment, et les amyloplast, servent respectivement au stockage des protéines et des granules d'amidon.

ciblage des protéines au/dans le chloroplaste [24], comme dans la génération de lipides signalant des molécules [25, 26]. A cause de l'importance biologique des galactolipides dans l'hétérotrophie* des plantes, beaucoup d'études ont été réalisées sur les propriétés physico-chimiques de ces lipides polaires non usuels. En particulier, le comportement de phase des galactolipides du chloroplaste, i.e leurs propriétés d'empilement en phase liquide-cristalline dans un solvant aqueux, ont été largement examinées. Tandis que DGDG forme des bicouches fluides, i.e des structures lamellaires L_{α} , les molécules de MGDG s'agrègent en des structures de type hexagonale inverse H_{II} [27]. Les lipides ne formant pas de bicouches, tel que le MGDG, pourraient servir à diriger la formation d'empilements lipoprotéiques dans la membrane du thylacoïde [28].

Les galactolipides MGDG et DGDG sont aussi présents dans les organes des plantes non photosynthétiques et sont, par exemple, les lipides majeurs des amyloplastes [29]. Tandis que la plupart des recherches ont été menées dans le but de comprendre le rôle des galactolipides dans l'appareil photosynthétique, très peu de travaux ont été consacrés à ces galactolipides dans les plastes des organes des plantes autotrophes, i.e les graines, les tubercules et les racines. Ainsi, l'étude des galactolipides du blé sera présentée au chapitre 4.

III.3 – Les puroindolines

Les protéines des céréales sont généralement subdivisées en albumines (solubles dans l'eau), globulines (solubles dans les solutions salines) et glutélines (insolubles dans l'eau) [30]. Les puroindolines appartiennent à la famille des protéines fixatrices de lipides que l'on retrouve dans la fraction albumine. Une protéine fixatrice de lipides est une protéine qui est capable de se lier spontanément aux lipides ou agrégats de lipides (structures liquides-cristallines). La recherche de ces protéines dans la farine de blé a débuté avec l'isolement d'un complexe lipoprotéique dans un extrait d'éther de pétrole [31]. Différentes protéines ont été isolées et caractérisées comme les thionines [31], les protéines extraites dans le chloroforme-méthanol (CM-protéines) [32], la ligoline [33] et les protéines S [34, 35]. Plus récemment, en utilisant des tests de fixation de lipides ou de partage de phase dans les détergents non ioniques, d'autres protéines comme les protéines de transfert de lipides (LTP) et les puroindolines ont été caractérisées. La plupart des protéines de blé fixant des lipides qui ont été isolées jusqu'à maintenant présentent des caractéristiques structurales communes comme une faible masse moléculaire, une forte teneur en cystéine et en acides aminés basiques

* hétérotrophie : se dit d'un être vivant qui se nourrit de substances organiques, comme les animaux et les plantes non chlorophylliennes.

ainsi qu'une teneur élevée (plus de 40%) en hélice- α . Nous allons décrire plus en détail les puroindolines.

III.3.1 – Analyse structurale

En 1993, deux isoformes majeures (~13 kDa) sont isolées du grain de blé (*Triticum aestivum*) et appelées puroindolines a et b du grec « puros » signifiant blé et du mot « indoline » faisant référence au noyau indole du tryptophane [36]. L'isoforme a est la plus abondante. Les deux isoformes pin-a (155 A.A) et pin-b (116 A.A) ont des structures primaires présentant 60% d'homologie, avec en particulier, la présence d'un domaine riche en tryptophane (**W**) tronqué pour la pin-b (figure 1.21).

Pin-a DVAGGGGAQQ**C**PVET–KLNS**C**RNYLLDR**C**STMKDFPVT**WR****W****W****K****W****W**KGG**C**Q–ELLGE
 Pin-b EVGGGGGSQQ**C**PQERP**K**LSS**C**KDYVMER**C**FTMKDFPVT**W**P – TK **W****W**KGG**C**EHEVREK

Pin-a **C**C SRLGQMPP**Q****C****R****C**NIIQGSIQGDLGGIFGFQRDRASKVIQEAKNLPP**R****C**NQGPP**C**NIPGT
 Pin-b **C****C**KQLSQ IAP**Q****C****R****C**DSIRRVIQGRLLGGFLGIWRGEVFKQLQRAQSLPS**K****C**NMGAD**C**KFPSG

Figure 1.21 : séquences d'acides aminés des puroindolines obtenues par séquençage automatique des peptides, d'après [36].

Les puroindolines sont cationiques (pHi ~ 11) et font partie de la famille des protéines riches en cystéine (**C**). La structure secondaire des puroindolines présente des similarités avec celle des nsLTP (non specific Lipid Transfer Protein, 9 kDa) ; il a été observé par dichroïsme circulaire et spectroscopie infrarouge qu'elles avaient une quantité similaire et importante d'hélices α [37]. Les deux cystéines qui encadrent le domaine riche en tryptophane forment un pont disulfure tandis que les huit autres sont connectées de la même façon que celles des nsLTP (figure 1.22).

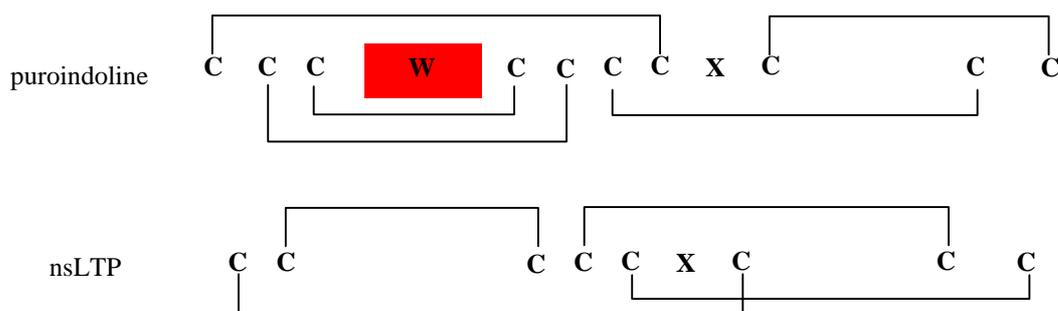


Figure 1.22 : localisation des ponts disulfure de la puroindoline et de la protéine de transfert des lipides de blé.

L'inversion au niveau du motif C-X-C, comparé aux nsLTP, est aussi trouvée chez les protéines qui ne possèdent pas de tunnel hydrophobe comme dans la protéine du soja, HPS [38]. Comme ce motif est trouvé dans la troisième hélice des nsLTP, une simple rotation de cette hélice pourrait conduire à une inversion des cystéines et ainsi induire l'absence ou la présence d'une cavité hydrophobe dans la famille structurale des indolines en général. La structure tertiaire des puroindolines reste inconnue à ce jour, mais elle a probablement des similitudes avec la structure tridimensionnelle des nsLTP (figure 1.19).

III.3.2 – Activités biologiques et interactions avec les membranes

Comme les puroindolines ont été extraites du grain de blé grâce à des agents déstructurant les membranes tels que les détergents non ioniques [36], il a été supposé qu'elles interagissaient avec les lipides. Des recherches sur le sujet ont été réalisées *in vitro* avec des protéines isolées et il a été démontré qu'elles ont besoin de la présence d'une interface. Par exemple, les interactions entre les puroindolines et des phospholipides en solution n'ont été possibles qu'au-dessus de la concentration micellaire critique [39]. En accord avec leur capacité à s'insérer plus ou moins profondément dans les agrégats lipidiques, comme les micelles ou les vésicules, environ 4 à 5 sites d'ancrage lipidique sont observés chez les puroindolines [22, 39, 40]. Comme observé pour les nsLTP, ces protéines basiques interagissent plus fortement avec les lipides anioniques qu'avec les lipides neutres, comme par exemple la phosphatidylcholine [22, 41].

La seule activité biologique qui a été mise en évidence *in vitro* chez les puroindolines est de type antifongique [42]. Comme les nsLTP antimicrobiennes, les propriétés fongicides des puroindolines sont probablement reliées à leurs propriétés de perméabilité des membranes, comme déjà observé sur les neurones [43]. Le domaine riche en tryptophane et leur caractère cationique sont probablement importants pour leur activité antifongique en référence à d'autres peptides antimicrobiens riches en tryptophane [44, 45]. Un effet de synergie des puroindolines sur les propriétés antifongiques des thionines ainsi qu'un rôle antagoniste du calcium sur les propriétés antifongiques des puroindolines ont été reportés [42]. Des études récentes ont aussi démontré que les puroindolines étaient efficaces *in vivo* pour contrôler les infections fongiques (par les champignons). Le riz ne contient normalement aucune indoline. S'il est transformé de manière à exprimer consécutivement les gènes de *pin-a* et/ou *pin-b*, il montre une augmentation significative de la résistance à *Magnaporthe grisea* (diminution de 29 à 54% des symptômes) ainsi qu'à *Rhizoctonia solani* (diminution de 11 à 22% des symptômes), deux parasites qui affectent la qualité et les propriétés du riz [46].

III.3.3 – Autres propriétés

La texture de l'albumen du blé, c'est-à-dire la dureté ou la tendreté, dépend principalement de l'expression d'un gène, nommé le gène de la dureté (*Ha*) et localisé sur le bras court du chromosome 5D [47]. La texture de l'albumen est reliée à la cohésion existant entre les granules d'amidon et la matrice protéique : un blé tendre (dur) est caractérisé par une faible (forte) cohésion, il est donc plus friable (résistant). Grâce à la technique de l'électrophorèse SDS-PAGE, Greenwell et Schofield [48] ont mis en évidence pour la première fois une relation entre la tendreté et la présence de protéines d'environ 15 kDa à la surface des granules d'amidon. Ces protéines ont été nommées friabilines ou GSP (Grain Softness Protein) [49]. Il a été montré que les puroindolines sont les composantes principales de la famille des friabilines/GSP [49-51]. En fait, les puroindolines sont présentes dans la plupart des blés durs ou tendres avec une tendance à des teneurs plus faibles chez les blés durs [52]. En effet, les variétés ne possédant pas de pin-a sont souvent des blés durs ou très durs [52, 53]. Le gène de pin-a est localisé sur le bras court du chromosome 5D à proximité du gène *Ha* (gène de la dureté) [54]. Une variation allélique (i.e. relative aux diverses formes possibles d'un gène) a été observée dans le gène de pin-b menant à un changement entre une glycine (G) et une sérine (S) et il a été montré que cette variation est fortement associée à la dureté des blés [53].

Dans l'albumen du blé, la présence des puroindolines à la surface des granules d'amidon pourrait se faire par l'intermédiaire des lipides [55], en accord avec les fortes interactions avec les lipides polaires du blé [22] et les récentes études de localisation réalisées sur des grains matures de blé [52]. Ainsi, il est très probable que la cohésion entre les granules d'amidon (dont les membranes sont constituées de lipides polaires) et la matrice protéique de l'albumen puisse être due à la formation de complexes lipoprotéiques dans lesquels le rôle des puroindolines reste à être précisé.

Concernant le rôle technologique des puroindolines, notamment en panification, des expériences ont montré leur rôle positif sur des mousses de liqueur de pâte à pain ou sur la texture de la mie de pain. Les figures 1.23 et 1.24 illustrent les propriétés moussantes uniques de la puroindoline-a par comparaison à celles de l'ovalbumine, une protéine du blanc d'œuf.

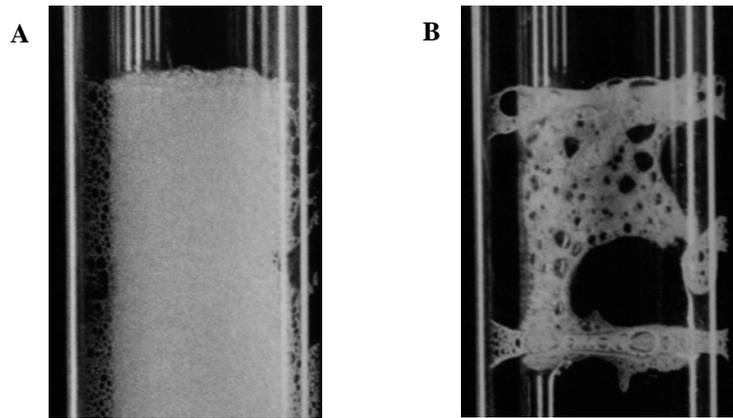


Figure 1.23 : mousses de liqueur de pâte à pain à la fin du bullage contenant 0.2 mg/mL de puroindoline-a (A) et 2 mg/mL d'ovalbumine (B), d'après [52].

D'après la figure 1.23, on constate qu'en présence de puroindoline-a, la mousse formée est beaucoup plus homogène et beaucoup plus stable dans le temps qu'en présence d'ovalbumine. Cette protéine du blanc d'œuf est néanmoins bien connue pour ses fortes propriétés moussantes, on peut citer l'exemple culinaire des blancs en neige. Notons également que la quantité de puroindoline-a ajoutée est dix fois plus faible que celle d'ovalbumine. Le second exemple (figure 1.24) concerne l'alvéolation du pain, critère primordial en panification.

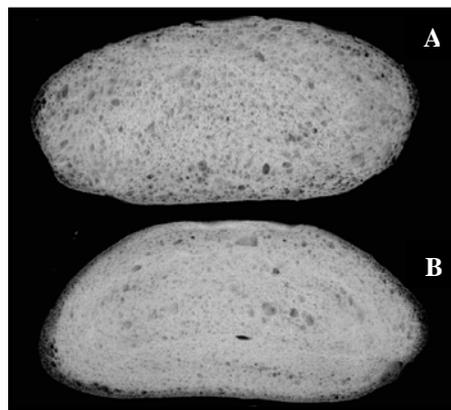


Figure 1.24 : texture de la mie de pain contenant 0.2 mg/mL de puroindoline-a (A) et 2 mg/mL d'ovalbumine (B), d'après [52].

La texture de la mie du pain en présence de puroindoline-a est plus fine et la distribution des bulles d'air est plus homogène qu'avec l'ovalbumine. Ces deux critères sont très importants en ce qui concerne la qualité du pain.

Les deux exemples présentés ici sont particulièrement intéressants. En effet, la pâte à pain contient naturellement des protéines, mais également des lipides. Cela signifie que, même en présence de lipides, la puroindoline est capable de former des mousses stables et homogènes. C'est une propriété remarquable puisque les lipides déstabilisent généralement les mousses de protéine. Ce phénomène s'explique par le fait que les deux composés en présence, protéines et lipides, sont en compétition pour monter à l'interface liquide/air. Les lipides étant fortement amphiphiles, ils ont tendance à exclure les protéines de l'interface ce qui se traduit par une mousse très instable car les lipides tensioactifs forment des films beaucoup moins viscoélastiques que ceux formés par les protéines. Ainsi, les deux exemples présentés ici montrent bien l'intérêt que peut représenter les puroindolines pour les technologies céréalières. De plus, ces observations tendent à se poser une question cruciale : pourquoi une telle synergie en présence de lipides ?

Bibliographie du chapitre 1

1. Stryer, L., J.M. Berg, and J.L. Tymoczko. 2003. Biochimie, 5ème édition. *Edition Médecine-Sciences, Flammarion*. 43.
2. Dervichian, D.G. 1939. Changes of phase and transformations of higher order in monolayers. *J. Chem. Phys.* 7:931-948.
3. Gaines, G.L.J. 1966. In Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. *Prigorine, I., Ed. Interscience. New York, Chapter 6*.
4. Peterson, I.R. and R.M. Kenn. 1994. Equivalence between two-dimensional and three-dimensional phases of aliphatic chain derivatives. *Langmuir*. 10:4645-4650.
5. Davies, J.T. and E.K. Rideal. 1963. Interfacial Phenomena. *Second Edition. Academic Press. New-York and London, Chapter 5*.
6. Cullis, P.R. and B.D. Kruijff. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta*. 559:399-420.
7. Luzzati, V. 1968. X-ray diffraction studies of lipid-water systems. In *Biological Membranes, Vol 1, Ed. E. Chapman (Academic Press, London)*. 71-123.
8. Tardieu, A., V. Luzzati, and F.C. Reman. 1973. Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: a study of lecithin-water phases. *J. Mol. Biol.* 75:711-733.
9. Ranck, J.L., T. Keira, and V. Luzzati. 1977. A novel packing of the hydrocarbon chains in lipids: the low temperature phases of dipalmitoyl phosphatidylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta*. 488:432-441.
10. Seddon, J.M. and R.H. Templer. 1995. Polymorphism of lipid-water systems. In *Structure and Dynamics of Membranes. 2d ed, Vol. 1. R. Lipowsky and E. Sackmann, editors. Elsevier/North Holland, Amsterdam*. 98-160.
11. Seddon, J.M. 1990. Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and non-lamellar transitions of lipids. *Biochim. Biophys. Acta*. 1031:1-69.
12. Mariani, P., V. Luzzati, and H. Delacroix. 1988. Cubic phases of lipid-containing systems. Structure, analysis and biological implications. *J. Mol. Biol.* 204:165-189.
13. Eisenberg, D., R.M. Weiss, and T.C. Terwilliger. 1982. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature*. 299:371-374.
14. Daune, M. 1993. Biophysique Moléculaire, Structures en mouvement. *Interéditions, Paris*.
15. Pauling, L. and R.B. Corey. 1951. Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. *PNAS*. 37:729-740.

16. Gincel, E., J.-P. Simorre, A. Caille, D. Marion, M. Ptak, and F. Vovelle. 1994. Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein: a new folding for lipid carriers. *Eur. J. Biochem. (FEBS)*. 226:413-422.
17. Feillet, P. 2000. Le grain de blé, composition et utilisation. *INRA Editions*. 24.
18. Simmonds, D.H. and T.O. O'Brien. 1981. Morphological and biochemical development of wheat endosperm. *In Advances in cereal science and technology, Ed. Y. Pomeranz, St-Paul, Minesota*. 4:5-70.
19. Pomeranz, Y., C.R. Martin, R. Rousser, D. Brabec, and F.S. Lai. 1988. Wheat hardness determined by single kernel compression instrument with semiautomated feeder. *Cereal Chemistry*. 65:86-94.
20. Hargin, K.D. and W.R. Morrison. 1980. The distribution of acyl lipids in the germ, aleurone, starch and non-starch endosperm of four wheat flour varieties. *J. Sci. Food Agric*. 31:877-888.
21. Murphy, D.J. 1990. Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog. Lipid Res*. 29:299-324.
22. Dubreil, L., J.-P. Compoin, and D. Marion. 1997. Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45:108-116.
23. Pali, T., G. Garab, L.I. Horvath, and Z. Kota. 2003. Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60:1591-1606.
24. Bruce, B.D. 1998. The role of lipids in plastid protein transport. *Plant Molecular Biology*. 38:223-246.
25. Marechal, E., M.A. Block, A.J. Dorne, R. Douce, and J. Joyard. 1997. Lipid synthesis and metabolism in the plastid envelope. *Physiologia Plantarum*. 100:65-77.
26. Montillet, J.L., J.P. Agnel, M. ponchet, F. Vailliau, D. Roby, and C. Triantaphylides. 2002. Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydraperoxydes is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiol. and Biochem*. 40:633-639.
27. Brentel, I., E. Selstam, and G. Lindblom. 1985. Phase equilibria of mixtures of plant galactolipids: the formation of a bicontinuous cubic phase. *Biochim. Biophys. Acta*. 812:816-826.
28. Lee, A.G. 2000. Membrane lipids: it's only a phase. *Current Biology*. 10:377-380.

29. Fishwick, M.J. and A.J. Wright. 1980. Isolation and characterization of amyloplast envelope membranes from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*. 19:55-59.
30. Osborne, T.B. 1907. The proteins of the wheat kernel. *Publ. 84. Carnegie Inst: Washington, DC*.
31. Balls, A.K. and W.S. Hale. 1940. A sulphur bearing constituent of the petroleum ether extract of wheat flour. *Cereal Chem.* 17:243-245.
32. Redman, D.G. and J.A.D. Ewart. 1973. Characterisation of three wheat protein found in chloroform-methanol extract. *J. Sci. Food Agric.* 24:629-636.
33. Frazier, P.J., N.W.R. Daniels, and P.W. Russel-Eggit. 1981. Lipid-protein interaction during dough development. *J. Sci. Food Agric.* 32:877-897.
34. Zawistowska, U., F. Bekes, and W. Bushuk. 1985. Gluten proteins with high affinity to flour lipids. *Cereal Chem.* 62:284-289.
35. Zawistowska, U. and W. Bushuk. 1986. Electrophoretic characterisation of low-molecular weight wheat protein of variable solubility. *J. Sci. Food Agric.* 37:409-417.
36. Blochet, J.-E., C. Chevalier, E. Forest, E. Pebay-Peyroula, M.-F. Gautier, P. Joudrier, M. Pézolet, and D. Marion. 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Letters*. 329:336-340.
37. Le Bihan, T., J.-É. Blochet, A. Désormeaux, D. Marion, and M. Pézolet. 1996. Determination of the secondary structure and conformation of puroindolines by infrared and Raman spectroscopy. *Biochemistry*. 35:12712-12722.
38. Baud, F., E. Pebay-Peyroula, C. Cohen-Addad, S. Odani, and M.S. Lehmann. 1993. Crystal structure of hydrophobic protein from soybean; a member of a new cysteine-rich family. *J. Mol. Biol.* 231:877-887.
39. Husband, F., P.J. Wilde, D. Marion, and D.C. Clark. 1995. A comparison of the foaming and interfacial properties of two related lipid binding proteins from wheat in the presence of a competitive surfactant. *In Food Macromolecules and Colloids. E. Dickinson, and D. Lorient, editors. Royal Society of Chemistry, London, UK.* 285-296.
40. Wilde, P.J., D.C. Clark, and D. Marion. 1993. Influence of competitive adsorption of a lysopalmitoylphosphatidylcholine on the functional properties of puroindoline, a lipid-binding protein isolated from wheat flour. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 41:1570-1576.

41. Le Guernevé, C., M. Seigneuret, and D. Marion. 1998. Interaction of the wheat endosperm lipid-binding protein puroindoline-a with phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 360:179-186.
42. Dubreil, L., T. Gaborit, B. Bouchet, D.J. Gallant, W.F. Broekaert, L. Quillien, and D. Marion. 1998. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Science*. 138:121-135.
43. Mattei, C., K. Elmorjani, J. Molgo, D. Marion, and E. Benoit. 1998. The wheat proteins puroindoline-a and [alpha]1 purothionin induce nodal swelling in myelinated axons. *NeuroReport*. 9:3803-3803.
44. Douliez, J.P., T. Michon, K. Elmorjani, and D. Marion. 2000. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *Journal of Cereal Science*. 32:1-20.
45. Chan, D.I., E.J. Prenner, and H.J. Vogel. 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*. 1758:1184-1202.
46. Krishnamurthy, K., C. Balconi, J.E. Sherwood, and M.J. Giroux. 2001. Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Mol. Plant Microbe Interactions*. 14:1255-1260.
47. Mattern, P.J., R. Morris, J.W. Schmidt, and V.A. Johnson. 1973. Proc. of the IVth International Wheat Genetic Symposium, Columbia, Missouri. 703.
48. Greenwell, P. and J.D. Schofield. 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chem*. 63:379-380.
49. Jolly, C., S. Rahman, A.A. Kortt, and T.J.V. Higgins. 1993. Characterisation of the wheat Mr 15000 " grain-softness protein " and analysis of the relationship between its accumulation in the whole seed and grain softness. *Theor. Appl. Gen.* 86:589-597.
50. Morris, C.F., G.A. Greenblatt, A.D. Bettge, and H.I. Malkawi. 1994. Isolation and characterization of multiple forms of friabilin. *J. Cereal Sci.* 20:167-174.
51. Oda, S. and J.D. Schofield. 1997. Characterisation of friabilin polypeptides. *J. Cereal Sci.* 26:29-36.
52. Dubreil, L., S. Méliande, H. Chiron, J.P. Compoin, L. Quillien, G. Branlard, and D. Marion. 1998. Effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour. *Cereal Chem*. 75:222-229.

53. Giroux, M.J. and C.F. Morris. 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *PNAS*. 95:6262-6266.
54. Sourdille, P., M.R. Perretant, G. Charmet, P. Leroy, M.F. Gautier, P. Joudrier, J.C. Nelson, M.E. Sorrells, and M. Bernard. 1996. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *Theor. Appl. Gen.* 93:580-586.
55. Greenblatt, G.A., A.D. bettge, and C.F. Morris. 1995. Relationship between endosperm texture and the occurrence of friabilin and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chem.* 72:172-176.

CHAPITRE 2

EXTRACTION ET PURIFICATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

I – Purification des puroidolines : isoformes a et b

| | |
|---|----|
| I.1 – Principe général | 43 |
| I.2 – Mode opératoire détaillé | |
| I.2.1 – Extraction dans un tampon à base de Triton X-114..... | 43 |
| I.2.2 – Chromatographie sur résine échangeuse d'ions..... | 44 |
| I.2.3 – Electrophorèse en conditions dénaturantes : SDS-PAGE..... | 45 |
| I.2.4 – Dialyse..... | 47 |
| I.2.5 – Purification par chromatographie HPLC en phase inverse..... | 47 |
| I.2.6 – Spectrométrie de masse : Electrospray Ionisation (ESI)..... | 49 |

II – Purification des galactolipides du blé : MGDG et DGDG.....52

Bibliographie.....55

CHAPITRE 2 EXTRACTION ET PURIFICATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

Ce chapitre est consacré à la description des méthodes de purification des puroindolines, isoformes a et b, et des galactolipides du blé, MGDG et DGDG. L'extraction des protéines se fait grâce à l'utilisation d'un détergent non ionique, le Triton X-114, puis s'ensuivent les étapes de chromatographie sur couches minces et d'électrophorèse SDS-PAGE. La purification est réalisée par HPLC tandis que la spectrométrie de masse permet de s'assurer de la nature des molécules obtenues. L'extraction des lipides est basée sur l'utilisation de solvants apolaires et la purification est effectuée par HPLC.

Les deux étapes de purification des protéines et des lipides ont été des points cruciaux de cette thèse. Elles ont permis d'une part de se rapprocher des systèmes réels par l'utilisation de composés naturels, et d'autre part de travailler avec des produits extrêmement purs. Ces travaux ont été réalisés à l'INRA de Nantes grâce à l'aide précieuse de D. Marion. Les abréviations utilisées dans ce chapitre sont définies à l'annexe 1.

I – Purification des puroindolines : isoformes a et b

I.1 – Principe général

Les puroindolines appartiennent à une nouvelle classe de protéines capables d'interagir spontanément et fortement avec les bicouches lipidiques des membranes en raison de leur structure amphiphile. Ce comportement est similaire à celui des membrano-toxines et dans une certaine mesure à celui de certaines protéines membranaires. Pour isoler spécifiquement les puroindolines à partir de farine de blé, une procédure simple et efficace a été utilisée : le partage de phase dans un détergent non ionique, le Triton X-114. Ce procédé s'inspire de celui utilisé pour isoler les protéines transmembranaires [1, 2]. Les détergents non ioniques, du fait de leur structure amphiphile, sont capables d'entrer en compétition et de remplacer les lipides membranaires naturels. De part leurs propriétés de détergent, ils solubilisent ensuite les protéines en formant des micelles protéine/détergent. Au dessus de 23°C, point de trouble du Triton X-114 (turbidité), l'agrégation des micelles se produit et deux phases se forment : une phase supérieure pauvre en détergent contenant les composés hydro-solubles et une phase inférieure riche en détergent qui contient les protéines membranaires, les puroindolines et les lipides. Ces phases sont facilement séparées par centrifugation à basse vitesse.

I.2 – Mode opératoire

I.2.1 – Extraction dans un tampon à base de Triton X-114

2 kg de grains de blé (*Triticum aestivum*) sont broyés pour obtenir une farine. Celle-ci est mélangée vigoureusement à 7°C avec 5 L de tampon d'extraction dont la composition est la suivante : NaCl 0.2 M, (EDTA + 2 H₂O) 2 mM, TRIS 100 mM pH 7.8 et Triton X-114: 5% en volume. Une première centrifugation du mélange (30 min, 4°C, 7000g) permet d'éliminer le matériel solide et insoluble (amidon, gluten et polysaccharides pariétaux notamment). Le surnageant est récupéré et laissé à décanter à 40°C pendant plusieurs heures. La température de turbidité du Triton X-114 est largement dépassée permettant de séparer le mélange en deux phases. La phase inférieure riche en détergent (contenant les puroindolines) est récupérée puis centrifugée (10 minutes, 30°C, 8000 tr/min), ce qui permet d'améliorer la décantation. On obtient de nouveau deux phases : la phase inférieure est conservée. Elle est traitée à l'acétone à -20°C ce qui fait précipiter les protéines. Les lipides, solubles dans l'acétone, restent en solution.

I.2.2 – Chromatographie sur résine échangeuse d’ions

Le précipité de protéines est récupéré et dissout dans le tampon d’élution A (acétate d’ammonium 50 mM, pH 6). Cette solution est chargée sur la colonne de chromatographie à échange d’ions dont le principe est basé sur les interactions électrostatiques. L’intérieur de la colonne est composé d’une résine porteuse de groupements ionisables (chargés positivement ou négativement) qui, au contact d’autres ions provenant d’une solution, ont la propriété d’échanger de façon réversible certains de leurs ions. Plus précisément, il s’agit d’une résine échangeuse de cations dont le principe est le suivant :

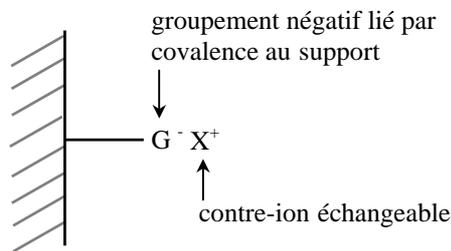
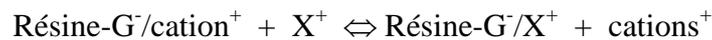


Figure 2.1 : résine échangeuse de cations.

Ce type de chromatographie permet d’effectuer une première séparation des protéines basée sur une différence d’affinité pour les billes de résine (billes de Sépharose, dextrane) sur lesquelles sont greffés des groupes sulfopropyles : $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$ (groupe G⁻). Le contre ion échangeable (X⁺) est l’ion Na⁺. A pH 6, les puroidolines sont chargées positivement (pHi ~ 11) et s’accrochent sur la colonne. On fait ensuite passer le tampon B (tampon A + gradient NaCl 0.7 M) dans la colonne. Les ions Na⁺ remplacent alors les puroidolines (et autres protéines) qui se décrochent de la colonne et sont ainsi récupérées. La collecte des différentes fractions est automatique et se fait par volume de 30 mL dans des tubes numérotés. Le débit d’élution étant fixé à 20 mL/min, on retrouve aisément les tubes qui ont récolté les fractions d’intérêt.

La détection se fait par une mesure de densité optique à $\lambda = 280$ nm (maximum d’absorption des tryptophanes et des tyrosines). Un profil d’élution type est présenté à la figure 2.2.

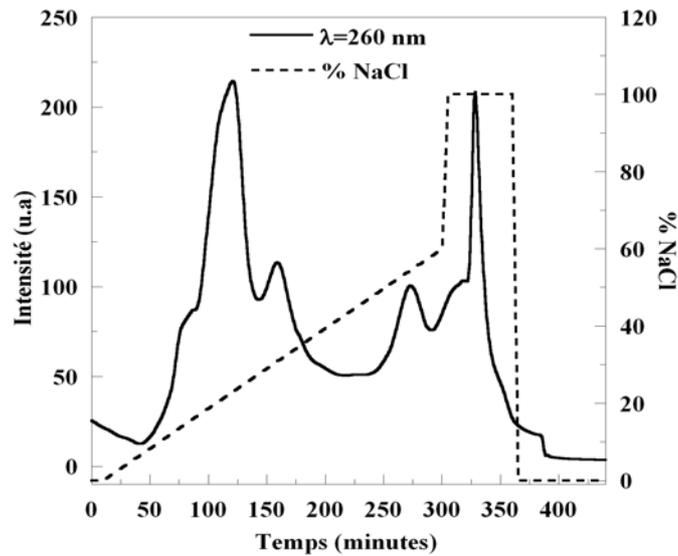


Figure 2.2 : profil de chromatographie sur résine échangeuse d'ions des protéines de faible poids moléculaire après partition de phase dans le Triton X-114.

I.2.3 – Electrophorèse en conditions dénaturantes : SDS-PAGE

Après cette première séparation, il faut identifier les fractions éluées contenant les protéines d'intérêt. Ceci est réalisé par électrophorèse de type SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis). Cette technique de séparation consiste à faire migrer les protéines dans un gel sous l'effet d'un courant électrique. Pour la préparation des échantillons, on prélève 30 μ L de fraction protéique dans les tubes de chromatographie (récoltés lors de l'étape précédente) auxquels on ajoute 20 μ L de tampon de solubilisation à base de SDS (annexe1) et 3 μ L de β -mercaptoéthanol.

Dans ces conditions, les protéines sont dénaturées par la rupture des liaisons faibles (SDS) et par la rupture des ponts disulfure (β -mercaptoéthanol). Le rôle du SDS est alors d'entourer de charges négatives les protéines pour qu'elles aient toutes la même densité de charge. Ainsi, seule la taille des protéines va intervenir dans le processus de migration ce qui va permettre de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire. Dans une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (figure 2.3), on utilise deux sortes de gel : le gel de concentration a un faible degré de réticulation (peu dense) ce qui permet aux protéines de se concentrer à la frontière entre les deux gels. Le gel de séparation est très dense (fort degré de réticulation). Il va ainsi ralentir plus ou moins les protéines suivant leur poids moléculaire et donc permettre leur séparation. La composition de ces deux gels est donnée en annexe 1.

Expérimentalement, on monte sur un support deux plaques de verre entre lesquelles seront coulés les gels, leur écartement (1 mm) est assuré par des espaceurs latéraux. Le gel de séparation est ensuite déposé entre les plaques et l'on ajoute au-dessus une fine couche d'un

mélange EtOH/H₂O pour éviter le contact avec l'oxygène de l'air et pour favoriser la polymérisation du gel (surface plane). On laisse ainsi polymériser pendant 15 minutes, puis l'on coule le gel de concentration au dessus du gel précédent après avoir retiré la fine couche d'EtOH/H₂O. On ajoute enfin le peigne permettant de former les puits (dans notre cas, 12 puits) et on laisse polymériser pendant 30 min. Le peigne est enlevé et les plaques de gel sont placées dans une cellule électrophorétique remplie de tampon de migration (annexe 1) en évitant les bulles d'air (risque de court-circuit).

Les échantillons (16 µL) sont chargés dans les puits en gardant un puits référence (mélange contenant des protéines de masses moléculaires connues). On réalise alors la migration jusqu'au bas du gel dans les conditions suivantes :

- gel de concentration : 30 minutes à 20 mA,
- gel de séparation : 1 heure à 40 mA.

Lorsque la migration est terminée, les gels sont démoulés puis colorés avec une solution à base de bleu de coomassie pendant 30 minutes. Ce colorant va se fixer de façon non covalente aux protéines. Puis, les gels sont décolorés pendant une nuit sous agitation latérale : la solution décolorante décoloré les gels mais pas les protéines (annexe 1). Les gels sont finalement séchés ; le profil obtenu est présenté à la figure 2.3.

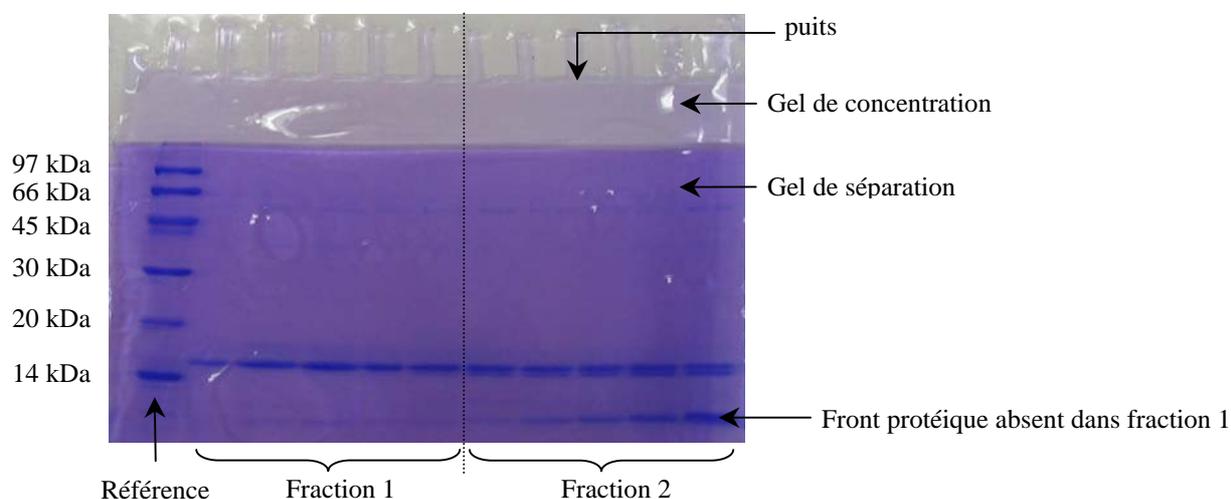


Figure 2.3 : résultats de l'électrophorèse réalisée sur les fractions protéiques issues de la chromatographie sur résine échangeuse d'ions. On ajoute à gauche de la figure les poids moléculaire des protéines contenues dans le puits référence.

Les résultats obtenus permettent de séparer clairement les tubes de chromatographie en deux fractions principales. Les tubes allant du n° 160 à 186 seront mis en commun pour former la fraction 1 et les tubes allant du n° 187 à 234 composeront la fraction 2. Sur la figure 2.3, on remarque qu'un front protéique est absent de la fraction 1. Par comparaison avec le

puits référence, ce front correspond à des protéines de poids moléculaire inférieur à 14 kDa. Ainsi, on s'intéressera désormais à la fraction 2 qui contient les puroidolines et les puorhionines.

I.2.4 – Dialyse

Lors de la chromatographie sur résine échangeuse d'ions, une quantité importante de sel est nécessaire pour décrocher les protéines de la colonne. L'étape de dialyse permet d'éliminer ce sel par diffusion à travers une membrane poreuse. On utilise pour cela des boudins en cellulose régénérée (plus flexible et plus amorphe que la cellulose native) calibrés en fonction du poids moléculaire des molécules (seuil de coupure 3 kDa). La solution protéique (fraction 2) est introduite dans le boudin puis celui-ci est plongé dans un grand bac d'eau déionisée. On laisse la diffusion s'établir pendant toute une nuit. Seules les molécules de poids moléculaire inférieur à 3 kDa sont éliminées. Les puroidolines (~13 kDa) et les puorhionines (~5 kDa) restent dans le boudin. Une mesure de conductivité permet de vérifier que tout le sel a bien été éliminé (à $T = 21.5^{\circ}\text{C}$, $\sigma_{\text{eau}} = 1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Après dialyse, les solutions sont congelées et lyophilisées. On récupère environ 500 mg de protéines.

I.2.5 – Purification par chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) en phase inverse

Cette étape va permettre de séparer très précisément les différentes protéines obtenues après chromatographie d'échange d'ions. On va séparer les puorhionines et les deux isoformes des puroidolines, pin-a et pin-b. Ce type de chromatographie est basé sur les interactions hydrophobes et consiste à faire circuler un fluide (phase mobile) dans une colonne contenant une phase stationnaire. La colonne est composée de billes de silice sur lesquelles sont greffées des chaînes carbonées linéaires de 18 carbones. Les composés sont élués en fonction de leur hydrophobie croissante. Pour cela on utilise un gradient d'éluion en diminuant, au cours de la séparation, la polarité de l'éluant. Dans notre cas, comme pour la plupart des protéines, on commence avec de l'eau et on augmente la concentration en acétonitrile au fur et à mesure de la séparation. Avant de commencer la purification, la colonne est équilibrée pendant quelques heures avec le tampon d'éluion A : $\text{H}_2\text{O} + \text{TFA}$ 0.06%. L'ajout de TFA permet de travailler à un pH acide (pH ~ 2) pour lequel les puroidolines sont chargées positivement et leur hydrophobie est maximum. La colonne est chauffée à 50°C ce qui permet d'augmenter les interactions hydrophobes entre la colonne et

les puroindolines par diminution de la force des liaisons hydrogène. La pin-b étant plus hydrophobe que la pin-a, on peut ainsi séparer les deux isoformes.

La protéine lyophilisée est dissoute dans le tampon A à une concentration de 20 mg/mL, puis 1 mL de cette solution est injecté dans la colonne. Le débit d'élution est fixé à 3 mL/min. Au départ, on travaille avec 75% de tampon A et 25% de tampon B (acétonitrile + TFA 0.04%) puis un gradient d'élution programmé permet de diminuer le pourcentage de tampon A au profit du tampon B. A la fin de la séparation, on atteint : 40% de tampon A et 60% de B. En sortie, un détecteur mesure l'absorption de la lumière par le composé sorti de la colonne. Il opère à deux longueurs d'onde constantes: $\lambda = 220$ nm (absorbance de la liaison peptidique) et $\lambda = 280$ nm (absorbance des tyrosines et tryptophanes). La phase mobile n'absorbe pas ou peu la lumière à ces longueurs d'onde. Un schéma du montage utilisé est présenté à la figure 2.4.

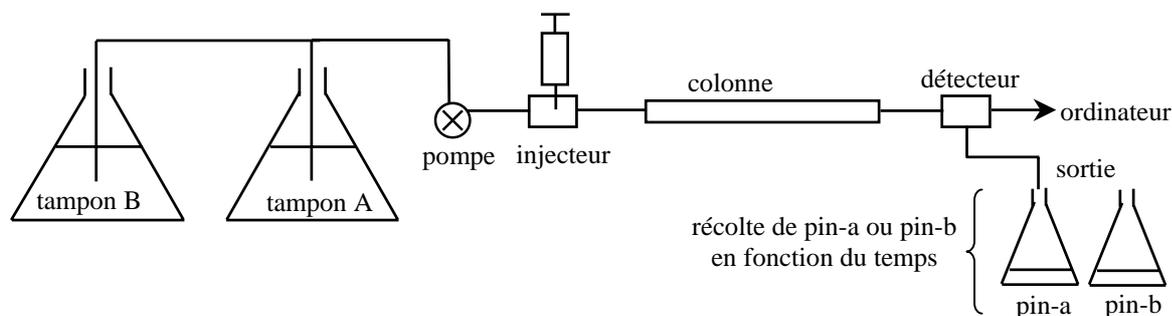


Figure 2.4 : principe de fonctionnement de l' HPLC.

Les différentes protéines sont décrochées à des temps différents qui dépendent des interactions hydrophobes plus ou moins fortes qui s'établissent entre les protéines et les chaînes carbonées fixées sur les billes. On sépare alors précisément les différentes molécules contenues dans le mélange de départ. Après identification de la nature des protéines sur le chromatogramme [3], la récolte des fractions de pin-a et pin-b se fait de façon manuelle dans des flacons en verre. Les purothionines ne sont pas conservées. Le chromatogramme type est présenté à la figure 2.5.

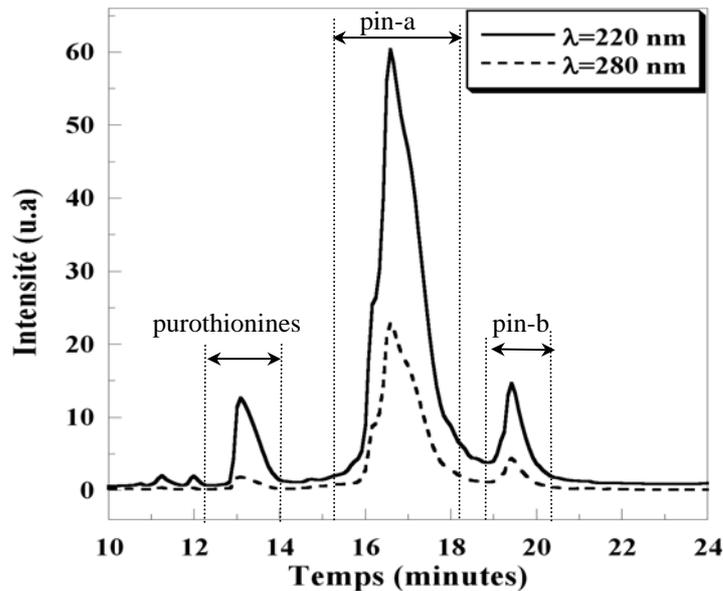


Figure 2.5 : chromatogramme obtenu par HPLC.

I.2.6 – Spectrométrie de masse : Electrospray Ionisation (ESI)

La spectrométrie de masse est une technique analytique utilisée pour mesurer le poids moléculaire d'un échantillon ce qui permet de l'identifier. Pour cela, la solution de protéine est introduite dans un capillaire qui est porté à un haut potentiel électrique (+3000 V). Le champ électrique intense appliqué à la sortie du capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Pendant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant par explosions "coulombiennes" successives (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée). Un flux d'azote est appliqué à l'interface pour aider à l'évaporation du solvant. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés par un ensemble d'échantillonneurs, c'est-à-dire un ensemble d'orifices sous pompage, vers l'analyseur où règne un vide poussé. Les spectres ESI obtenus en mode positif présentent un ensemble de pics correspondant aux ions multichargés de type $[M+zH]^{z+}$ où M correspond à la masse molaire de la molécule analysée, et z au nombre de charges portées par cette molécule ionisée. La masse M peut-être déterminée très simplement par déconvolution du spectre et transformation de ce dernier en une courbe masse-intensité. Par exemple, pour 2 pics successifs de rapports M/z (m) mesurés sur le spectre, m_1 et m_2 (avec $m_1 < m_2$), et de charges z_1 et z_2 (avec $z_1 = z_2 + 1 = z + 1$), nous savons que :

$$m_1 = \frac{M + z_1}{z_1} = \frac{M + z + 1}{z + 1} \quad (\text{eq. 2.1})$$

$$m_2 = \frac{M + z_2}{z_2} = \frac{M + z}{z} \quad (\text{eq. 2.2})$$

On obtient alors deux équations à deux inconnues qui sont : l'état de charge z (correspondant au pic m_2) et la masse moléculaire M :

$$z = \frac{m_1 - 1}{m_2 - m_1} \quad (\text{eq. 2.3})$$

$$M = \frac{(m_2 - 1)(m_1 - 1)}{m_2 - m_1} \quad (\text{eq. 2.4})$$

Les spectres de masse ESI obtenus pour les deux isoformes pin-a et pin-b sont présentés à la figure 2.6.

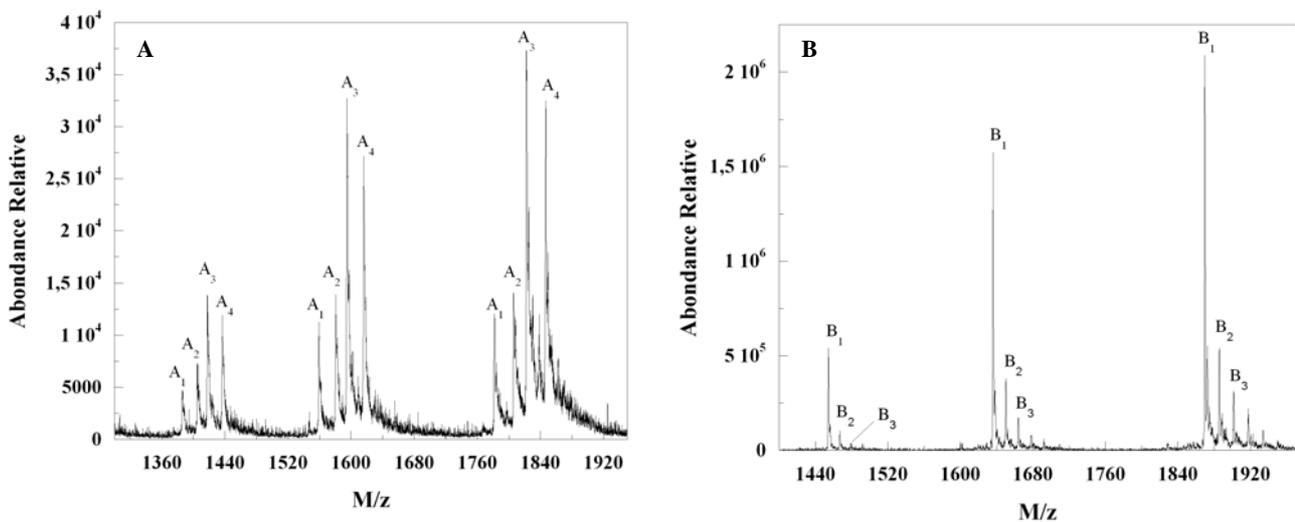


Figure 2.6 : spectre de masse ESI des espèces moléculaires correspondant à : A : pin-a et B : pin-b.

Sur les spectres de masses présentés ci-dessus, on observe des pics correspondant à différents ions moléculaires. Ces pics sont indexés dans les tableaux 2.1.A et 2.1.B, où l'on reporte également l'état de charge z ainsi que la masse molaire M correspondante que l'on calcule d'après les équations 2.3 et 2.4. Pour chaque espèce moléculaire, on note aussi la masse molaire moyenne.

| A | | | | | B | | | | |
|----------------|--------|---|---------|--------------------------|----------------|--------|---|---------|--------------------------|
| Espèce | M/z | z | M | M _{mov} (g/mol) | Espèce | M/z | z | M | M _{mov} (g/mol) |
| A ₁ | 1386.1 | 9 | 12465.9 | 12466.0 | B ₁ | 1454.5 | 9 | 13081.5 | 13080.3 |
| | 1559.3 | 8 | 12466.4 | | | 1636.0 | 8 | 13080.0 | |
| | 1781.8 | 7 | 12465.6 | | | 1869.5 | 7 | 13079.5 | |
| A ₂ | 1405.1 | 9 | 12636.9 | 12635.7 | B ₂ | 1468.0 | 9 | 13203.0 | 13195.8 |
| | 1580.5 | 8 | 12636.0 | | | 1650.1 | 8 | 13192.8 | |
| | 1905.9 | 7 | 12634.3 | | | 1885.5 | 7 | 13191.5 | |
| A ₃ | 1417.8 | 9 | 12751.2 | 12750.5 | B ₃ | 1479.3 | 9 | 13304.7 | 13303.6 |
| | 1594.9 | 8 | 12751.2 | | | 1664.0 | 8 | 13304.0 | |
| | 1822.3 | 7 | 12749.1 | | | 1901.3 | 7 | 13302.1 | |
| A ₄ | 1436.8 | 9 | 12922.2 | 12921.0 | | | | | |
| | 1616.1 | 8 | 12920.8 | | | | | | |
| | 1846.7 | 7 | 12919.9 | | | | | | |

Tableau 2.1 : indexation des pics M/z de pin-a (A) et pin-b (B) d'après les spectres ESI présenté à la figure 2.6.

Le calcul des masses molaires des protéines purifiées permet de s'assurer qu'on est bien en présence des puroidolines.

Sur les deux spectres ESI de pin-a et pin-b, on constate qu'une espèce moléculaire est plus abondante que les autres. Pour la pin-a, il s'agit de l'espèce A₃ et l'on considère alors que la masse molaire de la pin-a vaut : $M_a = 12750.5$ g/mol. De même pour la pin-b, l'espèce majoritaire est B₁ d'où la masse molaire de la pin-b : $M_b = 13080.3$ g/mol.

II – Purification des galactolipides du blé : MGDG et DGDG

500 g de farine commerciale (*Triticum aestivum*) sont mélangés pendant 2 heures avec 1.5 L de dichlorométhane/méthanol (2:1 v/v). Le mélange obtenu est filtré à travers un filtre de Büchner. Extraction et filtration sont à nouveau réalisées sur le résidu solide. Après évaporation du solvant, l'extrait brut de lipides est lavé par partage de phase dans du dichlorométhane/méthanol/NaCl aqueux 0.9% (8:4:3 v/v) pour éliminer les substances non lipidiques [4]. La phase inférieure riche en dichlorométhane est récupérée et le solvant évaporé. L'extrait brut de lipides du blé est fractionné par chromatographie d'absorption sur de l'acide silicique. Les fractions enrichies en lipides non polaires (triglycérides, stérols), MGDG, DGDG et phospholipides sont respectivement éluées avec du dichlorométhane, dichlorométhane/acétone (1:1 v/v), acétone et méthanol. Après évaporation du solvant, les deux fractions contenant les galactolipides sont séchées sous un flux d'azote puis pesées. Les composés DGDG et MGDG sont purifiés à température ambiante à partir des fractions de galactolipides correspondantes par HPLC sur une colonne (10 mm × 250 mm) remplie de Nucleosil® 100 Si, 5 µm (phase stationnaire) (diamètre des pores = 100 Å, diamètre des billes de silice = 5 µm). La phase mobile est constituée d'acétone/dichlorométhane (7:3 v/v) et d'acétone/chloroforme (1:1 v/v) pour les fractions de DGDG de MGDG respectivement. Le volume d'injection est de 1 mL contenant environ 30 mg d'extrait de lipides et le débit d'élution est fixé à 3 mL/min. La détection des galactolipides s'opère avec un réfractomètre différentiel (figure 2.7).

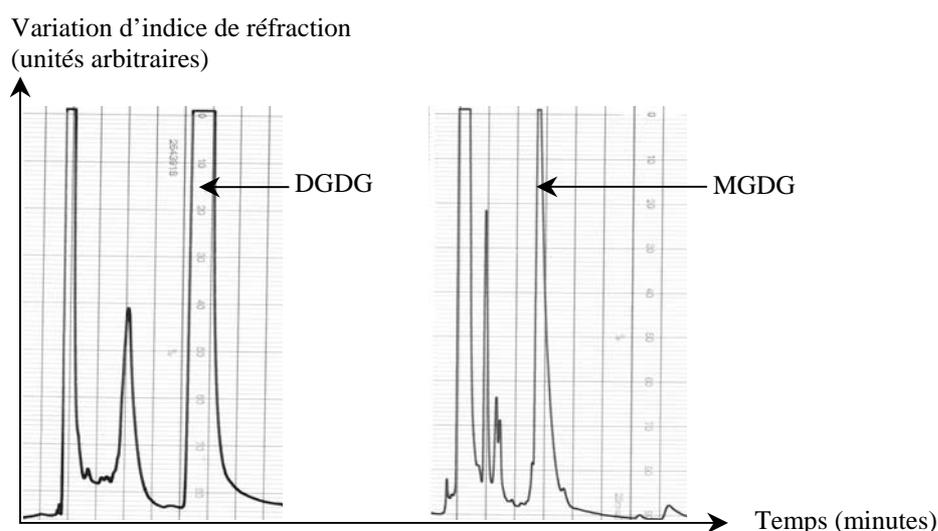


Figure 2.7 : profil de chromatographie HPLC du DGDG et du MGDG.

Les puretés du DGDG et MGDG sont contrôlées par chromatographie sur couche mince sur des plaques de gel de silice en utilisant un mélange de chloroforme/méthanol/ammoniac 25% (13:7:1 v/v/v) pour la migration (2 fractions collectées pour DGDG et 4 pour MGDG). Les lipides sont révélés sous radiation UV après pulvérisation avec une solution éthylique de rhodamine B. Après évaporation du solvant sous vide, le DGDG et MGDG purs sont totalement séchés sous flux d'azote, pesés et solubilisés dans du chloroforme. Les concentrations finales des solutions de DGDG et MGDG sont respectivement 45.9 mg/mL et 34.7 mg/mL.

L'analyse des espèces moléculaires de galactolipide est réalisée par HPLC en phase inverse sur une colonne (8 mm × 250 mm) remplie avec du Nucleosil® 100 C18 Si, 5 µm. La phase mobile est un mélange de méthanol/eau/acétonitrile (90.5:7:2.5 v/v/v) à température ambiante et le débit est fixé à 0.5 mL/min [5]. La détection est réalisée par UV à 210 nm. La proportion des différentes espèces est exprimée en % de l'absorbance totale (figure 2.8). La composition des chaînes acyl du MGDG et DGDG est déterminée par chromatographie gazeuse sur un chromatographe HP-5890 équipé d'une colonne capillaire DB5 (30 m × 0.32 mm, épaisseur du film : 0.25 µm) correspondant aux esters de méthyl obtenus par trans-estérification des galactolipides dans 14% de trifluorure de bore dans du méthanol (figure 2.8).

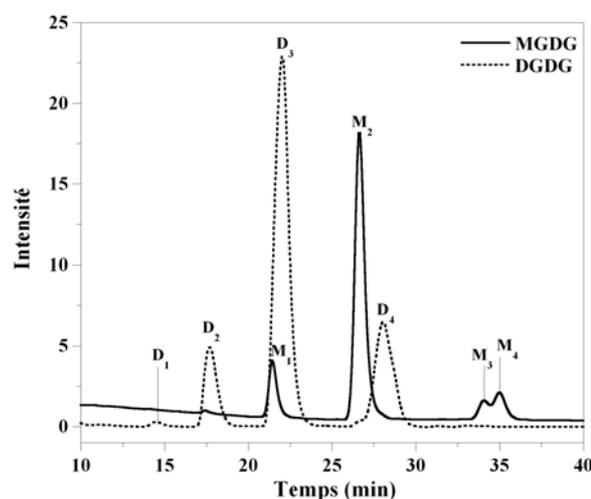


Figure 2.8 : profil de chromatographie HPLC en phase inverse du DGDG et du MGDG permettant de connaître la composition en acide gras des chaînes carbonées. Les numéros des pics sont référencés dans le tableau 2.2.

Quatre espèces majeures sont mises en évidence pour MGDG et DGDG, elles sont référencées dans le tableau 2.2 [6]. La composition en acides gras permet d'estimer la masse moléculaire moyenne du MGDG et DGDG, à savoir : 777 et 935 g/mol, respectivement.

| | MGDG | DGDG |
|---|-----------------------|-----------------------|
| C18:2^{Δ9,12}/C18:3^{Δ9,12,15} | 11% (M ₁) | 12% (D ₂) |
| C18:2^{Δ9,12}/C18:2^{Δ9,12} | 75% (M ₂) | 65% (D ₃) |
| C16:0/C18:2^{Δ9,12} | 5% (M ₃) | 20% (D ₄) |
| C18:2^{Δ9,12}/C18:1^{Δ9} | 9% (M ₄) | 3% (D ₁) |

Tableau 2.2 : composition des chaînes acyl du MGDG et DGDG, d'après la figure 2.8. La position des doubles liaisons est indiquée également.

On remarque un fort pourcentage de C16:0/C18:2 dans la composition du DGDG par rapport à celle de MGDG. Nous allons calculer l'indice de double liaison comme décrit par Bishop et al [7] : indice de double liaison = $\sum(\% \text{ acide gras}) \times (\text{nombre de doubles liaisons dans l'acide gras}) \times 10^{-2}$. Pour calculer cet indice, il faut calculer le pourcentage de chaque acide gras. On obtient pour MGDG : 87.5% de C18:2, 5.5% de C18:3, 2.5% de C16:0 et 4.5% de C18:1 ; et pour DGDG : 82.5% de C18:2, 6% de C18:3, 10% de C16:0 et 1.5% de C18:1. L'indice de double liaison vaut alors pour :

- MGDG : $[(87.5 \times 2) + (5.5 \times 3) + (4.5 \times 1)] \times 10^{-2} = 1.96 \sim 2.0$.

- DGDG : $[(82.5 \times 2) + (6 \times 3) + (1.5 \times 1)] \times 10^{-2} = 1.84 \sim 1.8$.

Nous reviendrons sur cet indice de double liaison dans le chapitre 4.

Bibliographie du chapitre 2

1. Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* 25:1604-1607.
2. Pryde, J.G. and J.H. Phillips. 1986. Fractionation of membrane proteins by temperature-induced phase. *Biochem. J.* 233:525-533.
3. Blochet, J.-E., C. Chevalier, E. Forest, E. Pebay-Peyroula, M.-F. Gautier, P. Joudrier, M. Pézolet, and D. Marion. 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Letters.* 329:336-340.
4. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane-Stanley. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
5. Gil, J.H., J. Hong, J.C. Choe, and Y.H. Kim. 2003. Analysis of fatty acyl groups of diacyl galactolipid molecular species by HPLC/ESI-MS with in-source fragmentation. *Bull. Korean Chem. Soc.* 24:1163-1168.
6. Kim, Y.H., J.H. Gil, J. Hong, and J.S. Yoo. 2001. Tandem mass spectrometric analysis of fatty acyl groups of galactolipid molecular species from wheat flour. *Microchemical Journal.* 68:143-155.
7. Bishop, D.G., J.R. Kenrick, J.H. Bayston, A.S. Macpherson, and S.R. Johns. 1980. Monolayers properties of chloroplast lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 602:248-259.

CHAPITRE 3 TECHNIQUES EXPERIMENTALES

| | |
|---|----|
| I - Etude sur la cuve de Langmuir | 59 |
| I.1 – Tensiométrie | |
| I.1.1 – Principe..... | 60 |
| I.1.2 – Isotherme de compression..... | 61 |
| I.1.3 – Technique de prélèvement de Langmuir-Blodgett..... | 62 |
| I.2 – Ellipsométrie et microscopie à l’angle de Brewster | |
| I.2.1 – Réflectivité de la lumière par une interface..... | 63 |
| I.2.2 – Coefficients de réflexion et transmission..... | 64 |
| I.2.3 – Angle de Brewster..... | 64 |
| I.2.4 – Principe de l’ellipsométrie..... | 65 |
| I.2.5 – Sensibilité de la mesure..... | 66 |
| I.2.6 – Dispositif expérimental..... | 67 |
| I.2.7 – Relation entre angle ellipsométrique et concentration de surface..... | 67 |
| I.2.8 – Microscopie à l’angle de Brewster..... | 68 |
| I.3 – Rhéologie de surface | |
| I.3.1 – Principe..... | 69 |
| I.3.2 – Dispositif expérimental..... | 69 |
| I.3.3 – Détermination de la constante élastique de cisaillement..... | 70 |
| | |
| II – Etudes spectroscopiques | |
| II.1 – La spectroscopie PM-IRRAS | 72 |
| II.1.1 – Principe de la spectroscopie PM-IRRAS..... | 73 |
| II.1.2 – Le montage optique..... | 73 |
| II.1.3 – Règles de sélection à l’interface eau/air..... | 74 |
| II.1.4 – Spectroscopie infrarouge des protéines..... | 76 |
| II.1.4.A – Modes de vibration de la liaison peptidique..... | 76 |
| II.1.4.B – Modes de vibration en fonction de la conformation des protéines..... | 77 |
| II.2 – La spectroscopie de réflexion totale atténuée (ATR) | 79 |
| II.3 – La spectroscopie Raman | |
| II.3.1 – Principe..... | 81 |
| II.3.2 – Règles de sélection..... | 83 |
| II.3.3 – Montage expérimental..... | 83 |
| | |
| III – Microscopie à force atomique | |
| III.1 – Instrumentation | 85 |
| III.2 – Modes de fonctionnement | |
| III.2.1 – Mode contact..... | 87 |
| III.2.2 – Mode contact oscillant (Tapping mode)..... | 89 |
| III.2.3 – Mode non-contact..... | 89 |
| | |
| IV – Diffraction des rayons X | 89 |
| | |
| Bibliographie | 92 |

CHAPITRE 3

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Ce chapitre est consacré à la description des techniques expérimentales utilisées pour caractériser les films aux interfaces liquide/air et solide/air ainsi que les dispersions en milieu aqueux. La plupart des expériences ont été réalisées à l'interface nécessitant l'utilisation de techniques appropriées. Nous allons décrire brièvement dans cet avant-propos l'apport de chacune des méthodes.

La cuve de Langmuir est l'outil indispensable à cette étude. En remplissant celle-ci d'une solution aqueuse, on crée une interface liquide/air sur laquelle nous formons les films monomoléculaires. La mesure de la pression de surface (analogue de la pression à trois dimensions) par la méthode de Wilhelmy permet de contrôler l'état du film lorsque l'on compacte les molécules (isotherme de compression). On peut aussi transférer les films sur un support solide grâce à la méthode de Langmuir-Blodgett. L'ellipsométrie permettant d'estimer la quantité de matière à l'interface est couplée à un microscope à l'angle de Brewster où l'on accède à la visualisation des films avec une résolution de l'ordre du μm .

Trois techniques de spectroscopie ont été utilisées. La spectroscopie PM-IRRAS (Polarisation Modulation InfraRed Reflexion-Absorption Spectroscopy) présente l'avantage de pouvoir travailler in situ sur la cuve de Langmuir et permet d'accéder à la structure et à l'orientation des molécules. Des mesures de spectroscopie de réflexion totale atténuée (ATR) et de spectroscopie Raman ont permis de caractériser les dispersions aqueuses. Ces deux techniques ont surtout été utilisées pour quantifier le désordre des chaînes lipidiques.

Grâce à la microscopie à force atomique, les films ont pu être visualisés à l'échelle du nm.

Finalement, la diffraction des rayons X a permis de déterminer les phases liquide-cristallines formées par les lipides en dispersion aqueuse.

Les expériences de PM-IRRAS ainsi que quelques clichés de microscopie à l'angle de Brewster ont été réalisées au LPCM à l'université de Bordeaux I (UMR CNRS 5803) en collaboration avec J. Géan et B. Desbat. Les mesures de spectroscopie ATR et Raman ont été effectuées au CERSIM à l'université Laval à Québec en collaboration avec M. Pérolet. Pour la diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) nous avons pu bénéficier de temps à l'ESRF (Grenoble) ainsi qu'à LURE (Orsay). De plus, un montage en laboratoire a été mis au point à l'ENSCR à Rennes. Ces mesures ont été réalisées par F. Artzner (GMCM, Rennes).

I – Etude sur la cuve de Langmuir

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

Expérimentalement, la cuve dite de Langmuir équipée de barrières coulissantes permet la formation de films monomoléculaires à l'interface liquide/air dans des conditions de pression de surface et de température contrôlées. La première étape consiste à déposer la solution de molécules à l'aide d'une micro-seringue, dans notre cas des lipides, à la surface de la cuve remplie par la sous-phase. De par leur nature amphiphile, les lipides s'organisent spontanément à la surface du liquide, les parties polaires (têtes) développant des interactions favorables avec la sous-phase et les chaînes carbonées hydrophobes dirigées vers l'air formant ainsi une monocouche à l'interface liquide/air (figure 3.1). A ce stade, plusieurs techniques permettent de caractériser ce film de Langmuir.

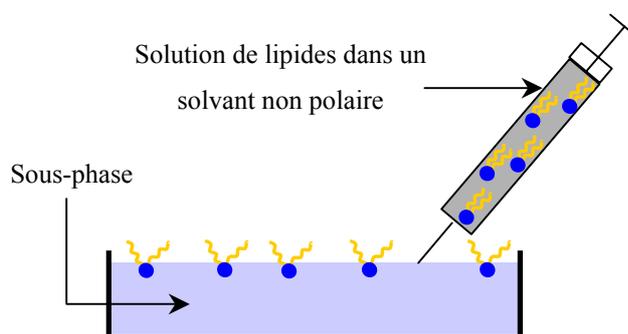


Figure 3.1 : organisation des molécules lipidiques à l'interface liquide /air.

La mesure de la pression de surface renseigne sur l'état physique du film (isotherme de compression). Un montage d'ellipsométrie permettant d'estimer la quantité de matière à l'interface est couplé à un microscope à l'angle de Brewster pour l'observation de la monocouche avec une résolution de l'ordre du μm . La rigidité de la monocouche peut être évaluée par une mesure rhéologique de torsion. La spectroscopie PM-IRRAS permet également des mesures *in situ* sur la cuve de Langmuir ; cette technique sera décrite dans la partie II.1 de ce chapitre. La technique de Langmuir-Blodgett consiste à transférer le film sur un substrat solide, afin de caractériser le film à l'échelle du nm grâce à la microscopie à force atomique qui sera décrite dans la partie III de ce chapitre.

I.1 – Tensiométrie

I.1.1 – Principe

La mesure de la pression de surface π est déterminée par la méthode de Wilhelmy [4] (figure 3.2) qui consiste à mesurer la force \mathbf{F} exercée sur une lame rectangulaire légèrement plongée dans la sous-phase (perpendiculairement à l'interface eau/air).

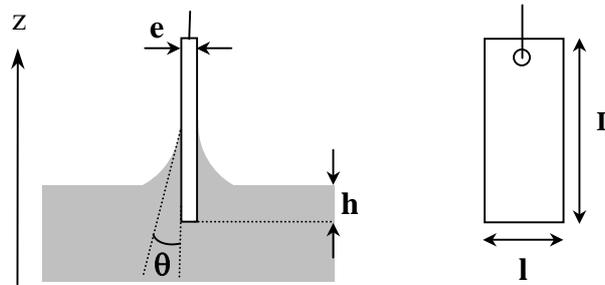


Figure 3.2 : mesure de la pression de surface par la méthode de Wilhelmy.

La résultante des forces qui s'exercent sur la lame s'écrit alors :

$$\mathbf{F} = \mathbf{P} + \mathbf{P}_A + \mathbf{f} \quad (\text{eq. 3.1})$$

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

Si l'on projette cette relation sur l'axe z perpendiculaire à l'interface eau/air, on obtient la force exercée par l'eau pure sur le papier F_z^{eau} :

$$F_z^{eau} = -\rho_{\text{lame}} \cdot L \cdot l \cdot e \cdot g + \rho_{\text{eau}} \cdot h \cdot l \cdot e \cdot g - 2 \cdot (e + l) \cdot \gamma_{\text{eau}} \cdot \cos \theta \quad (\text{eq. 3.2})$$

avec ρ_{lame} et ρ_{eau} respectivement les masses volumiques de la lame et de l'eau ; L , l , et e , respectivement la longueur, la largeur et l'épaisseur de la lame ; h la hauteur d'immersion de la lame ; g le constante de gravité ; γ_{eau} la tension superficielle de l'eau et θ l'angle de mouillage. En général la lame est en platine, métal inerte, mais nous avons choisi d'utiliser un papier filtre calibré ($20 \times 10 \times 0.15 \text{ mm}^3$). La lame de platine et le papier filtre sont totalement mouillant, l'angle θ est alors égal à 0° .

Dans le cas où la surface est recouverte d'un film mince, la force exercée sur le papier selon z (F_z^{film}) a pour expression :

$$F_z^{film} = -\rho_{lame}.L.l.e.g + \rho_{eau}.h.l.e.g - 2.(e + l).\gamma_{film} \quad (eq. 3.3)$$

où nous supposons que l'angle de mouillage sur la lame est très peu modifié par la présence de la monocouche.

Ainsi, la pression de surface $\pi = \gamma_{eau} - \gamma_{film}$ (exprimée généralement en mN/m) est directement liée à la différence entre les forces qui s'exercent sur le papier en présence et en l'absence de film à l'interface :

$$\pi = \frac{(F_z^{film} - F_z^{eau})}{2.(e + l)} \quad (eq. 3.4)$$

I.1.2 – Isotherme de compression

La pression de surface ainsi définie est l'équivalent de la pression pour un système tridimensionnel. La valeur de la tension superficielle de l'eau à 20°C vaut : $\gamma_{eau} = 72.8$ mN/m. Dans notre expérience, un logiciel (Nima Technology) pilote les barrières mobiles de la cuve de Langmuir et mesure la pression de surface π . On définit alors l'aire moléculaire A qui correspond à l'aire moyenne occupée par un ensemble de molécules sur une surface d'aire donnée :

$$A (\text{\AA}^2/\text{molécule}) = \frac{S (\text{cm}^2) \times 10^{-7}}{n (\text{mol}) \times N} \quad (eq. 3.5)$$

où A est l'aire moléculaire moyenne, S l'aire de la cuve, n le nombre de moles déposées à la surface et N le nombre d'Avogadro.

Une monocouche de Langmuir (système bidimensionnel) est donc caractérisée par la pression de surface π qui dépend directement de l'aire accessible aux molécules. Plus la pression de surface est forte, plus le film est ordonné. Plus l'aire moléculaire est faible, plus le film est compact. Il existe donc une relation entre la pression de surface et l'aire moléculaire d'un film. La courbe représentant la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire est appelée isotherme de compression (figure 3.3).

Sur la figure 3.3, on utilise les notations employées par Dervichian et Gaines [5, 6] que l'on a définies au chapitre 1 (partie I.3.1).

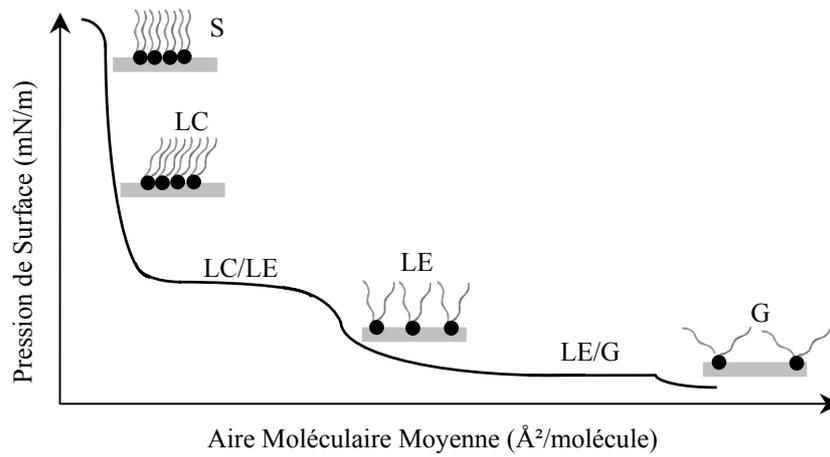


Figure 3.3 : isotherme de compression et évolution de l'état d'organisation du film en fonction de la pression de surface.

I.1.3 – Technique de prélèvement de Langmuir-Blodgett

Une fois le film formé à l'interface liquide/air, certaines techniques expérimentales de caractérisation peuvent être mises en œuvre *in situ*, directement sur la cuve de Langmuir. C'est le cas par exemple de l'ellipsométrie ou de la spectroscopie PM-IRRAS. Cependant, d'autres méthodes comme la microscopie à force atomique nécessitent de travailler sur un substrat solide. Dans ce but, la technique de Langmuir-Blodgett, devant son nom à ses inventeurs, consiste à transférer sur un substrat solide plongé verticalement, à pression de surface constante, une ou plusieurs couches d'une monocouche formée à l'interface liquide/air (figure 3.4). On réalise ainsi un prélèvement ou film de Langmuir-Blodgett (LB).

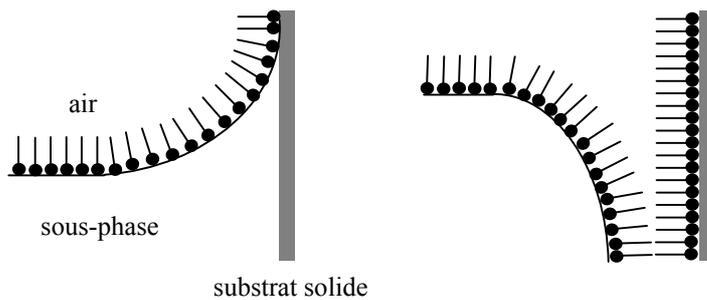


Figure 3.4 : technique de transfert de Langmuir-Blodgett, d'après [7].

Dans nos expériences, nous avons utilisé un substrat hydrophile, le mica. Ce matériau a une structure atomique en feuillets qui présente l'avantage de pouvoir être clivée facilement permettant d'obtenir une surface atomiquement plane et « propre ». Le dispositif de prélèvement est constitué d'une pince sur laquelle se fixe le substrat et qui peut être descendue et montée mécaniquement. L'ensemble du montage est présenté à la figure 3.5.

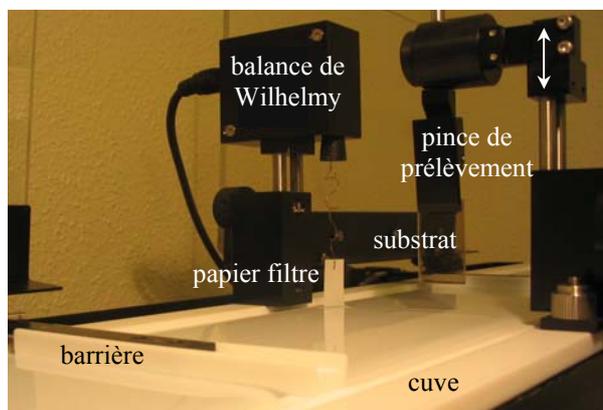


Figure 3.5 : photographie de la cuve de Langmuir (Nima Technology) en Téflon (10×70 cm²) équipée de deux barrières mobiles et des différents éléments permettant de contrôler la pression de surface (balance de Wilhelmy) et le prélèvement de la monocouche sur le substrat (mica).

I.2 – Ellipsométrie et microscopie à l'angle de Brewster

I.2.1 – Réflectivité de la lumière par une interface

Considérons une interface séparant deux milieux infinis, homogènes et isotropes, par exemple l'air et l'eau, d'indices respectifs n_1 et n_2 (figure 3.6). Lorsqu'une onde électromagnétique arrive sur cette interface, elle interagit avec les molécules d'eau et provoque l'excitation du nuage électronique des atomes. Chaque molécule réagit alors comme un dipôle oscillant à la même fréquence que le champ et rayonne dans toutes les directions sauf suivant leur axe de polarisation.

Si la longueur d'onde λ du rayon électromagnétique incident est supérieure aux distances caractéristiques entre molécules, l'eau peut être considérée comme un milieu continu de dipôles et l'interface air/eau comme parfaitement plane. Les ondes diffusées par les dipôles interfèrent alors de façon constructive dans une seule direction, conduisant à un faisceau réfléchi à un angle θ_r égal à l'angle d'incidence θ_i . L'onde transmise forme quant à elle un angle θ_t avec la normale tel que : $n_1 \cdot \sin(\theta_i) = n_2 \cdot \sin(\theta_t)$. De plus, les rayons réfléchis et transmis sont dans le plan d'incidence. Ce sont les lois de Snell-Descartes.

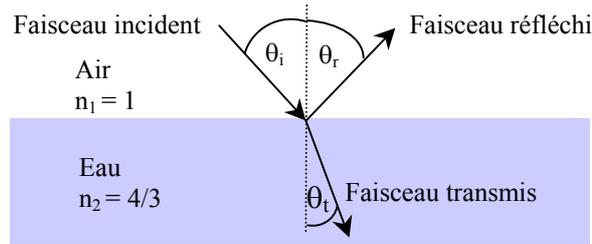


Figure 3.6 : réflexion et transmission du faisceau incident par une interface.

I.2.2 – Coefficients de réflexion et transmission

Les coefficients de réflexion et transmission sont des nombres qui caractérisent le rapport entre les amplitudes des ondes réfléchi et transmise et l'amplitude de l'onde incidente. Les équations 3.6 et 3.7 définissent les coefficients de réflexion pour des polarisations du champ électrique incident perpendiculaire (s) et parallèle (p) au plan d'incidence. Les termes de ces équations sont définis à la figure 3.6.

$$R_s(\theta) = \frac{n_1 \cdot \cos(\theta_i) - n_2 \cdot \cos(\theta_t)}{n_1 \cdot \cos(\theta_i) + n_2 \cdot \cos(\theta_t)} \quad (\text{eq. 3.6})$$

$$R_p(\theta) = \frac{n_2 \cdot \cos(\theta_i) - n_1 \cdot \cos(\theta_t)}{n_2 \cdot \cos(\theta_i) + n_1 \cdot \cos(\theta_t)} \quad (\text{eq. 3.7})$$

I.2.3 – Angle de Brewster

Si l'onde incidente est polarisée p, sa réfraction dans l'eau oriente les dipôles dans le plan d'incidence. Pour un certain angle d'incidence tel que $\theta_i + \theta_t = \pi/2$, les dipôles de l'eau ne rayonnent pas dans la direction réfléchi. En d'autres termes, l'onde n'est pas réfléchi par la surface de l'eau ($R_p = 0$). Cet angle particulier est l'angle de Brewster θ_B et il est défini par:

$$\tan \theta_B = \frac{n_2}{n_1} \quad (\text{eq. 3.8})$$

Pour une interface air/eau : $\theta_B = 53^\circ 12'$.

Si l'on trace les variations des coefficients de réflexion R_p et R_s en fonction de l'angle d'incidence θ_i (d'après les équations 3.6 et 3.7), on vérifie qu'à l'angle de Brewster θ_B , le coefficient R_p s'annule (figure 3.7).

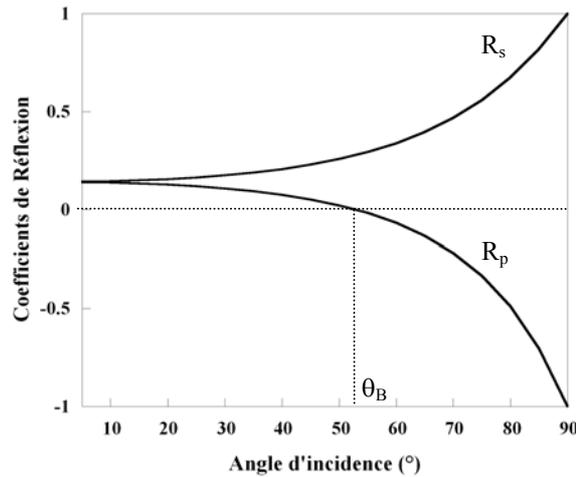


Figure 3.7 : variations des coefficients de réflexion perpendiculaire (R_s) et parallèle (R_p) en fonction de l'angle d'incidence θ .

L'annulation du coefficient de réflexion parallèle R_p permet d'utiliser une méthode optique de zéro, donc de caractériser des monocouches bien plus fines qu'une longueur d'onde visible. Cette méthode permet de réaliser des mesures (ellipsométrie), de l'imagerie (microscopie à angle de Brewster) ou les deux à la fois.

I.2.4 – Principe de l'ellipsométrie

L'ellipsométrie est une méthode optique d'analyse non-destructive basée sur le changement d'état de polarisation d'une lumière polarisée après réflexion en incidence oblique sur une surface plane. La géométrie du système est représentée à la figure 3.8. Le champ électrique \mathbf{E}_i de l'onde incidente possède deux composantes : l'une parallèle (\mathbf{E}_{pi}) et l'autre perpendiculaire (\mathbf{E}_{si}) au plan d'incidence. La modification du champ électrique après réflexion sur l'échantillon peut être représentée par les deux coefficients de réflexion agissant sur chacune des composantes du champ : le coefficient de réflexion pour une polarisation p : $R_p = |R_p| \cdot \exp(i\delta_p)$; et le coefficient de réflexion pour une polarisation s : $R_s = |R_s| \cdot \exp(i\delta_s)$.

Les deux coefficients R_p et R_s sont complexes. Les modules $|R_p|$ et $|R_s|$ représentent la modification apportée à l'amplitude de la composante du champ, et les phases, δ_p et δ_s , le retard introduit par la réflexion.

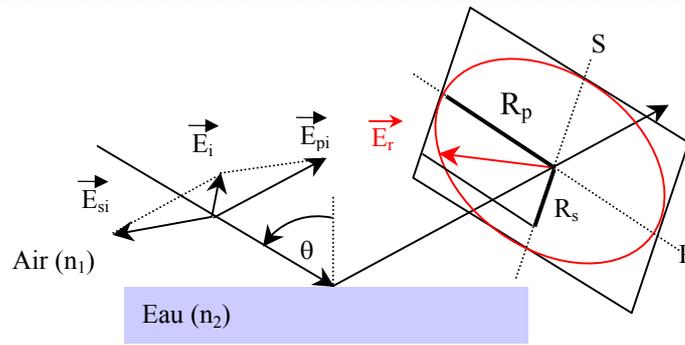


Figure 3.8 : géométrie du système.

En pratique, la quantité mesurée est le rapport de ces deux coefficients, appelé ellipticité, qui s'exprime sous la forme :

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan \psi \cdot \exp(i\Delta) \quad (\text{eq. 3.9})$$

où ψ et Δ correspondent aux deux paramètres ellipsométriques:

$$\psi = \arctan\left(\frac{R_p}{R_s}\right) \quad (\text{eq. 3.10})$$

$$\Delta = \arg|\rho| = \delta_p - \delta_s \quad (\text{eq. 3.11})$$

Pour une interface idéale, c'est-à-dire abrupte entre deux milieux d'indices de réfraction n_1 et n_2 , ρ s'annule et change de signe à l'incidence de Brewster. Dans le cas d'une interface réelle, c'est-à-dire d'épaisseur non nulle, comme une couche de protéines adsorbées par exemple, ρ prend à θ_B une valeur non nulle, mesurable, qui dépend de l'indice n et de l'épaisseur e de la couche.

I.2.5 – Sensibilité de la mesure

Une étude par ellipsométrie consiste à mesurer les valeurs de ψ et de Δ . Pour une couche très fine d'épaisseur inférieure à 100 Å, ψ présente pour θ_B un minimum non nul mais difficilement détectable. Le déphasage Δ est extrêmement sensible à toute variation de n et de e ; il est bien plus facile à mesurer avec précision. Nous avons choisi de travailler à un angle d'incidence décalé d'un degré de l'angle de Brewster, ce qui constitue un compromis entre une grande sensibilité en Δ et une ellipticité suffisante pour être détectable.

I.2.6 – Dispositif expérimental

Il existe plusieurs types d'ellipsomètre basés sur le principe décrit précédemment. Celui que nous avons utilisé au laboratoire est un ellipsomètre à annulation [8] (figure 3.9). La source lumineuse est un laser He-Ne (Melles Griot) de longueur d'onde $\lambda = 632,8$ nm. Une polarisation linéaire est obtenue grâce à un polariseur Glan-Thompson (Melles Griot) placé avant l'échantillon (P). Après réflexion sur la surface de l'échantillon, la lumière devient polarisée elliptiquement. Un lame quart d'onde ($\lambda/4$) placée sur le trajet du faisceau réfléchi permet d'obtenir à nouveau une polarisation linéaire. La rotation de l'analyseur Glan-Thompson (A) doit alors compenser celle induite par la réflexion à l'interface pour éteindre le faisceau. Dans cette configuration d'ellipsomètre à annulation [9], l'angle de l'analyseur multiplié par deux donne la valeur de l'angle ellipsométrique Δ , c'est-à-dire la différence de phase entre les polarisations parallèle et perpendiculaire du faisceau réfléchi. Le faisceau laser sonde une surface d'environ 1 mm^2 et une profondeur de $1 \text{ }\mu\text{m}$. Un photomultiplicateur (PM) enregistre l'intensité du signal de sortie. Une mesure nécessite entre 3 et 5 secondes.

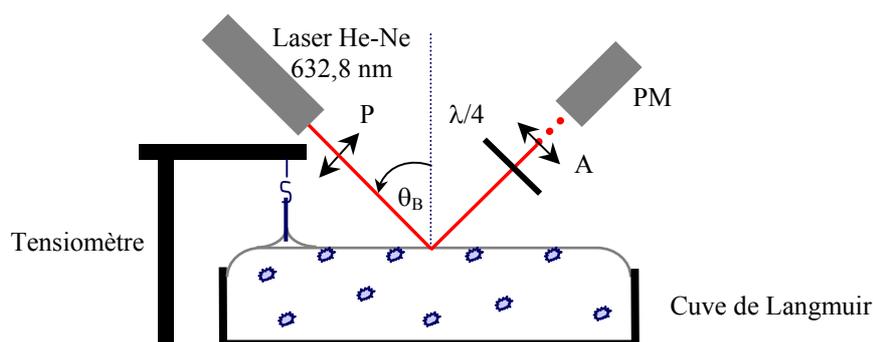


Figure 3.9 : montage expérimental de l'ellipsomètre à annulation.

I.2.7 – Relation entre l'angle ellipsométrique Δ et la concentration de surface

Pour l'étude de l'adsorption de protéines, l'ellipsométrie nous permet de déterminer la quantité de matière Γ présente à l'interface. Il a été montré qu'il existe une relation linéaire entre Δ et la concentration de surface Γ de protéines globulaires adsorbées à l'interface solide/air [10]. Cette linéarité a également été observée à l'interface eau/air [11, 12]. La valeur du coefficient de proportionnalité varie cependant d'un auteur à l'autre. Cette différence pourrait en partie être attribuée à différents réglages des systèmes de mesure (angle d'incidence ou longueur d'onde du faisceau réfléchi) ainsi qu'à différentes conditions expérimentales, notamment au niveau de la nature du substrat (solide ou liquide). Nous avons

choisi d'estimer Γ à partir de nos mesures de Δ en utilisant la relation extraite des données ellipsométriques publiées par De Feijter et al [11] pour l'étude de l'adsorption de κ -caséines à l'interface eau/air :

$$\Gamma (mg/m^2) = 0.20 \times \Delta (^\circ) \quad (\text{eq. 3.12})$$

I.2.8 – Microscopie à l'angle de Brewster

La microscopie à l'angle de Brewster [13, 14] est une technique qui permet de visualiser *in situ* l'état de la surface d'un film et/ou son évolution au cours d'une compression. Elle est basée sur la réflectivité nulle d'une surface d'eau pour une lumière polarisée dans le plan d'incidence (polarisation p) et pour un angle d'incidence appelé angle de Brewster (partie 1.2.3 de ce chapitre). Si la surface est recouverte d'un film mince d'indice optique n différent de celui de l'eau, un rayon lumineux de faible intensité est réfléchi puis collecté par une caméra CCD (Charge Coupled Device) (figure 3.10).

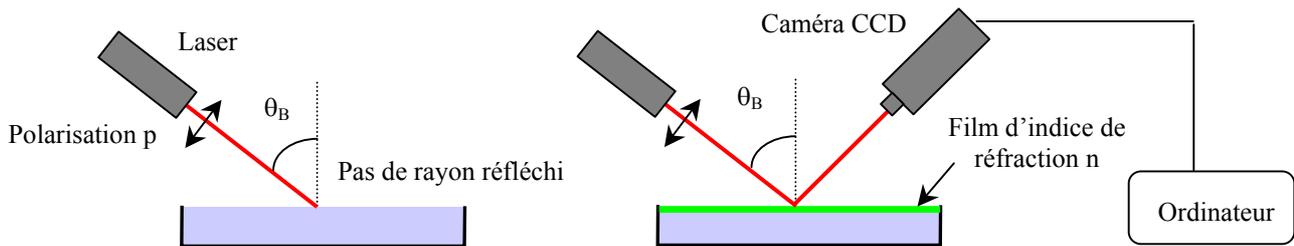


Figure 3.10 : montage expérimental de la microscopie à l'angle de Brewster.

La caméra CCD, équipée d'un objectif de grossissement $\times 10$, permet de visualiser la surface du film sur des images de dimensions $430 \mu\text{m} \times 540 \mu\text{m}$. Les images sont codées en niveaux de gris dont les variations dépendent des différences locales d'épaisseur et des propriétés de dispersion optique du film.

A l'interface eau/air et à l'angle de Brewster, on montre, d'après l'équation 3.13 [15], que, pour un indice optique du film constant, la réflectance varie comme l'épaisseur du film au carré.

$$R \propto \left(\frac{e}{\lambda}\right)^2 \frac{(n^2_{film} + n^2_{air})}{(n^2_{film} - n^2_{air})^2} \frac{(n^2_{film} - n^2_{eau})^2 (n^2_{air} - n^2_{eau})^2}{n^4_{eau}} \quad (\text{eq. 3.13})$$

où n_{air} , n_{eau} et n_{film} représentent respectivement les indices optiques de l'air, de l'eau et du film. Dans ces conditions, si on suppose que l'indice ne varie pas lorsque le film évolue d'une

monocouche à une bicouche ou d'une monocouche à une tricouche, la réflectance est respectivement multipliée par 4 ou 9. Sur le montage de microscopie à l'angle de Brewster de Rennes, le montage ne permet pas de calibrer les niveaux de gris. Sur le montage du LPCM à Bordeaux, la réflectance est déterminée expérimentalement à partir des niveaux de gris mesurés sur les images Brewster grâce à une procédure de calibration.

I.3 – Rhéologie de surface

I.3.1 – Principe

Cette méthode consiste à appliquer une contrainte de cisaillement de surface σ_{xy} à une monocouche lipidique ou couche de protéines adsorbées et à mesurer la déformation u_{xy} qui en résulte. L'analyse des courbes déformation/contrainte permet d'accéder à la constante élastique de cisaillement μ définie par :

$$\mu = \frac{1}{2} \cdot \frac{\sigma_{xy}}{u_{xy}} \quad (\text{eq 3.14})$$

Par définition, la couche est solide si et seulement si $\mu > 0$. Plus μ est grand, plus la couche est rigide.

I.3.2 – Dispositif expérimental

Le principe consiste à cisailer une couche de molécules à l'interface par l'intermédiaire de la rotation d'un flotteur aimanté placé dans un champ magnétique variable. Le montage expérimental (figure 3.11) a été développé durant la thèse de C. Zakri-Delplanque [16] en 1996. Une cuve circulaire en Téflon de diamètre $b = 4.7$ cm est remplie de 8 mL de sous-phase aqueuse recouverte d'un film monomoléculaire ou d'une couche de protéines adsorbées à l'interface. En son centre flotte un petit morceau d'aluminium en forme de moule à tarte, de diamètre $a = 1$ cm. Il est paraffiné dans le but d'améliorer sa flottabilité. Un aimant surmonté d'un petit miroir vertical est déposé sur ce flotteur. Le moment magnétique \mathbf{m} de l'aimant a pour intensité : $m = (3.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ A.m². Pour empêcher le flotteur de dériver, un champ magnétique continu, parallèle au champ magnétique terrestre est appliqué par un solénoïde placé exactement au-dessus du centre de la cuve. Le champ magnétique continu appliqué par le solénoïde s'ajoute à la composante horizontale du champ terrestre pour donner au niveau du flotteur un champ \mathbf{B}_0 d'intensité $B_0 = (6.4 \pm 0.5) \cdot 10^{-5}$ T.

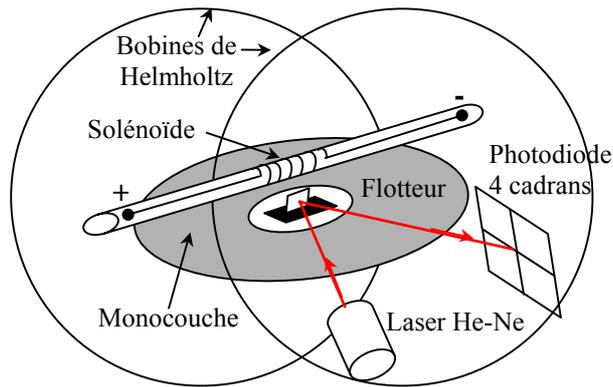


Figure 3.11 : dispositif expérimental du montage de mesure de la constante élastique de cisaillement.

Lors d'une mesure, un champ magnétique alternatif \mathbf{b} d'intensité $b \sim 10^{-4} B_0$ est appliqué à l'aide de bobines de Helmholtz. Le champ \mathbf{b} est horizontal, mais perpendiculaire à la direction du champ continu : un couple magnétique est ainsi appliqué à l'aimant. Le flotteur tourne alors autour de son axe vertical. L'amplitude de cette rotation est fonction de l'élasticité de la couche : plus la couche est élastique, plus elle aura tendance à ramener le flotteur dans sa position initiale.

L'amplitude de rotation est mesurée grâce à un faisceau laser qui est réfléchi par le petit miroir vers une photodiode à quatre cadrans, montée sur deux platines de translation motorisées. L'ensemble du dispositif est protégé des mouvements d'air ambiants et fixé à un mur porteur du bâtiment pour éviter les vibrations parasites.

La caractéristique principale de ce montage est sa grande sensibilité qui lui permet de détecter des déformations de cisaillement u_{xy} de l'ordre de 10^{-7} [16] et des réponses élastiques de cisaillement de l'ordre de 0.1 mN/m.

I.3.3 – Détermination de la constante élastique de cisaillement μ

L'équation du mouvement du flotteur est donnée par [16] :

$$J \cdot \frac{d^2 \theta}{dt^2} = -B_0 \cdot m [\theta(t) - \alpha(t)] + M_{2D} - J \cdot \gamma \cdot \frac{d\theta}{dt} \quad (\text{eq. 3.15})$$

où J est le moment d'inertie du flotteur, $\theta(t)$ l'angle de rotation du flotteur à l'instant t , $\alpha(t)$ l'angle que forme $B(t)$ avec $B_0(t)$ au même instant, $B_0 \cdot m [\theta(t) - \alpha(t)]$ le moment magnétique

appliqué au flotteur, M_{2D} le moment réponse exercé par la couche sur le flotteur et γ le coefficient d'amortissement.

La détermination de J et γ se fait grâce à la réalisation d'un spectre fréquentiel (de 0.01 à 100 Hz) sur de l'eau pure. Le flotteur est mis en mouvement sous l'effet de l'excitation sinusoïdale du champ $\mathbf{B}(t) = \mathbf{B}_0(t) + \mathbf{b}(t)$. Puisqu'il n'y a pas de couche formée, $M_{2D} = 0$. Le système se comporte alors comme un oscillateur harmonique amorti de pulsation propre :

$$\omega_0^2 = \frac{m \cdot B_0}{J} \quad (\text{eq. 3.16})$$

Un exemple de spectre réalisé sur de l'eau pure est montré à la figure 3.12.

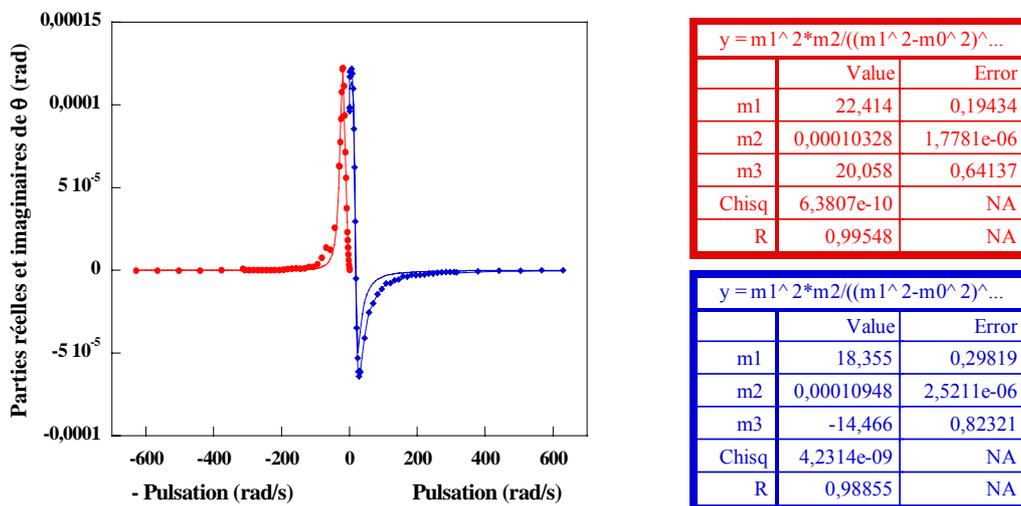


Figure 3.12 : spectre fréquentiel réalisé sur l'eau pure avec les mesures des parties imaginaires (●) et réelles (◆) de θ qui sont ajustées par le modèle de l'oscillateur amorti (traits pleins).

Le fait de tracer la partie imaginaire de θ en fonction de $-\omega$ n'est qu'un artifice destiné à nous permettre de tracer les parties réelles et imaginaires de θ sur le même graphique. L'ajustement des mesures par le modèle d'oscillateur amorti permet de déterminer les valeurs de la pulsation propre ω_0 ($m1$), de l'amplitude d'oscillation ($m2$) et du coefficient d'amortissement γ ($m3$). Deux valeurs sont obtenues pour $m1$, $m2$, $m3$ du fait que l'on ajuste les parties réelles et imaginaires. Aussi, on fera la moyenne des valeurs absolues des mesures obtenues par les deux ajustements pour obtenir les valeurs de ω_0 et γ . D'après la figure 3.12, on obtient : $\omega_0 = 20.4$ rad/s et $\gamma = 17.3$ rad/s. Sachant que $B_0 \cdot m = 19 \cdot 10^{-10}$ T.A.m², $J \sim 10^{-12}$ kg/m², ce qui est compatible avec la masse et le diamètre du flotteur.

Lorsque des molécules sont déposées ou adsorbées à l'interface, M_{2D} est non nul [16] et le système se comporte toujours comme un oscillateur harmonique mais la pulsation de résonance est déplacée de ω_0 à ω_1 :

$$\omega_1^2 = \omega_0^2 \cdot \left(1 + \frac{4\pi a^2 \mu}{B_0 m}\right) \quad (\text{eq. 3.17})$$

Par une mesure en fréquence variable sur la couche déposée ou adsorbée, nous avons alors accès, par l'ajustement des valeurs, à ω_1 et nous pouvons en déduire la constante de cisaillement μ de la couche déposée.

II – Etudes spectroscopiques

II.1 – La spectroscopie PM-IRRAS

La spectroscopie infrarouge est particulièrement adaptée à l'étude des systèmes biologiques et notamment des systèmes modèles des membranes biologiques. En effet, les modes de vibration des molécules les composant (lipides, protéines, sucres) sont intenses en infrarouge. Cette spectroscopie s'est particulièrement développée ces dernières années grâce notamment à l'utilisation de spectromètres infrarouge à transformée de Fourier. Par exemple, la spectroscopie IRRAS (InfraRed Reflexion-Absorption Spectroscopy) est devenue une technique très utilisée pour l'étude de films minces sur substrat métallique. L'anisotropie et l'exaltation du champ électrique créées à la surface d'un métal sont exploitées pour tirer des informations sur l'orientation des molécules à la surface. Cependant, cette méthode ne permet pas de discriminer les absorptions surfaciques des absorptions volumiques. Il est donc nécessaire de normaliser le spectre de l'échantillon par le spectre du substrat seul afin de faire ressortir les absorptions dues uniquement au film. L'enregistrement non simultané des deux spectres introduit des fluctuations inévitables du montage optique et de l'environnement qui affecte la qualité du spectre IRRAS. Cet inconvénient rend alors difficile la détection des absorptions de films ultra-minces (d'épaisseur inférieure à 100 Å) déposés sur une surface à cause de leurs signaux trop faibles. Pour pallier ces inconvénients, des techniques différentielles sont apparues comme la spectroscopie PM-IRRAS (Polarization Modulation-InfraRed Reflexion Absorption Spectroscopy). Cette spectroscopie permet d'obtenir des spectres normalisés en temps réel où seules les absorptions de surface sont détectées.

II.1.1 – Principe de la spectroscopie PM-IRRAS

La spectroscopie PM-IRRAS combine les trois techniques suivantes :

- la réflectivité en lumière polarisée et sous incidence quasi-rasante (IRRAS),
- la modulation rapide de la polarisation du faisceau incident entre les polarisations linéaires p (dans le plan d'incidence) et s (normale au plan d'incidence),
- le filtrage, la démodulation et le traitement mathématique de l'intensité détectée, afin d'obtenir les signaux ($R_p - R_s$) et ($R_p + R_s$), puis le signal de réflectivité différentielle normalisé :

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (\text{eq. 3.18})$$

En plus du gain en détectivité de plusieurs ordres de grandeur et de la normalisation en temps réel réduisant considérablement les effets de dérive et d'instabilités (source, interféromètre, système de purge...) par rapport à l'IRRAS, cette méthode présente les avantages suivants :

- la réalisation d'étude *in-situ*, le montage optique étant disposé à l'air libre,
- l'exaltation à incidence quasi-rasante du champ électrique perpendiculaire à la surface pour la lumière polarisée p dans le cas d'un très bon conducteur,
- les règles de sélection de surface impliquant une relation entre l'orientation des moments de transition des modes de vibration et l'intensité et la direction des bandes correspondantes sur les spectres PM-IRRAS.

II.1.2 – Le montage optique

Le montage est présenté à la figure 3.13 dans le cadre de l'étude de couches ultra-minces à l'interface eau/air [17]. Il est constitué d'un spectromètre à transformée de Fourier Nexus 870 (Thermo Electron) composé : d'une source infrarouge qui émet un spectre continu dans le moyen infrarouge (400 à 4000 cm^{-1}) et d'un interféromètre de Michelson. Le déplacement du miroir mobile à la vitesse v engendre des interférences qui créent une variation périodique de l'intensité lumineuse en fonction de la différence de marche. Cet interférogramme est ensuite traduit en signal électrique par le détecteur. Sa transformée de Fourier permet d'obtenir un signal qui varie en fonction du nombre d'onde. Ainsi, à un nombre d'onde donné ν_i correspond une fréquence de modulation f_i du signal donnée par la relation $f_i = 2\nu_i$. Pour la plupart des expériences, la vitesse du miroir est fixée à 0.4747 cm.s^{-1} ,

ce qui correspond à des fréquences de modulation variant de 0.76 à 3.80 kHz pour un domaine de nombres d'onde compris entre 800 et 4000 cm^{-1} .

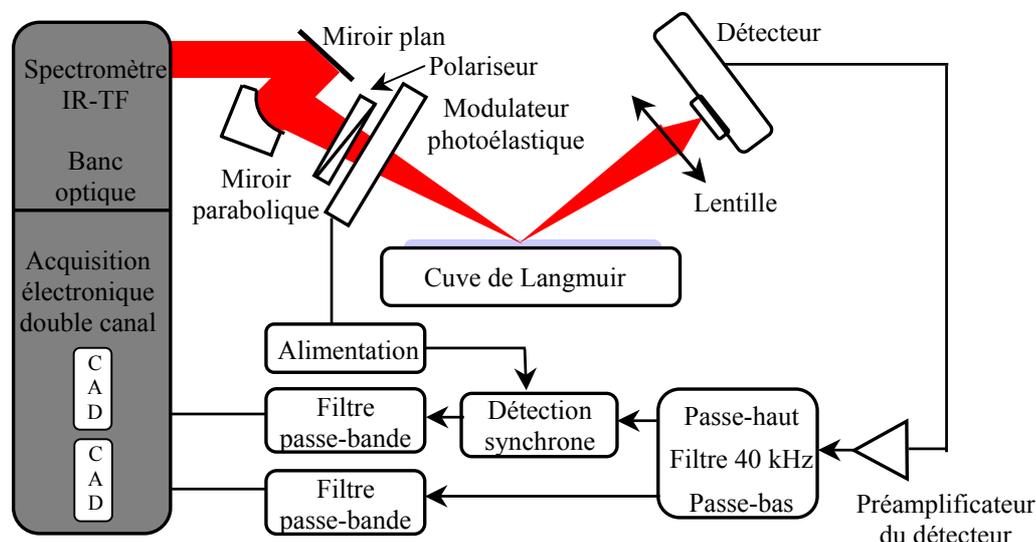


Figure 3.13 : montage expérimental de la spectroscopie PM-IRRAS à l'interface liquide/air.

La spectroscopie PM-IRRAS n'étant pas sensible aux absorptions de l'environnement, les expériences sur les cuves de Langmuir sont réalisées *in situ* à l'extérieur du spectromètre. Le faisceau infrarouge est alors envoyé à l'extérieur à l'aide d'un miroir basculant. Le faisceau parallèle est réfléchi sur un miroir parabolique (qui permet de focaliser le faisceau à la surface de l'eau). Il traverse ensuite un polariseur (tel que la polarisation s du champ électrique soit conservée) et un modulateur photoélastique (PEM).

L'application d'une tension sinusoïdale de fréquence f_m au modulateur photoélastique permet de moduler la polarisation du faisceau infrarouge entre les polarisations s et p à une fréquence fixe $2f_m$. Le faisceau infrarouge réfléchi est alors focalisé grâce à une lentille en sélénure de zinc sur un détecteur à bande étroite (mercure-cadmium-tellure) refroidi à l'azote liquide et associé à un préamplificateur. En fonction de l'intensité du signal, on pourra modifier l'amplification ou la fréquence de coupure du détecteur pour ajuster au mieux la dynamique du signal

II.1.3 – Règles de sélection à l'interface eau/air

A partir des spectres PM-IRRAS expérimentaux, il est possible de remonter à l'orientation des groupements moléculaires constituant les molécules à l'interface. En spectroscopie infrarouge, l'intensité d'une bande d'absorption associée à un mode de

vibration i est proportionnelle à la quantité de molécules constituant le système étudié et à $|\mathbf{M}_i \cdot \mathbf{E}|^2 = |\mathbf{M}_i \cdot \mathbf{E}|^2 \cdot \cos^2 \theta$ où \mathbf{M}_i est le moment de transition associé au mode de vibration i et \mathbf{E} le champ électrique exciteur (figure 3.14). Le moment de transition vaut : $\mathbf{M}_i = \langle \Psi_{v'} | \boldsymbol{\mu}_i | \Psi_{v''} \rangle$ où $\Psi_{v'}$ et $\Psi_{v''}$ sont respectivement les fonctions d'onde des états vibrationnels inférieur et supérieur et $\boldsymbol{\mu}_i$ l'opérateur moment dipolaire associé à la vibration i d'une liaison chimique donnée.

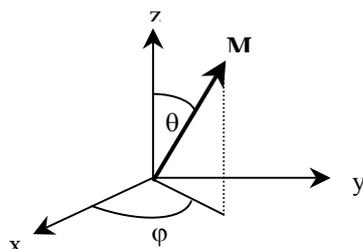


Figure 3.14 : orientation du moment de transition par rapport à la normale à l'interface.

L'intensité d'une bande d'absorption est donc directement reliée à l'angle que fait le moment de transition avec la direction du champ électrique produit à l'interface. Les règles de sélection ont été obtenues par simulations numériques du signal PM-IRRAS d'une bande d'absorption en fonction de la direction de son moment de transition par rapport à la normale à l'interface [18]. Pour cela, plusieurs paramètres ont été utilisés. L'angle d'incidence a été fixé à 75° car il a été montré expérimentalement que le meilleur rapport signal sur bruit est obtenu pour cette valeur d'angle [17]. Le système modèle est un film uniaxe d'épaisseur 20 \AA déposé sur une surface d'eau non absorbante d'indice de réfraction $n = 1.33$. Ces conditions permettent d'écrire les règles de sélection suivantes :

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

Ces résultats sont résumés sur la figure 3.15.

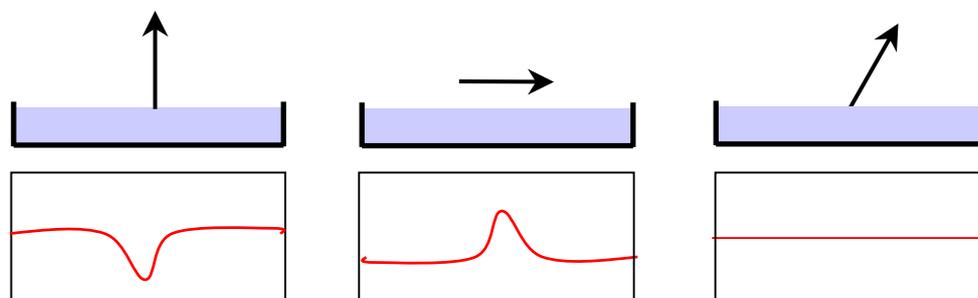


Figure 3.15 : règles de sélection de la spectroscopie PM-IRRAS à l'interface liquide/air.

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

II.1.4 – Spectroscopies infrarouge des protéines

La technique de spectroscopie infrarouge est très efficace pour l'investigation de la conformation des protéines et permet une analyse quantitative de la composition de leur structure secondaire [19-22]. Les protéines sont de grosses molécules composées au moins d'une centaine de résidus, soit environ 200 atomes, ce qui implique plus de $(3N-6) = 594$ vibrations en spectroscopie infrarouge ou Raman. Heureusement, on peut se limiter aux vibrations des groupements peptidiques des protéines qui absorbent dans le même domaine de longueur d'onde. Ils donnent en effet de fortes bandes d'absorption caractéristiques qu'on nomme communément bandes amide A et B pour les bandes d'absorption dans les hautes fréquences ($> 3000 \text{ cm}^{-1}$) et bandes amide I à VII pour les bandes d'absorption dans les basses fréquences ($< 1700 \text{ cm}^{-1}$). Nous allons décrire plus en détails l'ensemble de ces vibrations.

II.1.4.A – Modes de vibration de la liaison peptidique

On distingue les vibrations dans le plan de la liaison amide (bandes amide A et B et bandes amide I à IV) des vibrations hors du plan (bandes amide V à VII). Les bandes amide A et B sont caractéristiques de la vibration de la liaison N-H. Elles résultent d'une résonance de Fermi entre le premier état excité de la vibration N-H et le deuxième état excité de la vibration amide II [23]. Elles se situent respectivement vers 3300 et 3100 cm^{-1} . Ces deux bandes sont peu sensibles aux conformations des chaînes protéiques, bien que la première renseigne sur la force et la distribution des liaisons hydrogène dans une protéine.

Les bandes de vibration amide I à III, localisées entre 1000 et 4000 cm^{-1} , sont pertinentes pour l'étude des conformations des protéines car elles sont intenses et sensibles à

leurs structures secondaires. Les bandes amide IV à VII, situées à des fréquences inférieures à 700 cm^{-1} , ne sont pas observables dans le domaine de fréquences des montages utilisés. Lors de l'analyse des spectres, nous nous attacherons donc plus particulièrement aux bandes amide I et II qui donnent les bandes de vibration les plus intenses. A partir de leurs fréquences et de leurs intensités respectives, il sera alors possible de déterminer la structure secondaire des protéines étudiées.

La bande amide I est principalement localisée sur la vibration de la liaison C=O ($\sim 78\%$ en terme de répartition énergétique). La bande amide II est majoritairement localisée sur la déformation de la liaison N-H ($\sim 63\%$) et peu sur l'élongation de la liaison C-N ($\sim 34\%$). La bande amide III est localisée sur l'élongation de la liaison C-N ($\sim 35\%$) et la déformation de la liaison N-H ($\sim 29\%$). Les fréquences de ces bandes et leur description sont répertoriées dans le tableau 3.1.

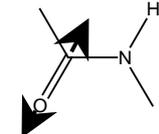
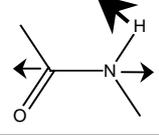
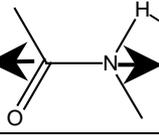
| Bandes de vibration | Description | Fréquence (cm^{-1}) |
|---------------------|---|--------------------------------|
| Amide I |  | 1700-1610 |
| Amide II |  | 1560-1510 |
| Amide III |  | 1310-1240 |

Tableau 3.1 : représentation des modes de vibration amide I, II et III de la liaison peptidique, d'après [23].

II.1.4.B – Modes de vibration en fonction de la conformation des protéines

Les chaînes polypeptidiques sont constituées d'une succession d'unités répétitives chacune comportant une liaison peptidique. De ce fait, dans le cas de protéines possédant une structure régulière, type hélice α ou feuillet β , il se produit un couplage entre les modes de vibration I et II de chaque unité répétitive notamment à cause des liaisons hydrogène qui interviennent entre motifs (hélice α) ou entre chaînes (feuillet β). De ce couplage, résulte l'éclatement des modes amides I et II qui dépend de la conformation de la protéine. Leurs fréquences de vibration vont alors dépendre, dans le cas de l'hélice α , uniquement de la différence de phase δ entre vibrations d'une sous-unité d'une même chaîne (phase

intrachaîne) et dans le cas d'un feuillet β , les vibrations seront aussi fonction de la différence de phase δ' entre vibrations de sous-unités appartenant à des chaînes différentes (différence de phase interchaîne). Les fréquences expérimentales observées dans H_2O des modes de vibration caractéristiques d'une conformation sont répertoriées dans le tableau 3.2. Ainsi, il sera possible de différencier les formes hélices α , feuillets β parallèles et anti-parallèles, les coudes β et les formes désordonnées.

| Structure secondaire | | Mode amide I (cm^{-1}) | Mode amide II (cm^{-1}) |
|-----------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|
| Hélice | | 1662-1645 | 1548-1510 |
| Feuillet | Parallèle | 1637-1618 | 1524-1510 |
| | Anti-parallèle | 1689-1682 | 1560-1550 |
| | | 1632-1618 | 1524-1510 |
| Coude | | 1682-1662 | 1568-1543 |
| Structure désordonnée | | 1673-1645 | 1550-1535 |

Tableau 3.2 : fréquences caractéristiques dans H_2O des modes amide I et II pour différentes conformations de protéines, d'après [24].

Il arrive parfois, lorsque les bandes d'absorption sont larges, que des bandes voisines se chevauchent. Dans ce cas, les stratégies pour déterminer les structures secondaires à partir d'un spectre infrarouge consistent à faire appel à des techniques de déconvolution.

II.2 – La spectroscopie infrarouge de réflexion totale atténuée (ATR)

La technique ATR concerne la propagation d'un rayonnement infrarouge (400 à 4000 cm^{-1}) dans un cristal d'indice élevé (cristal de germanium, $n_1 = 4$) et son absorption-réflexion à l'interface cristal/échantillon. Pour un angle d'incidence supérieur à un angle critique ($\sin \theta_c = n_2/n_1$, n_1 étant l'indice du support et n_2 celui de l'échantillon étudié), la réflexion est totale à l'interface. Les conditions de continuité du champ électrique vont cependant imposer l'existence, dans le second milieu, d'une onde évanescente dont l'amplitude va s'amortir exponentiellement et pour laquelle on définit une profondeur de pénétration (profondeur pour laquelle l'amplitude du champ électrique subit une atténuation de $1/e$). Le principe de la spectroscopie ATR est présenté à la figure 3.16. En pratique, les épaisseurs analysées seront d'autant plus faibles que l'indice de réfraction du cristal, l'angle d'incidence et le nombre d'onde du rayonnement seront élevés.

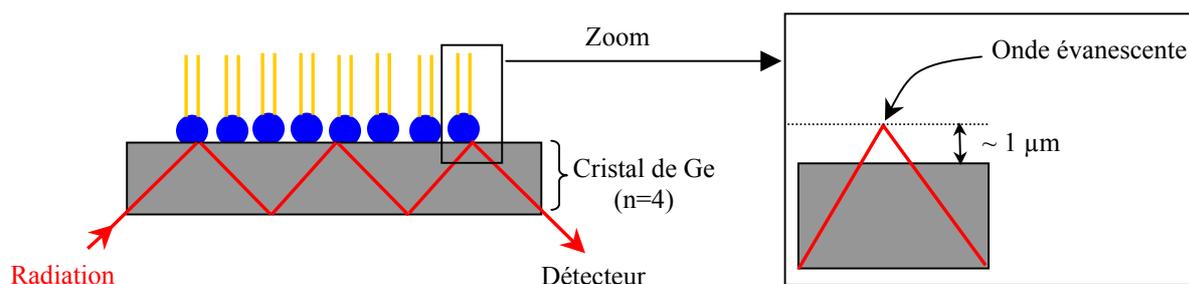


Figure 3.16 : schéma de principe de la spectroscopie ATR.

Les spectres infrarouge des galactolipides hydratés dans H_2O ont été enregistrés avec un spectromètre à transformée de Fourier Magna 760 (Thermo-Electron) équipé d'un détecteur à bande étroite (mercure-cadmium-tellure) refroidi à l'azote liquide. Un polariseur à grille en séléniure de zinc (Specac) à rotation motorisée situé à l'intérieur du compartiment où l'on place l'échantillon a été utilisé pour obtenir les spectres polarisés s et p sans casser la purge à l'intérieur du spectromètre. Le cristal ATR (parallélogramme à 45° , $50 \times 20 \times 2 \text{ mm}^3$) est placé à l'horizontale dans un porte-échantillon.

Pour déterminer l'orientation des chaînes acyl par rapport à la normale du cristal ATR, le rapport dichroïque R_{ATR} a été calculé à partir des spectres polarisés s et p en utilisant la relation suivante :

$$R_{ATR} = \frac{A_p}{A_s} \quad (\text{eq. 3.19})$$

où A_p et A_s sont les absorbances des bandes obtenues avec la radiation infrarouge polarisée perpendiculairement (p) ou parallèlement (s) au plan d'incidence.

En supposant que l'orientation des chaînes acyl est uniaxiale respectivement à la normale du cristal (axe z), le paramètre d'ordre S_z du moment de transition pour une vibration donnée peut être calculé par les trois moyennes au carré des amplitudes des champs électriques $\langle E_{x,y,z}^2 \rangle$ en utilisant l'équation suivante [25]:

$$S_z = \frac{\langle E_x^2 \rangle - \langle E_y^2 \rangle \cdot R_{ATR} + \langle E_z^2 \rangle}{\langle E_x^2 \rangle - \langle E_y^2 \rangle \cdot R_{ATR} - 2\langle E_z^2 \rangle} \quad (\text{eq. 3.20})$$

Cette équation montre qu'il est très important de connaître exactement les moyennes au carré des champs électriques le long des axes x, y et z pour réaliser une mesure d'orientation par spectroscopie ATR. Pour les expériences avec les galactolipides, nous avons considéré que les échantillons se rapprochaient le plus d'un modèle appelé « the two-phase approximation » [26]. Ce modèle considère qu'il vaut mieux traiter certains systèmes comme une simple interface entre deux phases semi-infinies (une phase représentant le cristal, et l'autre le lipide), plutôt que comme un film mince. Or, les échantillons ont été réalisés en déposant une goutte de lipides dissous dans du chloroforme sur le cristal ATR, puis après évaporation du solvant, les spectres infrarouge ont été enregistrés. Dans ces conditions, nous ne sommes pas en présence d'un film mince (type monocouche ou bicouche), et le calcul des champs électriques a donc été fait à partir des équations de Harrick [27] relatives à l'« approximation deux phases »:

$$\langle E_x^2(0) \rangle = \frac{4 \cdot \cos^2 \phi_1 \cdot (\sin^2 \phi_1 - n_{21}^2)}{(1 - n_{21}^2) \cdot [(1 + n_{21}^2) \cdot \sin^2 \phi_1 - n_{21}^2]} \quad (\text{eq. 3.21.a})$$

$$\langle E_y^2(0) \rangle = \frac{4 \cdot \cos^2 \phi_1}{(1 - n_{21}^2)} \quad (\text{eq. 3.21.b})$$

$$\langle E_z^2(0) \rangle = \frac{4 \cdot \cos^2 \phi_1 \cdot \sin^2 \phi_1}{(1 - n_{21}^2) \cdot [(1 + n_{21}^2) \cdot \sin^2 \phi_1 - n_{21}^2]} \quad (\text{eq. 3.21.c})$$

Dans ces équations ϕ_1 est l'angle d'incidence dans le cristal ATR et $n_{21} = n_2/n_1$, où n_1 et n_2 sont les parties réelles des indices de réfraction de la phase 1 (cristal ATR) et de la phase 2 (lipide). Après calcul, en considérant $\phi_1 = 45^\circ$, $n_1 = 4$ et $n_2 = 1.45$, on obtient : $\langle E_x^2 \rangle = 1.954$, $\langle E_y^2 \rangle = 2.303$, et $\langle E_z^2 \rangle = 2.651$.

Pour des chaînes avec une symétrie cylindrique et en supposant une orientation des chaînes uniaxiale, le paramètre d'ordre S_z est relié à l'angle d'orientation des chaînes θ par [28] :

$$S_z = \frac{3 \cdot \cos^2(\theta) - 1}{2} \quad (\text{eq. 3.22})$$

On pourra alors remonter à l'angle θ , angle entre le moment de transition de la vibration considérée et la normale au cristal. Voici un schéma permettant de visualiser l'angle θ pour la vibration d'élongation symétrique du CH_2 :

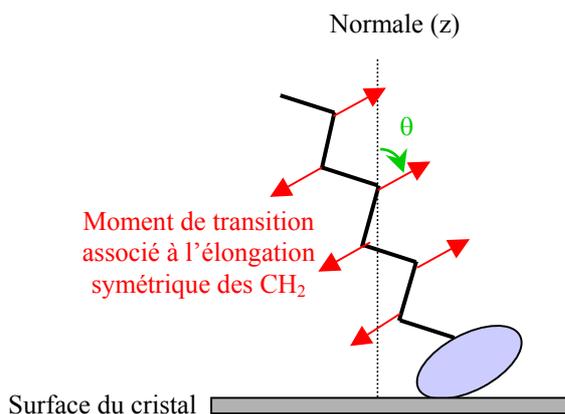


Figure 3.17 : représentation de l'angle θ (°) par rapport à la normale du cristal ATR.

II.3 – La spectroscopie Raman

II.3.1 – Principe

La spectroscopie Raman est un effet de diffusion inélastique des photons. La radiation d'excitation est monochromatique et beaucoup plus énergétique qu'une radiation infrarouge (IR). Au cours de l'interaction entre cette radiation et l'échantillon analysé, le nuage électronique est déformé, les mouvements vibrationnels affectant la polarisabilité électronique. Les photons sont alors diffusés de façon élastique ou inélastique. Lors de la diffusion élastique (diffusion Rayleigh), la molécule est excitée à un état virtuel puis relaxe à l'état fondamental en ré-émettant un photon à la même fréquence que la lumière incidente.

Dans ce cas, la molécule « n'absorbe » pas d'énergie (figure 3.18). Quand la diffusion Raman a lieu, la molécule excitée relaxe à un niveau vibrationnel différent de l'état original.

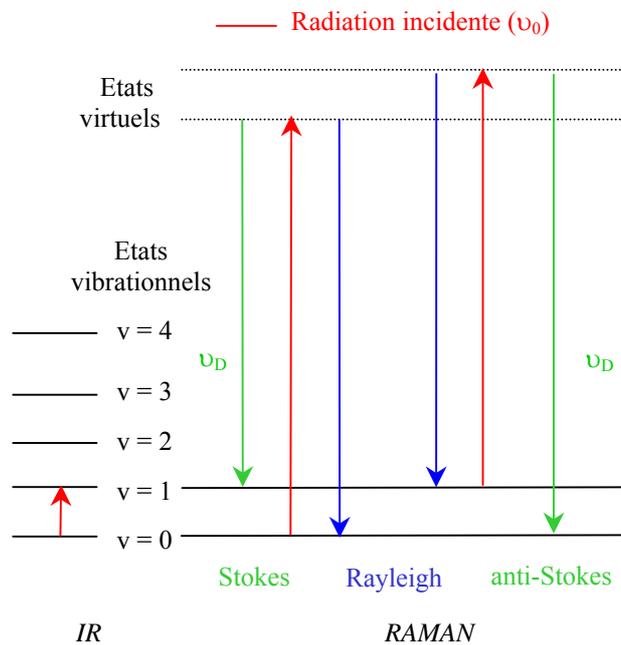


Figure 3.18 : niveaux d'énergie mis en jeu dans les spectroscopies infrarouge et Raman.

L'énergie d'un photon diffusé de manière inélastique est différente de l'énergie de la radiation incidente, on observe alors une création ou une annihilation de phonon. La différence d'énergie entre le photon incident ($E_0 = h.\nu_0$) et le photon diffusé ($E_D = h.\nu_D$) correspond à une variation d'énergie ($\Delta E_{\text{vibration}}$) lorsque la molécule change d'état vibrationnel :

$$h.\nu_0 = h.\nu_D + \Delta E_{\text{vibration}} \quad (\text{eq. 3.23})$$

On parle de diffusion Raman « Stokes », création de phonons, lorsque les fréquences des photons diffusés ν_D sont inférieures à la fréquence excitatrice ν_0 (déplacement vers le rouge). Inversement, si les fréquences ν_D sont supérieures à la fréquence ν_0 , on parle de diffusion Raman « anti-Stokes » où il y a annihilation de phonons (déplacement vers le bleu) (figure 3.19).

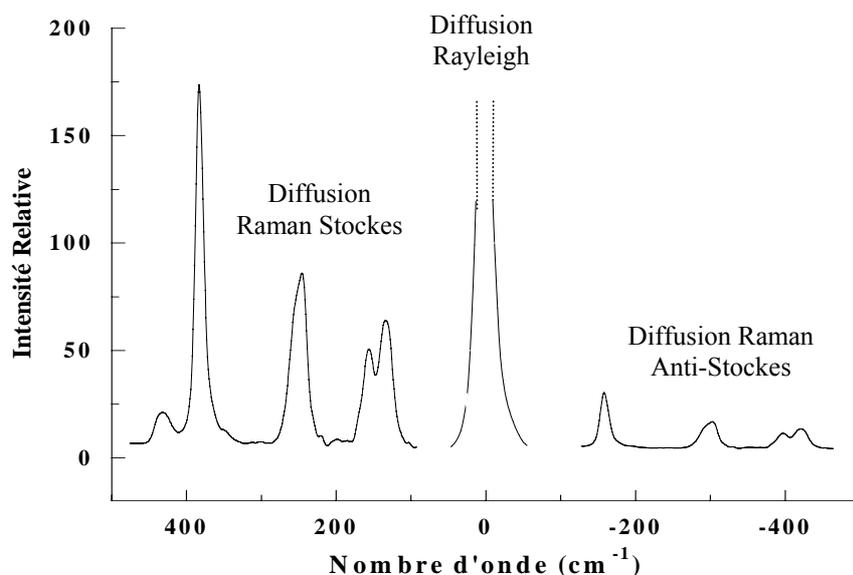


Figure 3.19 : mise en évidence des positions et des intensités des raies Stokes et anti-Stokes par rapport à la raie Rayleigh.

Comme la plupart des molécules se trouvent dans leur état de vibration fondamentale ($v = 0$) à température ambiante, les raies Stokes ont une intensité Raman plus forte que les raies anti-Stokes, qui elles, ont lieu à partir d'un état vibrationnel plus élevé ($v = 1$). Ainsi, les raies Stokes sont plus communément utilisées pour la caractérisation de molécules.

II.3.2 – Règles de sélection

Un mode de vibration est actif en infrarouge lorsqu'il y a une variation du moment dipolaire au cours de l'interaction avec la radiation incidente. Un mode vibrationnel est actif en Raman lorsqu'il y a un changement de polarisabilité induit par la vibration. Les molécules possédant un centre de symétrie n'ont pas de raies fondamentales en commun dans les spectres infrarouge et Raman. Qualitativement, les modes de vibration antisymétriques sont plus intenses en infrarouge tandis que les vibrations symétriques sont souvent fortes en Raman.

II.3.3 – Montage expérimental

Le montage est constitué d'un spectromètre Raman LabRam 800HR (Jobin Yvon) couplé à un microscope (Olympus BX 30). Le schéma optique du micro-spectromètre Raman confocal est présenté figure 3.20. A la sortie du laser (argon ionisé, $\lambda = 514.5$ nm), le faisceau est polarisé suivant y. Le faisceau est ensuite réfléchi par un filtre Notch vers le microscope. Après interaction avec l'échantillon, les faisceaux (Rayleigh et Raman) retournent en chemin

inverse vers le filtre Notch qui réfléchit le faisceau Rayleigh mais transmet le faisceau Raman. Un analyseur définit alors la polarisation de la radiation diffusée. Quatre spectres différents peuvent ainsi être obtenus en faisant varier à la fois l'orientation de la lame demi-onde et celle de l'analyseur. La lumière diffusée est par la suite analysée par le spectromètre. La radiation arrive par la fente d'entrée du spectromètre. Celui-ci est composé de deux miroirs sphériques. Le premier produit un faisceau parallèle qui est renvoyé sur un réseau (dans notre cas, réseau 600 traits/mm) qui sépare les longueurs d'onde. Le deuxième miroir focalise le signal sur le détecteur. Le système de détection multicanal est une caméra CCD (« Charge Coupling Device ») refroidie thermoélectriquement à -70°C . Ce détecteur est bidimensionnel et est composé de 1024×256 pixels. La résolution de la caméra est fixée par la taille de ces pixels. La résolution spectrale dépend de la longueur d'onde, elle est de l'ordre de $1.1 \text{ cm}^{-1}/\text{pixel}$ à 688 nm . L'ensemble du micro-spectromètre Raman est piloté à l'aide d'un ordinateur.

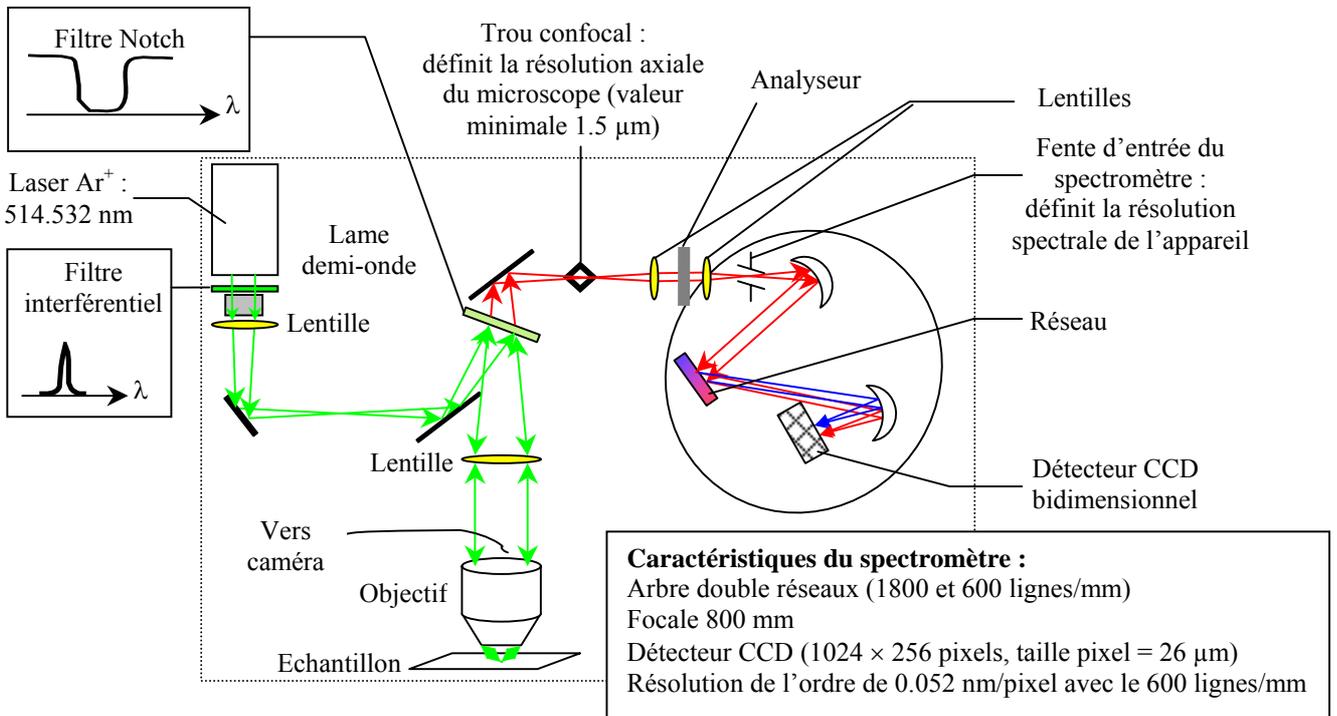


Figure 3.20 : schéma optique du micro-spectromètre Raman.

III – Microscopie à force atomique

Le premier microscope à force atomique (AFM) a été mis au point en 1986 [29]. Son principe est basé sur le contrôle des interactions locales entre une pointe-sonde extrêmement fine et la surface de l'échantillon. La sonde se déplace point par point au dessus de l'échantillon. Sous l'effet des forces d'interaction avec la surface, la distance pointe/surface change et la détection de ses mouvements permet d'obtenir une information tridimensionnelle de la surface (topographie). Les forces détectées sont de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-12} N, tandis que la résolution latérale est de l'ordre de l'angström (0.1 nm).

III.1 – Instrumentation

L'appareil utilisé au cours de ce travail est l'AFM multimode PicoPlus de la société Molecular Imaging. Le montage se divise en plusieurs parties : un tube piézoélectrique permettant les mouvements de la sonde suivant les axes x, y, z ; la sonde (pointe), le système de détection des forces d'interaction et le système d'asservissement et d'acquisition (figure 3.21)

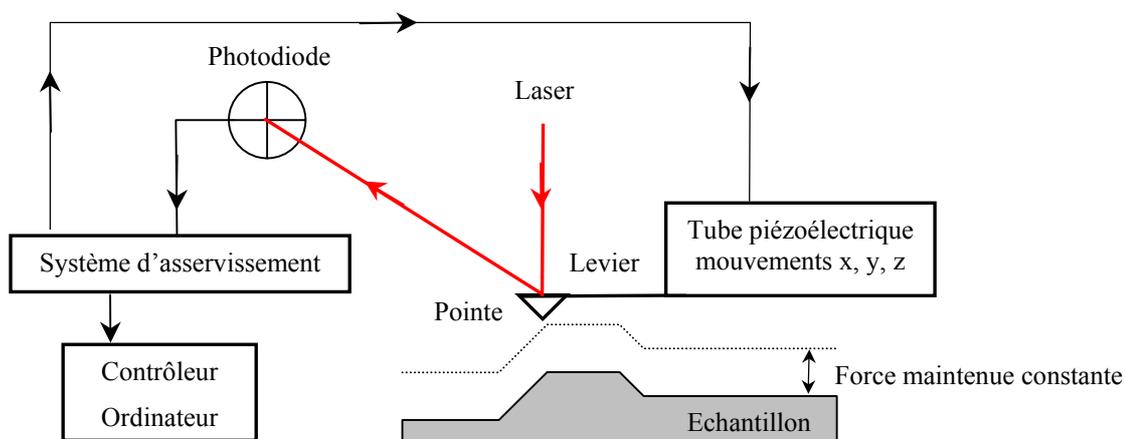


Figure 3.21 : schéma de principe du microscope à force atomique.

Sous l'effet d'une différence de potentiel, la céramique piézoélectrique se déforme permettant ainsi le déplacement tridimensionnel du levier au dessus de l'échantillon. C'est la précision des mouvements du tube (fraction d'angström) qui contribue en grande partie à la haute résolution du microscope. Les pointes utilisées dans ce travail sont en nitrure de silicium. Elles sont fixées sur des leviers triangulaires, eux-mêmes fixés sur un petit support de dimensions $\sim (3.5 \times 1.5)$ mm² (quatre leviers par support). Les leviers ont une épaisseur et une longueur (100 ou 200 μ m) qui déterminent la constante de raideur k de la sonde (figure 3.22).

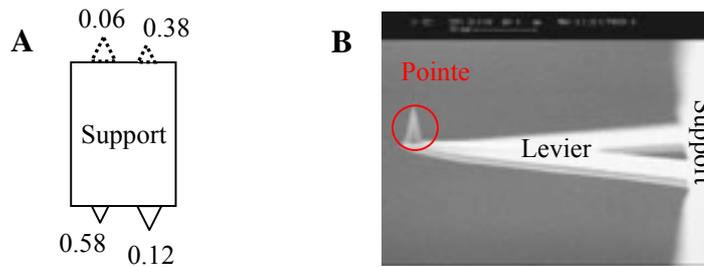


Figure 3.22 : description des sondes AFM utilisées (Scientec). A : les différentes constantes de raideur k (N/m) des leviers, B : visualisation de la pointe par microscopie électronique.

Les leviers les plus utilisés lors de nos études ont une longueur de 200 μm . Leur constante de raideur est de 0.06 N/m. Elle permet de déterminer la force appliquée sur l'échantillon (F) à partir des courbes de force (mesure de la déflexion Δz du micro-levier en fonction de l'élongation du tube piézoélectrique) par la loi de Hooke :

$$F = k \cdot \Delta z \quad (\text{eq. 3.24})$$

Plus la constante de raideur est faible, plus la force appliquée pourra être ajustée à de faibles valeurs car la sensibilité du levier est plus grande. Les leviers sont recouverts d'une fine couche d'or (~ 100 nm) pour permettre la détection de leurs mouvements.

Le système permettant la détection optique est placé au-dessus de la sonde. Un faisceau laser, focalisé à l'extrémité du levier, est réfléchi pour être renvoyé vers une photodiode à quatre cadrans. Au repos (aucune interaction sonde/échantillon), le faisceau est centré sur la photodiode par l'utilisateur. Lors du contact et en cours de balayage, les forces appliquées sur le levier produisent des déviations de l'angle du levier qui impliquent un déplacement de l'impact du faisceau laser sur la photodiode. Les déplacements produisent des photocourants directement proportionnels aux déviations de la déflexion du levier qui subit des forces. Des déplacements aussi faibles que 0.1 nm peuvent être détectés par ce système. Le déplacement de l'impact du faisceau laser traduit la variation de l'angle de fléchissement du levier. La photodiode à quatre cadrans permet de séparer les angles de fléchissement normaux (dus aux forces verticales) et latéraux (dus aux forces de friction).

Le système d'asservissement relie les informations détectées par la photodiode à la position du tube piézoélectrique. Il réajuste la position de l'échantillon pour conserver constante : soit la valeur des forces d'interaction pointe/échantillon par rapport à la force de consigne fixée par l'utilisateur, soit la hauteur de balayage en z de la pointe, soit la distance pointe/échantillon.

Les déplacements effectués par le tube piézoélectrique sont affichés à l'écran sous la forme d'une image 512 points par 512 points. L'échelle des hauteurs est traduite par une variation de couleur ; à chaque point, la hauteur est représentée par une couleur. Les images hauteur donnent la topographie de la surface (forces verticales et latérales). Pour toutes les images présentées dans ce manuscrit, les parties foncées correspondent aux niveaux les plus bas et les parties claires aux niveaux les plus élevés (figure 3.23).

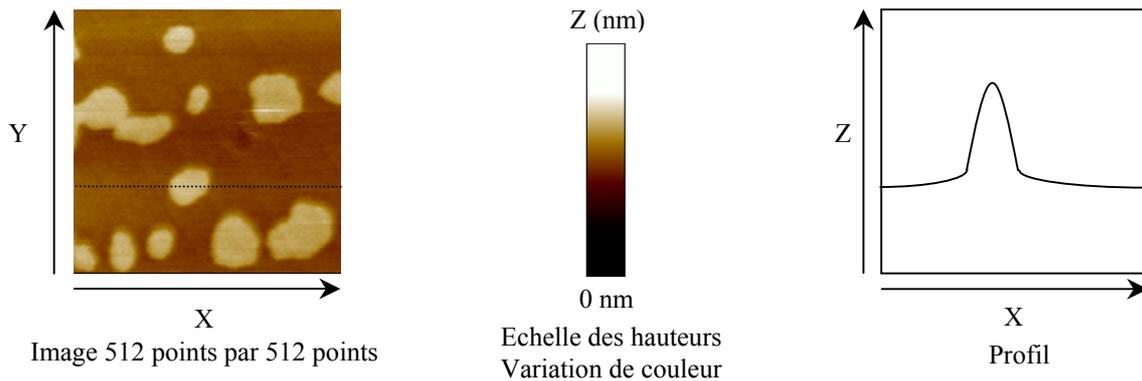


Figure 3.23 : représentation d'une image.

Les images de déflexion et de friction peuvent être enregistrées simultanément. Les images en déflexion accentuent les variations de hauteur ce qui donne des images intermédiaires entre 2D et 3D. Le signal détecté est la dérivée du signal hauteur (figure 3.24)

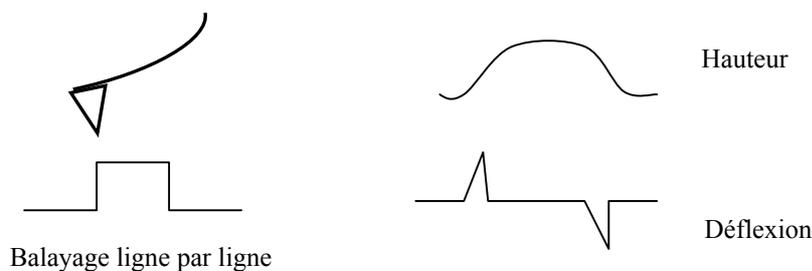


Figure 3.24 : signification des signaux hauteur et déflexion.

III.2 – Modes de fonctionnement

III.2.1 – Mode contact

Au contact réel, le levier est soumis aux interactions répulsives, une déflexion linéaire est ainsi détectée. Différents modes de fonctionnement sont possibles : le mode force constante et le mode hauteur constante. Nous avons choisi de travailler à force constante, mode dans lequel le système d'asservissement maintient la force pointe/échantillon constante. Elle est fixée par l'utilisateur en début de balayage grâce aux courbes de force visualisées à

l'écran (figure 3.25). Elle peut être également réajustée pendant le balayage lorsque l'on constate une dérive.

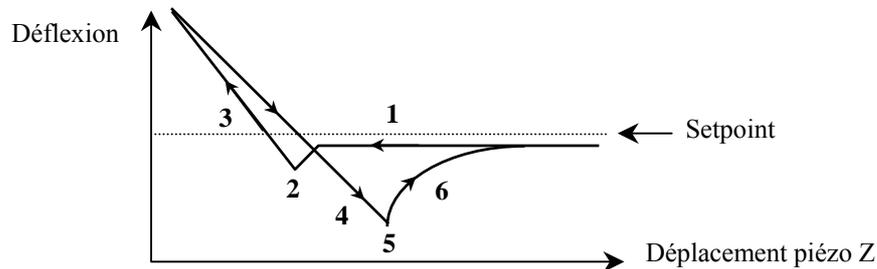


Figure 3.25 : courbe de force en mode contact.

Les courbes de force permettent de mesurer les interactions entre la pointe et l'échantillon. Les courbes enregistrées donnent la mesure de la déflexion du levier (en μm) en fonction de la distance z entre la pointe et l'échantillon (μm). La courbe typique est montrée à la figure 3.25. Nous allons décrire cette courbe.

A l'approche :

- 1 – La distance pointe/échantillon diminue, aucune interaction n'est ressentie par le levier.
- 2 – Le levier fléchit, il est attiré par les forces attractives de la surface. Lorsqu'elles deviennent supérieures à la constante de raideur, il y a instabilité et la pointe entre en contact avec la surface (attraction électrostatique et/ou force de capillarité).
- 3 – La pointe presse la surface, le levier se courbe vers le haut, les forces sont répulsives.

Au retrait :

- 4 – La pression exercée par la pointe diminue, le levier se relâche, les forces s'équilibrent, il y a toujours contact.
- 5 – La distance pointe/échantillon augmente, la pointe est soumise aux forces attractives de la surface et le levier se courbe jusqu'au décrochage (la force de ressort du levier est supérieure à la force d'attraction).
- 6 – La pointe est libre, les interactions sont nulles.

A partir des courbes de force, la force de contact peut être calculée. Cela passe par l'estimation de la sensibilité du système de détection. Elle est égale au rapport du signal de déflexion du levier sur le voltage appliqué au piézo. Sa valeur est donnée par la pente de la courbe de force lorsque la pointe est au contact de la surface. On obtient le nombre de nm par division. Δz est alors facilement déterminé. La constante de raideur du levier étant connue, le calcul est simple d'après l'équation 3.24.

III.2.2 – Mode contact oscillant (Tapping mode)

La première publication utilisant ce mode de balayage date de 1993 [30]. Son utilisation, en particulier en biologie n'a cessé de croître. L'intérêt de ce mode est de réduire la friction et les déformations élastiques des échantillons. La pointe vibre au-dessus de l'échantillon à sa fréquence de résonance ($\sim 5-300$ kHz). Les amplitudes des oscillations varient entre ~ 1 et 200 nm. Au maximum de son amplitude, la pointe est en contact intermittent avec la surface, contact de très courte durée. La boucle d'asservissement réajuste la hauteur de l'échantillon pour maintenir constante l'amplitude d'oscillation.

III.2.3 – Mode non-contact

En mode non-contact, la pointe vibre au-dessus de la surface à une distance telle qu'aucun contact n'ait lieu entre la pointe et l'échantillon ; l'amplitude est faible. Le paramètre important n'est pas dans ce cas la force mais la dérivée de la force attractive en fonction de la distance pointe/surface. Ce mode est peu utilisé en biologie.

IV – Diffraction des rayons X

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde est de l'ordre de l'angström (10^{-10} m), générées par l'impact d'électrons de grande énergie (canon à électrons, synchrotron) sur un métal. Les rayons X sont particulièrement adaptés à l'étude de structures ordonnées dont les paramètres géométriques sont du même ordre de grandeur que la longueur d'onde de la radiation. Ils interagissent avec la matière essentiellement au niveau des électrons (effet Compton, photoélectrique, fluorescence...) mais seule la diffusion cohérente, appelée diffraction, est intéressante dans le cadre d'études structurales. La diffraction des rayons X est obtenue selon des conditions particulières, énoncées par la formule de Bragg pour un cristal parfait (figure 3.25) :

$$2d \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda \quad (\text{eq. 3.25})$$

où d est la distance répétitive entre les plans réticulaires définissant les symétries du cristal (plans repérés par les indices de Miller hkl), θ l'angle de diffraction, λ la longueur d'onde du faisceau incident et n un entier.

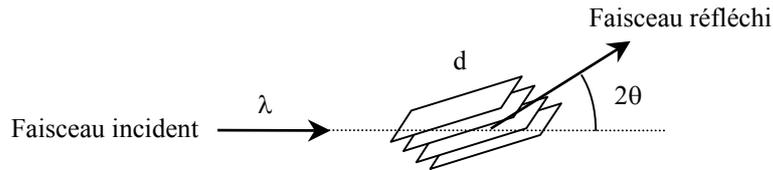


Figure 3.26 : condition de diffraction (loi de Bragg).

En d'autres termes, la cohérence de phase des faisceaux réfléchis par une structure organisée, soit l'interférence constructive de ces faisceaux, est obtenue à un angle θ si la différence de marche ($2d \cdot \sin\theta$) entre faisceaux réfléchis est un multiple entier (n) de la longueur d'onde du faisceau incident (λ). Le faisceau intense résultant d'une telle interférence constructive est appelée réflexion. Connaissant la longueur d'onde du faisceau incident et l'angle de réflexion, il est alors possible de déduire la distance inter-réticulaire correspondante. Suivant la valeur de l'entier n , des réflexions du premier ordre ($n = 1$), second ordre ($n = 2$) ou d'ordre supérieur sont observées. Les diagrammes de diffraction représentent l'intensité diffractée en fonction de la distance réciproque q (\AA^{-1}), cette dernière valant $2\pi/d$. Ces graphiques résultent de l'intégration radiale de clichés de diffraction obtenus par impact des faisceaux réfléchis sur un détecteur plan (2D) (figure 3.27).

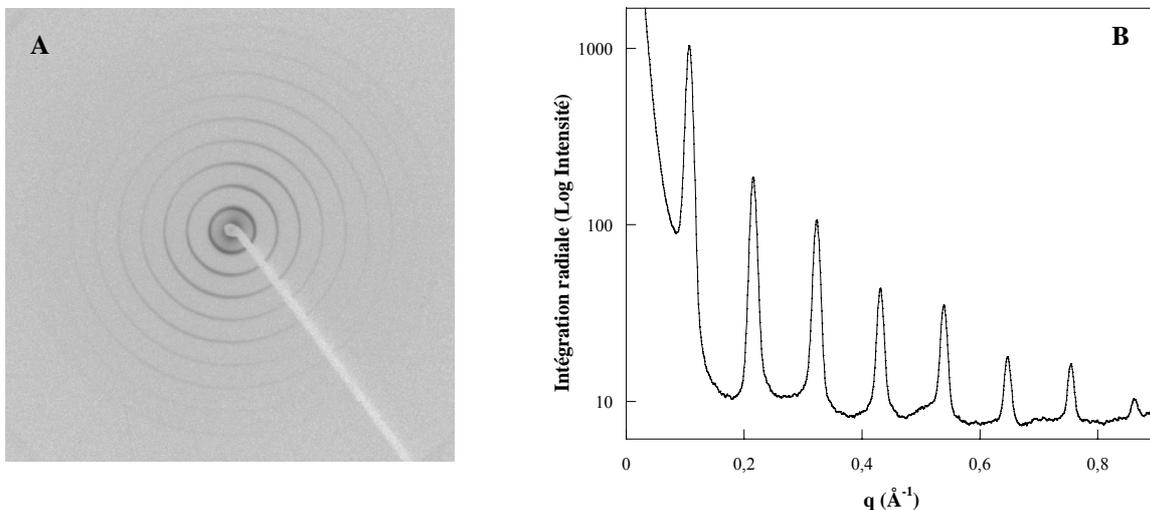


Figure 3.27 : cliché de diffraction (détecteur 2D) et son intégration radiale obtenus pour le béménate d'argent ($d=58.380 \text{ \AA}$). La zone apparaissant blanche sur le cliché correspond à la trace du beamstop, une tige métallique cachant le faisceau incident.

Lorsque plusieurs ordres de réflexion sont enregistrés, il est possible d'accéder à la géométrie et à la taille unitaire du cristal en attribuant le plan réticulaire correspondant (nh , nk , nl) pour chaque ordre, i.e en procédant à l'indexation des pics de diffraction. A cet effet

sont utilisées des équations établies pour différentes géométries de maille et reliant les indices de Miller (hkl) aux positions (q) des réflexions [31].

Selon les tailles des organisations étudiées, il convient d'adapter la distance échantillon/détecteur. Ainsi, pour des distances inter-réticulaires relativement petites sont utilisés des montages grands angles (petite distance échantillon/détecteur) et inversement, pour des distances inter-réticulaires relativement grandes sont utilisés des montages petits angles (figure 3.28).

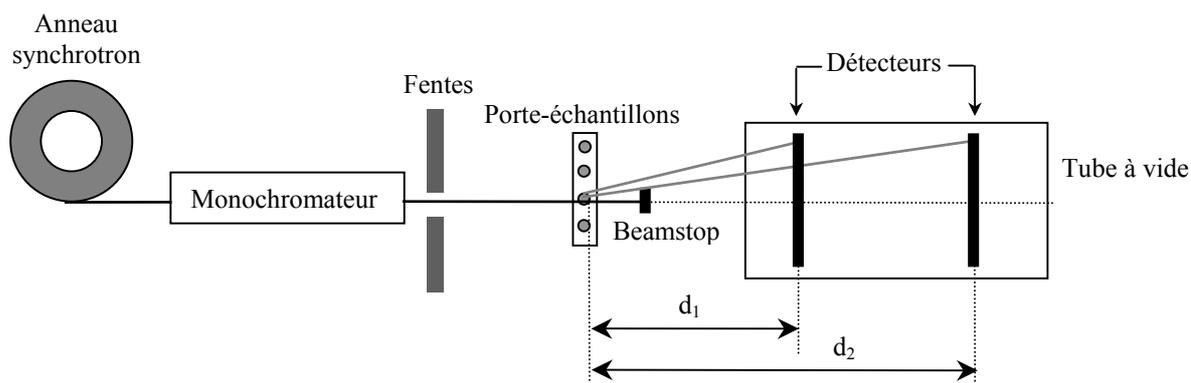


Figure 3.28 : schéma d'un montage de diffraction des rayons X ayant pour source une radiation synchrotron. La distance échantillon-détecteur est optimisée en fonction de l'angle de diffraction ; d_1 : diffraction aux grands angles, d_2 : diffraction aux petits angles.

Bibliographie du Chapitre 3

1. Langmuir, I. 1917. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *JACS*. 39:1848-1906.
2. Blodgett, K.B. 1935. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. *JACS*. 57:1007-1022.
3. Blodgett, K.B. and I. Langmuir. 1937. Built-up films of barium stearate and their optical properties. *Phys. Rev.* 51:964-982.
4. Davies, J.T. and E.K. Rideal. 1963. Interfacial Phenomena. *Second Edition*. Academic Press. New-York and London, Chapter 1.
5. Dervichian, D.G. 1939. Changes of phase and transformations of higher order in monolayers. *J. Chem. Phys.* 7:931-948.
6. Gaines, G.L.J. 1966. In Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. *Prigorine, I., Ed. Interscience*. New York, Chapter 6.
7. Tredgold, R.H. 1994. Order in thin organic films. *Cambridge University Press*.
8. Berge, B. and A. Renault. 1993. Ellipsometry study of 2D crystallization of 1-alcohol monolayers at the water surface. *Europhys. Lett.* 21:773-777.
9. Azzam, R.M.A. and N.M. Bashara. 1977. Ellipsometry and Polarized Light, Elsevier/North Holland, Amsterdam. 340.
10. Jönsson, U., M. Malmqvist, and I. Rönnberg. 1985. Adsorption of immunoglobulin G, protein A, and fibronectin in the submonolayer region evaluated by a combined study of ellipsometry and radiotracer techniques. *J. Colloid Interface Sci.* 103:360-372.
11. de Feijter, J.A., J. Benjamins, and F.A. Veer. 1978. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interfaces. *Biopolymers*. 17:1759-1772.
12. Lamarche, F. 1988. Une approche permettant de qualifier et de quantifier les interactions lipide-protéine et chlorophylle-protéine à l'interface eau/air. *Thèse de l'Université du Québec à Trois-Rivières*.
13. Hénon, S. and J. Meunier. 1991. Microscope at the Brewster angle: direct observation of first-order phase transitions in monolayers. *Review of Scientific Instruments*. 62:936-939.
14. Hönig, D. and D. Möbius. 1991. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *Journal of physical chemistry*. 95:4590-4592.

15. de Mul, M.N.G. and J. J. Adin Mann. 1998. Determination of the thickness and optical properties of a Langmuir film from the domain morphology by Brewster angle microscopy. *Langmuir*. 14:2455-2466.
16. Zakri-Delplanque, C. 1997. Etude de la fusion-cristallisation de monocouches de 1-alcools à la surface de l'eau: mesures d'élasticité latérale par diffraction de rayons X et par une méthode mécanique. *Thèse de doctorat de l'université Grenoble 1*.
17. Saccani, J. 2003. Réalisation de systèmes membranaires modèles et étude de leur organisation par microscopie à l'angle de Brewster, spectroscopie PM-IRRAS et dichroïsme circulaire vibrationnel. *Thèse de doctorat de l'université Bordeaux 1*.
18. Blaudez, D., J.-M. Turllet, Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, and B. Desbat. 1996. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92:525-530.
19. Arrondo, J.L.R., A. Muga, J. Castresana, and F.M. Goni. 1993. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59:23-56.
20. Byler, M.D. and H. Susi. 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*. 25:469-487.
21. Dousseau, F. and M. Pézolet. 1990. Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. *Biochemistry*. 29:8771-8779.
22. Williams, R.W. 1986. Protein secondary structure analysis using Raman amide I and amide III spectra. *Methods Enzymol.* 130:311-331.
23. Fasman, G.D. 1967. Poly- α -amino acids. Protein models for conformational studies. Chap. 2. Infrared spectra and helical conformations. *T. Miyazama. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York*.
24. Goormaghtigh, E., V. Cabiaux, and J.M. Ruyschaert. 1994. Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. *Subcellular Chemistry*. chap. 10:
25. Fringeli, U.P. and H.H. Günthard. 1981. Infrared membrane spectroscopy. In *Membrane Spectroscopy. E. Grell, editor. Springer-Verlag, New-York*. 270-332.
26. Citra, M.J. and P.H. Axelsen. 1996. Determination of molecular order in supported lipid membranes by internal reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biophysical Journal*. 71:1796-1805.

27. Harrick, N.J. 1965. Electric field strengths at totally reflecting interfaces. *J. Opt. Soc. Am.* 55:851-857.
28. Buffeteau, T. and M. Pézolet. 2002. Linear Dichroism in Infrared Spectroscopy. *In Handbook of Vibrational Spectroscopy. John M. Chalmers and Peter R. Griffiths (Editors).* John Wiley & Sons, Ltd, Volume 1:693-710.
29. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber. 1986. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56:930-933.
30. Zhong, Q., D. Inniss, K. Kjoller, and V.B. Elings. 1993. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Sci. Lett.* 290:L688-L692.
31. Guinier, A. 1964. Théorie et technique de la radiocristallographie. *Dunod. Paris.*

CHAPITRE 4

ETUDE STRUCTURALE DES GALACTOLIPIDES DU BLE

| | |
|--|-----|
| I - Etude des monocouches lipidiques aux interfaces liquide/air et solide/air | |
| I.1 – Isothermes de compression | 98 |
| I.2 – Ellipsométrie et microscopie à l'angle de Brewster | 100 |
| I.3 – Spectroscopie PM-IRRAS | 103 |
| I.4 – Observations par microscopie à force atomique (AFM) | 105 |
| I.5 – Rhéologie de surface | 107 |
| II - Etude des mésophase liquide-cristallines en milieu aqueux | |
| II.1 – Diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS) | |
| II.1.1 – Phase formée par le système DGDG/eau..... | 109 |
| II.1.2 – Phase formée par le système MGDG/eau..... | 114 |
| II.1.3 – Phase formée par le système MGDG/DGDG/eau..... | 117 |
| II.2 – Microscopie à l'angle de Brewster au-delà du collapse | 120 |
| II.3 – Spectroscopie Raman et infrarouge | 122 |
| Conclusion et discussion relatives au chapitre 4 | 125 |
| Bibliographie | 128 |

CHAPITRE 4

ETUDE STRUCTURALE DES GALACTOLIPIDES DU BLE

Tandis que la plupart des recherches ont été menées dans le but de comprendre le rôle des galactolipides dans l'appareil photosynthétique, très peu de travaux ont été consacrés à ces galactolipides dans les plastes¹ des organes des plantes autotrophes², i.e les graines, les tubercules et les racines. Ces plastes jouent un rôle central dans la synthèse et la réserve de différents « produits finis » tels que les pigments, l'amidon ou les protéines, et on pourrait s'attendre à ce que la composition lipidique de leurs enveloppes régule leurs fonctions. Les galactolipides des amyloplastes diffèrent principalement de ceux des chloroplastes par leur composition en acides gras. Tandis que les galactolipides des amyloplastes sont riches en acide linoléique (C18:2), les galactolipides des chloroplastes se concentrent en acide linoléique (C18:3) (tableau 1.1). Cette différence pourrait avoir un impact considérable sur la forme générale des galactolipides, un paramètre qui est étroitement relié aux propriétés de phase liquide-cristalline des lipides polaires [1]. Cependant, des études préliminaires ont indiqué que les galactolipides isolés à partir d'amyloplastes adoptent des phases liquide-cristallines similaires à celles des chloroplastes [2].

En plus du rôle biologique des galactolipides dans les diverses fonctions des plastes, ils sont aussi impliqués dans les transformations technologiques des produits issus des plantes. Ils jouent en effet un rôle dans les procédés de transformation des grains de blé en farine et en produits cuits, comme par exemple dans la rétention de gaz dans la pâte à pain en formant des films stables lipoprotéiques aux interfaces liquide/air [3]. Ils pourraient aussi être impliqués dans le compactage étroit de l'endosperme du blé qui définit les phénotypes dur (compact) ou tendre (friable) des blés hexaploïdes, et, par conséquent, dans les propriétés de mouture [4]. En particulier, il a été montré que les dépôts de lipides trouvés entre la matrice protéique et les granules d'amidon de l'endosperme d'un blé dur sont organisés en structures non lamellaires, probablement en structures hexagonales ou cubiques [5]. De façon remarquable, il existe d'étroites relations entre dureté et extractibilité des lipides polaires avec des solvants apolaires. Par exemple, une corrélation négative a été trouvée pour le galactolipide MGDG ne formant pas de bicouches, tandis qu'une positive a été observée pour le DGDG, le galactolipide formant des phases lamellaires [6]. Il a été

¹ le plaste est un organite cellulaire possédant un ADN propre. On distingue quatre types de plastes : les chloroplastes, où a lieu la photosynthèse, contiennent la chlorophylle ; les chromoplastes contiennent un pigment coloré autre que la chlorophylle ; les leucoplastes, sans pigment, et les amyloplastes, servent respectivement au stockage des protéines et des granules d'amidon.

² autotrophe : se dit des organismes (plantes chlorophylliennes, certaines bactéries) capables de se développer à partir des seuls éléments minéraux.

également suggéré que l'extractibilité des lipides polaires pourrait être influencée par leur phase liquide-cristalline [3].

Par rapport aux différentes fonctions de ces lipides uniques des plantes, les propriétés d'association des galactolipides MGDG et DGDG de l'endosperme du blé ont été examinées dans ce chapitre, aux interfaces liquide/air et en phases liquide-cristallines hydratées. Dans ce but, différentes techniques physiques complémentaires ont été associées pour mettre en évidence les propriétés de compactage des galactolipides du blé en monocouche (films de Langmuir) et en solution aqueuse. Les deux galactolipides étant présents dans le grain, une attention particulière a été portée à leur mélange équimolaire.

I – Etude des monocouches lipidiques aux interfaces liquide/air et solide/air

Pour examiner les propriétés des films de Langmuir de galactolipides formés à l'interface liquide/air, plusieurs techniques ont été utilisées. Tout d'abord, les isothermes de compression apportent des informations sur l'aire occupée par les molécules à leur point de compressibilité maximale et sur l'état physique des chaînes carbonées. Les mesures d'ellipsométrie couplées à la microscopie à l'angle de Brewster permettent d'obtenir des informations sur l'épaisseur des films, tandis que l'orientation des têtes oses galactosyl est déterminée d'après les spectres PM-IRRAS. Finalement, les prélèvements de Langmuir-Blodgett sont visualisés par microscopie à force atomique à basse (15 mN/m) et forte (35 mN/m) pression de surface. Dans le but d'alléger le manuscrit, le détail des procédures expérimentales est reporté dans l'annexe 2.

I.1 – Isothermes de compression

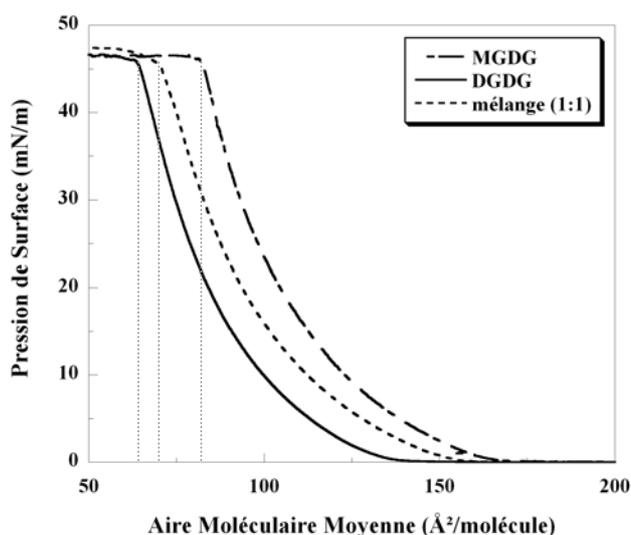


Figure 4.1 : isothermes de compression du MGDG, mélange équimolaire et DGDG à 19°C. Les traits pointillés correspondent aux aires moléculaires moyennes minimales des lipides.

La figure 4.1 montre les isothermes de compression du MGDG, DGDG et du mélange équimolaire de ces deux lipides. L'incertitude sur la mesure de l'aire moléculaire moyenne est de $\pm 2 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$.

Jusqu'à l'apparition du collapse, les trois courbes montrent une augmentation régulière de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire moyenne, sans épaulement ni point d'inflexion. Cela indique la présence d'une phase unique attribuée à la phase liquide expansé

(LE), en accord avec la haut degré d'insaturation des chaînes acyl qui limite le compactage moléculaire [7]. Les pressions de collapse sont proches de 46 mN/m pour MGDG et DGDG, et 47 mN/m pour le mélange équimolaire. Ces fortes valeurs indiquent une bonne pureté des lipides comme indiqué par Tancredi et al [8].

Du début à la fin de l'isotherme, le DGDG occupe une aire moléculaire moyenne plus petite que celle du MGDG et du mélange équimolaire. L'aire moléculaire moyenne minimale correspond à l'abscisse du point d'intersection entre la tangente au plateau du collapse et la tangente à la pente de la courbe en fin d'isotherme. Les aires moléculaires moyennes minimales obtenues sont de : 64, 70 et 82 Å²/molécule pour le DGDG, le mélange équimolaire et le MGDG, respectivement (figure 4.1). Bien que la tête polaire du DGDG possède deux groupes galactosyl, son aire moléculaire moyenne à l'interface est plus petite que celle du MGDG dont la tête polaire n'est composée que d'un seul groupe galactosyl.

Cette observation a déjà été faite avec des galactolipides extraits de feuilles d'orge [9] mais plusieurs auteurs ont constaté le phénomène inverse avec des galactolipides de la membrane photosynthétique [10] et d'autres issus de feuilles de haricot [11]. Dans le cas des lipides de l'amyloplaste du blé, nous attribuons ce phénomène à deux contributions principales.

D'une part, nous avons vu au chapitre 2 que les deux galactolipides ont des indices de double liaison différents : 2.0 pour MGDG et 1.8 pour DGDG. En effet, le DGDG possède plus de chaînes saturées (10% de C16:0) par rapport au MGDG (2.5% de C16:0). Cette différence semble avoir un rôle important sur les propriétés de compactage des lipides à l'interface, comme nous l'observons sur les isothermes.

D'autre part, on ne peut pas négliger l'effet des têtes polaires. De par leur nature galactosyl, les têtes ont une forte tendance à former des liaisons hydrogène entre elles ainsi qu'avec les molécules d'eau de la sous-phase. Une forte association avec les molécules d'eau limite le compactage des têtes à l'interface [10]. Ainsi, comme le DGDG possède deux groupes galactosyl, on peut penser que les têtes forment des liaisons hydrogène surtout entre elles et moins avec l'eau. De plus, une étude récente suggère que les interactions dues aux liaisons hydrogène dans le DGDG sont plus importantes que l'effet d'insaturation des acides gras [12].

Bilan intermédiaire

Les isothermes des lipides purs et du mélange équimolaire sont typiques d'une phase liquide expansé signifiant que les lipides sont en phase fluide tout au long de la compression.

Un décalage au niveau des aires moléculaires moyennes est observé entre les trois courbes. Le DGDG occupe une aire moléculaire moyenne inférieure à celle du MGDG tandis que le mélange est intermédiaire. Cette observation est attribuée à un effet des chaînes acyl qui sont plus insaturées pour le MGDG que le DGDG ainsi qu'à un effet des têtes galactosyl qui pourraient s'orienter de façon à maximiser leur contact dans le cas du DGDG améliorant ainsi le compactage des molécules.

I.2 – Ellipsométrie et microscopie à l'angle de Brewster

Les images de microscopie à l'angle de Brewster (BAM) ont été réalisées sur les lipides purs uniquement. L'évolution des niveaux de gris (réflectivité) permet de visualiser l'état de la surface au cours de la compression des molécules. Le contraste des images a été corrigé de la même manière pour pouvoir comparer les intensités des niveaux de gris (logiciel : PhotoShop). Les légendes indiquent la pression de surface à laquelle l'image a été prise ainsi que l'aire moléculaire moyenne A correspondante exprimée en $\text{\AA}^2/\text{molécule}$.

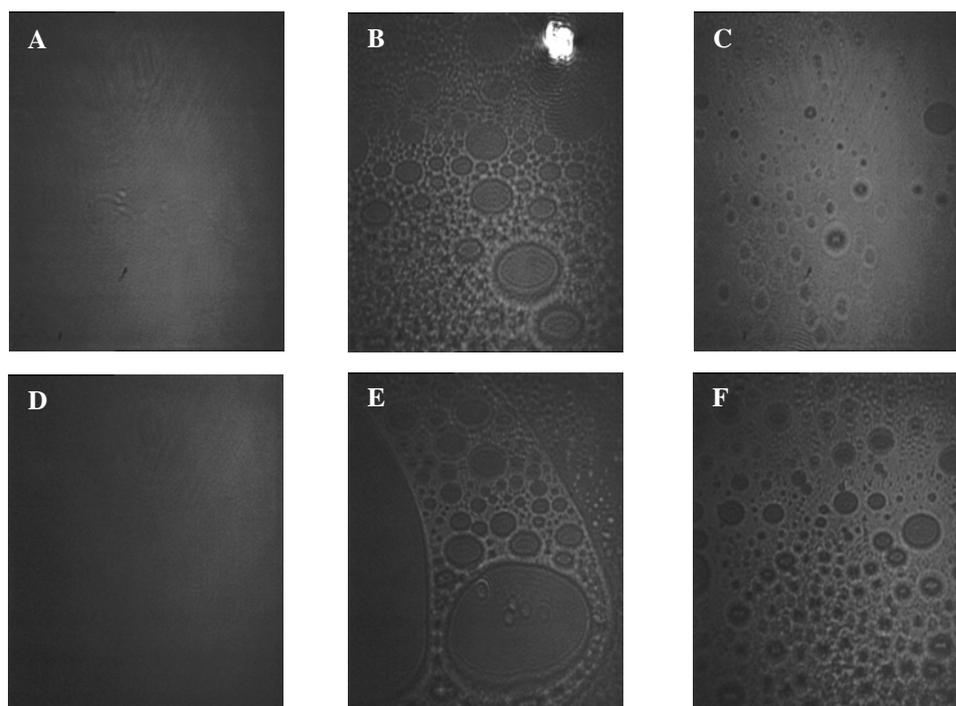


Figure 4.2 : images Brewster ($430 \times 540 \mu\text{m}^2$) réalisées au début de la compression des lipides.

MGDG : A : interface non recouverte de lipides, B : $\pi = 0.2 \text{ mN/m}$ ($A = 168$), C : $\pi = 0.5 \text{ mN/m}$ ($A = 163$)

DGDG : D : interface non recouverte de lipides, E : $\pi = 0.2 \text{ mN/m}$ ($A = 139$), F : $\pi = 0.5 \text{ mN/m}$ ($A = 134$).

Les images Brewster réalisées sur la sous phase (figure 4.2, images A et D) permettent de définir le niveau de gris de départ. Après le dépôt des lipides à l'interface et à basse

pression de surface ($\pi = 0.2$ mN/m, images B et E), on identifie les phases gaz (fond noir qui correspond à des zones non recouvertes de molécules) et liquide expansé (zones claires correspondant aux régions lipidiques). Les deux films ont le même comportement en ce qui concerne la forme des domaines observés. Les images prises à 0.5 mN/m (images C et F) montrent que le film évolue très rapidement. Les films ne sont pas encore homogènes mais les zones claires tendent à se regrouper. Dès 1 mN/m (images non montrées), les films sont totalement homogènes à la surface comme en témoigne le niveau de gris continu.

Parallèlement, des mesures d'ellipsométrie et des images Brewster ont été enregistrées pour des aires moléculaires moyennes plus petites (figure 4.3).

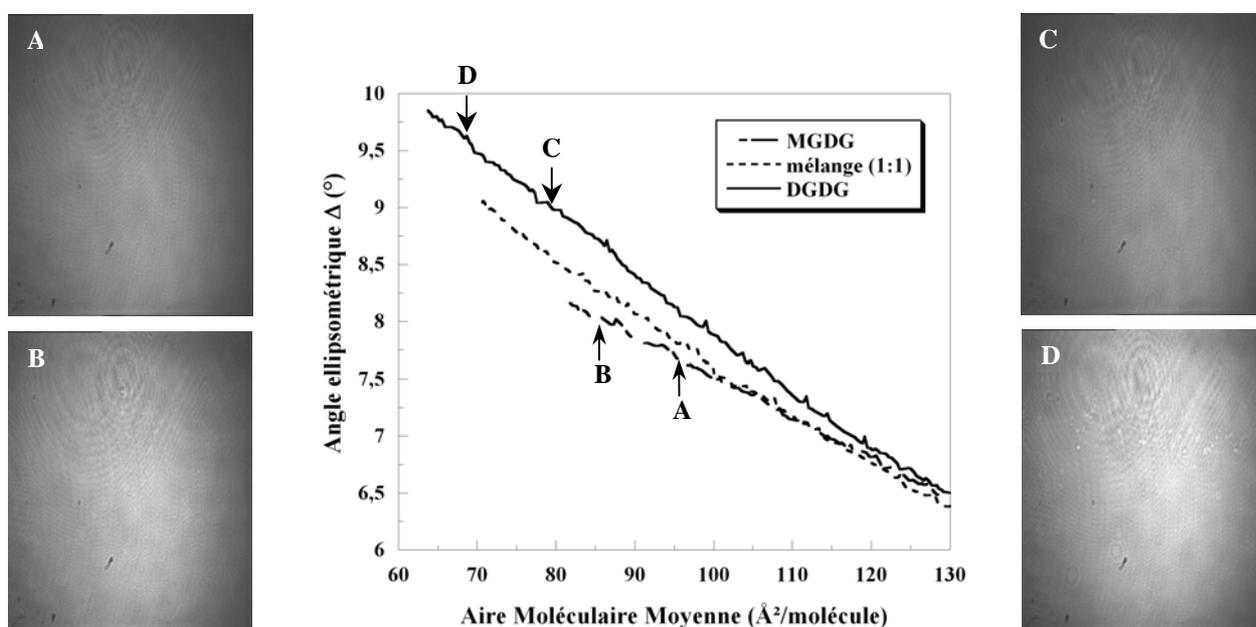


Figure 4.3 : courbes montrant l'évolution de l'angle ellipsométrique delta en fonction de l'aire moléculaire moyenne du MGDG, mélange équimolaire et DGDG à 19°C. Images Brewster ($430 \times 540 \mu\text{m}^2$) réalisées au cours de la compression des lipides purs. MGDG : A : $\pi = 27.0$ mN/m ($A = 96$), B : $\pi = 40.3$ mN/m ($A = 86$). DGDG : C : $\pi = 25.0$ mN/m ($A = 79$), D : $\pi = 40.0$ mN/m ($A = 68$).

Les images Brewster réalisées à plus fortes pressions de surface (figure 4.3) montrent une évolution de la réflectivité qui devient de plus en plus intense au fur et à mesure que la pression de surface augmente. C'est une conséquence de la variation de l'indice de réfraction et de l'épaisseur du film au cours de la compression [13]. En fin de compression (figure 4.3, images B et D), on constate que le niveau de gris sur les images du DGDG est plus clair que pour le MGDG. A ce point, le problème majeur est que nous ne connaissons pas les indices de réfraction des galactolipides et il nous est donc difficile de tirer des conclusions quant à

l'épaisseur des films. Pour obtenir plus d'informations, des mesures d'ellipsométrie ont été réalisées.

La figure 4.3 montre l'évolution de l'angle ellipsométrique Δ en fonction de l'aire moléculaire moyenne pour les monocouches de MGDG, DGDG et leur mélange équimolaire. Les incertitudes de mesure valent : $\pm 0.04^\circ$ pour le MGDG, $\pm 0.07^\circ$ pour le DGDG et $\pm 0.14^\circ$ pour le film mixte. Chaque monocouche est comprimée jusqu'à son aire moléculaire moyenne minimale (avant l'apparition du collapse).

A l'aire moléculaire initiale ($130 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$), Δ a environ la même valeur pour les trois monocouches lipidiques. Au delà de $120 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$, Δ devient plus fort pour le DGDG que pour le MGDG. Comme pour les isothermes, aucun plateau n'est observé et les valeurs finales des angles sont : 9.85° pour le DGDG, 9.04° pour le mélange équimolaire et 8.10° pour le MGDG. Au point de compressibilité maximale, i.e au début du collapse, la différence entre les angles ellipsométriques du MGDG et du DGDG vaut au moins 1.64° .

Si la réflectivité des images Brewster était déterminée uniquement par les chaînes hydrophobes des lipides, les niveaux de gris au point de compressibilité maximale devraient être identiques pour les deux galactolipides étant donné qu'ils ont des compositions en acide gras très proches (majorité de C18:2). Ce n'est pas le cas (figure 4.3, images B et D) et cela met en évidence la nécessité de prendre en compte l'effet des groupes oligosaccharides, comme l'ont montré Tamada et al [14].

La différence entre les deux lipides réside en la présence d'un groupe galactosyl supplémentaire dans la tête polaire du DGDG par rapport à celle du MGDG. Ainsi, si l'on raisonne sur un modèle « quatre phase » [14] (air/chaîne/tête/eau), la seule différence entre les deux lipides provient de la partie tête qui est plus dense pour le DGDG. Par une mesure d'ellipsométrie sur des solutions de saccharose à différentes concentrations (indices de réfraction connus), nous avons pu déterminer la dépendance des angles ellipsométriques Ψ et Δ et des indices de réfraction. Nous avons ainsi conclu que la variation de l'angle Δ est essentiellement affectée par la variation d'épaisseur du film (annexe 3).

Bilan intermédiaire

Pour les deux lipides, on observe la formation de films continus et homogènes à l'échelle du micromètre. Les images Brewster corroborent l'allure des isothermes ; on ne visualise pas de domaine à l'interface ce qui est en accord avec une phase liquide expansé.

L'évolution régulière des angles ellipsométriques témoigne de films lipidiques homogènes à l'interface. D'après les valeurs des angles ellipsométriques Δ mesurées avant le collapse, il semblerait que le film de DGDG (9.85°) soit plus épais que celui de MGDG (8.10°), le mélange ayant un épaisseur intermédiaire.

I.3 – Spectroscopie PM-IRRAS

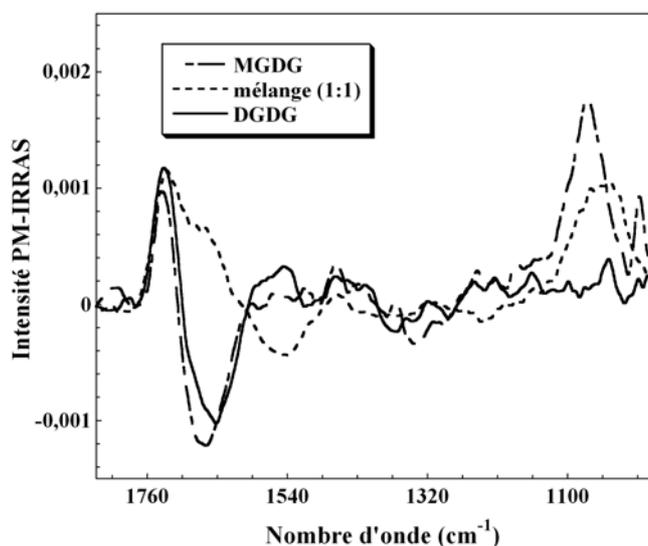


Figure 4.4 : spectres PM-IRRAS réalisés à 19°C dans la région 1850 à 950 cm^{-1} de monocouches de MGDG, mélange équimolaire et DGDG comprimées à 35 mN/m .

La figure 4.4 montre les spectres PM-IRRAS des galactolipides comprimés à 35 mN/m dans la région 1850 - 950 cm^{-1} . Dans cette région, on observe les modes de vibration suivants : la bande d'élongation du groupe carbonyle C=O (autour de 1735 cm^{-1}), l'effet spécifique IRRAS de l'eau (autour de 1665 cm^{-1}), la bande de flexion des groupes méthylène présents dans les chaînes acyl δCH_2 (autour de 1464 cm^{-1}) et la vibration d'élongation des liaisons C-O-C des groupes galactosyl (autour de 1050 cm^{-1}).

Les spectres montrent des différences au niveau de la bande assignée à la vibration d'élongation du C=O. En effet, un déplacement vers les faibles nombres d'onde est observé à partir du MGDG (1736 cm^{-1}), vers le DGDG (1734 cm^{-1}) puis le mélange équimolaire (1729 cm^{-1}). Cela met en évidence des hydratations différentes du groupe carbonyle C=O. En effet, un tel décalage est généralement relié aux liaisons hydrogène entre les groupes carbonyle et les molécules d'eau, comme vu pour des monocouches de DMPC où la bande C=O évolue de 1737 à 1728 cm^{-1} quand la pression de surface diminue de 34 à 0.1 mN/m [15]. De plus, il a été montré pour des phospholipides en solution que la bande carbonyle apparaît à 1740 cm^{-1}

pour des C=O libres, tandis qu'elle apparaît à 1726 cm^{-1} pour des C=O hydratés qui forment des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau [16, 17]. Finalement, une étude récente a montré la formation de liaisons hydrogène entre les groupes carbonyle de phosphatidylcholine et des molécules de saccharose [18]. Dans notre cas, la position de la bande C=O doit être fortement influencée par l'hydratation des groupes carbonyle mais aussi par la formation de liaisons hydrogène entre ces groupes et les résidus galactosyl des têtes polaires des lipides. Le nombre d'onde de la bande C=O à 35 mN/m est plus faible pour le mélange équimolaire (1729 cm^{-1}) indiquant que celui-ci est plus hydraté que les deux lipides purs, même à forte pression de surface. Cette faible valeur de nombre d'onde suggère également que le réseau de liaisons hydrogène entre les groupements carbonyle et galactosyl est perturbé pour le mélange équimolaire ce qui pourrait être dû à de fortes interactions entre les groupes mono- et di-galactosyl du MGDG et du DGDG.

Le creux profond autour de 1665 cm^{-1} observé sur les spectres du MGDG et du DGDG est un effet optique de la technique IRRAS dû à la forte dispersion de l'indice de réfraction de l'eau liquide. Pour le mélange équimolaire, le spectre est clairement différent de ceux des lipides purs avec disparition du creux et apparition d'une bande positive à 1670 cm^{-1} et d'une négative à 1545 cm^{-1} . Cela signifie que les molécules d'eau interfaciales sont fortement perturbées et cela témoigne ainsi des interactions spécifiques qui ont lieu entre les têtes mono- et di-galactosyl.

Finalement, des changements significatifs sont observés dans la région $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ correspondant à la vibration d'élongation des liaisons C-O-C des groupes galactosyl. Pour la monocouche de MGDG, une bande positive centrée à 1068 cm^{-1} est observée, bande absente pour le film de DGDG bien qu'une faible contribution apparaisse à 1035 cm^{-1} . D'après les règles de sélection de PM-IRRAS à l'interface air/liquide [19] (figure 3.17), l'orientation des têtes oligosaccharides a été estimée grâce à cette bande C-O-C. La bande positive observée pour le MGDG correspond à une orientation parallèle des groupes mono-galactosyl par rapport au plan de l'interface. L'absence de cette bande pour le DGDG est caractéristique d'un angle d'orientation moyen de 40° des groupes di-galactosyl par rapport à la normale à l'interface. Pour le mélange équimolaire, une bande plus large et moins intense est observée, qui peut être décomposée en deux bandes d'intensité similaire centrées à 1068 cm^{-1} , comme observé pour le MGDG seul, et à 1035 cm^{-1} . Cette dernière bande pourrait être due aux têtes di-galactosyl du DGDG tandis que la première serait due au MGDG. Cette hypothèse est supportée par le fait que l'intensité de la bande du MGDG dans le mélange équimolaire est deux fois plus faible, ce qui est dû à l'effet de dilution du MGDG dans le

mélange des deux galactolipides. Cela suggère que, dans le mélange, le groupe mono-galactosyl du MGDG force le groupe di-galactosyl du DGDG à adopter une orientation plus parallèle à l'interface. Les différentes orientations adoptées par les groupes galactosyl pourraient être modulées par le réseau de liaisons hydrogène formé entre les têtes polaires et les molécules d'eau.

Bilan intermédiaire

Des hydratations différentes du groupe carbonyle C=O ont été mises en évidence. Ainsi, les groupes carbonyle dans le mélange équimolaire sont très hydratés, même à forte pression de surface. Au contraire, ces groupes présentent une faible hydratation dans le MGDG. Les règles de sélection de PM-IRRAS ont permis de conclure quant à l'orientation des groupes mono- et di-galactosyl. Les cycles mono-galactosyl s'orientent parallèlement à l'interface dans le MGDG tandis que les groupes di-galactosyl adoptent une orientation d'environ 40° par rapport à la normale à l'interface dans le DGDG. Dans le mélange équimolaire, les groupes mono-galactosyl induisent une réorientation des groupes di-galactosyl du DGDG qui semblent s'orienter parallèlement à l'interface. Cela suggère de fortes interactions entre les têtes polaires du MGDG et du DGDG dans le mélange, notamment via des liaisons hydrogène. Cette hypothèse est supportée par le fait que la couche d'eau interfaciale est très perturbée dans le cas du mélange équimolaire, comme en témoigne la forme du creux de l'eau.

I.4 – Observation par microscopie à force atomique

Les prélèvements de Langmuir-Blodgett (LB) ont été observés par microscopie à force atomique (AFM) en mode contact à l'air en utilisant un scanner de 10 × 10 μm². Les images topographiques sont acquises en maintenant la force pointe/échantillon constante avec des pointes en nitrure de silicium de constante de force 0.06 N/m. Les images sont considérées comme représentatives de l'échantillon après avoir sondé au moins cinq zones de trois échantillons préparés à des jours différents.

Sur les images AFM que l'on présente, on remarque la présence de larges bandes verticales. Elles proviennent du fait que les épaisseurs sondées sont extrêmement faibles par rapport à la taille du scanner provoquant alors des interférences avec le laser.

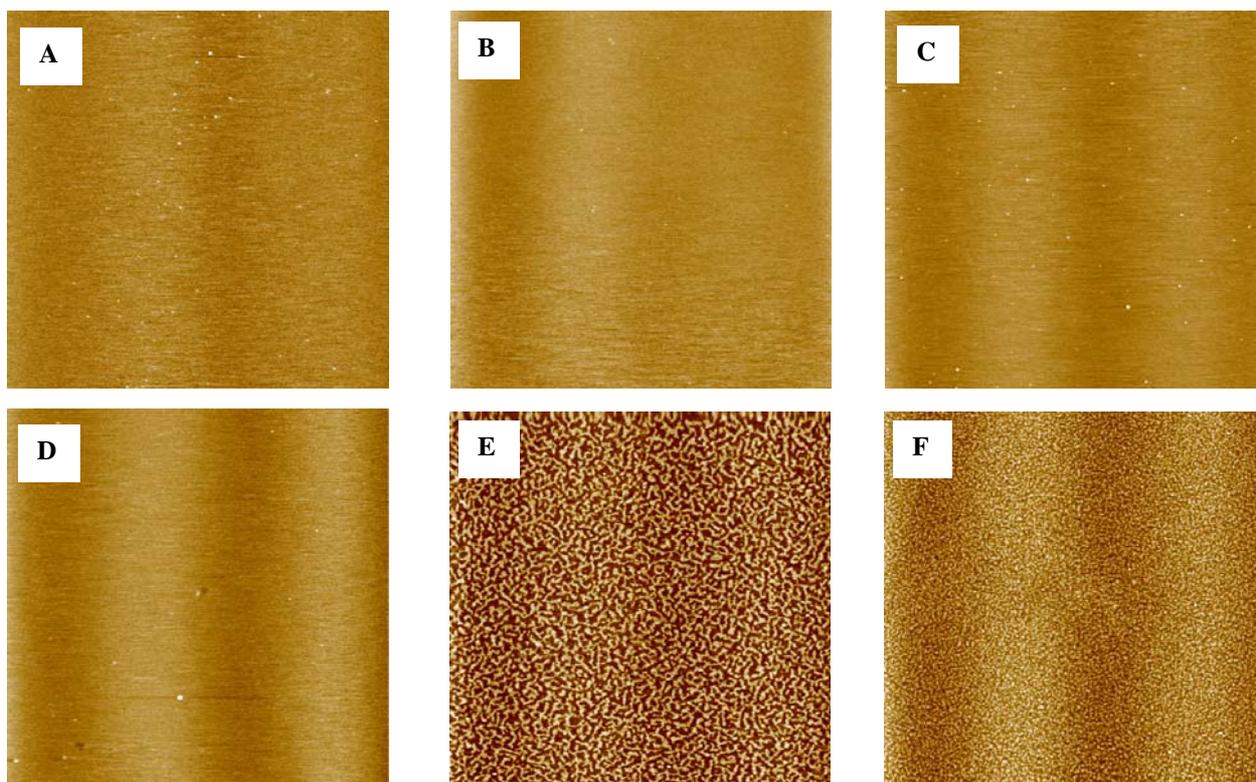


Figure 4.5 : images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) des films LB de galactolipides. A, B, C : DGDG, MGDG et mélange équimolaire à 15 mN/m, respectivement. D, E, F : DGDG, MGDG et mélange équimolaire à 35 mN/m, respectivement. L'échelle en z est de 20 Å.

La figure 4.5 montre les films de Langmuir-Blodgett des galactolipides examinés par AFM à 15 et 35 mN/m. Les trois films sont homogènes à 15 mN/m : il n'y a ni ségrégation ni séparation de phase visible (A, B, C). Aucun changement n'est détecté pour le film de DGDG lorsque la pression de surface est augmentée jusqu'à 35 mN/m (D), tandis qu'une ségrégation apparaît pour le MGDG (E) et pour le mélange équimolaire (F). Pour le MGDG, cette rugosité est perçue dès 20 mN/m et les structures sont clairement visibles à partir de 25 mN/m. Au fur et à mesure que la pression de surface augmente, les structures formées par le MGDG se densifient, comme observé à la figure 4.6.

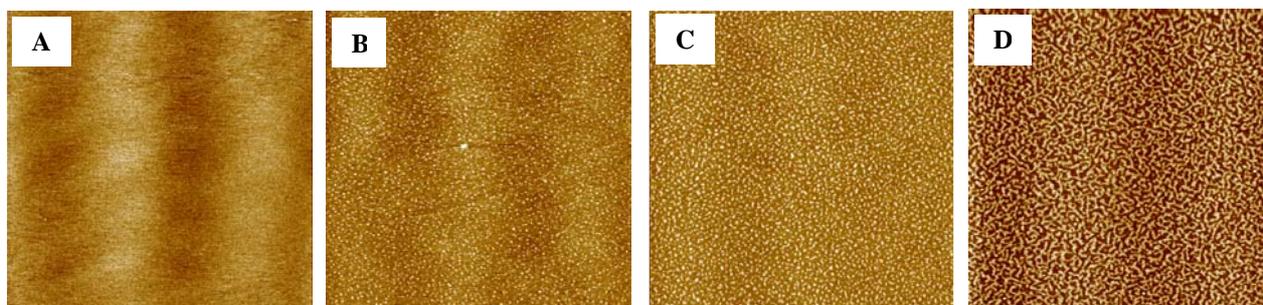


Figure 4.6 : images AFM ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) montrant l'évolution des protubérances formées par le MGDG en fonction de la pression de surface. A : 20 mN/m, B : 25 mN/m, C : 30 mN/m, D : 35 mN/m. L'échelle en z est de 20 Å.

La figure 4.7 montre que ces structures ségréguées sont mieux résolues en utilisant une taille de scan plus petite. Dans le cas du MGDG, des protubérances interconnectées couvrent la surface, tandis que des petits patches isolés sont observés pour le mélange équimolaire. De plus, les sections horizontales donnent la hauteur des structures observées qui sont proches de 7 Å pour le MGDG et 4 Å pour le mélange. La forme des structures de MGDG est irrégulière, tandis que le film mixte forme des domaines ronds de diamètre 100 nm environ.

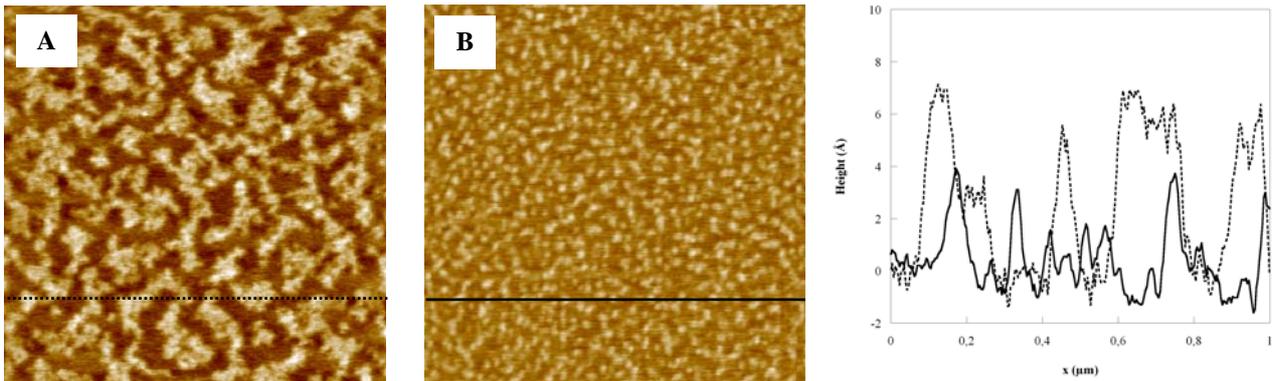


Figure 4.7 : images AFM ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$) des films LB à 35 mN/m. A : MGDG, B : mélange équimolaire. L'échelle en z est de 20 Å. Les sections horizontales montrent la différence de hauteur entre les protubérances du MGDG (.....) et celles du mélange équimolaire (—).

Usuellement, les protubérances observées à la figure 4.7 sont induites soit par une hétérogénéité de compactage des chaînes acyl, soit par l'organisation des têtes polaires [20]. La première possibilité peut être exclue car les deux galactolipides MGDG et DGDG sont en phase fluide et, dans le cas du DGDG, les images à 35 mN/m ont montré un film uniforme bien que les chaînes soient comprimées à des aires moléculaires moyennes plus petites que celles du MGDG. Ainsi, les structures observées à 35 mN/m pour MGDG seraient dues à un effet des têtes galactosyl. D'après la taille latérale de ces protubérances, la ségrégation concerne plusieurs molécules qui forment un motif de type labyrinthe dont la largeur minimale est d'environ 50 nm.

Bilan intermédiaire

A faible pression de surface, tous les films sont homogènes. Un changement apparaît pour le MGDG et le mélange équimolaire à forte pression. Les films forment des protubérances de hauteur très faible attribuées à des interactions spécifiques entre les têtes polaires. La présence, la forme et l'organisation de ces structures semblent être fortement corrélées à l'augmentation de la pression de surface du film.

I.5 – Rhéologie de surface

Afin de comparer la rigidité des monocouches de galactolipides à l'interface, des mesures de rhéologie ont été réalisées sur les films comprimés à 35 mN/m à l'interface liquide/air. Nous présentons une seule allure de spectre (celui du MGDG) car les deux galactolipides ainsi que le mélange équimolaire ont montré des comportements similaires.

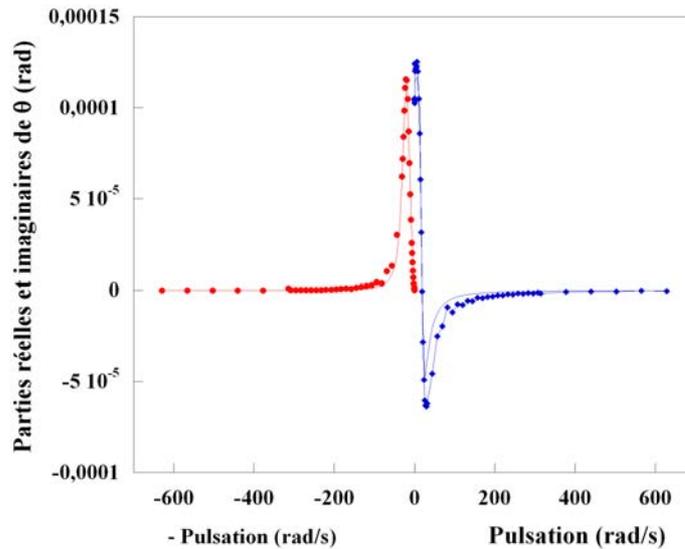


Figure 4.8 : spectres fréquentiels réalisés sur une monocouche de MGDG à 35 mN/m avec les mesures des parties imaginaires (—●) et réelles (—◆) de θ ajustées par le modèle de l'oscillateur amorti (traits pleins).

La figure 4.8 montre les spectres fréquentiels réalisés sur les monocouches lipidiques à 35 mN/m. Rappelons que sur l'eau pure, la valeur de la pulsation propre est : $\omega_0 = 20.4$ rad/s. D'après les spectres obtenus, les valeurs de ω_1 valent : 21.0, 21.1 et 20.7 pour MGDG, DGDG et le mélange équimolaire, respectivement. Ces valeurs sont très proches de celles de l'eau témoignant de l'extrême fluidité des films lipidiques à l'interface liquide/air bien qu'ils soient comprimés à forte pression de surface.

Bilan intermédiaire

Les films lipidiques ne présentent strictement aucune rigidité à l'interface. Une couche solide est définie pour $\mu > 0$. Dans notre cas, les valeurs obtenues sont de l'ordre 10^{-5} mN/m ce qui tend à penser que la couche est plus proche d'un système liquide que solide. Cela met en évidence l'extrême fluidité des lipides à l'interface, même à forte pression de surface.

II – Etude des mésophases liquide-cristallines en milieu aqueux

Pour examiner les structures tridimensionnelles, des mesures de diffraction des rayons X aux petits angles ont été réalisées sur les dispersions de lipides dans l'eau. Dans le cas des composés purs MGDG et DGDG, la reconstruction de la densité électronique a apporté des informations cruciales sur le compactage moléculaire des têtes polaires galactosyl. Des images de microscopie à l'angle de Brewster au-delà du collapse ont permis de visualiser les structures formées par les lipides. Finalement, grâce aux mesures spectroscopiques (Raman et infrarouge à transformée de Fourier), nous avons sondé l'état physique des chaînes acyl.

II.1 – Diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS)

Les structures tridimensionnelles formées par le MGDG, DGDG et le mélange équimolaire en excès d'eau ont été déterminées par l'analyse des profils de diffraction des rayons X à 20°C. Deux régions ont été utilisées pour identifier les phases lipidiques. La région des petits angles correspond à la symétrie et à l'organisation longue distance (phase cubique, hexagonale ou lamellaire), tandis que la région des grands angles donne des informations sur le compactage moléculaire (phase gel ou fluide). Pour tous les échantillons, la présence d'un signal diffus aux grands angles (pour q autour de 1.4 \AA^{-1}) indique que les chaînes sont en phase fluide dénotée α (spectres non montrés dans cette région). Nous ne présenterons les profils que dans la région des petits angles.

II.1.1 – Phase formée par le système DGDG/eau

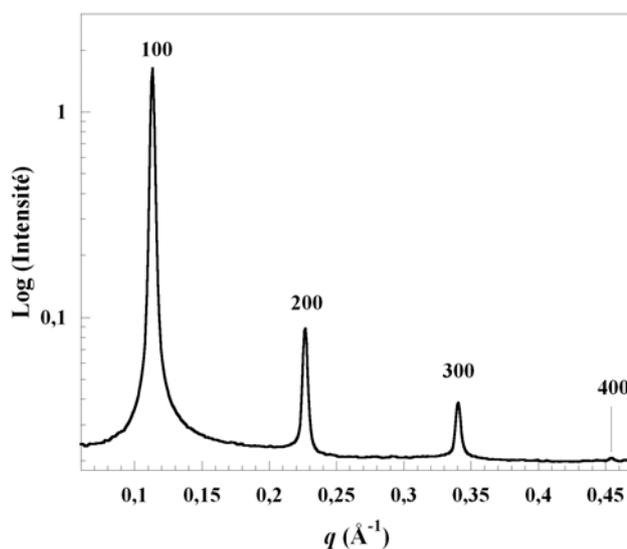


Figure 4.9 : profil SAXS du système DGDG/eau enregistré à 20°C. L'indexation ($h00$) est indiquée également.

La figure 4.9 montre le profil de diffraction aux petits angles obtenu pour la dispersion de DGDG. La présence de pics uniques régulièrement espacés révèle une structure lamellaire L_{α} . Le paramètre de maille de cette phase vaut : $d_{lam} = 2\pi/d_{100} = 54.9 \pm 0.1 \text{ \AA}$. Les positions observées (q_{obs}) des quatre réflexions de Bragg et les positions théoriques ($q_n = 2\pi n/d_{lam}$) calculées avec une périodicité lamellaire (d_{lam}) de 54.9 \AA sont données dans le tableau 4.1.

| $h\ 0\ 0$ | n | $q_{obs} (\text{\AA}^{-1})$ | $q_n (\text{\AA}^{-1})$ | $F_{obs} (A)$ | $F_{obs} (B)$ |
|-----------|-----|-----------------------------|-------------------------|---------------|---------------|
| 1 0 0 | 1 | 0.1144 | 0.1145 | -100 | +100 |
| 2 0 0 | 2 | 0.2289 | 0.2291 | -42 | +42 |
| 3 0 0 | 3 | 0.3436 | 0.3436 | -36 | -36 |
| 4 0 0 | 4 | 0.4584 | 0.4582 | +11 | +11 |

Tableau 4.1: données SAXS de la phase lamellaire du système DGDG/eau à 20°C. n est l'ordre de la réflexion de Bragg. q_{obs} et q_n sont respectivement les positions observées et calculées ($q_n = 2\pi n/d_{lam}$, avec une périodicité lamellaire d_{lam} égale à 54.85 \AA) des réflexions ($h00$) aux petits angles. F_{obs} est le facteur de structure calculé d'après l'équation 4.2 et normalisé en utilisant la valeur du 1^{er} pic ; les phases choisies pour F_{obs} (+ ou -) sont déduites des critères décrits ci-après.

Le paramètre lamellaire de 54.9 \AA est cohérent avec celui de 54.0 \AA obtenu par Shipley et al [21] pour du DGDG extrait de feuilles de *Pelargonium* (géranium) et celui de 55.3 \AA obtenu par Sen et al [11] pour du DGDG extrait de feuilles de haricot.

Pour obtenir plus d'informations moléculaires sur la conformation des têtes, la densité électronique perpendiculairement au plan de la bicouche a été reconstruite.

Reconstruction de la densité électronique de la phase lamellaire formée par DGDG

La densité électronique a été calculée à partir des intensités des réflexions observées dans le profil de diffraction en utilisant la combinaison de phase [22, 23]. Les variations de la densité électronique sont relatives aux intensités des pics de Bragg par :

$$\Delta\rho(x) = \sum_n F_n^{obs} \times \cos(2\pi n x) \quad (\text{eq. 4.1})$$

avec, après les corrections de la polarisation de Lorentz aux petits angles,

$$|F_n^{obs}| = q_n \times \sqrt{A_n}, \quad (\text{eq. 4.2})$$

où F_n^{obs} est le facteur de structure, q_n les positions des réflexions de Bragg et A_n l'aire sous le pic de Bragg.

Du fait de la centrosymétrie de la structure lamellaire, la phase de F_n^{obs} peut être 0 ou π , et par conséquent : $F_n^{obs} = \pm q_n \times \sqrt{A_n}$. Ainsi, pour déterminer le profil de densité électronique, le signe de chaque F_n^{obs} doit être déterminé. Il est important de noter que la solution translatée $x = x + d_{lam}/2$ ne change que le signe de F_n^{obs} car quel que soit n :

$$\Delta\rho(x + \frac{d_{lam}}{2}) = \sum_n F_n^{obs} \times (-1)^n \cos(2\pi nx) \quad (\text{eq. 4.3})$$

Ainsi, l'observation de n pics de Bragg donne 2^n solutions valables pour les variations de la densité électronique. Comme il y a une solution translatée identique pour chaque profil de densité possible, il y a seulement 2^{n-1} solutions non équivalentes.

Quatre pics sont observés dans le profil de diffraction du DGDG (figure 4.9) ce qui mène à 8 solutions possibles. Des considérations moléculaires simples sur les profils de densité électronique dans les bicouches [24] permettent d'exclure les solutions fausses. Ces critères sont :

- 1) les têtes galactosyl ont la plus grande densité électronique : $\rho_{tête} > \rho_{eau} > \rho_{chaîne}$,
- 2) la densité électronique est constante le long de la chaîne acyl,
- 3) le minimum correspondant au méthyle terminal doit être le plus étroit possible.

Les valeurs de F_{obs} et leurs signes respectifs sont listés dans le tableau 4.1 pour les deux solutions possibles qui respectent les critères cités ci-dessus et les profils de densité électronique correspondants (A et B) sont présentés à la figure 4.10.

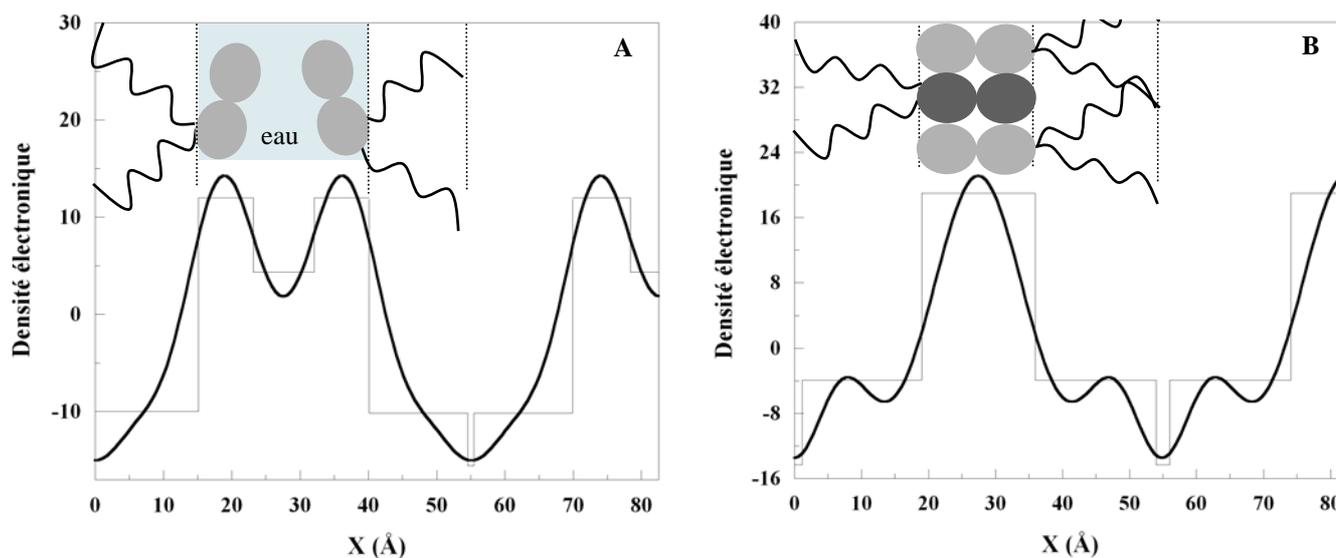


Figure 4.10 : allure des deux profils de densité électronique possibles calculés pour la phase fluide lamellaire (L_{α}) formée par le système DGDG/eau. On associe à ces profils les modèles à trois marches correspondants ainsi qu'une vue schématique de l'organisation de deux (A) et trois (B) molécules de DGDG.

Nous allons décrire séparément les deux profils de la figure 4.10 en discutant l'organisation des molécules qu'ils impliquent. Puis nous confronterons les deux modèles afin de choisir le plus probable.

Analyse du profil A

Le premier minimum ($x = 0 \text{ \AA}$) correspond au groupe méthyle terminal CH_3 de la chaîne acyl. Puis, la densité électronique est constante le long de la chaîne hydrocarbonée jusqu'à un maximum attribué à la tête polaire ($x = 18.8 \text{ \AA}$). Après ce point, la densité électronique diminue jusqu'à un minimum ($x = 27.5 \text{ \AA}$) attribué au centre de la couche d'eau entre les deux têtes polaires. Le profil de densité devient ensuite symétrique à celui que l'on vient de décrire.

Ce profil de densité ressemble beaucoup à celui obtenu par McDaniel pour du DGDG extrait de graines de *Briza humilis* (graminée) [25]. La longueur des chaînes est estimée à 15 \AA , ce qui équivaut à un cœur hydrophobe de 30 \AA . Cette valeur est plus faible qu'une chaîne fluide de DOPC dont la longueur est de 18 \AA [26].

D'autre part, la longueur d'une tête polaire de DGDG a été estimée à environ 18 \AA en utilisant le modèle CPK (Corey-Pauling-Koltun) et en tenant compte des deux groupes galactosyl et de la partie glycérol ; McDaniel estime également cette valeur à 18 \AA [25]. D'après le profil de densité, la largeur de la tête est d'environ 8 \AA . Ainsi, il apparaît

clairement que les têtes ne sont pas complètement étendues mais orientées parallèlement au plan de la bicouche, comme illustré à la figure 4.10.A.

Analyse du profil B

Le premier minimum ($x = 0 \text{ \AA}$) correspond au groupe méthyle terminal CH_3 de la chaîne acyl. Puis, la densité électronique est constante le long de la chaîne hydrocarbonée jusqu'à un maximum attribué à la tête polaire ($x = 27.5 \text{ \AA}$). Après ce point, la densité électronique diminue jusqu'au groupe méthyle terminal suivant, puis, le profil de densité devient symétrique. Tandis que dans les bicouches de phospholipides, la présence d'une couche d'eau induit un minimum de densité électronique entre les deux têtes polaires [27] ; dans le profil B du DGDG, aucun minimum n'est observé, ce qui suggère la présence d'une zone déshydratée. En prenant en compte les positions des différents extremums dans l'axe des x (\AA), les longueurs de la tête polaire et des chaînes acyl d'une molécule de DGDG peuvent être déduites. Ainsi, la longueur des chaînes est estimée à 18 \AA , en bon accord avec la valeur obtenue pour des phospholipides à l'état fluide [26]. Le fort niveau de densité électronique correspondant aux deux têtes polaires présente un pic unique. Sa largeur est de 18 \AA , valeur équivalente à la longueur d'une seule tête de DGDG (modèle CPK : deux groupes galactosyl et un groupe glycérol). Ces valeurs suggèrent fortement une interdigitation des têtes, comme illustré à la figure 4.10.B. Ce résultat implique que, même en excès d'eau, la structure formée par le DGDG est peu hydratée. Enfin, de par la présence d'une interdigitation et de par la longueur d'une tête de DGDG, cela implique que les têtes doivent être orientées plutôt verticalement par rapport à l'axe de symétrie de la bicouche.

Comparaison des deux profils de densité électronique A et B

Les deux profils retenus respectant les critères cités ci-dessus impliquent des organisations radicalement différentes des têtes polaires. Dans le cas du profil A, les têtes s'orientent parallèlement au plan de la bicouche permettant la présence d'une zone hydratée. Le profil B est beaucoup plus atypique puisqu'il implique une interdigitation des têtes polaires qui seraient alors orientées perpendiculairement au plan de la bicouche.

L'interdigitation au niveau des chaînes de phospholipides a souvent été mise en évidence. Ce phénomène peut par exemple être induit par de basses températures [28], par des dispersions de lipides dans des solvants autre que l'eau [29] ou par la présence d'ions [30].

Les systèmes présentant une interdigitation au niveau des têtes sont beaucoup plus rares et sont observés dans des conditions très particulières. On peut citer l'exemple du

mélange phospholipide EPC/ganglioside GM1 pour lequel une interdigitation des têtes polaires du GM1 est observée pour de faibles concentrations de ganglioside [31]. De plus, il a été montré pour des membranes contenant des lactosylcéramides que les têtes sucre s'interdigitent durant l'agrégation des liposomes [32].

Pour trancher entre ces deux possibilités radicalement différentes, nous avons réalisé une mesure de diffraction des rayons X aux petits angles sur un échantillon de DGDG préalablement hydraté puis lyophilisé (mesure réalisée à l'ENSCR à Rennes). Si les têtes sont réellement interdigitées (\Leftrightarrow région des têtes déshydratée), aucune diminution du paramètre de maille sur l'échantillon sec ne doit être observée. Nous avons obtenu un paramètre de maille de 44 Å permettant d'exclure l'organisation décrite par le profil B.

Finalement, la phase lamellaire formée par le système eau/DGDG est une phase lamellaire « classique ». Les têtes di-galactosyl s'orientent parallèlement au plan de la bicouche comme cela a été observé par diffraction de neutrons [25].

II.1.2 – Phase formée par le système MGDG/eau

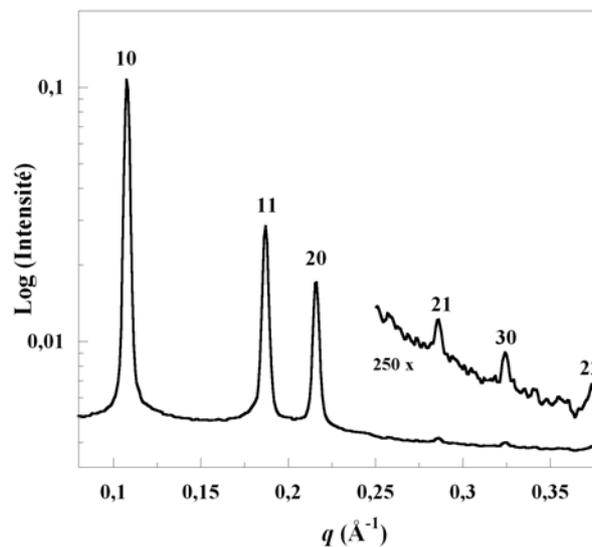


Figure 4.11: profil SAXS du système MGDG/eau enregistré à 20°C. L'indexation (hk) est indiquée également.

La figure 4.11 montre le profil de diffraction obtenu pour le MGDG. Les six pics de diffraction de Bragg peuvent être indexés avec des ratios de $1, \sqrt{3}, \sqrt{4} \dots$ ce qui est caractéristique d'une phase hexagonale notée H. Le paramètre de maille de cette phase vaut : $d_{\text{hex}} = 4\pi/\sqrt{3} d_{10} = 67.2 \text{ \AA}$. Les positions observées (q_{obs}) des réflexions (hk), les positions théoriques ($q_n = 4\pi\sqrt{n}/\sqrt{3} d_{\text{hex}}$, avec $n = h^2 + hk + k^2$) calculées avec une périodicité

hexagonale de 67.2 Å et les facteurs de structure (F_{obs}) avec leurs signes correspondants sont listés dans le tableau 4.2.

| $h k$ | n | $q_{obs} (\text{Å}^{-1})$ | $q_n (\text{Å}^{-1})$ | F_{obs} |
|-------|-----|---------------------------|-----------------------|-----------|
| 1 0 | 1 | 0.1077 | 0.1080 | +100 |
| 1 1 | 3 | 0.1870 | 0.1870 | +87 |
| 2 0 | 4 | 0.2159 | 0.2159 | -74 |
| 2 1 | 7 | 0.2857 | 0.2856 | +11 |
| 3 0 | 9 | 0.3243 | 0.3239 | -13 |
| 2 2 | 12 | 0.3733 | 0.3740 | +13 |

Tableau 4.2 : données SAXS de la phase hexagonale du système MGDG/eau à 20°C. $n = h^2 + hk + k^2$. q_{obs} et q_n sont respectivement les positions observées et calculées ($q_n = 4\pi \sqrt{n} / d_{hex}$, avec une périodicité hexagonale d_{hex} égale à 67.2 Å) des réflexions (hk) aux petits angles. F_{obs} est le facteur de structure calculé d'après l'équation 4.2 et normalisé en utilisant la valeur du 1^{er} pic ; la phase choisie pour F_{obs} (+ ou -) est déduite des critères décrits ci-après.

Deux types de structures hexagonales sont généralement décrites [33]. Les structures hexagonales directes H_I sont des cylindres de lipides, dont les cœurs sont formés par les chaînes acyl, assemblés en une maille hexagonale. Au contraire, la phase hexagonale inverse H_{II} est caractérisée par un assemblage hexagonal de cylindres d'eau recouverts par les têtes polaires des lipides avec les chaînes orientées vers l'extérieur. Usuellement, la phase hexagonale H_I ne doit pas exister en excès d'eau. En effet, quand on ajoute de l'eau dans le système, la structure H_I gonfle jusqu'à être en équilibre avec des structures micellaires (formation de deux phases distinctes) (figure 1.12). Dans notre cas, on n'observe pas de variation du paramètre de maille et on ne détecte pas la présence de micelles, quelle que soit la position du faisceau sur le capillaire. Ainsi, la structure de la mésophase hydratée de MGDG est de type hexagonal inverse H_{II} (figure 1.13).

A partir du paramètre de maille d_{hex} (67.2 Å), et en tenant compte de la taille d'une tête polaire de MGDG de 9 Å (modèle CPK : un groupe galactosyl + partie glycérol) et de la longueur des chaînes de 18 Å (chaîne d'octodécane en phase fluide) [26], le diamètre estimé du canal d'eau devrait être de l'ordre de 13.2 Å. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Shipley et al [21] sur du MGDG extrait de feuilles de *Pelargonium*. En effet, les auteurs ont trouvé que la distance entre les axes des cylindres de la phase H_{II} du MGDG variait de 52.5 à

60.5 Å pour un échantillon sec et complètement hydraté, respectivement ; tandis que les diamètres de la zone hydratée changeaient de 17.4 à 29.8 Å. Afin de mieux comprendre ces différences, la densité électronique a été reconstruite.

Reconstruction de la densité électronique de la phase hexagonale formée par MGDG

La densité électronique a été reconstruite perpendiculairement au canal d'eau en appliquant la formule suivante sur les pics observés [34] :

$$\rho_{el}(r) \propto \sum_{n=1,3,4,7,9,12} F_n J_0\left(2\pi r \frac{2\sqrt{n}}{\sqrt{3}d}\right) \quad (\text{eq. 4.4})$$

où F_n est le facteur de structure des pics q_n , J_0 est l'ordre 0 de la fonction de Bessel, r est la distance à partir du centre du canal d'eau, d est le paramètre de la maille hexagonale, et n est égal à $h^2 + hk + k^2$.

Comme pour le cas de la phase lamellaire, la densité électronique est reconstruite en choisissant un phasage spécifique. Avec six pics dans le profil de diffraction, 2^6 solutions existent. Pour discriminer les solutions fausses, certains critères ont été utilisés.

Considérant que la densité électronique de la tête sucre galactosyl est supérieure à celle de l'eau et que celle de l'eau est elle-même supérieure à celle des chaînes, trois niveaux différents doivent apparaître. L'origine du graphe sera localisée au centre du canal d'eau (densité intermédiaire), puis la densité électronique présente un maximum (tête polaire) suivi par une diminution significative et lente de la densité le long des chaînes acyl jusqu'au méthyle terminal.

La figure 4.12 montre l'unique solution qui vérifie ces critères. En considérant une longueur de chaîne de 18 Å (comparé aux chaînes de DOPC en phase fluide, d'après [26]) et une longueur de tête de MGDG de 9 Å, et d'après le rayon du cylindre ($d_{\text{hex}}/2 = 33.6$ Å), le centre de masse des têtes polaires devrait être localisé à 11.1 Å (point $C_{\text{théo}}$). Néanmoins, la densité électronique montre que le centre de masse des têtes de MGDG est situé à 9.9 Å (point C_{exp}). Cela semble indiquer l'existence d'une rugosité due au fait que les têtes ne sont pas au même niveau mais décalées les unes par rapport aux autres. Cette rugosité peut être évaluée à : $2 \times (C_{\text{théo}} - C_{\text{exp}}) = 3.6$ Å. Finalement, le canal d'eau est plus petit que supposé auparavant suggérant une structure peu hydratée.

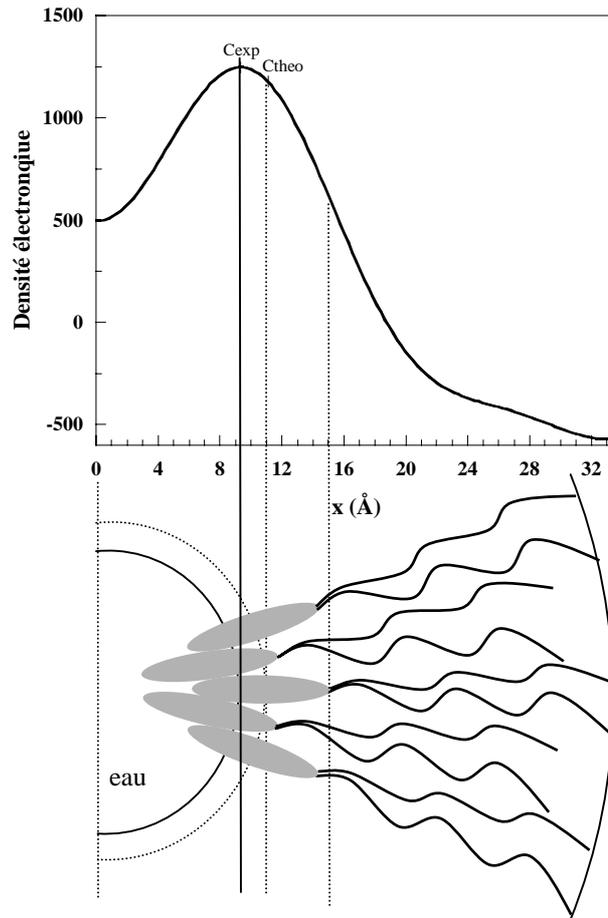


Figure 4.12 : profil de densité électronique calculé pour la phase hexagonale inverse (H_{II}) formée par le système MGDG/eau. Une vue schématique de l'organisation de cinq molécules de MGDG mettant en évidence l'organisation spécifique des têtes galactosyl est associée à ce profil.

II.1.3 – Phase formée par le système MGDG/DGDG/eau

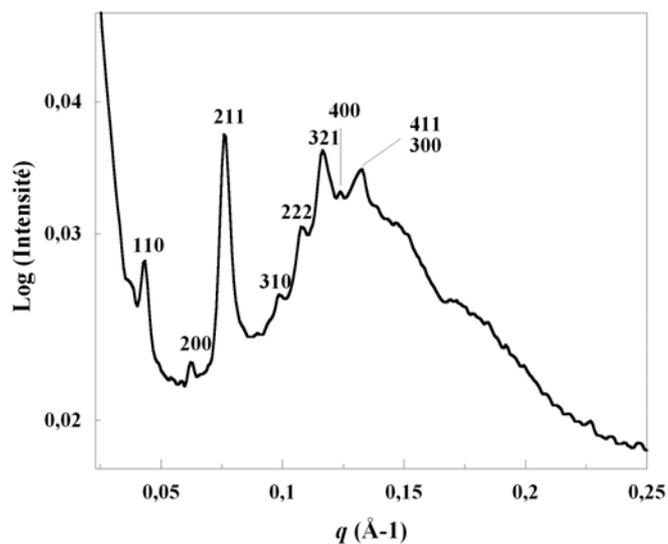


Figure 4.13 : profil SAXS du système MGDG/DGDG/eau enregistré à 20°C. L'indexation (hkl) est indiquée également.

La figure 4.13 montre un profil de diffraction typique d'une phase cubique pour le mélange équimolaire MGDG/DGDG en excès d'eau. Le paramètre de maille de cette phase vaut : $d_{\text{cub}} = 2\pi\sqrt{2}/d_{110} = 202 \text{ \AA}$. Les positions observées (q_{obs}) des réflexions (hkl) et les positions théoriques ($q_n = 2\pi\sqrt{n}/d_{\text{cub}}$, avec $n = h^2 + k^2 + l^2$) calculées avec un paramètre de maille cubique de 202 \AA sont listées dans le tableau 4.3.

| $h k l$ | n | $q_n (\text{\AA}^{-1})$ | $q_{\text{obs}} (\text{\AA}^{-1})$ | $Im3m$ § | $Pn3m$ § |
|---------|-----|-------------------------|------------------------------------|----------|----------|
| 1 1 0 | 2 | 0.044 | 0.044 | + | + |
| 1 1 1 | 3 | 0.054 | n.o | abs | + |
| 2 0 0 | 4 | 0.062 | 0.062 | + | + |
| 2 1 1 | 6 | 0.076 | 0.076 | + | + |
| 2 2 0 | 8 | 0.088 | n.o | + | + |
| 3 0 0 | 9 | 0.093 | n.o | abs | + |
| 2 1 1 | | | | | |
| 3 1 0 | 10 | 0.098 | 0.099 | + | + |
| 3 1 1 | 11 | 0.103 | n.o | abs | + |
| 2 2 2 | 12 | 0.108 | 0.108 | + | + |
| 3 2 1 | 14 | 0.116 | 0.116 | + | + |
| 4 0 0 | 16 | 0.124 | 0.124 | + | + |
| 4 1 1 | 18 | 0.132 | 0.133 | + | + |
| 3 3 0 | | | | | |

Tableau 4.3 : données SAXS de la phase cubique du système MGDG/DGDG/eau à 20°C. $n = h^2 + k^2 + l^2$. q_{obs} et q_n sont respectivement les positions observées et calculées ($q_n = 2\pi\sqrt{n}/d_{\text{cub}}$, avec une périodicité cubique d_{cub} égale à 202 \AA) des réflexions (hkl) aux petits angles. § Ces colonnes indiquent quels pics sont observés (+) ou absents (abs) dans chaque groupe d'espace possible. n.o = non observé.

A partir de là, trois groupes d'espace sont possibles : $Im3m$, $Ia3d$ et $Pn3m$. Néanmoins, l'observation du plan (110) élimine le groupe d'espace $Ia3d$. Comme spécifié dans le tableau 4.3, l'absence systématique des pics impairs ($h + k + l$) est en faveur d'une maille centrée typique du groupe d'espace $Im3m$ (Q^{229}). Cette phase peut être décrite comme un réseau orthogonal de canaux d'eau connectés six par six et séparés par des bicouches lipidiques [35].

La formation de phases cubiques a généralement lieu entre des phases lamellaire et hexagonale de lipides purs ou de systèmes mixtes hydratés [36]. De plus, une analyse théorique a montré que la phase cubique a un degré de frustration plus faible que les phases lamellaire et hexagonale [33].

Le groupe d'espace $Im3m$ a déjà été observé pour des lipides synthétiques de type β -D-galactosyl diacylglycérol avec des chaînes saturées possédant de 14 à 16 carbones [37]. En augmentant la température, ces systèmes adoptent d'abord une phase lamellaire fluide, puis une première phase cubique $Pn3m$ suivie par une seconde phase cubique $Im3m$ et finalement une phase hexagonale inverse H_{II} . Cette combinaison de phases cubiques a aussi été observée avec des chaînes acyl plus courtes de PE [38, 39] mais avec des paramètres de maille plus petits que celui des galactolipides du blé. Pour des chaînes acyl plus longues (C18), ces auteurs ont montré que la transition passe directement de la phase L_{α} à la phase H_{II} . La stabilisation du groupe d'espace $Im3m$ pourrait révéler des interactions spécifiques entre les têtes polaires des molécules dans le mélange équimolaire et en particulier entre les groupes mono- et di-galactosyl. En effet, avec des chaînes similaires mais des têtes glucosyl, Turner et al ont montré la coexistence des structures $Ia3d$ et $Pn3m$ [40].

Il est généralement difficile d'obtenir des informations moléculaires par reconstruction de la densité électronique mais l'existence de relations épitaxiales entre des plans spécifiques des phases hexagonale et cubique est utile pour extraire des informations moléculaires par similarité avec la phase hexagonale associée [41]. Le rapport des paramètres entre les mailles hexagonale et lamellaire vaut $2/\sqrt{3}$, tandis qu'il vaut $\sqrt{16}$ entre les mailles cubique et lamellaire [42]. Ainsi, entre les phases hexagonale et cubique, le ratio est égal à $1/2\sqrt{3}$.

Dans notre cas, en appliquant cette règle, le diamètre du cylindre lipidique entourant le canal d'eau pour une phase hypothétique hexagonale formée par le mélange équimolaire dans l'eau vaudrait 58.3 \AA ($= d_{\text{cub}} / 2\sqrt{3}$). Cette valeur est très inférieure au paramètre de maille obtenu pour la phase hexagonale formée par le MGDG pur dans l'eau ($d_{\text{hex}} = 67.2 \text{ \AA}$). Ce résultat semble assez surprenant car l'addition de molécules de DGDG avec des têtes plus longues diminuerait le paramètre de la maille hexagonale. Cela met en évidence le comportement spécifique du mélange équimolaire qui n'est pas directement relié avec ce qui serait attendu à partir des lipides purs.

Bilan intermédiaire

En dispersion aqueuse, les lipides purs et le mélange équimolaire forment trois phases très distinctes. La reconstruction des densités électroniques pour MGDG et DGDG a permis d'obtenir des informations quant à l'organisation des molécules dans ces structures.

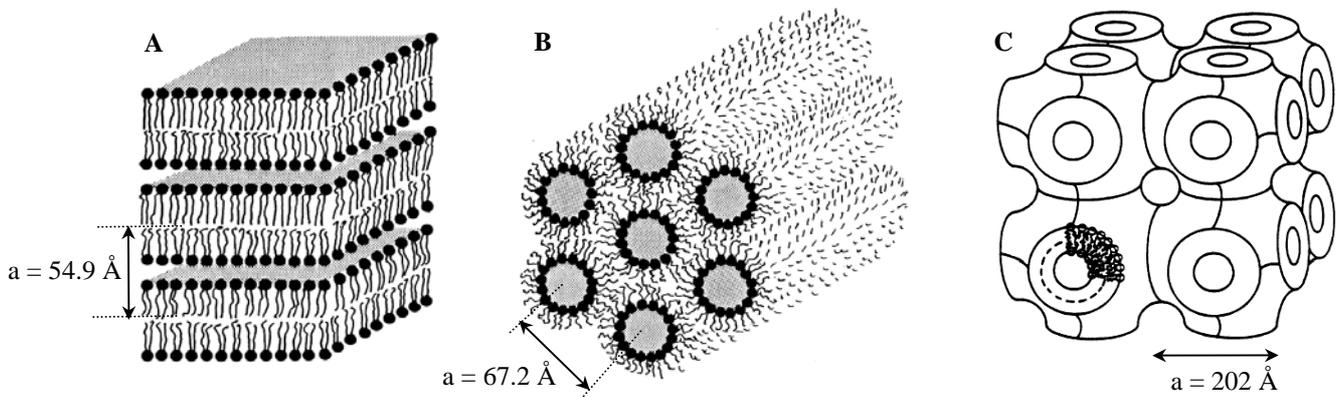


Figure 4.14 : phases adoptées par les systèmes galactolipide/eau. A : phase lamellaire formée par le DGDG [43]. B : phase hexagonale inverse formée par le MGDG [38]. C : phase cubique $Im3m$ formée par le mélange équimolaire [44].

II.2 – Microscopie à l’angle de Brewster au-delà du collapse

Le collapse, notion induite pour les monocouches [45], fait référence aux phénomènes qui apparaissent sur les isothermes de compression pour de fortes pressions de surface. Il est associé à la formation locale de surépaisseurs lorsque la monocouche ne peut plus être comprimée, la surface étant totalement occupée par les molécules. Ainsi, bien que l'on ait travaillé à l'interface liquide/air, ce paragraphe sur la microscopie à l'angle de Brewster est intégré à la partie sur les phases liquide-cristallines car les structures formées sont tri-dimensionnelles et donc non relatives au comportement à deux dimensions.

Les expériences ont été réalisées à Bordeaux où une barrière spéciale, permettant de ne pas rompre l'interface au delà du collapse, a été utilisée [15]. En effet, si la tension superficielle de la surface devient trop faible, le ménisque formé par le liquide ne peut se maintenir sur les bords de la cuve. Afin de contourner ce problème, la barrière permet de comprimer le film à la surface de l'eau même si le niveau d'eau est plus bas que les bords de la cuve. Ainsi, il est possible de comprimer les molécules au delà du collapse, la vitesse de la barrière en mouvement étant utilisée comme force motrice pour induire la formation de multicouches ou d'autres structures.

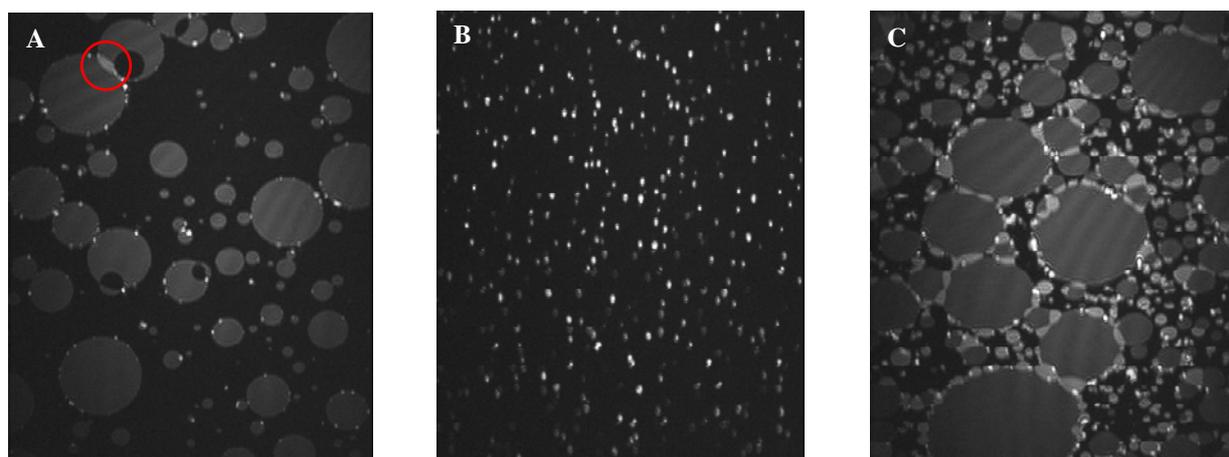


Figure 4.15 : images Brewster des lipides au delà du collapse. Taille des images : $(430 \times 540) \mu\text{m}^2$, vitesse d'obturation de la caméra au $2000^{\text{ème}}$ de seconde. A : DGDG, B : MGDG, C : mélange équimolaire.

Les trois images présentées à la figure 4.14 ont été prises avec une vitesse d'obturation identique permettant de les comparer directement. Les niveaux de gris moyens calculés sur toute la surface de l'image sont de 38 pour le DGDG, 34 pour le MGDG, et 50 pour le mélange équimolaire. Plus le niveau de gris est fort, plus la réflectance est importante.

Le DGDG forme des domaines ronds de formes très régulières suggérant que les structures sont fluides. Cette hypothèse est corroborée par la mobilité des domaines à l'interface. Le niveau de gris très uniforme des domaines indique la formation de multicouches d'épaisseur constante. Le cercle rouge (figure 4.15.A) montre deux domaines qui commencent à fusionner. L'intensité plus lumineuse signifie qu'à l'endroit de la fusion, les molécules ne sont pas encore réparties de façon uniforme et homogène formant ainsi des surépaisseurs. Par endroit, des petits points plus lumineux apparaissent, attribués à des multicouches plus épaisses.

Pour le MGDG, la surface apparaît comme une multitude de points très lumineux signifiant que les structures formées sont très épaisses. Notons que le niveau de gris de l'image du MGDG (34) est inférieur à celui de DGDG (38). Néanmoins, cette valeur est une moyenne calculée sur toute l'image. Comme la surface du MGDG est beaucoup moins recouverte que celle du DGDG, il est donc normal d'obtenir un niveau de gris inférieur.

Ces observations peuvent être corrélées au concept de forme géométrique des lipides proposé par Israelachvili [46]. En effet, le DGDG possède deux groupes galactosyl. La tête polaire et les chaînes occupent un volume équivalent ; le lipide peut alors s'inscrire dans un cylindre. Au contraire, le volume de la tête du MGDG est inférieur à celui des chaînes acyl ; le lipide s'inscrit dans un cône. Par conséquent, la forme géométrique des lipides impose des contraintes qui induisent la formation de structures tridimensionnelles satisfaisant les volumes

respectifs des têtes et des chaînes. Finalement, on peut relier le comportement à l'interface à la forme des molécules. En effet, la forme cylindrique du DGDG est en accord avec la formation de multicouches tandis que la forme conique du MGDG induit une instabilité à l'interface.

Pour le mélange équimolaire, de grands domaines de forme et d'intensité régulières sont visualisés, connectés entre eux par des domaines plus lumineux et de forme plus découpée. Il est difficile de connaître la composition de ces domaines mais il semble que l'on forme des structures particulières lorsque les deux galactolipides sont mis en contact.

II.3 – Spectroscopies Raman et infrarouge à transformée de Fourier

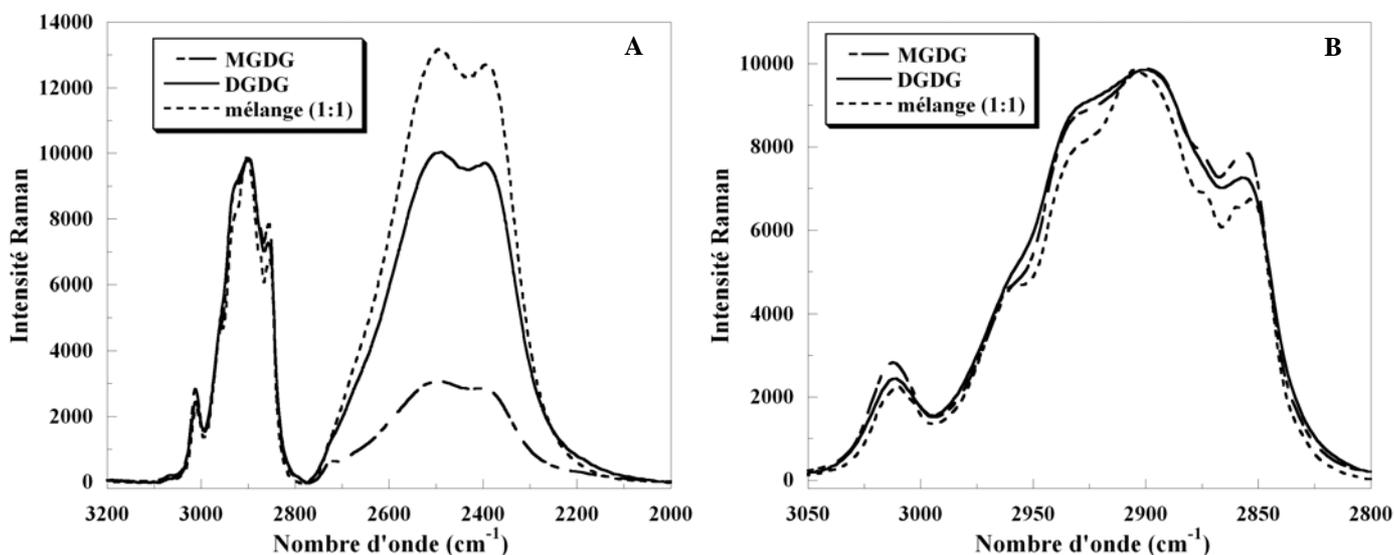


Figure 4.16 : spectres Raman du MGDG, du mélange équimolaire et du DGDG en dispersion dans D_2O à $20.5^\circ C$. A : région 2000 à 3200 cm^{-1} . B : région 3050 à 2800 cm^{-1} .

La figure 4.15.A montre les spectres Raman des galactolipides dans la région 2000 à 3200 cm^{-1} . L'intensité du large pic entre 2000 et 2800 cm^{-1} dû aux modes d'élongation des liaisons O-D de D_2O révèle que l'hydratation du MGDG est très faible. Au contraire, le mélange équimolaire est fortement hydraté.

Les bandes dues aux différentes vibrations d'élongation des liaisons C-H des chaînes acyl apparaissent dans la région 2800 - 3050 cm^{-1} . Les vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons C-H du méthylène CH_2 apparaissent à 2856 et 2899 cm^{-1} respectivement.

L'épaulement à 2932 cm^{-1} est assigné à la résonance de Fermi de la vibration symétrique d'élongation du groupe méthyle CH_3 , tandis que le pic à 2959 cm^{-1} est dû à la vibration asymétrique de ce même groupe.

Finalement, la bande due à la vibration d'élongation des C-H des liaisons $\text{CH}=\text{CH}$ est observée à 3011 cm^{-1} . La position de ces différentes bandes présentes dans les spectres Raman du MGDG et DGDG sont comparées dans le tableau 4.4 à celles obtenues pour des bicouches de DMPC et DOPC en environnement aqueux [47].

| | DMPC * | POPC * | MGDG | DGDG |
|--|--------|--------|------|------|
| vibration d'élongation symétrique du CH_2 | 2851 | 2855 | 2856 | 2856 |
| vibration d'élongation antisymétrique du CH_2 | 2882 | 2893 | 2899 | 2899 |
| vibration d'élongation symétrique du CH_3 | 2928 | 2928 | 2932 | 2931 |
| vibration d'élongation antisymétrique du CH_3 | 2972 | 2972 | 2955 | 2960 |

Tableau 4.4 : comparaison des positions en nombre d'onde (cm^{-1}) des vibration d'élongation des liaisons C-H des lipides totalement hydratés DMPC, POPC, MGDG et DGDG. *, d'après [47].

D'après la figure 4.16.B, des différences spectrales sont clairement observées pour le mélange équimolaire par comparaison avec les lipides purs.

La bande due à la vibration d'élongation symétrique du méthylène est déplacée vers les faibles nombres d'onde (2853 cm^{-1}) tandis que la bande due à la vibration antisymétrique apparaît aux plus hauts nombres d'onde (2905 cm^{-1}).

Il a été montré que le rapport des intensités I_{2900}/I_{2850} (R_2) est sensible au couplage intermoléculaire et par conséquent, au compactage latéral des chaînes acyl [48, 49]. D'autre part, le rapport des intensités I_{2930}/I_{2900} (R_1) permet d'évaluer essentiellement le désordre des chaînes acyl [50, 51]. Les rapports R_1 et R_2 ont été calculés pour les trois systèmes lipidiques et sont reportés dans le tableau 4.5.

La figure 4.16 montre les spectres infrarouge de réflexion totale atténuée (ATR) polarisés s et p enregistrés pour les dispersions lipidiques dans la région 2800 à 3050 cm^{-1} . On reporte dans le tableau 4.5 la position de la vibration antisymétrique du méthylène ainsi que la valeur du paramètre d'ordre S_z correspondant à cette bande, calculée d'après l'équation 3.20.

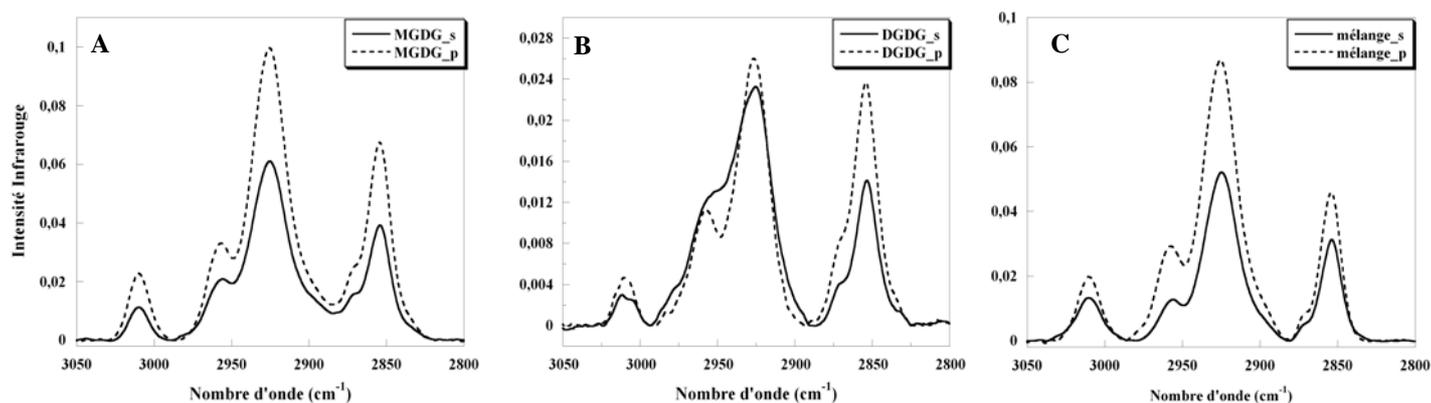


Figure 4.17 : spectres infrarouge ATR des dispersions lipidiques dans l'eau à 20.5°C dans la région 2800 à 3050 cm^{-1} . A : MGDG, B : DGDG et C : mélange équimolaire.

| | MGDG | DGDG | mélange (1:1) |
|---|--------|--------|---------------|
| $R_1 = I_{2930}/I_{2900}$ | 0.89 | 0.91 | 0.81 |
| $R_2 = I_{2900}/I_{2850}$ | 1.26 | 1.36 | 1.47 |
| $\nu_a(\text{CH}_2)$ (cm^{-1}) | 2925.7 | 2925.9 | 2924.9 |
| S_z | -0.09 | -0.09 | -0.17 |

Tableau 4.5 : valeurs des rapports d'intensité $R_1 = I_{2930}/I_{2900}$ et $R_2 = I_{2900}/I_{2850}$ calculés à partir des spectres Raman du MGDG, DGDG et mélange équimolaire ; valeur de la position en nombre d'onde de la bande d'élongation de la vibration antisymétrique du CH_2 observée sur les spectres ATR, et paramètre d'ordre S_z correspondant calculé à partir des spectres infrarouge ATR.

Les deux rapports d'intensité R_1 et R_2 , calculés d'après les spectres Raman, montrent clairement que les chaînes acyl sont plus ordonnées dans le mélange équimolaire que dans les lipides purs. Ce résultat est supporté par la position de la bande due à la vibration d'élongation antisymétrique des liaisons C-H du méthylène, observée sur les spectres infrarouge ATR, qui apparaît aux plus faibles nombres d'onde pour le mélange équimolaire. Finalement, le calcul du paramètre d'ordre S_z du moment de transition de cette même bande, pour les galactolipides hydratés indique un meilleur alignement des liaisons C-H parallèlement au cristal ATR pour le mélange équimolaire ce qui témoigne d'une phase plus ordonnée que celles des lipides purs.

Bilan intermédiaire

De façon générale, les spectres infrarouge et Raman sur les lipides en solution aqueuse ont montré que les chaînes acyl sont extrêmement fluides. Néanmoins, les résultats convergent vers un mélange équimolaire des deux lipides plus ordonné que les lipides purs.

Conclusion et discussion relatives au chapitre 4

Dans le but de mettre en évidence l'influence des chaînes aliphatiques et des têtes mono- ou di-galactosyl sur les propriétés d'organisation des galactolipides, notre approche a été d'associer des techniques dédiées à l'étude des mésophases liquide-cristallines et d'autres spécifiques de l'auto-organisation confinée à deux dimensions.

Pour les deux galactolipides MGDG et DGDG, le lipide dilinoléique est l'espèce moléculaire majeure (C18:2/C18:2). La présence de plusieurs insaturations dans les chaînes acyl est connue pour empêcher la formation de phases ordonnées [7], comme nous l'avons observé pour les galactolipides du blé. En effet, les résultats des expériences menées sur les monocouches et les dispersions aqueuses montrent un comportement typique de lipides en phase fluide. Les isothermes de compression des films monomoléculaires sont caractéristiques de phases liquide expansé (figure 4.1), tandis que les mesures de diffraction des rayons X en excès d'eau montrent des signaux diffus aux grands angles (clichés non montrés dans cette région). De plus, les mesures de rhéologie ont révélé que les films sont extrêmement fluides à l'interface. Finalement, les résultats de spectroscopie de vibration (Raman et infrarouge à transformée de Fourier) convergent vers un faible degré d'ordre des chaînes acyl pour les phases formées par les galactolipides purs MGDG et DGDG, tandis qu'au contraire, la phase formée par le mélange équimolaire semble plus ordonnée.

Etant donné que les chaînes lipidiques sont fortement désordonnées en monocouches et en mésophases liquide-cristallines, les organisations spécifiques des galactolipides, particulièrement pour le mélange, doivent être fortement influencées par les interactions entre les têtes galactosyl. D'après la littérature abondante disponible au sujet des interactions entre les groupes oligosaccharides [52-55] et d'après nos résultats, l'organisation des têtes polaires en monocouches et en phases liquide-cristallines a pu être comprise.

Dans la phase lamellaire déterminée pour DGDG, l'épaisseur de bicouche de 54.9 Å est proche de celle obtenue par Sen et al [11] ainsi que de la plus forte valeur trouvée par Shipley et al [21] pour le galactolipide correspondant du *Pelargonium* où l'épaisseur de la bicouche varie de 44.8 à 54.0 Å (à 20°C) pour un taux d'hydratation croissant. La reconstruction de la densité électronique a été extrêmement utile et a montré que les têtes di-galactosyl sont orientées parallèlement au plan de la bicouche. En monocouche, une faible aire moléculaire moyenne est atteinte dans le film monomoléculaire de DGDG qui semble relativement épais par rapport aux films formés par les autres composées, comme estimé par ellipsométrie et microscopie à l'angle de Brewster (figure 4.3). Ces phénomènes ont été compris grâce à la

spectroscopie PM-IRRAS où nous avons conclu que les deux groupes galactosyl constituant la tête polaire du DGDG étaient orientés dans la même direction à environ 40° par rapport à la normale (à une pression de surface de 35 mN/m). En plus d'un degré d'insaturation des chaînes moins élevé que le MGDG, les têtes di-galactosyl adoptent une configuration qui autorise un compactage élevé. Ainsi on comprend que l'aire moléculaire du DGDG soit plus faible que celle du MGDG et que le film de DGDG soit plus épais. Si l'on n'applique pas de contrainte de compression au film monomoléculaire de DGDG, c'est-à-dire à faible pression de surface, on peut penser que les têtes polaires s'orientent plutôt parallèlement à l'interface. Ainsi, cela met en évidence la flexibilité de conformation des groupes di-galactosyl qui sont capables de se réorienter sous l'effet de la compression. Ceci est en accord avec une liberté de conformation importante des groupes di-galactosyl [56]. Finalement, le fort compactage des molécules de DGDG peut aussi s'expliquer par de fortes interactions attractives de type van der Waals entre les résidus di-hexoses [32].

Concernant la phase hexagonale inverse H_{II} du MGDG, le paramètre de maille obtenu de 67.2 Å est clairement plus grand que les valeurs obtenues par Shipley et al [21]. Notre reconstruction de la densité électronique (figure 4.12) a permis de comprendre cette différence en mettant en évidence un comportement spécifique des têtes mono-galactosyl. En effet, les têtes du MGDG sont décalées de part et d'autre du point expérimental C_{exp} (figure 4.12). Ce décalage entre têtes voisines pourrait être directement relié aux observations AFM. En effet, le film de MGDG a révélé des nano-structures de hauteur 7 Å à 35 mN/m (figure 4.5.E) qui apparaissent à partir de 25 mN/m (figure 4.6). En augmentant la pression de surface, le comportement du MGDG à deux dimensions semble révéler une nette tendance au décalage des têtes pouvant correspondre à un début de courbure du film [38]. La spectroscopie PM-IRRAS a permis de conclure que les têtes monogalactosyl étaient orientées parallèlement à l'interface. Une telle organisation des têtes polaires corrobore une épaisseur moins importante du film de MGDG par rapport à celui de DGDG. De plus, cette orientation ainsi qu'un degré d'insaturation des chaînes plus élevé que le DGDG expliquent que le MGDG occupe une aire moléculaire plus importante à l'interface. Finalement, il a été montré que la flexibilité de conformation est plus faible pour le MGDG que pour le DGDG [57]. De plus on peut penser que les interactions attractives de type van der Waals sont moins importantes entre les groupes mono-galactosyl qu'entre les groupements di-galactosyl ce qui peut également favoriser un compactage moins fort des molécules de MGDG par rapport à celles de DGDG.

En ce qui concerne le mélange équimolaire, des études précédentes sur les galactolipides ont montré que les groupes d'espace $Ia3d$ et $Pn3m$ sont fréquemment observés

et corrélés avec le taux d'hydratation de la mésophase, i.e faible pour $Ia3d$ et élevé pour $Pn3m$ [58]. Par exemple, le diagramme de phase des galactolipides extraits de la membrane du thylacoïde montre une phase bicontinue qui appartient au groupe d'espace $Ia3d$ [59, 60]. Cependant, la structure de la phase formée par le mélange des galactolipides MGDG et DGDG purifiés à partir du grain de blé n'a jamais été décrite. Nos mesures de diffraction des rayons X pour le mélange équimolaire révèlent une phase cubique bicontinue appartenant au groupe d'espace $Im3m$ dont le paramètre de maille vaut 202 Å. La stabilisation de ce groupe d'espace est attribuée aux fortes interactions entre les têtes galactosyl pouvant mener à une légère diminution de la fluidité des chaînes relativement aux phases des lipides purs, comme observé par les données spectroscopiques mentionnées plus haut. Ce comportement spécifique en mésophase liquide-cristalline est aussi observé en monocouche par AFM. En effet, des petits domaines déconnectés de hauteur 4 Å ont été observés (figure 4.7.B). Il est difficile d'assigner ces domaines au DGDG ou au MGDG. Néanmoins, la différence de topographie pourrait être reliée à des changements d'orientation des têtes induits par les interactions entre les groupes galactosyl des deux galactolipides. Cette hypothèse est supportée par le spectre PM-IRRAS du mélange équimolaire qui semble indiquer que le groupe mono-galactosyl du MGDG force le groupe di-galactosyl du DGDG à adopter une orientation plus parallèle à l'interface. De plus, le nombre d'onde de la bande C=O à 35 mN/m est plus faible pour le mélange indiquant que celui-ci est plus hydraté que les deux lipides purs, même à forte pression de surface. Cette plus forte hydratation du mélange, comparée aux lipides purs, est également confirmée en mésophase liquide-cristalline sur les spectres Raman d'après le large pic de D₂O entre 2000 et 2800 cm⁻¹ (figure 4.15.A).

Finalement, il apparaît clairement que l'addition d'un seul groupe galactosyl dans la partie polaire modifie complètement l'organisation des molécules en monocouches et en phases liquide-cristallines. De plus, les résultats obtenus en monocouche et en phase liquide-cristalline mettent en évidence les interactions spécifiques entre les têtes polaires mono- et di-galactosyl dans le mélange équimolaire de ces deux lipides.

Bibliographie du chapitre 4

1. van den Brink-van der Laan, E., J.A. Killian, and B.D. Kruijff. 2004. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim. Biophys. Acta.* 1666:275-288.
2. Larsson, K. and S. Puang-Ngern. 1979. The aqueous system of monogalactosyl diglycerides and digalactosyl diglycerides - Significance to the structure of the thylakoid membrane. In *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*, L. Å. Appelqvist and C. Liljenberg, editors, Elsevier/North Holland Biomedical press. 27-33.
3. Marion, D., L. Dubreil, P.J. Wilde, and D.C. Clark. 1998. Lipids, lipid-protein interactions and the quality of baked cereal products. In *Interactions: the keys to cereal quality*. R. J. Hamer and R. C. Hoseneey, editors, AACC, St-Paul, MN. 131-167.
4. Turnbull, K.M. and S. Rahman. 2002. Endosperm texture in wheat. *Journal of Cereal Science.* 36:327-337.
5. Al Saleh, A., D. Marion, and D.J. Gallant. 1986. Microstructure of mealy and vitreous wheat endosperms (*Triticum durum* L.) with special emphasis on location and polymorphic behavior of lipids. *Food Microstructure.* 5:131-140.
6. Ohm, J.B. and O.K. Chung. 2000. NIR transmittance estimation of free lipid content and its glycolipid and digalactosyldiglyceride contents using wheat flour lipid extracts. *Cereal Chem.* 77:556-559.
7. Davies, J.T. and E.K. Rideal. 1963. *Interfacial Phenomena. Second Edition. Academic Press. New-York and London, Chapter 5.*
8. Tancrede, P., G. Chauvette, and R.M. Leblanc. 1981. General method for the purification of lipids for surface pressure studies. Application to monogalactosyldiglyceride. *Journal of Chromatography A.* 207:387-393.
9. Gallant, J. and R.M. Leblanc. 1991. Purification of galactofipids by high-performance liquid chromatography for monolayer and Langmuir-Blodgett film studies. *Journal of Chromatography A.* 542:307-316.
10. Bishop, D.G., J.R. Kenrick, J.H. Bayston, A.S. Macpherson, and S.R. Johns. 1980. Monolayers properties of chloroplast lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 602:248-259.
11. Sen, A., W.P. Williams, and P.J. Quinn. 1981. The structure and thermotropic properties of pure 1,2-diacylgalactosylglycerols in aqueous systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 663:380-389.

12. Popova, A.V. and D.K. Hinch. 2005. Effects of the sugar headgroup of a glycoylglycerolipid on the phase behavior of phospholipid model membranes in the dry state. *Glycobiology*. 15:1150-1155.
13. de Feijter, J.A., J. Benjamins, and F.A. Veer. 1978. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interfaces. *Biopolymers*. 17:1759-1772.
14. Tamada, K., H. Minamikawa, and M. Hato. 1996. Phase Transition in Glycolipid Monolayers Induced by Attractions between Oligosaccharide Head Groups. *Langmuir*. 12:1666 -1674.
15. Saccani, J. 2003. Réalisation de systèmes membranaires modèles et étude de leur organisation par microscopie à l'angle de Brewster, spectroscopie PM-IRRAS et dichroïsme circulaire vibrationnel. *Thèse de doctorat de l'université Bordeaux I*.
16. Blume, A., W. Huebner, and G. Messner. 1988. Fourier transform infrared spectroscopy of ¹³C=O-labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry*. 27:8239-8249.
17. Lewis, R.N., R.N. McElhaney, W. Pohle, and H.H. Mantsch. 1994. Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. *Biophys. J.* 67:2367-2375.
18. Cacela, C. and D.K. Hinch. 2006. Low amounts of sucrose are sufficient to depress the phase transition temperature of dry phosphatidylcholine, but not for lyoprotection of liposomes. *Biophys. J.* 90:2831-2842.
19. Blaudez, D., J.-M. Turlet, Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, and B. Desbat. 1996. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92:525-530.
20. Vié, V., N.V. Mau, E. Lesniewska, J.P. Goudonnet, F. Heitz, and C.L. Grimellec. 1998. Distribution of ganglioside GM1 between two-component, two-phase phosphatidylcholine monolayers. *Langmuir*. 14:4574-4583.
21. Shipley, C.G., J.P. Green, and B.W. Nichols. 1973. The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 311:531-544.
22. Tardieu, A., V. Luzzati, and F.C. Reman. 1973. Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: a study of lecithin-water phases. *J. Mol. Biol.* 75:711-733.
23. Hauet, N., F. Artzner, F. Bouchery, C. Grabielle-Madelmont, I. Cloutiery, G. Keller, P. Lesieur, D. Durand, and M. Paternostre. 2003. Interaction between Artificial Membranes

- and Enflurane, a General Volatile Anesthetic: DPPC-Enflurane Interaction. *Biophysical Journal*. 84:3123-3137.
24. Harper, P.E., D.A. Mannock, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, and S.M. Gruner. 2001. X-Ray Diffraction Structures of Some Phosphatidylethanolamine Lamellar and Inverted Hexagonal Phases. *Biophysical Journal*. 81:2693-2706.
 25. McDaniel, R.V. 1988. Neutron diffraction studies of digalactosyldiacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta*. 940:158-164.
 26. Gruner, S.M., M.W. Tate, G.L. Kirk, P.T.C. So, D.C. Turner, and D.T. Keane. 1988. X-ray diffraction study of the polymorphic behavior of N-methylated dioleoylphosphatidylethanolamine. *Biochemistry*. 27:2853-2866.
 27. Wiener, M.C., R.M. Suter, and J.F. Nagle. 1989. Structure of the fully hydrated gel phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biophysical Journal*. 55:315-325.
 28. Ranck, J.L., T. Keira, and V. Luzzati. 1977. A novel packing of the hydrocarbon chains in lipids the low temperature phases of dipalmitoyl phosphatidyl-glycerol. *Biochim. Biophys. Acta*. 488:432-441.
 29. McDaniel, R.V., T.J. McIntosh, and S.A. Simon. 1983. Nonelectrolyte substitution for water in phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*. 731:97-108.
 30. Cunningham, B.A. and L.J. Lis. 1986. Thiocyanate and bromide ions influence the bilayer structural parameters of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*. 861:237-242.
 31. McIntosh, T.J. and S.A. Simons. 1994. Long- and Short-Range Interactions between Phospholipid/Ganglioside GM1 Bilayers. *Biochemistry*. 33:10477-10486.
 32. Yu, Z.W., T.L. Calvert, and D. Leckband. 1998. Molecular Forces between Membranes Displaying Neutral Glycosphingolipids: Evidence for Carbohydrate Attraction. *Biochemistry*. 37:1540-1550.
 33. Seddon, J.M. and R.H. Templer. 1995. Polymorphism of lipid-water systems. In *Structure and Dynamics of Membranes. 2d ed, Vol. 1. R. Lipowsky and E. Sackmann, editors. Elsevier/North Holland, Amsterdam*. 98-160.
 34. Valéry, C., M. Paternostre, B. Robert, T. Gulik-Krzywicki, T. Narayanan, J.-C. Dedieu, G. Keller, M.-L. Torres, R. Cherif-Cheikh, P. Calvo, and F. Artzner. 2003. Biomimetic organization: Octapeptide self-assembly into nanotubes of viral capsid-like dimension. *PNAS*. 100:10258-10262.
 35. Luzzati, V., A. Tardieu, T. Gulik-Krzywicki, E. Rivas, and F. Reiss-Husson. 1968. Structure of the cubic phases of lipid-water systems. *Nature*. 7:485-488.

36. Rilfors, L., P.-O. Eriksson, G. Arvidson, and G. Lindblom. 1986. Relationship between Three-Dimensional Arrays of "Lipidic Particles" and Bicontinuous Cubic Lipid Phases. *Biochemistry*. 25:7702-7711.
37. Mannock, D.A., P.E. Harper, S.M. Gruner, and R.N. McElhaney. 2001. The physical properties of glycosyl diacylglycerols. Calorimetric, x-ray diffraction and Fourier transform spectroscopic studies of a homologous series of 1,2-di-O-acyl-3-O-(b-D-galactopyranosyl)-sn-glycerols. *Chemistry and Physics of Lipids*. 111:139-161.
38. Seddon, J.M. 1990. Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase, and non-lamellar transitions of lipids. *Biochim. Biophys. Acta*. 1031:1-69.
39. Seddon, J.M., J.L. Hogan, N.A. Warrender, and E. Pebay-Peroula. 1990. Structural studies of phospholipid cubic phases. *Prog. Coll. Polym. Sci*. 81::189-197.
40. Turner, D.C., Z.G. Wang, S.M. Gruner, D.A. Mannock, and R.N. McElhaney. 1992. Structural study of the inverted cubic alkyl-b-D-glucopyranosyl-rac-glycerol. *J. Phys. II France*. 2:2039-2063.
41. Raçon, Y. and J. Charvolin. 1988. Epitaxial Relationships during Phase Transformations in a Lyotropic Liquid Crystal. *J. Phys. Chem*. 92:2646-2651.
42. Kutsumizu, S., T. Ichikawa, M. Yamada, S. Nojima, and S. Yano. 2000. Phase transitions of 4'-n-Hexacosyloxy-3'-nitrobiphenyl-4-carboxylic acid (ANBC-26): two types of thermotropic cubic phases. *J. Phys. Chem. B*. 104:10196-10205.
43. Luzzati, V. 1968. X-ray diffraction studies of lipid-water systems. In *Biological Membranes, Vol 1, Ed. E. Chapman (Academic Press, London)*. 71-123.
44. Mariani, P., V. Luzzati, and H. Delacroix. 1988. Cubic phases of lipid-containing systems. Structure, analysis and biological implications. *J. Mol. Biol*. 204:165-189.
45. Gaines, G.L.J. 1966. In *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces. Prigorine, I., Ed. Interscience. New York, Chapter 6*.
46. Israelachvili, J. 1991. Intermolecular & Surface Forces. *Academic Press. Second Edition*. 366-421.
47. Lee, C. and C.D. Bain. 2005. Raman spectra of planar supported lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1711:59-71.
48. Gaber, B.P. and W.L. Peticolas. 1977. On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 465:260-274.
49. Snyder, R.G., J.R. Scherer, and B.P. Gaber. 1980. Effects of chain packing and chain mobility on the raman spectra of biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 601:47-53.

50. Bunow, M.R. and I.W. Levin. 1977. Comment on the carbon-hydrogen stretching region of vibrational raman spectra of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 487:388-394.
51. Huang, C., J.T. Mason, and I.W. Levin. 1983. Raman spectroscopic study of saturated mixed-chain phosphatidylcholine multilamellar dispersions. *Biochemistry.* 22:2775-2780.
52. Matsuura, K., H. Kitakouji, R. Oda, Y. Morimoto, H. Asano, H. Ishida, M. Kiso, K. Kitajima, and K. Kobayashi. 2002. Selective expansion of the GM3 glycolipid monolayer induced by carbohydrate-carbohydrate interaction with Gg3 trisaccharide-bearing glycoconjugate polystyrene at the air-water interface. *Langmuir.* 18:6940-6945.
53. Vill, V. and R. Hashi. 2002. Carbohydrate liquid crystals: structure-property relationship of thermotropic and lyotropic glycolipids. *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 7:395-409.
54. Popova, A.V. and D.K. Hinch. 2003. Intermolecular interactions in dry and rehydrated pure and mixed bilayers of phosphatidylcholine and digalactosyldiacylglycerol: a Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biophys. J.* 85:1682-1690.
55. Shinoda, K., A. Carlsson, and B. Lindman. 1996. On the importance of hydroxyl groups in the polar headgroup of nonionic surfactants and membrane lipids. *Advances in Colloid and Interface Science.* 64:253-271.
56. Howard, K.P. and J.H. Prestegard. 1996. Conformation and Dynamics of Membrane-Bound Digalactosyldiacylglycerol. *J. Am. Chem. Soc.* 118:3345-3353.
57. Howard, K.P. and J.H. Prestegard. 1995. Membrane and solution conformations of monogalactosyldiacylglycerol using NMR/molecular modeling methods. *J. Am. Chem. Soc.* 117:5031-5040.
58. Lindblom, G. and L. Rilfors. 1989. Cubic phases and isotropic structures formed by membrane lipids: possible biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta.* 988:221-256.
59. Brentel, I., E. Selstam, and G. Lindblom. 1985. Phase equilibria of mixtures of plant galactolipids: the formation of a bicontinuous cubic phase. *Biochim. Biophys. Acta.* 812:816-826.
60. Rivas, E. and V. Luzzati. 1969. Polymorphisme des lipides polaires et des galactolipides de chloroplastes de maïs en présence d'eau. *J. Mol. Biol.* 41:261-275.

CHAPITRE 5

CARACTERISATION DES PUROINDOLINES

| | |
|---|-----|
| I - Etude aux interfaces liquide/air et solide/air | |
| I.1 – Adsorption des protéines à l’interface liquide/air | |
| I.1.1 – Suivi d’une cinétique d’adsorption par tensiométrie et ellipsométrie..... | 135 |
| I.1.2 – Calcul du coefficient de diffusion..... | 137 |
| I.1.3 – Effet de la concentration sur l’adsorption de la pin-a et la pin-b..... | 138 |
| I.2 – Dépôt des protéines à la surface : isothermes et ellipsométrie | |
| 140 | |
| I.3 – Morphologie des films de protéines à différentes échelles | |
| I.3.1 – Microscopie à l’angle de Brewster..... | 142 |
| I.3.2 – Microscopie à force atomique..... | 145 |
| I.4 – Spectroscopie PM-IRRAS..... | |
| 147 | |
| II - Etude en solution | |
| II.1 – Spectroscopie Raman..... | |
| 150 | |
| II.2 – Diffusion des rayons X aux petits angles sur une solution de pin-a..... | |
| 151 | |
| Conclusion et discussion relatives au chapitre 5..... | |
| 153 | |
| Bibliographie..... | |
| 154 | |

CHAPITRE 5

CARACTERISATION DES PUROINDOLINES

Avant d'étudier les interactions entre les puroindolines et les galactolipides, il est nécessaire de comparer les propriétés des deux isoformes pin-a et pin-b. Ces protéines ont révélé des propriétés de surface exceptionnelles (propriétés moussantes notamment) et semblent intervenir sur l'organisation de la matrice amylo-protéique de l'albumen du grain de blé [1, 2], comme décrit au chapitre 1. Ces propriétés sont essentielles pour la transformation du blé en farine et produits de cuisson (pains, biscuits, pâtes alimentaires...). Ainsi, l'étude des propriétés interfaciales représente une importance tant au niveau fondamental que technologique nécessitant alors des investigations systématiques.

Ce chapitre présente différentes expériences réalisées à l'interface liquide/air et solide/air. Pour cela, deux techniques ont été utilisées : soit l'adsorption libre des molécules à l'interface, soit le dépôt direct des molécules à la surface. Dans chaque cas, la caractérisation a été possible par des mesures de tensiométrie, ellipsométrie, spectroscopie PM-IRRAS, microscopie à l'angle de Brewster et microscopie à force atomique. De plus, quelques résultats sur les propriétés des puroindolines en solution, obtenus en spectroscopie Raman et diffusion des rayons X aux petits angles, compléteront ce chapitre.

I – Etude aux interfaces liquide/air et solide/air

Les solutions protéiques sont préparées à partir des poudres de protéines obtenues après purification, comme décrit au chapitre 2, dissoutes dans la sous-phase (NaCl 0.1 M). On prépare généralement 1 mL de solution à une concentration peu élevée pour éviter tout problème d'agrégation des protéines, de l'ordre de 0.5 à 1 mg/mL. Pour vérifier la concentration de la solution fraîchement préparée, on réalise une mesure d'absorption à 280 nm (annexe 4). La solution est conservée durant une semaine environ après sa préparation. Dans le but d'alléger le manuscrit, le détail des procédures expérimentales est reporté dans l'annexe 5.

I.1 – Adsorption des protéines à l'interface liquide/air

I.1.1 – Suivi d'une cinétique d'adsorption par tensiométrie et ellipsométrie

Après injection des protéines en sous-phase, la cinétique d'adsorption peut être suivie par tensiométrie, qui renseigne sur les interactions latérales entre molécules, et par ellipsométrie qui permet d'évaluer la quantité de matière à l'interface. Un exemple concernant l'isoforme a injectée en sous-phase à une concentration $10 \cdot 10^{-8}$ mol/L est présenté à la figure 5.1. Les incertitudes expérimentales sont de ± 0.2 mN/m pour la pression de surface et $\pm 0.2^\circ$ pour l'angle ellipsométrique.

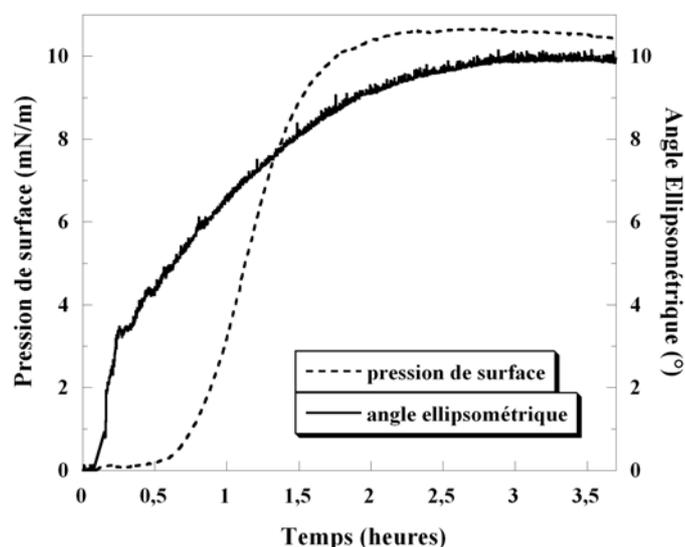


Figure 5.1 : suivi de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique au cours de la cinétique d'adsorption de pin-a injectée à une concentration de $C = 10 \cdot 10^{-8}$ mol/L à 19°C .

Après l'injection de pin-a dans la cuve, la pression de surface augmente régulièrement au fur et à mesure que les molécules s'adsorbent à l'interface liquide/air et qu'elles

commencent à interagir entre elles. La pression de surface atteinte en fin de cinétique est nommée pression de plateau (π_p) ; sur l'exemple présenté à la figure 5.1, elle vaut 10.7 mN/m. Parallèlement à la pression de surface, l'angle ellipsométrique augmente jusqu'à saturer à une valeur de 10°.

Nous allons comparer ces valeurs à deux protéines globulaires de poids moléculaire proche de celui de la pin-a : d'une part le lysozyme, une protéine de l'œuf de 14.3 kDa, et d'autre part la caséine kappa, une protéine du lait chèvre de 19.3 kDa (tableau 5.1).

| | C ($\times 10^{-8}$ mol/L) | π (mN/m) | Δ (°) | D ($\times 10^{-10}$ m ² /s) | Γ_0 (mg/m ²) | θ_1 (mN*m/mg) (pente de la courbe Γ - π) |
|-----------------------|-----------------------------|--------------|--------------|--|---------------------------------|--|
| pin-a | 10 | 10.7 | 10 | 8.0 | 0.9 | 5.0 |
| caséine kappa chèvre* | 10 | 10.0 | 12.5 | 0.5 | 1.2 | 3.3 |
| lysozyme † | 20 | 5.5 | 7.5 | - | - | - |

Tableau 5.1 : comparaison des valeurs des pressions de surface π et des angles ellipsométriques Δ atteints en fin de cinétique d'adsorption de la pin-a, du lysozyme et de la caséine kappa de chèvre ; * d'après [3], † d'après [4]. On compare aussi les valeurs des coefficients de diffusion D, des taux de couverture Γ_0 et des pentes θ_1 obtenus d'après la figure 5.2 pour la pin-a et d'après [3] pour la caséine kappa.

Pour une même concentration, la pin-a et le lysozyme ont des comportements similaires tandis que l'adsorption du lysozyme à une concentration deux fois plus importante se traduit par des valeurs plus faibles de pression de surface et d'angle ellipsométrique. Cela met en évidence une plus forte affinité pour l'interface de la pin-a et de la caséine kappa. Nous reviendrons sur la comparaison entre la pin-a et la caséine kappa dans les paragraphes suivants.

Dans le cas de l'adsorption de protéines globulaires à l'interface liquide/air, l'angle ellipsométrique est relié linéairement à la concentration de surface (équation 3.12) [5]. D'après la figure 5.1, la concentration surfacique en fin de cinétique est de 2 mg/m². Par rapport à la quantité de matière injectée, on estime qu'un tiers des molécules s'adsorbe à l'interface. On peut remarquer que l'angle ellipsométrique passe de 0 à 3° juste après l'injection de la protéine dans la cuve. Cet angle étant sensible à la quantité de matière à la surface, il semble que les protéines migrent très rapidement vers l'interface. Nous allons voir qu'il est possible de déterminer le coefficient de diffusion des protéines d'après les données ellipsométriques.

I.1.2 – Calcul du coefficient de diffusion

Le tracé de Γ en fonction de π permet de déterminer le taux de couverture Γ_0 à partir duquel la pression de surface devient différente de zéro (figure 5.2.A). θ_1 est obtenu à partir de la pente de la courbe Γ - π et correspond à l'augmentation de la pression de surface relative à l'augmentation de la concentration surfacique [6]. De plus, lors de la première étape de l'adsorption, le transport des molécules protéiques de la sous-phase à l'interface est supposé être un processus à diffusion contrôlée. Ainsi, la concentration de surface suit la relation de Ward et Tordai [7] décrite par l'équation suivante :

$$\Gamma = 2C_b.(D.t/\pi)^{1/2}$$

où Γ est la concentration de surface, C_b est la concentration de protéine en solution, D est le coefficient de diffusion et t le temps.

Le graphique Γ - $t^{1/2}$ (figure 5.2.B) montre une corrélation linéaire dans la partie initiale de la courbe rendant possible la détermination du coefficient de diffusion. La pente θ_2 vaut $2.4 \times 10^{-8} \text{ kg.m}^{-2}.\text{s}^{-1/2}$.

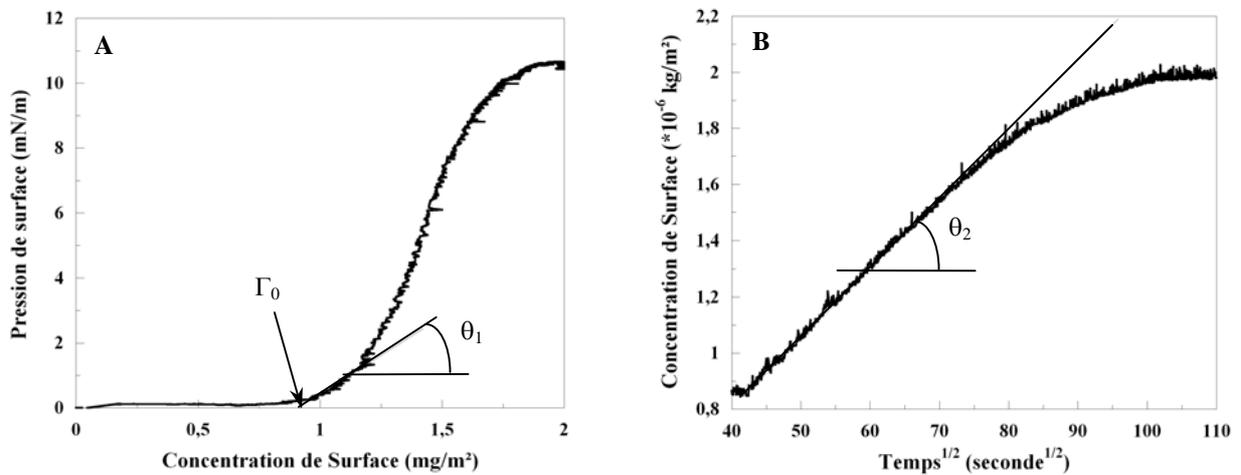


Figure 5.2 : courbes issues des mesures de tensiométrie et d'ellipsométrie présentées à la figure 5.1. A : pression de surface π en fonction de la concentration de surface Γ . B : Γ en fonction de la racine carrée du temps.

Nous comparons dans le tableau 5.1 les valeurs des coefficients de diffusion, des taux de couverture Γ_0 et des pentes θ_1 obtenus pour la pin-a et pour la caséine kappa [3]. Il a été démontré que la caséine kappa s'agrège fortement en solution entraînant une diffusion très lente à l'interface à cause de la taille des agrégats. La valeur du coefficient de diffusion de pin-a est très supérieure à celle de la caséine kappa ainsi qu'à d'autres obtenues pour des

protéines globulaires [5]. On peut alors supposer que la pin-a ne s'agrège pas ou très peu en solution.

I.1.3 – Effet de la concentration sur l'adsorption de la pin-a et la pin-b

L'expérience de tensiométrie présentée ci-dessus pour la pin-a a été reproduite avec les deux isoformes a et b à des concentrations variant de $4 \cdot 10^{-8}$ à $40 \cdot 10^{-8}$ mol/L. Sur la figure 5.3, nous reportons les valeurs des pressions de plateau atteintes en fin de cinétique (π_p) en fonction de la concentration de protéines en sous-phase. Les expériences ont été répétées au moins deux fois, l'incertitude expérimentale est de ± 0.4 mN/m.

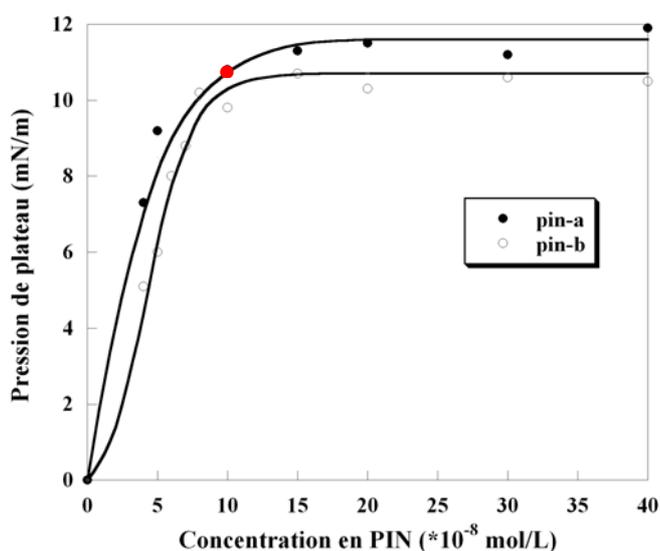


Figure 5.3 : évolution de la pression de plateau en fonction de la concentration de protéine en sous-phase à 19°C. Chaque point correspond à une cinétique ; le point rouge fait référence à la cinétique présentée à la figure 5.1. Les courbes permettant de lisser les points sont présentées également.

Pour les faibles concentrations, les pressions de plateau progressent significativement lorsque la concentration de protéines en sous-phase augmente. Lorsque l'on dépasse $15 \cdot 10^{-8}$ mol/L, celles-ci se stabilisent autour d'une valeur de 11.9 et 10.6 mN/m pour la pin-a et la pin-b, respectivement. Ce plateau signifie que l'interface est totalement saturée. Il se produit ensuite des échanges entre l'interface et la sous-phase. En particulier, il peut y avoir soit une accumulation des protéines sous l'interface, entraînant la formation de multicouches, soit une accumulation en solution, conduisant à une éventuelle agrégation des molécules.

Nous avons estimé précédemment qu'un tiers des molécules injectées à $C = 10 \cdot 10^{-8}$ mol/L s'adsorbait à l'interface. Ainsi, même si l'interface n'est pas complètement saturée, une grande partie des molécules reste en solution. Cette observation laisse penser qu'en adsorption

libre, les puroindolines n'ont pas tendance à s'accumuler en multicouches à l'interface une fois qu'une première couche de protéines est adsorbée. Néanmoins, il est difficile de savoir si les protéines s'agrègent en solution. Nous obtiendrons une ébauche de réponse à la fin de ce chapitre grâce à la diffusion des rayons X aux petits angles.

Pour les expériences suivantes, notamment avec les galactolipides, on prendra soin de travailler à des concentrations de protéines bien inférieures à $15 \cdot 10^{-8}$ mol/L ($C = 7 \cdot 10^{-8}$ mol/L) de manière à ne pas être dans des conditions de saturation de l'interface.

Les valeurs des plateaux sont de 11.9 et 10.6 mN/m pour la pin-a et la pin-b, respectivement et ceux-ci sont atteints à partir d'une concentration de $15 \cdot 10^{-8}$ mol/L. Pour cette même concentration, la pression de surface atteinte est de 12 mN/m pour les caséines kappa [3], valeur très similaire à celles des puroindolines. Néanmoins, pour les caséines kappa, la pression de surface sature à 20 mN/m à partir d'une concentration en solution de $70 \cdot 10^{-8}$ mol/L [3].

Le caractère amphiphile est légèrement plus marqué pour la pin-a (11.9 mN/m) que pour la pin-b (10.9 mN/m). Les puroindolines possèdent un domaine riche en tryptophane qui est tronqué chez la pin-b (pin-a: WRWWKWWK, pin-b: WPTKWWK). Le fait que la pin-a possède deux tryptophanes supplémentaires contribue certainement à augmenter son caractère hydrophobe. Cet acide aminé est connu pour être hydrophobe et pour former des liaisons hydrogène avec les composés polaires, c'est pourquoi on le retrouve souvent aux interfaces hydrophile/hydrophobe formées par les lipides [8-11]. De plus, Kooijman et al ont suggéré que le domaine riche en tryptophane forme probablement une boucle à l'extérieur de la protéine [12]. Ainsi, la boucle formée dans le cas de la pin-a est plus amphiphile et certainement plus flexible (de par la présence de deux tryptophanes supplémentaires) que celle de la pin-b augmentant ainsi l'accessibilité à l'interface.

Bilan intermédiaire

Les expériences d'adsorption libre ont montré que les deux isoformes ont une activité quasiment identique à l'interface bien que les propriétés amphiphiles soient légèrement plus marquées pour l'isoforme a. Ceci laisse penser que le domaine unique riche en tryptophane est intimement relié aux propriétés de surface. La détermination du coefficient de diffusion de la pin-a montre que les protéines migrent très rapidement à l'interface en gardant un équilibre entre la sous-phase et l'interface. L'interface est saturée à partir d'une concentration de pin-a extrêmement faible.

I.2 – Dépôt des protéines à la surface : isothermes et ellipsométrie

La première approche a été de comparer les propriétés amphiphiles des deux puroindolines et nous venons d'observer que les deux isoformes présentent une affinité pour l'interface liquide/air. On peut ainsi déposer les molécules directement à l'interface afin de mieux contrôler la quantité de matière à la surface. La réalisation d'isothermes de compression après dépôt des molécules à l'interface permet d'obtenir des informations sur l'aire moyenne occupée par les molécules en contrôlant l'aire accessible et sur les interactions latérales en mesurant la tension superficielle. Parallèlement, la mesure de l'angle ellipsométrique permet d'estimer la quantité de matière à l'interface.

On présente à la figure 5.4 les variations de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire moyenne pour la pin-a et la pin-b. Les incertitudes expérimentales sont de ± 0.2 mN/m pour la pression de surface et $\pm 0.2^\circ$ pour l'angle ellipsométrique.

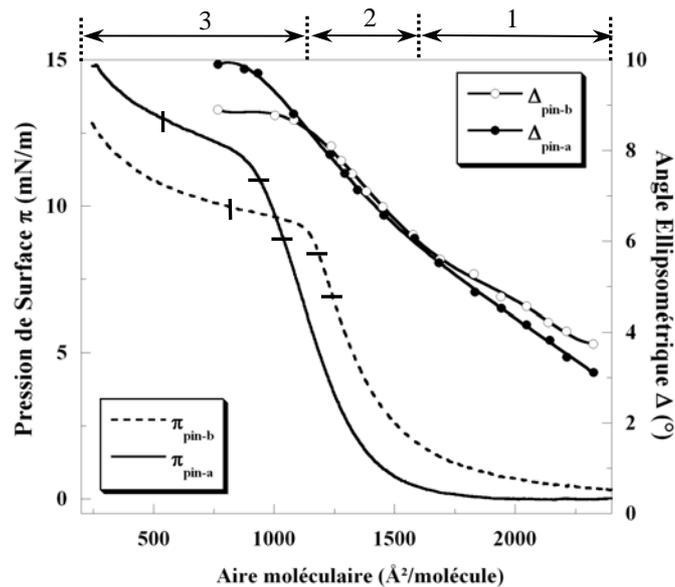


Figure 5.4 : évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique en fonction de l'aire moléculaire moyenne des puroindolines à 19°C ; on y indique les numéros des régions étudiées. Les encoches indiquent les pressions de surface auxquelles ont été réalisés les prélèvements pour la microscopie à force atomique.

Les deux isothermes de compression montrent une forme identique avec une augmentation régulière de la pression de surface lorsque l'aire moléculaire diminue jusqu'à l'apparition d'un point d'inflexion et d'un plateau. Sur ce plateau, la pression de surface augmente très lentement correspondant à la saturation de la surface occupée par les molécules. Un décalage entre les courbes des deux isoformes est observé concernant la pression de surface et l'aire moléculaire moyenne. Les coordonnées du point d'inflexion,

déterminées par l'intersection entre la tangente au plateau et la tangente à la pente de l'isotherme, correspondent à la pression de surface du plateau (π_p) et à l'aire moléculaire moyenne minimale (A_p). On constate que les valeurs obtenues pour la pin-a ($\pi_p = 11.6$ mN/m et $A_p = 940$ Å²/molécule) sont inférieures à celles de la pin-b (9.4 mN/m et 1140 Å²/molécule).

Nous allons séparer l'analyse de la figure 5.4 en trois parties : la région des grandes aires moléculaires moyennes (1), la région intermédiaire (2) et la région du plateau (3) ($A < 940$ et 1140 Å²/molécule pour la pin-a et la pin-b, respectivement).

Dans la région 1 ($A > 1600$ Å²/molécule), une augmentation légère et régulière de la pression de surface est détectée pour pin-b, tandis que celle-ci reste nulle dans le cas de pin-a. Il semble que les molécules de pin-b interagissent plus rapidement entre elles par rapport à pin-a. On peut supposer que certains domaines de la séquence d'acides aminés de pin-b sont plus dépliés à l'interface permettant des contacts plus rapidement. Parallèlement, les valeurs de l'angle ellipsométrique Δ pour la monocouche de pin-b sont plus élevées que celles de pin-a. Cela signifie qu'à une aire moléculaire moyenne donnée, la quantité de matière est plus importante pour pin-b que pin-a, en accord avec les interactions latérales plus fortes détectées pour la pin-b dans cette région.

Dans la région 2, les deux courbes ellipsométriques des puroindolines montrent la même évolution. Les deux monocouches présentent donc des quantités de matière identiques à l'interface.

Finalement, à l'aire moléculaire moyenne minimale A_p de chaque isoforme, les valeurs des angles ellipsométriques sont respectivement de 9.7 et 8.5° pour la pin-a et la pin-b. Lorsque les films sont compactés au maximum, la monocouche de pin-a est donc plus dense que celle de pin-b. En considérant que la pin-a possède un acide aminé de moins que la pin-b, la différence observée entre les deux angles ellipsométriques d'environ un degré ($\pm 0.2^\circ$) est significative. Cela suggère des orientations différentes des protéines à l'interface qui pourraient mener à des compactages plus ou moins denses des films. Cette question sera abordée lors des mesures de PM-IRRAS (I.1.4). De plus, il est très intéressant d'observer qu'en fin de compression, l'angle ellipsométrique des puroindolines sature à une valeur constante. Bien que l'on continue à comprimer les molécules, la quantité de matière n'évolue plus à l'interface. Deux phénomènes peuvent alors se produire : soit les protéines s'assemblent en un nombre de couches déterminé et constant, soit elles sont expulsées de

l'interface vers la sous-phase. Nous reviendrons sur ce point lors de l'observation des films protéiques par microscopie à force atomique.

Bilan intermédiaire

Les mesures de tensiométrie et d'ellipsométrie sur les isoformes a et b déposées à l'interface ont montré des différences. La pin-a est plus compressible que la pin-b et, comme observé lors de l'adsorption libre, elle montre des propriétés amphiphiles légèrement plus marquées. Au point de compressibilité maximale, le film de pin-a est plus dense à l'interface (plus forte quantité de matière).

I.3 – Morphologie des films de protéines à différentes échelles

I.3.1 – Microscopie à l'angle de Brewster

Pour les expériences de microscopie à l'angle de Brewster, nous ne présenterons que le cas de la pin-a car les images obtenues n'ont pas montré de différences significatives entre les deux isoformes. Nous avons d'abord suivi la cinétique d'adsorption de la pin-a ($C = 8.10^{-8}$ mol/L) pour observer la formation du film à l'interface. Puis, en fin de cinétique, les molécules adsorbées ont été comprimées légèrement au-delà de la pression du plateau de l'isotherme de pin-a pour observer le comportement du film sous l'effet de la compression. Les images de microscopie à l'angle de Brewster ont été réalisées à différents stades de l'adsorption et de la compression comme montré à la figure 5.5. La résolution des images est de l'ordre du μm .

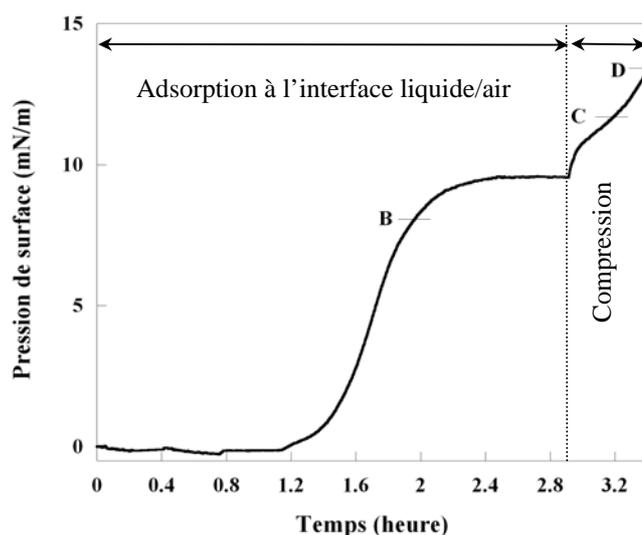


Figure 5.5 : cinétique d'adsorption de l'isoforme a injectée en sous-phase à $C = 8.10^{-8}$ mol/L puis évolution de la pression de surface sous l'effet d'une compression des molécules adsorbées à $v = 2$ cm^2/min . Les encoches indiquent les pressions de surface auxquelles les images Brewster ont été réalisées (figure 5.6).

La figure 5.5 montre une augmentation régulière de la pression de surface lors de l'adsorption des molécules à l'interface liquide/air. En fin de cinétique, la pression de surface atteinte est de 9.6 mN/m. Lorsque les protéines adsorbées sont comprimées, on observe une augmentation importante de la pression de surface jusqu'à 13.5 mN/m (aire minimale atteinte). On observe un point d'inflexion à 11.6 mN/m qui correspond à la pression de surface du plateau observé sur l'isotherme de la pin-a (π_p).

Nous présentons à la figure 5.6 les images de microscopie à l'angle de Brewster réalisées lors de l'adsorption à des pressions de surface valant 1.2, 8.0 et 9.6 mN/m ; ainsi que lors de la compression à 11.7 et 13.5 mN/m. Toutes les images ont été corrigées de la même façon pour pouvoir comparer les niveaux de gris.

Parallèlement, nous ajoutons deux images Brewster réalisées à Bordeaux lors d'une surcompression d'un film de protéines (figure 5.7). Les images ont été réalisées bien au delà du plateau à une pression de surface d'environ 15 mN/m.

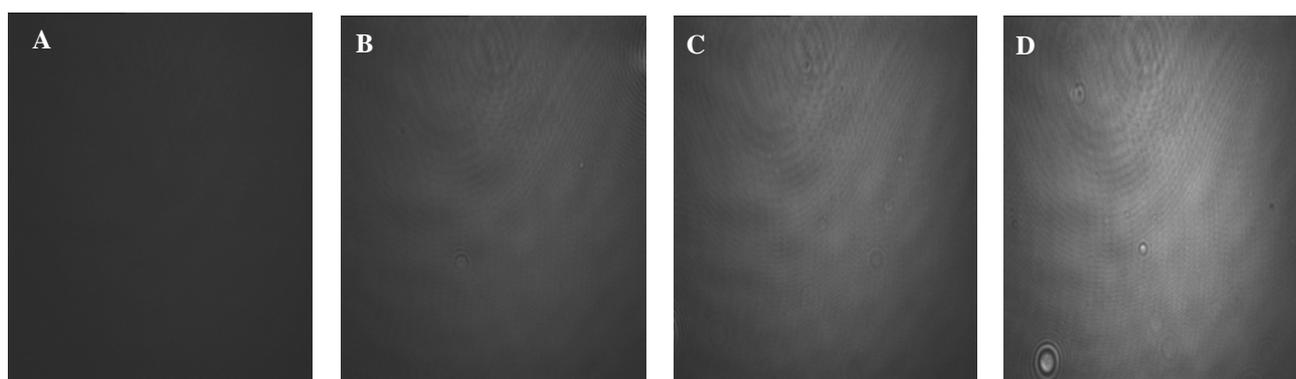


Figure 5.6 : images Brewster ($430 \times 540 \mu\text{m}^2$) réalisées au cours de l'adsorption à l'interface liquide/air et de la compression de la pin-a. A : sous-phase avant l'injection de la protéine. Adsorption: B : $\pi = 8.0 \text{ mN/m}$, Compression: C : $\pi = 11.7 \text{ mN/m}$, D : $\pi = 13.5 \text{ mN/m}$.

Concernant l'adsorption de la pin-a à l'interface liquide/air, nous observons une augmentation régulière du niveau de gris au fur et à mesure que la pression de surface augmente (image B). Quelle que soit la pression de surface, on n'observe pas de domaine ce qui témoigne d'un film extrêmement homogène à l'échelle du μm .

A la fin de la cinétique d'adsorption, les molécules qui se trouvent à l'interface liquide/air sont comprimées. Sur l'image C, correspondant à la pression du plateau observé sur l'isotherme de la pin-a (π_p), aucun domaine n'est observé bien que l'on discerne quelques agrégats. Par comparaison avec l'image C, on remarque que le niveau de gris a sensiblement augmenté sur l'image D, enregistrée au delà de la pression de plateau π_p , alors que la

différence de pression de surface est faible entre ces deux images ($< 2 \text{ mN/m}$). De plus, un seul niveau de gris apparaît. Cela suggère qu'après le plateau, la pin-a forme des structures de type multicouches très régulières. Cela corrobore le fait que l'angle ellipsométrique sature au delà du plateau, comme observé à la figure 5.4.

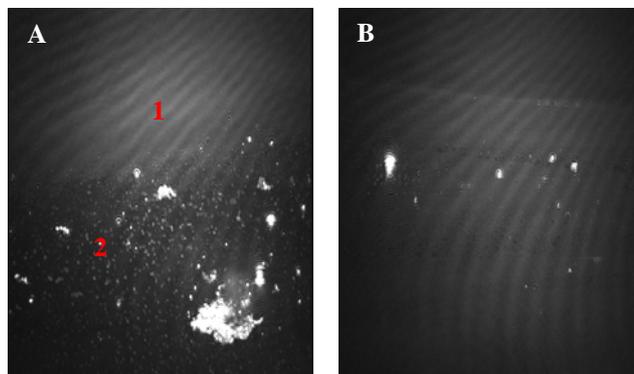


Figure 5.7 : images Brewster ($430 \times 540 \mu\text{m}^2$) réalisées au cours de la surcompression d'un film de pin-a à $\sim 15 \text{ mN/m}$. Vitesse d'obturation de la caméra au $50^{\text{ème}}$ (A) et au $250^{\text{ème}}$ de seconde (B).

Sur les images réalisées, on identifie clairement la présence de deux niveaux de gris. Sur l'image A, on observe un domaine déjà formé (1) et un autre en train de se former par coalescence de petits domaines (2). On attribue les deux niveaux de gris à la présence de multicouches due à une forte surcompression. De plus, on identifie la présence de nombreux agrégats (A).

Bilan intermédiaire

Les images de microscopie à l'angle de Brewster montrent que le film de puroindoline adsorbée à l'interface liquide/air est très homogène du début à la fin de l'adsorption, avec une augmentation du niveau de gris proportionnellement à la quantité de matière adsorbée. Le niveau de gris augmente sensiblement lorsque l'on comprime les molécules (D) suggérant la formation d'une couche supplémentaire par rapport à l'adsorption.

Les images de la figure 5.7 semblent indiquer que lors d'une surcompression, la pin-a a tendance à former des structures de type multicouches et non des agrégats. Dans le but d'observer les films de protéines à des échelles plus petites, nous avons utilisé la microscopie à force atomique.

I.3.2 – Microscopie à force atomique

Les observations par microscopie à force atomique des films de Langmuir-Blodgett ont été réalisées en mode contact. Les images topographiques ont été acquises en mode force constante en utilisant une pointe en nitrure de silicium avec une constante de raideur k de 0.06 N/m. Deux scanners de 10 et 100 μm ont été utilisés. Les images ont été obtenues à partir d'au moins deux échantillons différents sur lesquels nous avons sondé au moins cinq zones séparées macroscopiquement. Nous avons indiqué sur les isothermes présentées à la figure 5.4 les différentes pressions de surface où les observations par microscopie à force atomique ont été réalisées, c'est-à-dire, avant, sur et après le plateau de l'isotherme. Nous présentons sur les figures 5.8 et 5.9 les images obtenues pour la pin-a et la pin-b, respectivement.

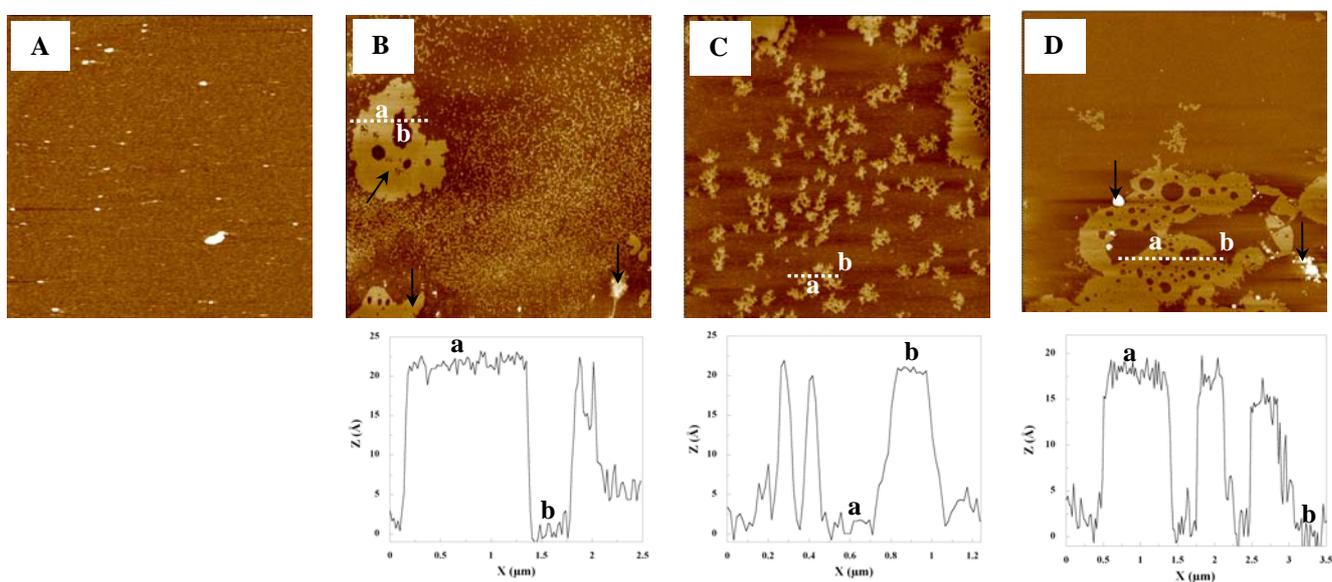


Figure 5.8 : images réalisées en microscope à force atomique sur des films LB de pin-a à différentes pressions de surface. A : $\pi = 9 \text{ mN/m}$, ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$). B : $\pi = 11 \text{ mN/m}$, ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$). C : $\pi = 11 \text{ mN/m}$, ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$). D : $\pi = 13 \text{ mN/m}$, ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$). Echelle en z : A : $\Delta z = 50 \text{ \AA}$, B et C : $\Delta z = 75 \text{ \AA}$, D : $\Delta z = 100 \text{ \AA}$. Les sections horizontales correspondant aux traits pointillés (images B, C et D) sont présentées également.

A 9 mN/m, c'est-à-dire avant la pression de plateau π_p , le film est relativement homogène avec la présence de petits agrégats (A).

A une pression superficielle proche de la pression de plateau, les images B et C montrent clairement une évolution du film qui tend à former des surépaisseurs de hauteurs très régulières d'environ 1.8 à 2.0 nm. Cette valeur laisse penser que la pin-a forme des structures de type bicouches lorsque l'on comprime les molécules. La hauteur de 1.8 nm peut paraître faible pour une couche de protéines mais on peut penser que la deuxième couche de protéines dont on mesure l'épaisseur est certainement ancrée dans la première.

L'image B est particulièrement intéressante. On observe de larges domaines de protéines (indiqués par des flèches) entourés par des espaces très pauvres en agrégats, tandis que le reste de l'image représente une multitude de petits domaines prêts à coalescer en un plus grand. La formation de cette bicouche semble être gouvernée d'une part par la formation de petits domaines isolés, puis par le regroupement de ces domaines en un plus grand, comme observé sur l'image C.

Au-delà du plateau (D), ces structures en bicouche se densifient en conservant une hauteur de 1.8 à 2.0 nm. De plus, quelques points d'agrégation sont observés (repérés par des flèches). Ainsi, même au-delà du plateau, la pin-a ne semble pas former de multicouches. Le processus d'assemblage des protéines s'arrête à la formation d'une bicouche. Cela nous permet d'expliquer la saturation de la valeur de l'angle ellipsométrique (figure 5.4).

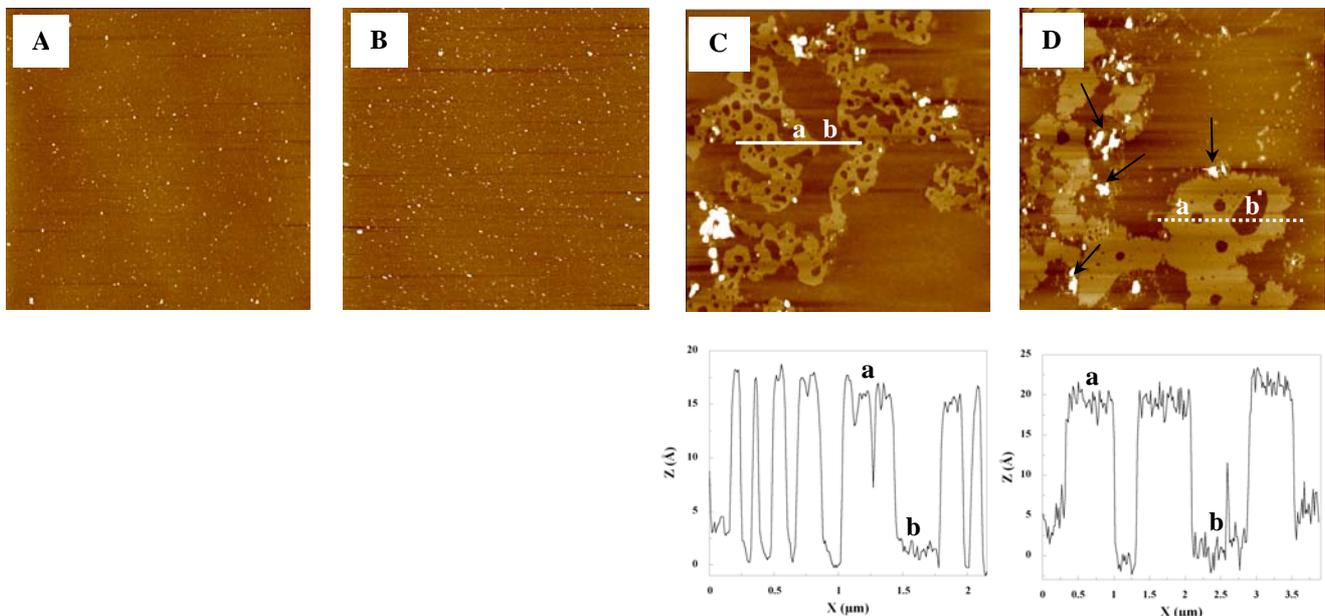


Figure 5.9 : images réalisées en microscope à force atomique sur des films LB de pin-b à différentes pressions de surface. A : $\pi = 7 \text{ mN/m}$, ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$). B : $\pi = 8.5 \text{ mN/m}$, ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$). C : $\pi = 8.5 \text{ mN/m}$, ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$). D : $\pi = 10 \text{ mN/m}$, ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$). Echelle en z : A, B : $\Delta z = 50 \text{ \AA}$; C, D : $\Delta z = 100 \text{ \AA}$. Les sections horizontales correspondant aux traits pointillés (images C et D) sont présentées également.

Le comportement de la pin-b est très similaire à celui de la pin-a. Aux faibles pressions de surface (A), la pin-b forme un film continu relativement homogène avec la présence de petits domaines circulaires plus épais. Sur le plateau, on dénote la présence de ces mêmes domaines (B) ainsi que la formation de surépaisseurs d'une hauteur très régulière d'environ 1.8 nm (C). Finalement, sur le plateau (D), la pin-b forme le même type de

structures que la pin-a, c'est-à-dire des structures de type bicouche, ainsi que des points d'agrégation plus nombreux que pour la pin-a (indiqués par des flèches).

Bilan intermédiaire

Les deux isoformes semblent se structurer de façon similaire en fonction de la pression de surface du film. Avant le plateau, les puroindolines forment des films homogènes, c'est-à-dire des structures en monocouche, avec la présence de nano-domaines de hauteur plus importante. Sur le plateau, on voit apparaître des surépaisseurs d'une hauteur régulière qui semblent provenir du regroupement de nombreux petits domaines entre eux. Nous attribuons ces domaines à des bicouches. Au delà du plateau, on retrouve ces bicouches qui ont une hauteur d'environ 1.8 à 2.0 nm. Ces organisations adoptées par les puroindolines semblent indiquer qu'elles sont très structurées à l'interface malgré la présence de quelques zones agrégées, particulièrement dans le cas de la pin-b.

I.4 – Spectroscopie PM-IRRAS

La figure 5.10 montre les spectres PM-IRRAS de monocouches de puroindolines a et b obtenues par deux méthodes différentes : par dépôt à la surface et par injection en sous-phase. L'objectif de cette étude est d'obtenir des informations sur la structure secondaire des protéines et sur l'orientation de certains groupements moléculaires à l'interface liquide/air.

Les spectres ont été enregistrés dans la région spectrale allant de 1800 à 1400 cm^{-1} , caractéristique des modes vibrationnels des bandes amide I et II des protéines. La quantité de protéines déposée ou injectée a été choisie telle que la pression de surface de travail soit inférieure à celle du plateau π_p observée sur l'isotherme de chaque isoforme (figure 5.4). En effet, il est important pour ces expériences d'éviter l'auto-agrégation non contrôlée et la formation de structures tridimensionnelles qui pourraient induire des perturbations sur les mesures interfaciales.

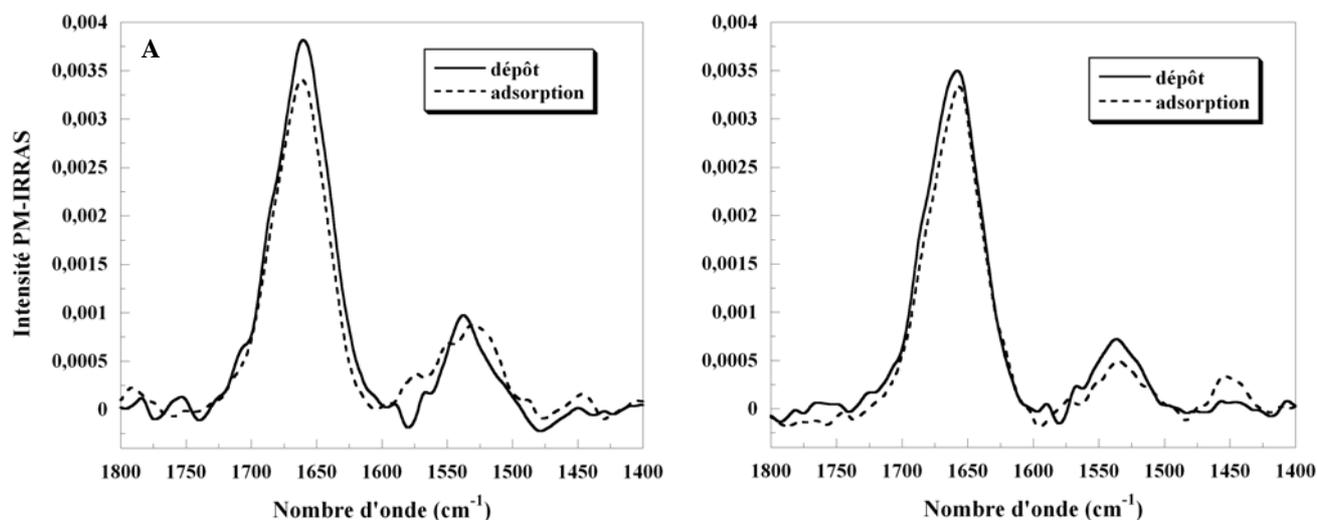


Figure 5.10 : spectres PM-IRRAS des puroindolines. A : comparaison des spectres de la pin-a adsorbée à l'interface ($C = 7.10^{-8}$ mol/L) à $\pi = 8.8$ mN/m et déposée à la surface à $\pi = 11.0$ mN/m. B : comparaison des spectres de la pin-b adsorbée à l'interface ($C = 7.10^{-8}$ mol/L) à $\pi = 6.4$ mN/m et déposée à la surface à $\pi = 9.0$ mN/m.

Les quatre spectres présentés ci-dessus montrent des profils similaires : on observe pour chacun deux bandes positives localisées à 1659 et 1537 cm^{-1} correspondant respectivement à la bande amide I (la plus intense) et à la bande amide II.

Des corrélations ont été faites dans la littérature entre la position de la bande amide I et la structure secondaire de la protéine [13]. Il a ainsi été montré que les bandes amide I et II d'hélices α sont respectivement observées entre 1648 et 1660 cm^{-1} et 1535 et 1550 cm^{-1} . Ce résultat suggère que les puroindolines a et b adoptent principalement une structure secondaire

en hélices α quelque soit la méthode de formation des films à l'interface. Par ailleurs, il a été établi que la position en fréquence de la bande amide I varie de façon inversement proportionnelle à la longueur de l'hélice et que la position en fréquence de la bande amide I d'une hélice α infinie se situe à environ 1653 cm^{-1} [14]. Le profil des spectres obtenus et la position de la bande amide I à 1659 cm^{-1} suggèrent donc que les puroindolines sont composées de plusieurs hélices α plutôt courtes dont la longueur moyenne est d'environ quinze résidus.

De plus, de nombreuses similitudes ont été mises en évidence entre les structures secondaires des puroindolines et des protéines de transfert de lipides (LTP) [15]. La structure tridimensionnelle des LTP a été résolue [16] et a montré que cette protéine est composée d'un faisceau de quatre hélices α . Le Bihan et al ont également prédit la présence de quatre hélices α dans la structure des puroindolines [17]. Partant de ces résultats, nous supposons que les puroindolines sont composées de quatre hélices α afin d'aller plus loin dans nos investigations. Des simulations numériques ont montré que le profil des bandes amide est fortement corrélé à l'orientation des hélices α par rapport à la normale à l'interface (figure 5.11).

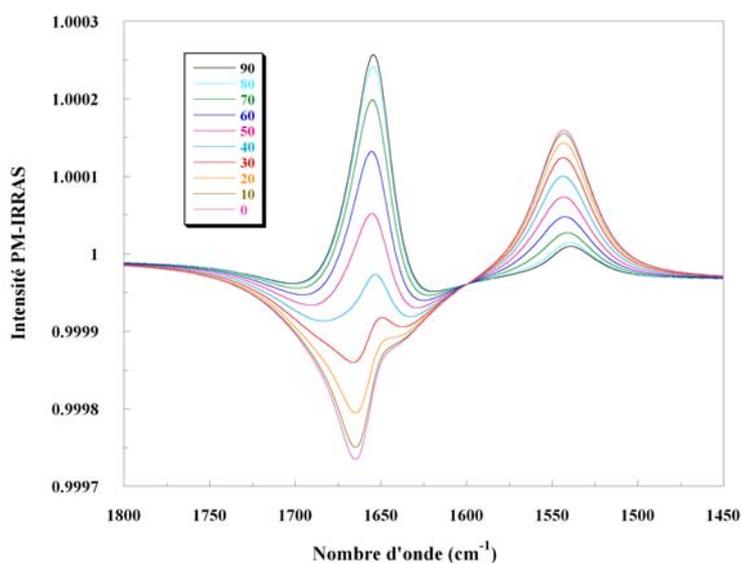


Figure 5.11 : spectres PM-IRRAS simulés pour différentes orientations des hélices α par rapport à la normale à l'interface liquide/air.

Le profil des spectres expérimentaux obtenus avec notamment une bande amide I intense et positive suggère que les quatre hélices sont orientées dans la même direction par rapport à la normale à l'interface. D'autre part, plusieurs études ont montré qu'il était possible

d'obtenir des informations sur l'orientation des hélices dans un film en calculant le rapport des intensités des bandes amide I et II [18-20]. Les spectres PM-IRRAS simulés (figure 5.11) des bandes amide I et II d'une hélice pour différentes orientations dans un film ont permis de montrer la dépendance du rapport $R_{I/II}$ en fonction de l'angle d'inclinaison θ des hélices par rapport à la normale à l'interface (figure 5.12).

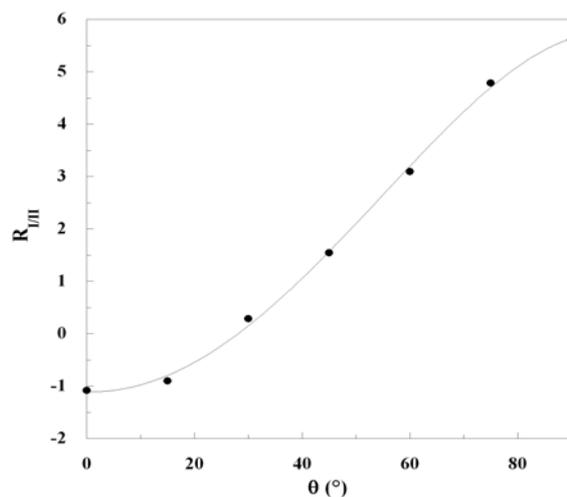


Figure 5.12 : rapport $R_{I/II}$ calculé pour des hélices α lorsque l'angle d'orientation θ entre l'axe de l'hélice et la normale à l'interface évolue, d'après [18].

Dans le cas des puroindolines étudiées ici, les valeurs de $R_{I/II}$ calculées à partir des spectres PM-IRRAS expérimentaux ainsi que les angles moyens d'orientation θ correspondants sont reportés dans le tableau 5.2.

| | | $R_{I/II}$ | θ (°) |
|-------|------------|------------|--------------|
| pin-a | dépôt | 3.9 | 66 |
| | adsorption | 3.9 | 66 |
| pin-b | dépôt | 4.7 | 75 |
| | adsorption | 5.0 | 77 |

Tableau 5.2 : valeurs des rapports $R_{I/II}$ des intensités des bandes amides I et II calculés d'après les spectres PM-IRRAS présentés à la figure 5.10 et valeurs des angles θ correspondants calculés d'après la figure 5.12.

Quelle que soit la méthode de formation des films, l'orientation des quatre hélices α est proche d'une orientation à plat avec un angle moyen par rapport à la normale à l'interface d'environ 66° pour la pin-a et d'environ 76° pour la pin-b. La différence observée sur les angles d'inclinaison entre les deux isoformes signifie que les hélices α de la pin-a sont orientées plus perpendiculairement à l'interface que celles de la pin-b. Ce résultat est cohérent

avec les résultats obtenus à partir des isothermes de compression et des courbes ellipsométriques, à savoir que les molécules de pin-a sont plus compressibles que celles de pin-b et que la monocouche de pin-a est plus condensée que celle de pin-b (figure 5.4).

Bilan intermédiaire

A notre connaissance, aucun spectre infrarouge des puroindolines à l'interface liquide/air n'est disponible pour comparer avec les données obtenues dans cette étude. Le Bihan et al ont étudié la structure secondaire des puroindolines en solution par spectroscopies infrarouge et Raman [17]. Il a montré que les deux isoformes a et b ont des structures secondaires similaires composées d'hélices α , de feuilletts β et de structures non organisées dans les mêmes proportions à pH 7. Nous concluons donc que la structure secondaire des puroindolines à l'interface liquide/air diffère de celle en solution. En effet, qu'elles soient déposées ou adsorbées à l'interface, les puroindolines a et b ont une forte capacité à s'auto-organiser à l'interface adoptant une structure secondaire principalement en hélices α , les hélices étant plutôt orientées à plat par rapport à l'interface. La différence d'orientation observée entre les deux isoformes montrent que les hélices de la pin-a sont plus redressées dans la monocouche que celles de la pin-b témoignant d'une monocouche plus compacte.

II – Etude en dispersion aqueuse

II.1 – Spectroscopie Raman

Cette étude n'est pas nouvelle puisque ces travaux ont déjà été réalisés sur les deux isoformes pin-a et pin-b [17]. Lors de nos expériences, nous avons travaillé dans D_2O uniquement tandis que Le Bihan et al ont ajouté du NaCl (150 mM). Ces différences peuvent expliquer que nos spectres présentent une moins bonne qualité que ceux de Le Bihan et al.

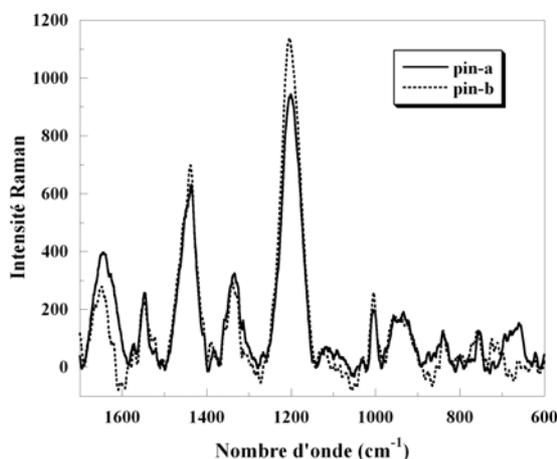


Figure 5.13 : spectres Raman de la pin-a et la pin-b en solution dans D_2O (5% w/v) à 20.5°C.

Sans refaire l'analyse faite par Le Bihan et al, la comparaison des spectres réalisés dans H₂O et D₂O indique une deutération partielle des noyaux indole (~ 50%) avec le même nombre de tryptophanes accessibles à la deutération pour les deux isoformes a et b. De plus, les résidus tryptophane de la pin-b semblent être dans un environnement moins hydrophobe que ceux de la pin-a.

II.2 – Diffusion des rayons X aux petits angles sur une solution de pin-a

Les mesures de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont permis de définir l'état de la protéine en milieu aqueux. Elles ont été effectuées au laboratoire de l'ENSCR à Rennes.

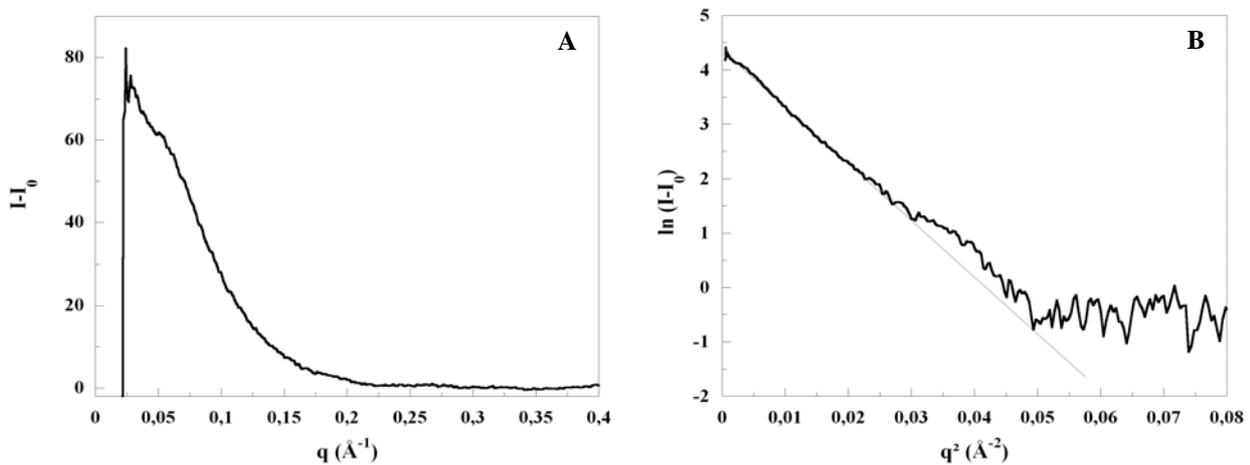


Figure 5.14 : diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) d'une solution de pin-a à 10% (w/v). A : intégration radiale du cliché. B : courbe correspondante en coordonnées $[\ln(I-I_0), q^2]$ à laquelle on superpose une droite de pente $\alpha = -104$.

Sur l'intégration radiale du cliché (A) présentée ci-dessus, on a soustrait une valeur I_0 pour ramener le signal à zéro. Cette valeur I_0 correspond à un bruit de fond que l'on supposera constant. On remarque que la courbe ressemble à une gaussienne. En traçant la courbe $\ln(I-I_0) = f(q^2)$, on obtient un profil linéaire (de pente α) pour les faibles valeurs de q^2 , ce qui indique que le profil de diffusion suit bien une évolution gaussienne. Le modèle de sphère est donc compatible avec le profil de diffusion obtenu (A). En appliquant la loi de Guinier, on remonte à un rayon de giration R_g :

$$I - I_0 = \exp(-q^2 \cdot R_g^2/3) \quad (\text{eq. 5.2})$$

La notion de rayon de giration implique que la pin-a forme des particules de forme sphérique en accord avec la nature globulaire de cette protéine. D'après la pente calculée (α), on obtient $R_g = 17.6 \text{ \AA}$. Ce rayon de giration renferme une information sur la taille et la géométrie de l'entité. Pour des sphères de rayon R , on a : $R_g^2 = 3/5 \times R^2$. Ainsi, la pin-a en solution se structure en particules uniques et sphériques de diamètre 45 \AA et ne s'agrège pas, même à la concentration à laquelle nous avons travaillé ($\sim 10^{-3} \text{ mol/L}$).

Bilan intermédiaire

Les expériences de diffraction des rayons X aux petits angles sur une solution de pin-a en solution aqueuse ont montré qu'elle se structure en objets sphériques de diamètre 45 \AA . Il est intéressant d'observer qu'elle ne s'agrège pas, même à forte concentration.

Cette expérience a été réalisée sur un montage à anode tournante. Cela permet d'envisager plus facilement des expériences futures.

Conclusion et discussion relatives au chapitre 5

De manière générale, les expériences menées à l'interface liquide/air sur les deux isoformes des puroindolines pin-a et pin-b ont montré qu'elles se comportaient de façon relativement similaire. Les expériences de dépôt ou d'adsorption convergent vers un caractère amphiphile légèrement plus marqué pour la pin-a suggérant une implication du domaine riche en tryptophane dans les propriétés tensioactives.

En dépôt ou en adsorption libre, les puroindolines se structurent principalement en hélice α (nous supposons qu'elles sont au nombre de quatre) qui sont plutôt courtes et orientées dans une direction unique. Le faisceau d'hélices de la pin-a est légèrement plus redressé par rapport à la normale à l'interface que celui de la pin-b. Cela corrobore le fait que le film de pin-a est plus compact que celui de pin-b en terme d'aire moléculaire moyenne et de quantité de matière à l'interface.

Les techniques d'imagerie utilisées pour déterminer la morphologie des films ont révélé que l'assemblage des protéines dépend de la pression de surface du film. A faible pression superficielle ($< \pi_p$) et avec les deux techniques de dépôt et d'adsorption libre, les protéines semblent s'organiser en monocouche. Lorsque les molécules sont comprimées à l'interface, on identifie clairement par microscopie à force atomique des structures de type bicouche. Finalement, en état de surcompression, on constate la présence de multicouches.

De façon générale, malgré des séquences primaires qui diffèrent de 40%, cela n'induit pas de différences très significatives entre les deux isoformes des puroindolines. On peut alors penser que les domaines d'acides aminés que l'on retrouve chez les deux isoformes orientent fortement les propriétés des puroindolines, en particulier le domaine unique riche en tryptophane et les cinq ponts disulfure.

Parallèlement à cette étude aux interfaces, quelques expériences complémentaires ont été réalisées en solution. La diffusion des rayons X sur une solution de pin-a a montré qu'elle ne s'agrège pas (même aux très fortes concentrations) et qu'elle se trouve à l'état d'objets sphériques de diamètre 45 Å. Le point important de cette étude est qu'elle a été réalisée en laboratoire ce qui ouvre de nouvelles pistes d'investigation.

Bibliographie du chapitre 5

1. Dubreil, L., J.-P. Compoin, and D. Marion. 1997. Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45:108-116.
2. Dubreil, L., S. Méliande, H. Chiron, J.P. Compoin, L. Quillien, G. Branlard, and D. Marion. 1998. Effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour. *Cereal Chem.* 75:222-229.
3. Vié, V., J. Moreno, S. Beaufile, E. Lesniewska, J. Léonil, and A. Renault. 2002. Interfacial Behavior of Goat Kappa Casein: Ellipsometry and Atomic Force Microscopy Study. *Single Mol.* 3:127-133.
4. Le Floch-Fouere, C. Relations structure/propriétés interfaciales de protéines du blanc d'oeuf. *Thèse de doctorat en cours de l'université Rennes 1*.
5. de Feijter, J.A., J. Benjamins, and F.A. Veer. 1978. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interfaces. *Biopolymers*. 17:1759-1772.
6. Damodaran, S. and C.S. Rao. 2001. Molecular basis for protein adsorption at fluid-fluid interfaces. In *Food Colloids: Fundamentals of Formulation*. E. Dickinson and R. Miller, editors. Royal Society of Chemistry, London. 165-180.
7. Ward, A.F. and L. Tordai. 1946. Time dependence of boundary tensions of solution. I. The role of diffusion in the time effects. *J. Chem. Phys.* 14:453-461.
8. Schiffer, M., C.H. Chang, and F.J. Stevens. 1992. The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng.* 5:213-214.
9. Landolt-Marticorena, C., K.A. Williams, C.M. Deber, and R.A.F. Reithmeier. 1993. Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J. Mol. Biol.* 229:602-608.
10. Hu, W., N.D. Lazo, and T. A.Cross. 1995. Tryptophan dynamics and structural refinement in a lipid bilayer environment: solid state NMR of the gramicidin channel. *Biochemistry*. 34:14138-14146.
11. Yau, W.-M., W.C. Wimley, K. Gawrisch, and S.H. White. 1998. The Preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry*. 37:14713-14718.
12. Kooijman, M., R. Orsel, M. Helsing, R.J. Hamer, and A.C.A.P.A. Bekkers. 1997. Spectroscopic characterisation of the lipid-binding properties of wheat puroindolines. *Journal of Cereal Science*. 26:145-159.

13. Jackson, M. and H.H. Mantsch. 1995. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:95-120.
14. Nevskaya, N.A. and Y.N. Chirgadze. 1976. Infrared spectra and resonance interactions of amide I and II vibrations of α -helix. *Biopolymers.* 15:637-648.
15. Blochet, J.-E., C. Chevalier, E. Forest, E. Pebay-Peyroula, M.-F. Gautier, P. Joudrier, M. Pézolet, and D. Marion. 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Letters.* 329:336-340.
16. Gincel, E., J.-P. Simorre, A. Caille, D. Marion, M. Ptak, and F. Vovelle. 1994. Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein: a new folding for lipid carriers. *Eur. J. Biochem. (FEBS).* 226:413-422.
17. Le Bihan, T., J.-  . Blochet, A. Désormeaux, D. Marion, and M. Pézolet. 1996. Determination of the secondary structure and conformation of puroindolines by infrared and Raman spectroscopy. *Biochemistry.* 35:12712-12722.
18. Castano, S., B. Desbat, M. Laguerre, and J. Dufourcq. 1999. Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic LiKj(i=2j) peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1416:176-194.
19. Blaudez, D., J.-M. Turllet, Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, and B. Desbat. 1996. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92:525-530.
20. Buffeteau, T., E.L. Calvez, S. Castano, B. Desbat, D. Blaudez, and J. Dufourcq. 2000. Anisotropic Optical Constants of α -Helix and β -Sheet Secondary Structures in the Infrared. *J. Phys. Chem. B.* 104:4537-4544.

CHAPITRE 6 INTERACTIONS PUROINDOLINE/GALACTOLIPIDE

| | |
|--|-----|
| I – Etude aux interfaces liquide/air et solide/air | |
| I.1 – Mesure de tensiométrie lors de l’adsorption des puroindolines dans des monocouches de galactolipides..... | 159 |
| I.2 – Rhéologie de surface sur des films mixtes à l’interface air/liquide..... | 162 |
| I.3 – Morphologie des films mixtes puroindoline/galactolipide | |
| I.3.1 – Suivi des cinétiques d’adsorption par ellipsométrie et BAM..... | 163 |
| I.3.2 – Observation par AFM des films de Langmuir-Blodgett | |
| I.3.2.A – Paramètres influençant l’organisation des protéines dans les films lipidiques..... | 166 |
| I.3.2.B – Observation par AFM de l’organisation des puroindolines dans les films lipidiques..... | 169 |
| I.4 – Mesure de PM-IRRAS sur des films mixtes déposés à l’interface..... | 172 |
| I.5 – Isothermes réalisées sur des films mixtes à l’interface..... | 175 |
| II – Etude en solution des systèmes pin-a/galactolipide | |
| II.1 – Spectroscopie Raman..... | 178 |
| II.2 – Diffusion des rayons X aux petits angles..... | 180 |
| II.3 – Microscopie à l’angle de Brewster au-delà du collapse..... | 181 |
| Conclusion et discussion relatives au chapitre 6..... | 184 |
| Bibliographie..... | 186 |

CHAPITRE 6

INTERACTIONS PUROINDOLINE/GALACTOLIPIDE

Parmi les protéines fixatrices de lipides, deux protéines basiques et riches en cystéine ont été isolées de l'endosperme du blé par partage de phase dans le Triton X-114, les puroindolines a et b [1, 2]. La pin-a possède 115 acides aminés et un poids moléculaire de 12.7 kDa tandis que la pin-b est constituée de 116 aminoacides pour un poids moléculaire de 13.1 kDa. Les deux isoformes présentent 60% d'homologie et possèdent cinq ponts disulfure ainsi qu'un domaine riche en tryptophane (5 pour la pin-a et 3 pour la pin-b) [3].

Bien que le rôle biologique des puroindolines soit inconnu, les puroindolines auraient des propriétés antifongiques et antimicrobiennes [4, 5] qui pourraient être reliées à leur capacité à perturber la perméabilité des membranes [6, 7]. De plus, la dureté des blés étant associée à l'adsorption de lipides et des puroindolines sur la surface des granules d'amidon [8, 9], il a été suggéré que ces protéines pourraient jouer un rôle majeur sur la texture de l'endosperme du blé en contrôlant les interactions entre les granules d'amidon et la matrice protéique. Ces interactions impliquent la formation d'interfaces lipide/protéine où les puroindolines pourraient avoir un rôle clé [10].

Les propriétés interfaciales et de fixation aux lipides de ces protéines représentent un grand intérêt pour l'industrie alimentaire. Nous avons vu au chapitre 5 que les puroindolines s'adsorbent rapidement à l'interface où elles forment des films stables à l'origine de leurs fortes propriétés moussantes. De façon remarquable, elles sont capables d'empêcher la déstabilisation des mousses de protéines par les lipides [11, 12], tandis que certains complexes puroindoline/surfactant et puroindoline/phospholipide peuvent montrer des propriétés moussantes meilleures que la protéine isolée [13, 14].

L'objectif de ce chapitre est d'examiner les films mixtes de puroindoline/galactolipide dans le but de mieux comprendre les propriétés à l'origine des différentes caractéristiques des puroindolines en présence de lipides citées ci-dessus. Pour cela, notre choix s'est porté sur les monocouches lipidiques. En effet, ces systèmes modèles ont été largement utilisés pour explorer un certain nombre de mécanismes ayant lieu dans les membranes biologiques et ils sont pertinents pour mimer les films qui stabilisent les bulles de gaz (interface liquide/air) [15, 16]. Comme dans le chapitre précédent, la plupart des expériences ont été menées à l'interface liquide/air ou solide/air et seront complétées par quelques résultats obtenus sur des mélanges de lipides et de protéines en solution aqueuse. Les procédures expérimentales relatives à ce chapitre sont décrites dans l'annexe 6.

I – Etude aux interfaces liquide/air et solide/air

I.1 – Mesures de tensiométrie lors de l’adsorption des puroindolines dans des monocouches de galactolipides

La première étape de cette étude sur les interactions lipide/protéine a été de déterminer la capacité d’insertion des deux isoformes des puroindolines pin-a et pin-b dans des monocouches préformées de galactolipides.

Les cinétiques d’adsorption des protéines ont été réalisées à différentes pressions de surface de départ des lipides. L’objectif est de mesurer la quantité de la protéine à s’adsorber en fonction de l’état plus ou moins condensé du film. Nous avons travaillé à une concentration fixe de protéine : $C = 7.10^{-8}$ mol/L (inférieure à la concentration de saturation de l’interface, figure 5.3). La figure 6.1 montre un exemple de cinétique d’adsorption de la pin-a sous une monocouche de DGDG comprimée au départ à 15 mN/m.

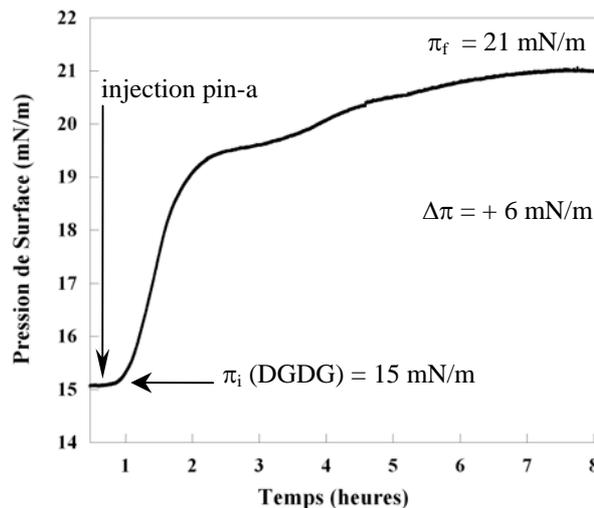


Figure 6.1 : exemple d’une cinétique d’adsorption de la pin-a sous une monocouche de DGDG comprimée à une pression de départ de 15 mN/m.

Sur la figure présentée ci-dessus, l’adsorption de la pin-a dans le film de DGDG se traduit par une augmentation de la pression de surface. Elle est induite par la présence d’interactions latérales entre les molécules à l’interface. En fin de cinétique, la pression de surface atteint un plateau, sur cet exemple, 21 mN/m. La différence de pression entre la pression de départ du lipide et la pression finale atteinte, c’est-à-dire la surpression $\Delta\pi$, vaut 6 mN/m. Cette expérience a été reproduite avec les deux isoformes a et b sous les deux lipides MGDG et DGDG comprimés à des pressions de surface de départ variant de 5 à 35 mN/m. Le récapitulatif des différentes cinétiques d’adsorption est présenté à la figure 6.2. Les valeurs

des surpressions $\Delta\pi$ sont représentées en fonction de la pression de départ du lipide π_i . Les résultats correspondent à une moyenne de deux à trois cinétiques. L'incertitude expérimentale sur la mesure de la surpression $\Delta\pi$ vaut ± 0.2 mN/m. Dans un souci de clarté, les deux graphiques sont présentés à la même échelle.

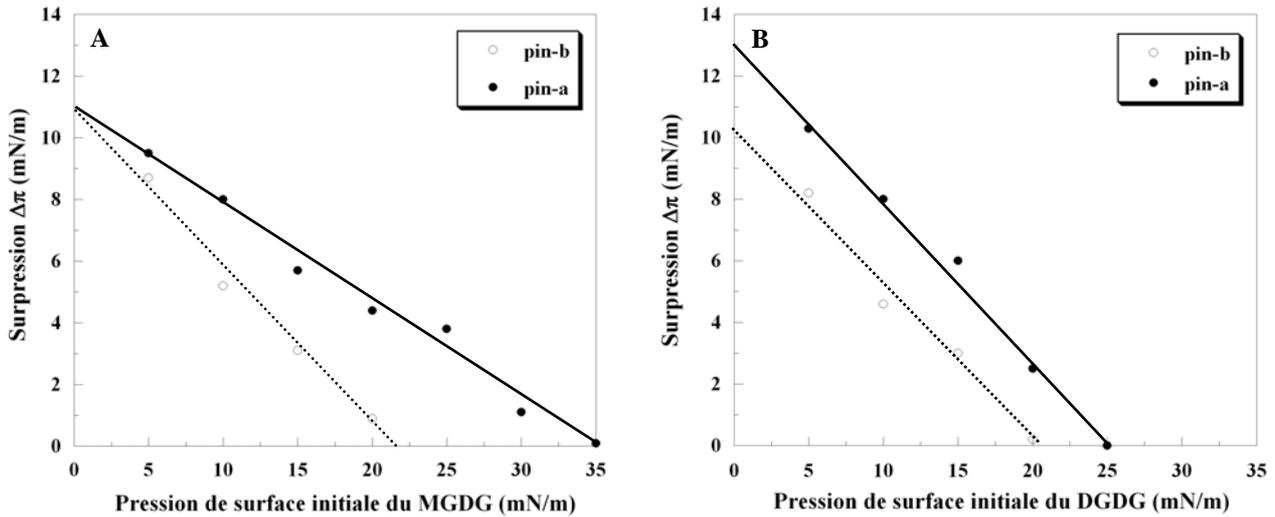


Figure 6.2 : cinétiques d'adsorption de la pin-a et la pin-b ($C = 7.10^{-8}$ mol/L) (chaque point correspond à une cinétique) sous des monocouches de MGDG (A) et DGDG (B) comprimées à différentes pressions de surface initiales. L'ensemble des points est ajusté par une courbe linéaire.

De façon générale, lorsque la pression de surface initiale des lipides augmente, la surpression $\Delta\pi$ est réduite signifiant que plus le film est condensé, moins les protéines s'insèrent. Les courbes présentées ci-dessus permettent de comparer les comportements des deux isoformes pin-a et pin-b en fonction du lipide. Afin de se rendre compte des différences entre MGDG et DGDG pour une même isoforme, nous récapitulons les résultats dans le tableau 6.1.

| π_i (mN/m) | Pin-a $\Delta\pi$ (mN/m) | | Pin-b $\Delta\pi$ (mN/m) | |
|----------------|--------------------------|------|--------------------------|------|
| | MGDG | DGDG | MGDG | DGDG |
| 5 | 9.5 | 10.3 | 8.7 | 8.1 |
| 10 | 8.0 | 8.0 | 5.2 | 4.6 |
| 15 | 5.7 | 6.0 | 3.1 | 3.0 |
| 20 | 4.4 | 2.5 | 0.9 | 0.2 |
| 25 | 3.8 | 0.1 | - | - |
| 30 | 1.1 | - | - | - |
| 35 | 0.1 | - | - | - |

Tableau 6.1 : surpressions mesurées avec MGDG et DGDG pour la pin-a et la pin-b, d'après les figures 6.2.A et 6.2.B.

La pin-b présente un comportement relativement similaire en présence des deux galactolipides. En effet, les surpressions mesurées pour une même pression de départ du MGDG ou du DGDG sont très proches. On définit la pression de surface critique π_c par la pression initiale des lipides au-delà de laquelle la protéine n'est plus capable de s'insérer. Pour l'isoforme b, la valeur de π_c est de l'ordre de 20 mN/m dans le cas des deux lipides.

L'isoforme pin-a montre un comportement différent de la pin-b. Aux faibles pressions de surface initiales des lipides, la pin-a pénètre plus fortement dans le film de DGDG que dans celui de MGDG. Cette tendance s'inverse à partir de 20 mN/m où une différence importante est observée pour $\pi_i = 25$ mN/m avec des suppressions mesurées de 3.8 (MGDG) et 0.1 mN/m (DGDG).

Les résultats précédents sur les lipides seuls à l'interface liquide/air (chapitre 4) montrent qu'à partir de 20-25 mN/m, le MGDG forme des protubérances. La formation de ces nano-domaines a été attribuée à une organisation spécifique des têtes mono-galactosyl du MGDG qui pourrait être due à de fortes interactions latérales entre les groupes galactosyl. Ce chevauchement entre les têtes polaires du MGDG pourrait induire la formation d'instabilités locales favorisant l'insertion de la protéine dans le film [17, 18]. Au contraire, dans le cas du DGDG, les têtes polaires plus volumineuses (deux groupes galactosyl) pourraient limiter l'insertion de la pin-a.

Finalement, les pressions de surface critiques π_c obtenues pour la pin-a sont de 25 et 35 mN/m pour DGDG et MGDG, respectivement. Ces valeurs peuvent être comparées à celles obtenues par Dubreil et al [19] qui a étudié l'adsorption de la pin-a dans des monocouches de phospholipides synthétiques DPPG et DPPC. Il a été montré que la surpression due à l'adsorption de pin-a dans les films est plus forte en présence du lipide chargé négativement DPPG, qu'en présence du lipide zwitterionique DPPC. Les pressions de surface critiques obtenues valent 25 et 35 mN/m pour DPPC et DPPG, respectivement. La pin-a présentant une charge nette fortement positive (+5), la contribution électrostatique à l'interaction lipide/protéine est significativement plus forte pour DPPG que pour DPPC.

Ainsi, bien que les deux galactolipides soient neutres et qu'ils possèdent des têtes polaires plus volumineuses que les phospholipides, les pressions critiques d'insertion de la pin-a sont comparables (DGDG/DPPC et MGDG/DPPG). Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'extrême fluidité des galactolipides (chapitre 4) et également par la présence des groupes galactosyl propice à la formation de nombreuses liaisons hydrogène avec la pin-a. De plus, il est connu que les résidus aromatiques (tryptophane, phénylalanine, tyrosine) interagissent

fortement avec les résidus saccharides via notamment des liaisons de type van der Waals [20, 21] et des contacts hydrophobes [22, 23]. D'après le nombre important de tryptophanes que possèdent les puroindolines, il est très probable que ces protéines interagissent fortement avec les groupes galactosyl (liaisons hydrogène et van der Waals et contacts hydrophobes) favorisant ainsi leur pénétration dans les films de galactolipides.

Bilan intermédiaire

Ces expériences d'adsorption ont montré que les deux isoformes pin-a et pin-b pénètrent fortement les monocouches de MGDG et DGDG. Cela témoigne de fortes interactions s'exerçant entre les puroindolines et les galactolipides, telles que des liaisons hydrogène, des contacts hydrophobes et des liaisons de type van der Waals.

On peut classer la force de ces interactions d'après les pressions de surface critiques mesurées : pin-a/MGDG > pin-a/DGDG > pin-b/MGDG ~ pin-b/DGDG. Comme observé lors des expériences d'adsorption libre des puroindolines à l'interface liquide/air (chapitre 5), les différences observées entre la pin-a et la pin-b sont certainement reliées au nombre de tryptophanes que possède chacune des isoformes. En effet, le noyau indole du tryptophane a une nette préférence pour l'interface due à sa forte capacité à former des liaisons de type hydrogène avec les têtes polaires et des contacts hydrophobes avec les chaînes acyl des lipides. Il est ainsi généralement localisé à l'interface polaire/non polaire des bicouches lipidiques [24-29].

Cela corrobore le fait que le domaine riche en tryptophane est largement impliqué dans les interactions puroindoline/galactolipide, comme observé par Kooijman et al concernant les interactions avec des phospholipides [30].

I.2 – Rhéologie de surface sur des films mixtes à l'interface liquide/air

Des mesures de rhéologie de surface ont été réalisées sur des films de pin-a adsorbée ($C = 7.10^{-8}$ mol/l) sous les films de galactolipides comprimés à une pression initiale de 20 mN/m. Les spectres ont été enregistrés à fréquence fixe, 5 Hz. Nous ne présentons pas les courbes obtenues car nous n'avons observé aucun changement par rapport à l'état du film de lipide pur (chapitre 4). La présence de la pin-a n'a donc aucun effet sur l'état rhéologique du film lipidique. Les films mixtes protéine/lipide sont extrêmement peu rigides à l'interface suggérant qu'ils sont peu cohésifs. Cela suggère que les interactions s'exerçant entre les deux composés sont principalement de type liaison hydrogène.

I.3 – Morphologie des films mixtes puroindoline/galactolipide

Dans cette partie, nous avons sondé la structure des films mixtes à travers quelques paramètres comme la quantité de matière à l'interface et l'organisation des films à différentes échelles. Les expériences ont été menées par adsorption des protéines dans les films lipidiques. Dans un premier temps, les expériences d'ellipsométrie et de microscopie à l'angle de Brewster (BAM) seront consacrées à l'isoforme a uniquement. Dans un second temps, l'observation des prélèvements de Langmuir-Blodgett par microscopie à force atomique (AFM) va permettre de sonder l'organisation des films à l'échelle du nanomètre mettant en évidence d'éventuelles différences entre les deux isoformes pin-a et pin-b. Pour pouvoir comparer les différents résultats obtenus, nous avons dû choisir une pression de surface de départ des lipides. Il a fallu faire un compromis entre une pression de surface suffisamment forte permettant néanmoins l'adsorption des isoformes a et b dans les films de galactolipides. Notre choix s'est porté sur 20 mN/m, pression de surface critique de l'isoforme b avec les deux galactolipides MGDG et DGDG, comme observé au paragraphe précédent.

I.3.1 – Suivi des cinétiques d'adsorption par ellipsométrie et Brewster (BAM)

L'adsorption de la protéine à une concentration de 7.10^{-8} mol/L dans les films de MGDG et DGDG est suivie par une mesure de l'angle ellipsométrique Δ (figure 6.3). Parallèlement, des images de microscopie à l'angle de Brewster sont réalisées au cours de l'adsorption permettant de suivre l'état du film (figure 6.4).

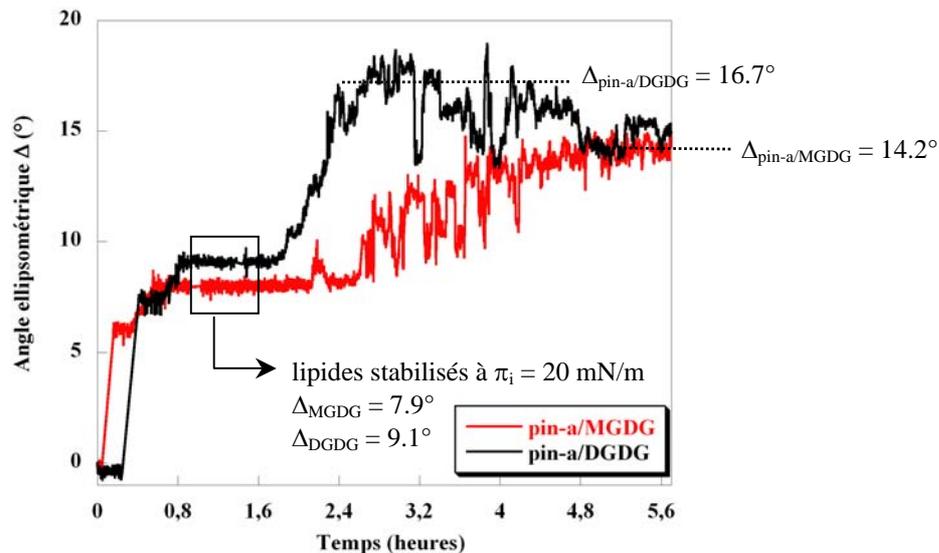


Figure 6.3 : suivi des cinétiques d'adsorption de pin-a ($C = 7.10^{-8}$ mol/L) sous des monocouches de MGDG et DGDG préformées à une pression de surface de 20 mN/m par une mesure de l'angle ellipsométrique Δ .

D'après la figure 6.3, on peut mesurer les angles ellipsométriques Δ des monocouches lipidiques stabilisées à 20 mN/m. On obtient les valeurs de 7.9° (MGDG) et 9.1° (DGDG).

D'après les différentes mesures réalisées au chapitre 5, on peut aussi remonter à l'angle ellipsométrique que l'on obtiendrait par adsorption de la pin-a à l'interface liquide/air dépourvue de lipide à une concentration de 7.10^{-8} mol/L ; cet angle vaut 9.2°.

Lorsque les monocouches sont formées à 20 mN/m, la mesure de l'angle ellipsométrique pour MGDG et DGDG est relativement stable. Dans le cas du DGDG, l'injection de la pin-a se traduit par une augmentation rapide de l'angle ellipsométrique. En fin d'adsorption, on remarque que la mesure de l'angle est extrêmement bruitée. Cela montre un film clairement inhomogène avec des régions riches en protéines (brusque augmentation de l'angle) et d'autres moins (creux soudains). Nous relevons néanmoins une valeur « moyenne » correspondant à l'angle d'un film mixte pin-a/DGDG, cet angle vaut 16.7°.

La cinétique d'adsorption est plus lente dans le cas du MGDG. De façon générale, le paramètre « temps » est difficilement contrôlable car étroitement dépendant de la façon dont est injectée la protéine (goutte plus ou moins grosse, endroit où est réalisée l'injection plus ou moins proche de la monocouche...).

On dénote un comportement différent du DGDG où l'adsorption de la pin-a se fait de façon plus lente et aussi de façon plus inhomogène car on observe des variations importantes de l'angle ellipsométrique sur la partie ascendante de la courbe. Cependant, en fin d'adsorption (saturation de l'angle), les variations de l'angle sont minimales et on relève facilement la valeur moyenne du film mixte pin-a/MGDG : 14.2°.

Lors des cinétiques d'adsorption des protéines dans les monocouches lipidiques, les variations de l'angle ellipsométrique présentent un maximum puis on observe un phénomène de relaxation. Cette diminution de l'angle ellipsométrique est attribuée à une réorganisation des protéines dans le film. Les observations AFM corroborent cette supposition car nous verrons plus tard que les prélèvements réalisés au maximum d'insertion ou en fin de relaxation présentent des différences au niveau de l'organisation des protéines.

Intéressons-nous désormais aux valeurs des angles ellipsométriques des composés seuls ou des films mixtes que nous récapitulons dans le tableau 6.2, ainsi que les valeurs des pressions de surface.

| | Pression de surface π (mN/m) | Angle ellipsométrique Δ (°) |
|---|---------------------------------------|------------------------------------|
| MGDG | 20 | 7.9 |
| DGDG | 20 | 9.1 |
| adsorption pin-a à l'interface liquide/air | 9.6 | 9.2 |
| adsorption pin-a à l'interface liquide/MGDG | $\pi_i = 20 \rightarrow \pi_f = 24.5$ | 14.2 |
| adsorption pin-a à l'interface liquide/DGDG | $\pi_i = 20 \rightarrow \pi_f = 22.5$ | 16.7 |

Tableau 6.2 : valeurs des angles ellipsométriques Δ des films lipidiques MGDG et DGDG ainsi que celles mesurées en fin d'adsorption de la pin-a à $C = 7.10^{-8}$ mol/L aux différents interfaces.

Les pressions de surface mesurées en fin d'adsorption de la pin-a sont de 24.5 et 22.5 mN/m sous le MGDG et le DGDG, respectivement. Les résultats sur les lipides seuls (chapitre 4) montrent que les angles valent : $\Delta = 8.1^\circ$ (MGDG) et 9.3° (DGDG) à ces pressions de surface. Les valeurs des angles dus à l'augmentation de pression des lipides sont bien inférieures aux angles mesurés lors de l'adsorption de la pin-a témoignant ainsi de l'insertion de la protéine dans les films.

Si l'on additionne simplement les valeurs des angles du lipide seul et de la pin-a seule, on obtient les angles « théoriques » : 17.1° pour pin-a/MGDG et 18.3° pour pin-a/DGDG. On peut considérer que cet angle théorique correspond au cas où l'on aurait une monocouche de lipides et une couche de protéines sous cette monocouche qui ne serait pas insérée dans le film lipidique. Ces valeurs sont plus importantes que celles réellement mesurées : 14.2° et 16.7° pour les mélanges pin-a/MGDG et pin-a/DGDG, respectivement.

Les différences entre les angles théoriques et mesurés sont de 2.9° (MGDG) et 1.6° (DGDG). Ainsi, le fait de mesurer des valeurs d'angle ellipsométrique inférieures à la somme des angles des deux composés seuls confirme l'insertion de la protéine dans le film. L'insertion de la pin-a dans le film de MGDG semble donc être plus importante que dans le film de DGDG, ce qui est corroboré par les valeurs des pressions de surface mesurées. En effet, la surpression mesurée dans le cas de pin-a/MGDG (+ 4.5 mN/m) est plus forte que pour pin-a/DGDG (+ 2.5 mN/m) ce qui traduit des interactions latérales plus fortes à l'interface.

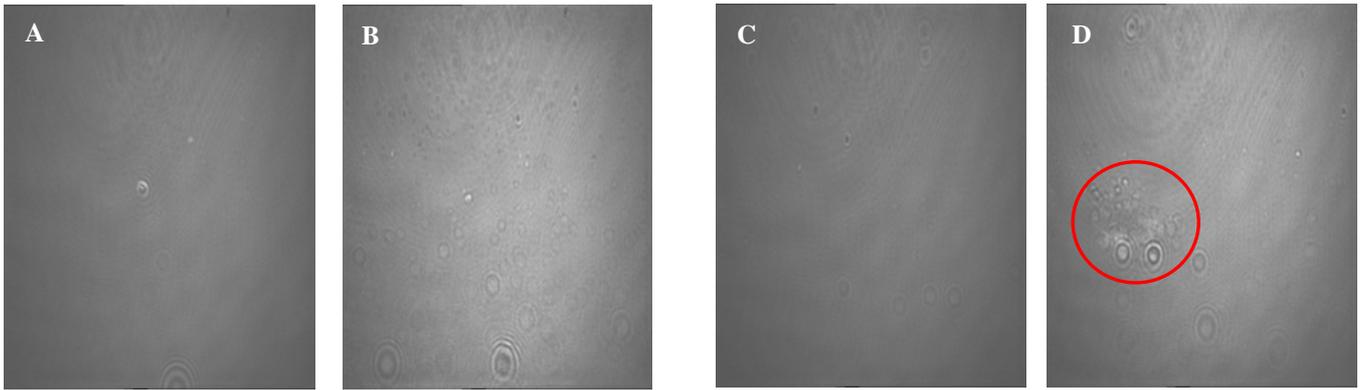


Figure 6.4 : images Brewster ($430 \times 540 \mu\text{m}^2$) lors de l'adsorption de pin-a sous des monocouches de MGDG et de DGDG comprimées à une pression de surface initiale de 20 mN/m.

MGDG : A : après injection pin-a, $\pi = 20 \text{ mN/m}$; B : fin de l'adsorption, $\pi = 24.5 \text{ mN/m}$.

DGDG : C : après injection pin-a, $\pi = 20 \text{ mN/m}$; D : fin de l'adsorption, $\pi = 22.5 \text{ mN/m}$.

En ce qui concerne l'organisation des films mixtes pin-a/galactolipides, les images réalisées en microscopie à l'angle de Brewster ne permettent pas de donner une description détaillée. On observe cependant une augmentation du niveau de gris au fur et à mesure que les protéines s'adsorbent dans le film. En fin d'adsorption de la pin-a dans le film de DGDG (image D), on observe une agrégation de la pin-a que l'on repère par un cercle rouge sur l'image.

Bilan intermédiaire

Les expériences d'ellipsométrie et de microscopie à l'angle de Brewster semblent converger vers un film de pin-a/MGDG plus homogène que celui de pin-a/DGDG. On peut alors penser que la pin-a est mieux répartie dans le film de MGDG. Pour se rendre compte de l'organisation des films mixtes à une échelle inférieure au μm , nous avons effectué des observations par microscopie à force atomique.

I.3.2 – Observation par AFM des films mixtes de Langmuir-Blodgett

Cette partie est scindée en deux sous-parties. Premièrement, nous allons nous intéresser à deux paramètres influençant l'organisation de la protéine dans le film lipidique : la pression de départ du lipide et le moment où est réalisé le prélèvement de Langmuir-Blodgett. Pour ne pas être redondant, nous regarderons le cas de pin-a/MGDG uniquement. Dans un second temps, nous nous focaliserons sur la comparaison de l'organisation des isoformes a et b dans les films de galactolipides.

I.3.2.A – Paramètres influençant l'organisation des protéines dans les films lipidiques

Comme précisé précédemment, lors d'une expérience d'adsorption d'une protéine sous une monocouche lipidique, on observe généralement un phénomène de relaxation, c'est-à-dire une diminution de la pression de surface après que celle-ci ait atteint son maximum. La figure 6.5 présente un exemple de ce phénomène.

Sur la figure 6.5, on définit le maximum d'insertion, moment où la pression de surface atteint son maximum, ainsi que la fin de la relaxation, moment où la pression de surface redevient constante après le phénomène de relaxation.

On attribue ce phénomène à une réorganisation de la protéine dans le film vers une configuration énergétiquement plus stable. Cela se traduit par une diminution des interactions latérales entre molécules comme en témoigne la diminution de la pression de surface.

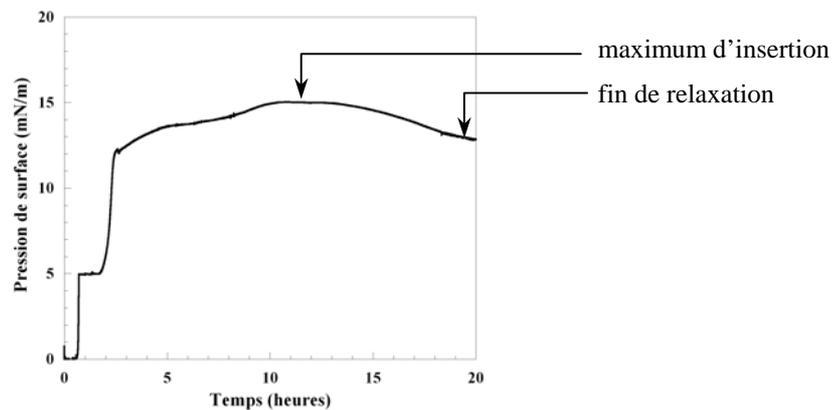


Figure 6.5 : illustration du phénomène de relaxation lors de l'adsorption de pin-a ($C = 7.10^{-8}$ mol/L) sous une monocouche de MGDG comprimée à une pression de départ de 5 mN/m.

Nous présentons à la figure 6.6 des images AFM des prélèvements de Langmuir-Blodgett (LB) réalisés lors de l'adsorption de la pin-a sous une monocouche de MGDG dans différentes conditions.

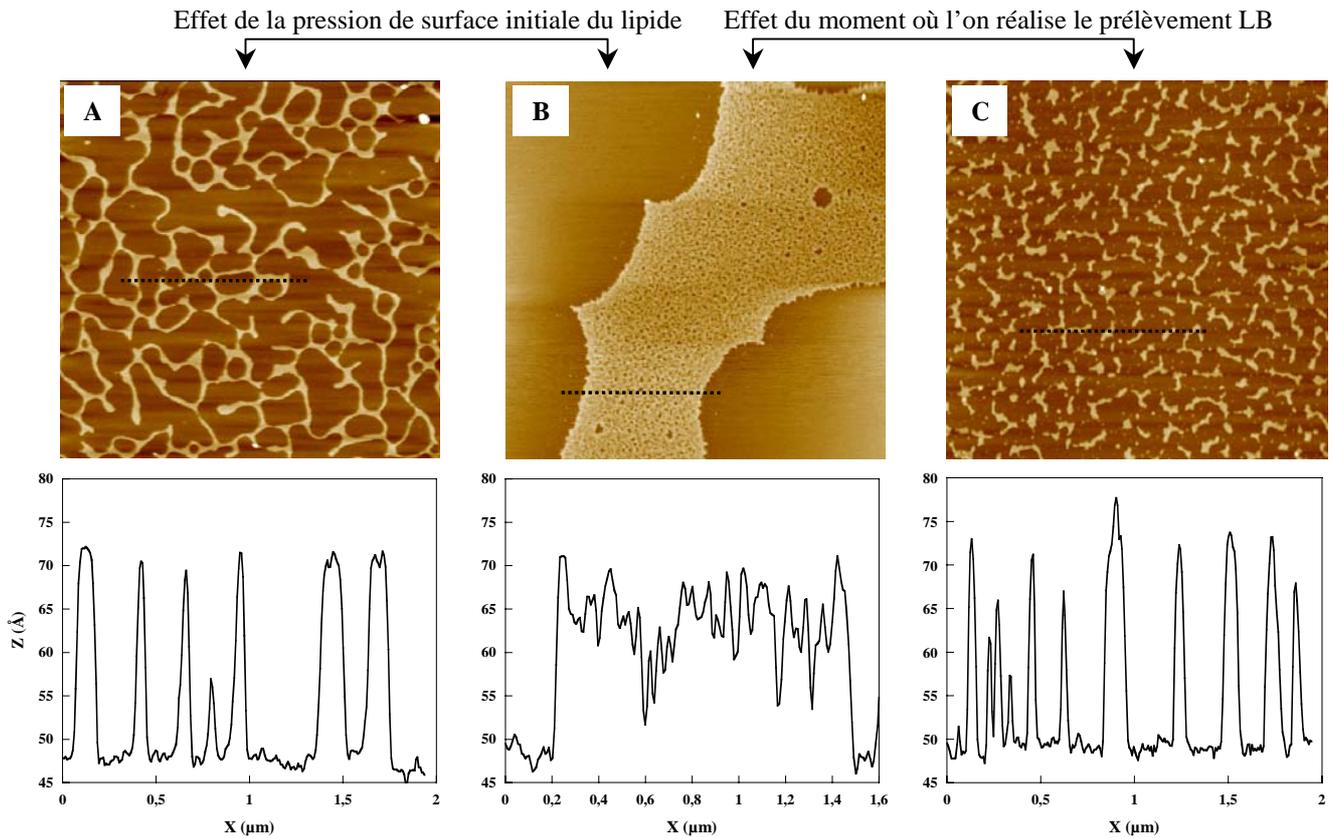


Figure 6.6 : images réalisées en microscopie à force atomique ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$) lors de l'adsorption de la pin-a ($C = 7.10^{-8} \text{ mol/L}$) sous des monocouches de MGDG. A : $\pi_i = 7 \text{ mN/m}$, film LB réalisé en fin de relaxation. B : $\pi_i = 20 \text{ mN/m}$, film LB réalisé en fin de relaxation. C : $\pi_i = 20 \text{ mN/m}$, film LB réalisé au maximum d'insertion. On ajoute les sections horizontales correspondant aux traits pointillés sur les images. L'échelle en z est de 100 \AA .

Pour illustrer l'effet de la pression de surface de départ du lipide (π_i), nous avons choisi deux pressions de surface initiales suffisamment éloignées : 7 (A) et 20 mN/m (B) et les prélèvements de Langmuir-Blodgett ont été réalisés en fin de relaxation.

Dans un second temps, nous sommes partis d'une même pression de surface du lipide, 20 mN/m, et les prélèvements ont été réalisés en fin de relaxation (B) et au maximum d'insertion (C).

Par comparaison avec les images AFM des films de lipides purs (chapitre 4) et d'après la hauteur des domaines clairs observés sur la figure 6.6 ($\sim 2.5 \text{ nm}$), nous attribuons l'apparition de ces domaines à la présence de la protéine. La monocouche lipidique correspond au fond continu plus foncé. Néanmoins, il est difficile de connaître la composition de ces domaines. Ils peuvent être uniquement composés de protéines ou bien correspondre à la formation de complexes lipoprotéiques. La hauteur de ces domaines étant très proche de la

hauteur des structures formées par les protéines pures (chapitre 5), cela tend à exclure la formation de complexes protéine/lipide.

Comme observé sur l'isotherme du MGDG, ce lipide se trouve en phase liquide expansé tout au long de la compression. Néanmoins, la pression de surface initiale du MGDG détermine l'état de compression plus ou moins fort du lipide et influe sur l'insertion et l'organisation de la protéine, comme observé sur les images A et B.

A faible pression de surface de départ du lipide, 7 mN/m (A), la pin-a forme un réseau interconnecté peu dense et la hauteur des domaines protéiques, très régulière, vaut environ 2.4 nm. On remarque que la structure est peu résolue. Cela peut s'expliquer par de faibles interactions latérales s'exerçant entre les molécules ; notamment car le prélèvement est réalisé à faible pression de surface (~ 12 mN/m).

A forte pression de surface initiale, 20 mN/m (B), la pin-a forme également un réseau interconnecté mais qui est cette fois extrêmement dense. La hauteur de ce réseau est estimée à 2.2 nm en moyenne.

En ce qui concerne le moment où est réalisé le prélèvement, on observe une différence significative entre les images B et C. Lorsque le prélèvement est effectué au maximum d'insertion, la protéine forme des petits domaines de forme très irrégulière ainsi que de nombreuses petites protubérances entre ces domaines ; la hauteur moyenne est de 2.4 nm. On peut penser que l'organisation de la protéine est « inachevée » au sens où les protubérances semblent représenter des points d'ancrage entre les domaines plus grands dans le but de former, avec le temps, un réseau interconnecté très dense comme observé sur l'image B.

Bilan intermédiaire

En conclusion, nous avons observé que les paramètres tels que la pression initiale du lipide ou le moment de réalisation du prélèvement jouent un rôle important sur l'organisation de la protéine. Il faut désormais choisir les valeurs des paramètres qui resteront fixes dans l'étude qui va suivre. Pour la pression de départ du lipide, nous avons choisi de travailler à 20 mN/m, pression plus proche, bien qu'inférieure à la pression de surface de la membrane biologique, i.e 30-45 mN/m [31-33]. Néanmoins, nous avons observé qu'au-delà de 20 mN/m, la pin-b ne s'insère quasiment plus dans les films lipidiques. Pour le moment du prélèvement, nous avons opté pour une meilleure organisation de la protéine, autrement dit les prélèvements de Langmuir-Blodgett seront effectués en fin de relaxation. Les conditions expérimentales ayant été établies, nous allons pouvoir comparer les comportements des deux isoformes en présence du MGDG et du DGDG.

I.3.2.B – Observation par AFM de l’organisation des protéines dans les films lipidiques

Dans cette partie, nous allons exposer les images réalisées en microscopie à force atomique à partir de prélèvements de Langmuir-Blodgett. Rappelons brièvement que les expériences ont été réalisées à partir de l’adsorption des puroindolines à $C = 7.10^{-8}$ mol/L sous des films de MGDG et DGDG comprimés à une pression de surface initiale de 20 mN/m. Les prélèvements ont été réalisés en fin de relaxation, comme expliqué précédemment.

Les images topographiques ont été réalisées en mode contact à l’air en utilisant un scanner de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ et en maintenant constante la force pointe/échantillon. Les pointes utilisées sont en nitrure de silicium et ont une constante de force de 0.06 N/m. Les images sont considérées comme représentatives de l’échantillon après avoir sondé au moins cinq zones de trois échantillons préparés à des jours différents. Dans le but de comparer le comportement des isoformes a et b, nous présenterons les images AFM en fonction du lipide. La figure 6.7 présente l’organisation des puroindolines dans les monocouches de MGDG.

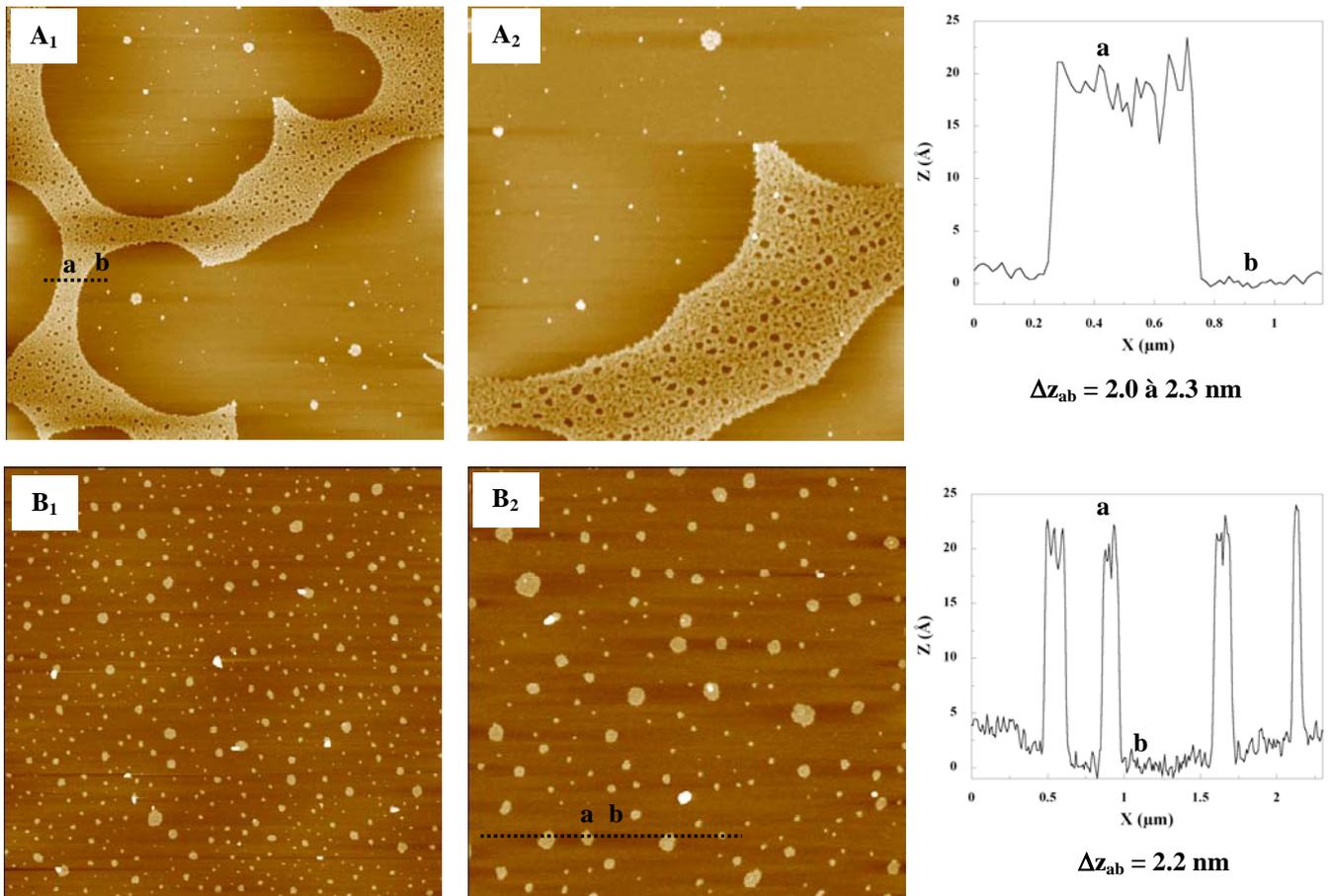


Figure 6.7 : images réalisées en microscopie à force atomique lors de l’adsorption des protéines ($C = 7.10^{-8}$ mol/L) sous des monocouches de MGDG comprimées à $\pi_i = 20$ mN/m. Pin-a : A_1 ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) et A_2 ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$). Pin-b : B_1 ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) et B_2 ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$). L’échelle en z est de 100 Å. Les sections horizontales correspondant aux pointillés sur les images A_1 et B_2 sont présentées également.

On remarque d'après les images AFM que l'organisation de la pin-a et de la pin-b dans la monocouche de MGDG diffère totalement. La pin-a forme un réseau interconnecté très dense ainsi que quelques nano-domaines arrondis entre les mailles de ce réseau (A_1). Notons que l'image B de la figure 6.6 a été obtenue à partir du même échantillon. En zoomant sur le réseau formé (A_2), on remarque qu'il présente une structure alvéolée ce qui met en évidence le fait que la protéine n'a pas tendance à s'agréger. Cette structure alvéolée est mieux définie à la figure 6.8. Notons qu'à l'intérieur de ces alvéoles se trouvent des molécules de MGDG. Il semble alors que la pin-a ait tendance à maximiser la surface de contact avec les lipides tout en gardant une continuité protéine/protéine. La hauteur de ce réseau protéique est régulière, proche de 2.0 à 2.3 nm.

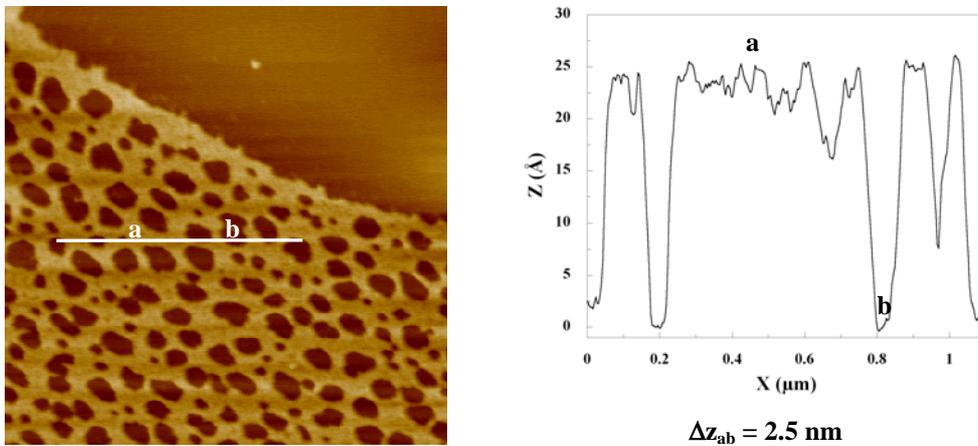


Figure 6.8 : image réalisée en microscopie à force atomique ($2 \times 2 \mu\text{m}^2$) lors de l'adsorption de la pin-a ($C = 7.10^{-8} \text{ mol/L}$) sous une monocouche de MGDG comprimée à $\pi_i = 20 \text{ mN/m}$. L'échelle en z est de 100 \AA . La section horizontale correspondant aux pointillés est présentée également.

Au contraire de l'isoforme a, la pin-b s'insère dans le film de MGDG sous forme de nano-domaines arrondis de diamètre d'environ 100 à 200 nm (B_1). Ces petits patches sont dispersés uniformément dans la monocouche et présentent une hauteur régulière de 2.2 nm par rapport au fond continu (B_2). Cela tend à penser que les interactions protéine/protéine sont plus faibles pour la pin-b ce qui pourrait empêcher la formation d'un réseau interconnecté comme observé pour la pin-a.

Intéressons-nous désormais à l'organisation des puroindolines dans les monocouches de DGDG ; les images AFM sont présentées à la figure 6.9.

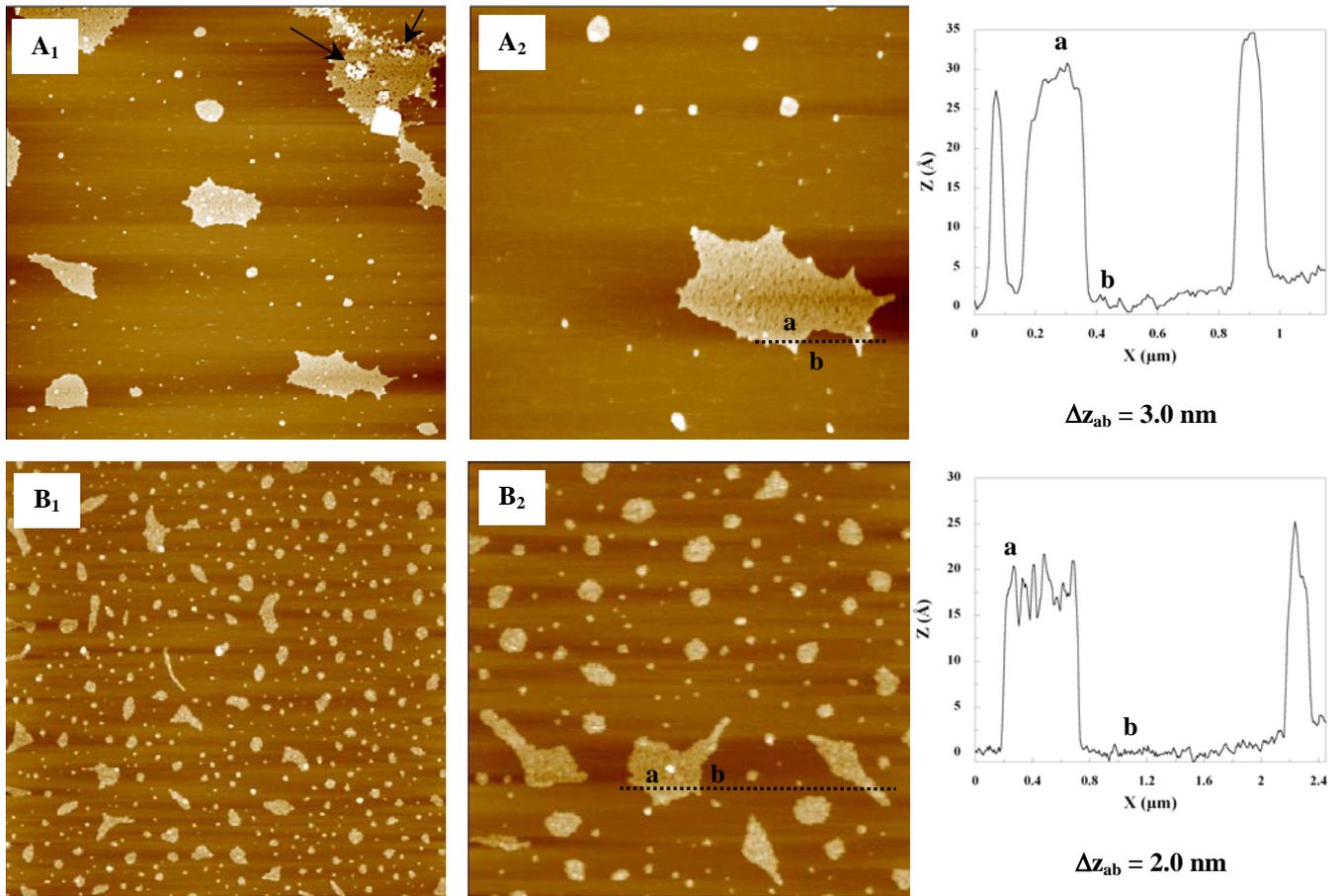


Figure 6.9 : images réalisées en microscopie à force atomique lors de l'adsorption des protéines ($C = 7.10^{-8}$ mol/L) sous des monocouches de DGDG comprimées à $\pi_i = 20$ mN/m. Pin-a : A_1 ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) et A_2 ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$). Pin-b : B_1 ($8 \times 8 \mu\text{m}^2$) et B_2 ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$). L'échelle en z est de 100 \AA . Les sections horizontales correspondant aux pointillés sur les images A_2 et B_2 sont présentées également.

On observe que la pin-a pénètre la monocouche de DGDG en formant des domaines de taille relativement importante, de l'ordre de un à plusieurs μm , ainsi que des petits patches arrondis entre ces domaines ; la hauteur de ces deux types d'arrangement est identique, de l'ordre de 3.0 nm. On dénote par endroit la présence de points d'agrégation que l'on repère par des flèches (A_1). On observe parfois des objets très hauts (35 nm) de forme carrée attribués à des cristaux de sel (image A_1).

En zoomant sur la structure des grands domaines (A_2), nous décelons une structure relativement proche de celle du réseau formé par la pin-a dans le MGDG mais moins bien définie. En effet, la surface est rugueuse sans pour autant présenter une alvéolation régulière. Cela peut traduire une plus forte interaction entre protéines. Ceci est corroboré par la présence

de points d'agrégation qui suggère que les interactions protéine/protéine sont plus fortes avec le DGDG. Finalement, on décèle des prémices d'alvéoles mais également des zones d'agrégation comme cela a été observé avec le DPPC [19]. On peut penser que l'encombrement stérique dû aux larges têtes polaires du DGDG peut empêcher la connexion entre les larges domaines formés par la pin-a.

Concernant l'organisation de la pin-b dans la monocouche de DGDG, on observe des petits patches arrondis de diamètre de l'ordre de 100 à 200 nm dispersés uniformément dans la monocouche ainsi que des domaines plus grands présentant une forme irrégulière (B₁). Ces deux types de structure ont une hauteur identique proche de 2.0 à 2.2 nm (B₂). De façon générale, l'organisation de la pin-b avec le DGDG présente des similitudes avec celle adoptée en présence de MGDG. La formation des domaines plus larges dans le DGDG par rapport au MGDG peut suggérer des interactions plus fortes entre les molécules de pin-b.

Bilan intermédiaire

En conclusion, les observations AFM ont montré des différences entre les deux isoformes a et b, mais aussi des différences dues à la nature du lipide, en particulier pour pin-a. Les structures formées par la pin-a dans le MGDG et le DGDG sont très distinctes. Les résultats sont en accord avec les expériences d'adsorption, la pin-a s'insère beaucoup plus facilement dans le MGDG que le DGDG. L'isoforme b adopte des organisations comparables avec les deux galactolipides. A ce stade, il serait intéressant de savoir si les différentes organisations dans MGDG et DGDG peuvent être reliées à d'éventuels changements d'orientation des molécules.

I.4 – Mesures de PM-IRRAS sur des films mixtes déposés à l’interface

Dans cette partie, nous nous proposons d’étudier les puroindolines en interaction avec les galactolipides à l’interface liquide/air par spectroscopie PM-IRRAS. L’objectif est de sonder les éventuels changements d’organisation et d’orientation des lipides et des protéines lorsqu’ils interagissent.

Afin de respecter les proportions observées dans le grain de blé, nous avons choisi d’étudier les monocouches mixtes telles que le rapport molaire lipide/protéine soit de 20:1 c’est-à-dire qu’une mole de protéine est en interaction avec vingt moles de lipides. Afin de contrôler et de garder ce rapport constant pour chaque expérience, nous avons choisi de déposer les protéines à la surface de la monocouche de lipides au lieu de les injecter sous le film de lipides pour éviter qu’une partie des protéines reste en sous-phase.

La figure 6.10 compare les spectres des protéines seules et en présence des deux galactolipides MGDG et DGDG.

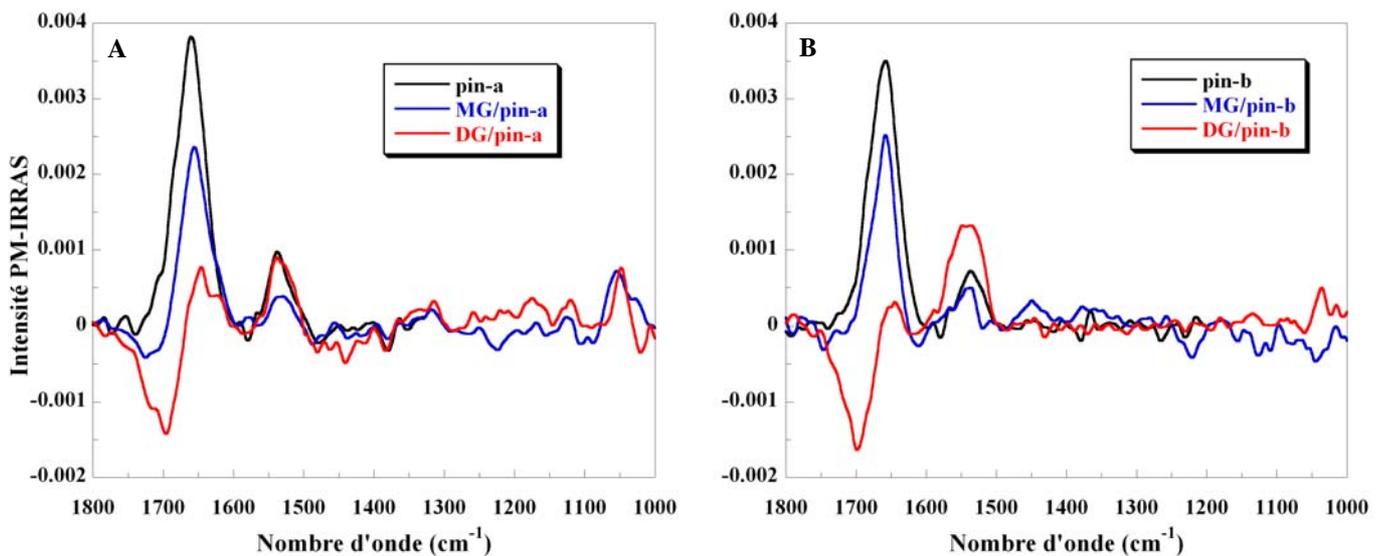


Figure 6.10 : spectres PM-IRRAS réalisés à $T = 19^{\circ}\text{C}$ dans la région $1800\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. A : pin-a en dépôt, pin-a/MGDG et pin-a/DGDG à $\pi = 11\text{ mN/m}$. B : pin-b en dépôt, pin-b/MGDG et pin-b/DGDG à $\pi = 9\text{ mN/m}$. Pour la clarté des graphiques, les spectres de la pin-a et la pin-b ne sont pas présentés jusqu’à 1000 cm^{-1} .

A première vue, les positions des bandes amides I et II de la pin-a et la pin-b sont peu modifiées par la présence du MGDG et du DGDG. Cela suggère qu’en présence des galactolipides, les deux isoformes conservent leur structure en hélices α .

En présence du MGDG, la forme des bandes amide I et II de la pin-a et la pin-b ressemble à celle des protéines seules. Néanmoins, le rapport des intensités des bandes amide

I et II est modifié et augmente en présence du lipide. Ce rapport évolue de 3.9 à 5.6 (correspondant à une augmentation de l'angle d'inclinaison moyen des hélices de 66 à 90°) pour l'isoforme a et de 4.7 à 5.0 (correspondant à une augmentation de l'angle d'inclinaison de 75 à 80°) pour l'isoforme b. Cette augmentation témoigne d'une orientation du faisceau d'hélices des protéines à plat dans la monocouche de MGDG.

En revanche, en présence du DGDG, la forme de la bande amide I de la pin-a et la pin-b est très fortement perturbée par rapport à celles des protéines seules. En calculant le rapport des intensités des bandes amide I et II (R_{II}), on obtient des valeurs de 0.8 et 0.2 pour pin-a/DGDG et pin-b/DGDG, respectivement. Ces valeurs correspondent à un angle d'inclinaison moyen des hélices α de la pin-a et la pin-b de 38 et 31° par rapport à la normale à l'interface, respectivement. Cela montre que les hélices des puroindolines se redressent dans la monocouche de DGDG.

Intéressons-nous désormais à l'effet des protéines sur la structure et l'organisation des galactolipides. Sur la figure 6.11, les spectres PM-IRRAS des lipides purs sont superposés à ceux des mélanges lipide/protéine.

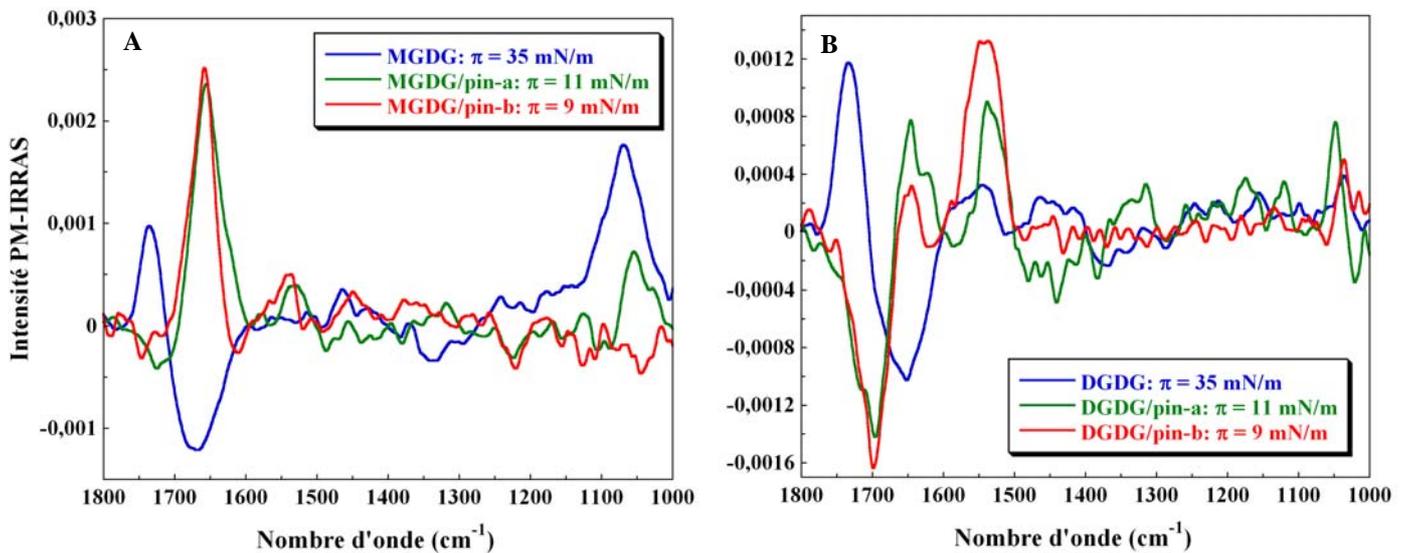


Figure 6.11 : spectres PM-IRRAS réalisés à $T = 19^{\circ}\text{C}$ dans la région spectrale 1800-1000 cm^{-1} . A : MGDG, pin-a/MGDG et pin-b/MGDG. B : DGDG, pin-a/DGDG et pin-b/DGDG.

Si l'on compare les spectres des monocouches compactes des lipides seuls (35 mN/m) à ceux des films mixtes, on remarque que la bande de vibration du carbonyle du lipide à 1730 cm^{-1} a totalement disparu. Ce résultat peut être lié à deux phénomènes : d'une part la diminution de l'intensité de cette bande à une pression de surface plus faible [34] et d'autre

part, l'orientation particulière à environ 40° par rapport à l'interface des groupements carbonyles du fait de l'interaction des molécules de lipides avec les puroindolines [35].

La présence de la bande de vibration de la liaison C-O-C du cycle galactosyl autour de 1050 cm⁻¹ à ces faibles pressions de surface (9 et 11 mN/m) signifie que la présence des puroindolines dans les films de lipides tend à structurer les monocouches.

Pour les monocouches mixtes lipide/pin-a, l'observation d'une bande positive de faible intensité suggère que les têtes galactosyles sont orientées plutôt à plat par rapport à l'interface.

Pour les monocouches mixtes lipides/pin-b, en comparaison avec les monocouches mixtes lipides/pin-a, la disparition de la bande C-O-C dans le cas du MGDG et la diminution de son intensité dans le cas du DGDG suggèrent que les molécules de lipides adoptent là encore une orientation plutôt parallèle à l'interface mais qu'elles sont légèrement moins à plat en présence de la pin-b.

Bilan intermédiaire

Bien que très faibles, nous avons détecté des signaux dans la région des têtes polaires (1100-1000 cm⁻¹) alors que nous avons travaillé à des pressions de surface bien inférieures à 35 mN/m (pression minimale à appliquer aux monocouches de lipides purs pour détecter un signal). Ainsi, les puroindolines semblent structurer les têtes polaires des galactolipides à l'interface.

Les différences observées au niveau des positions des bandes de vibration des têtes polaires des lipides en présence de l'une ou l'autre des puroindolines ne sont pas significatives mais montrent cependant qu'elles tendent à s'orienter plutôt à plat dans la monocouche. Autrement dit, le MGDG conserve son orientation parallèle tandis que les têtes du DGDG passent d'une orientation d'environ 40° à une orientation parallèle à l'interface.

Les deux galactolipides induisent des effets inverses sur l'orientation des hélices. En présence du MGDG, les hélices s'orientent encore plus parallèlement à l'interface que pour les protéines seules. Le DGDG semble induire une perturbation plus grande sur les puroindolines conduisant notamment à un redressement du faisceau d'hélices α par rapport à la normale à l'interface.

I.5 – Isothermes de compression des films mixtes déposés à l’interface

Les images de microscopie à force atomique ont indiqué que les interactions protéine/protéine étaient plus importantes dans le DGDG que dans le MGDG. On peut se poser la question de savoir si ces différences vont se ressentir sur l’allure des isothermes mixtes. De plus, nous allons pouvoir évaluer la miscibilité des galactolipides et des puroindolines. Pour cela, nous avons fait varier la fraction molaire de protéine pour les différentes isothermes : 0 (lipide seul), 0.02, 0.22, 0.35 et 1 (protéine seule).

La figure 6.12.A est un exemple qui montre les isothermes mixtes de pin-a/DGDG à différentes fractions molaires de pin-a. De plus, nous représentons sur la figure 6.12.B l’influence de la fraction molaire de pin-a sur l’aire moléculaire moyenne du film mixte.

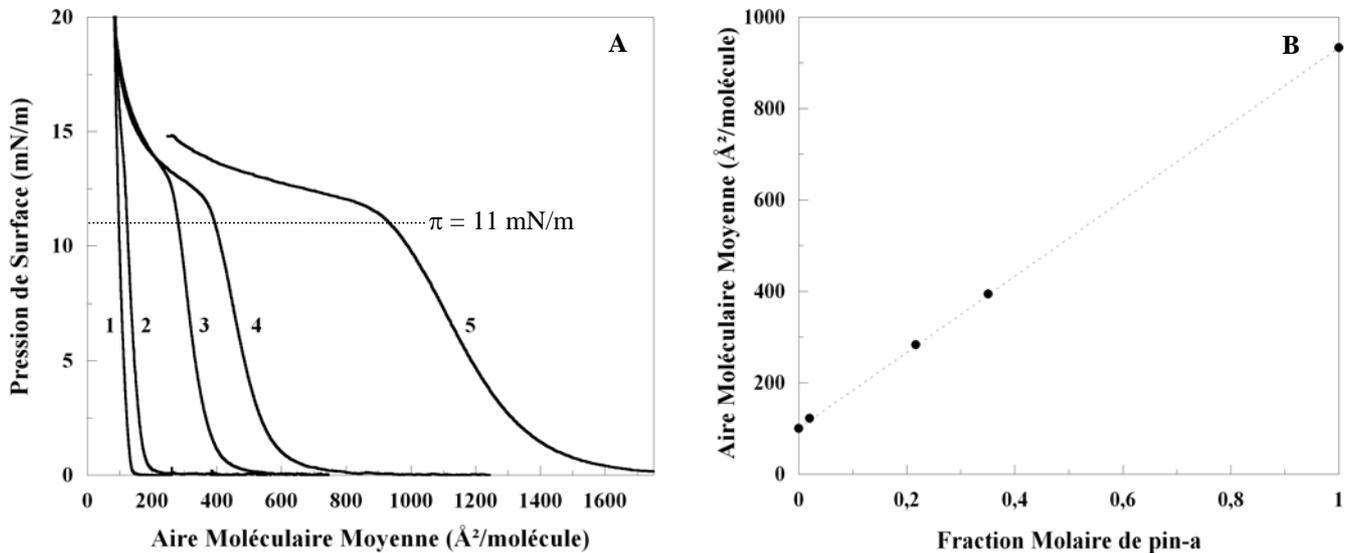


Figure 6.12 : A : superposition des isothermes mixtes DGDG/pin-a pour des fractions molaires de pin-a de 0 (1), 0.02 (2), 0.22 (3), 0.35 (4) et 1 (5). B : influence de la fraction molaire de pin-a sur l’aire moléculaire moyenne du mélange à $\pi = 11$ mN/m. Le mélange idéal est tracé en pointillé et les données expérimentales sont représentées par les points.

D’après la figure 6.12.A, la position du point d’inflexion correspondant au plateau de la pin-a augmente légèrement quand la proportion de DGDG s’accroît ce qui suggère que le lipide stabilise la protéine à l’interface. De plus, à partir de 20 mN/m, les isothermes mixtes suivent la même évolution que celle du lipide seul suggérant l’expulsion des protéines du film sous l’effet d’une trop forte compression.

Pour déterminer la miscibilité des composés, on reporte sur la figure 6.12.B les aires moléculaires moyennes relevées pour une même pression de surface. Les courbes ont été tracées à 11 et 9 mN/m pour la pin-a et la pin-b, respectivement. Nous ne présentons que le

cas de pin-a/DGDG car tous les autres mélanges étudiés (pin-a/MGDG, pin-b/MGDG et pin-b/DGDG) ont montré le même comportement, c'est-à-dire une déviation nulle par rapport au mélange idéal [36, 37]. En effet, les points expérimentaux sont tous alignés sur la droite correspondant au mélange idéal : $A_{12} = X_1.A_1 + X_2.A_2$, où A représente l'aire moléculaire moyenne, X la fraction molaire et les indices 1, 2 et 12 se référant aux composés 1 et 2 et à leur mélange, respectivement.

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus pour les mélanges de pin-a et de phospholipides (DPPC et DPPG) où des déviations positives par rapport au mélange idéal ont été observées [19]. On attribue ces différences à des interactions électrostatiques qui n'ont pas lieu avec les galactolipides de par leur neutralité.

Les mélanges étudiés ne montrent pas de déviation par rapport au mélange idéal indiquant que les deux composés sont soit immiscibles ou idéalement miscibles. Il est difficile d'imaginer une totale immiscibilité entre les deux composés puisque les images AFM ont montré des domaines de protéines répartis dans les monocouches lipidiques.

Bilan intermédiaire

Les isothermes de compression des mélanges semblent indiquer une bonne miscibilité des deux composés. Des changements d'orientation des hélices α ont été mis en évidence par spectroscopie PM-IRRAS qui ne semblent pas être perceptibles sur ces isothermes de compression. Néanmoins, les résultats observés par PM-IRRAS sont à l'échelle de la molécule tandis que les isothermes de compression sont à l'échelle macroscopique.

II – Etude en solution des systèmes pin-a/galactolipide

Cette seconde partie concerne l'étude de dispersions aqueuses mixtes lipide/protéine. Ces expériences sont complémentaires des mesures à l'interface, elles ne représentent pas une étude complète mais peuvent cependant apporter des informations intéressantes pour la compréhension de la relation entre les structures bi- et tridimensionnelles. On présentera des mesures de spectroscopie Raman, des images de microscopie à l'angle de Brewster réalisées au-delà du collapse et des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles réalisées sur des systèmes mixtes pin-a/galactolipide.

II.1 – Spectroscopie Raman

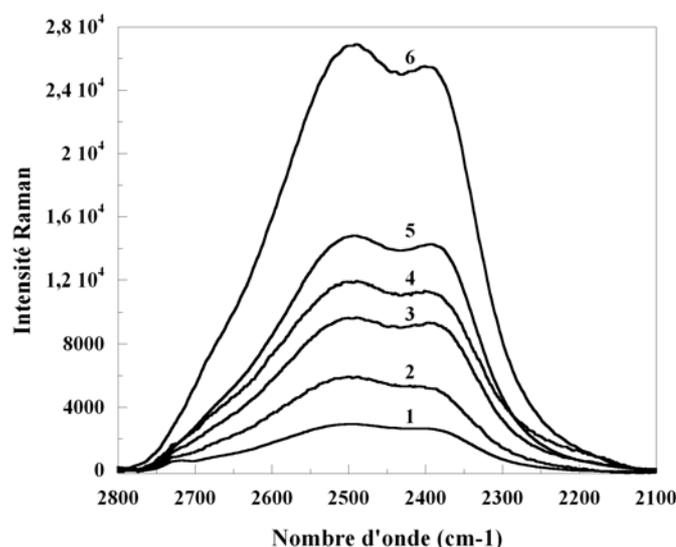


Figure 6.13 : superposition des spectres Raman à 20.5°C des lipides purs et en présence de pin-a ($R = 20$) dans la région 2100 à 2800 cm^{-1} mettant en évidence l'effet de la pin-a sur l'hydratation des lipides. 1 : MGDG, 2 : MGDG/pin-a, 3 : DGDG, 4 : DGDG/pin-a, 5 : mélange équimolaire des lipides, 6 : mélange équimolaire/pin-a.

Les spectres présentés à la figure 6.13 sont normalisés par rapport à la bande d'étirement symétrique du méthylène des chaînes carbonées située à environ 2900 cm^{-1} . L'intensité du large pic entre 2000 et 2800 cm^{-1} est due aux modes d'élongation des liaisons O-D de D_2O et il révèle que la présence de la protéine augmente sensiblement l'hydratation des lipides, en particulier pour le mélange équimolaire des deux galactolipides. La pin-a est très soluble dans l'eau, ainsi, du fait de son interaction avec le lipide, elle semble favoriser l'accès de l'eau aux structures tridimensionnelles formées par les lipides.

Nous présentons à la figure 6.14 les spectres des lipides purs et des dispersions mixtes dans la région 3050 à 2800 cm^{-1} où apparaissent les bandes dues aux différentes vibrations

d'élongation des liaisons C-H des chaînes acyl. Les vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique des liaisons C-H du méthylène CH₂ apparaissent à 2856 et 2899 cm⁻¹ respectivement.

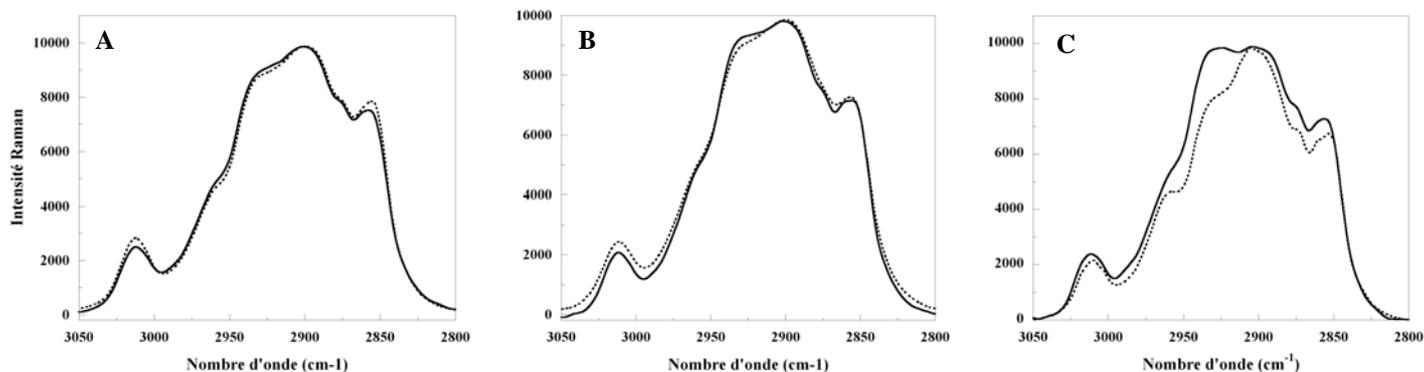


Figure 6.14 : superposition des spectres Raman des lipides purs (trait pointillé) et en présence de pin-a ($R = 20$) (trait plein) dans la région 3050 à 2800 cm⁻¹ montrant l'effet de la protéine sur l'état physique des chaînes carbonées des lipides. A : MGDG, B : DGDG, C : mélange équimolaire des galactolipides.

| | $R_1 = I_{2930}/I_{2900}$ | $R_2 = I_{2900}/I_{2850}$ | Variations R_1 | Variations R_2 |
|---------------|---------------------------|---------------------------|------------------|------------------|
| MGDG | 0.89 | 1.26 | + 0.02 | + 0.05 |
| MGDG/pin-a | 0.91 | 1.31 | | |
| DGDG | 0.91 | 1.36 | + 0.04 | + 0.01 |
| DGDG/pin-a | 0.95 | 1.37 | | |
| mélange | 0.81 | 1.47 | + 0.18 | - 0.11 |
| mélange/pin-a | 0.99 | 1.33 | | |

Tableau 6.3 : valeurs des rapports d'intensité $R_1 = I_{2930}/I_{2900}$ et $R_2 = I_{2900}/I_{2850}$ calculés à partir des spectres Raman présentés à la figure 6.13. On ajoute les variations des rapports R_1 et R_2 induites par la présence de la pin-a.

Il a été montré que le rapport des intensités I_{2900}/I_{2850} (R_2) est sensible au couplage intermoléculaire et par conséquent, au compactage latéral des chaînes acyl [38, 39]. D'autre part, le rapport des intensités I_{2930}/I_{2900} (R_1) est sensible à l'ordre conformationnel et il permet d'évaluer le désordre des chaînes acyl [40, 41].

La présence de la pin-a dans les dispersions de MGDG et DGDG induit une faible augmentation des rapports R_1 et R_2 . Ces deux observations peuvent paraître contradictoires. Néanmoins, l'insertion de la pin-a dans les structures tridimensionnelles des lipides peut induire non seulement une augmentation du désordre des chaînes acyl mais également un compactage des chaînes et donc un plus fort couplage entre elles.

Lorsque la pin-a est mise en présence du mélange équimolaire, des variations très importantes des rapports R_1 et R_2 sont observées que l'on peut clairement identifier sur le spectre C de la figure 6.14. L'augmentation du rapport R_1 indique que les chaînes acyl, initialement mieux ordonnées que celles des lipides purs (chapitre 4), subissent une forte désorganisation due à la présence de la pin-a. Parallèlement, la diminution du rapport R_2 suggère que le compactage et le couplage des chaînes diminue.

Pour clore cette discussion, nous tenons à faire remarquer que l'effet des lipides sur la pin-a n'a pu être étudié. En effet, la bande amide I, permettant notamment d'apporter des informations quant à la conformation de la protéine, est située à 1644 cm^{-1} (figure 5.13). Cependant les spectres des lipides présentent une bande intense à 1655 cm^{-1} de par la présence de nombreuses insaturations dans les chaînes acyl. Ainsi, le signal de la protéine (intensité ~ 400) est totalement « noyé » dans la bande d'élongation des liaisons C=C (intensité ~ 5000).

Bilan intermédiaire

L'ajout de pin-a aux dispersions lipidiques se traduit par une augmentation de l'hydratation des structures lipidiques et par un accroissement du désordre des chaînes acyl. Les effets sont comparables pour les lipides purs tandis qu'ils sont beaucoup plus significatifs pour le mélange équimolaire. On suggère alors une meilleure accessibilité aux lipides de la pin-a avec la structure cubique formée par le mélange.

II.2 – Diffusion des rayons X aux petits angles

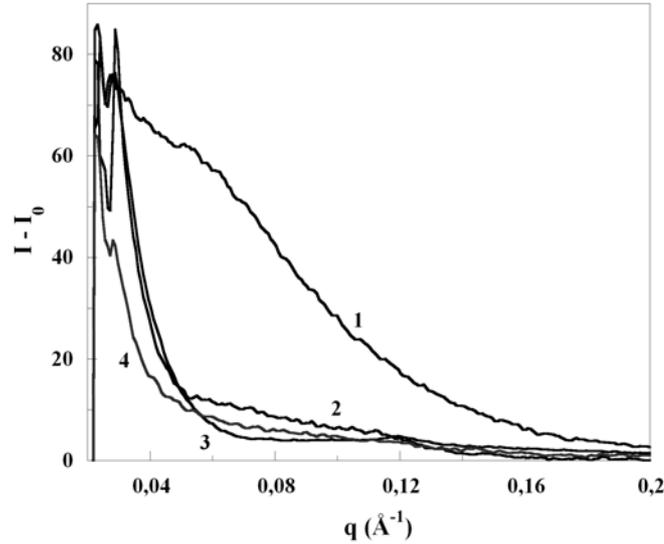


Figure 6.15 : intégration radiale des clichés de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) de solutions mixtes pin-a/lipides ($R=20$). 1 : pin-a seule, 2 : pin-a/MGDG, 3 : pin-a/DGDG, 4 : pin-a/mélange équimolaire.

Ces clichés sont présentés à titre indicatif et nous n'en ferons pas une analyse détaillée. Néanmoins, nous montrons que le signal des systèmes mixtes est radicalement différent de celui de la pin-a seule. L'apparition de ce nouveau signal laisse présumer qu'un nouveau complexe est formé. Par comparaison du signal de la pin-a seule et des signaux des systèmes mixtes, on peut supposer que s'il y a formation d'agrégats, ils sont plus gros que les objets formés par la pin-a seule (q diminue \Rightarrow taille de l'objet augmente). Pour avoir plus de détails sur ces nouveaux complexes formés, il faudrait travailler à des angles plus petits ce qui nécessite de travailler sur un synchrotron. Un essai a été réalisé sur un mélange de pin-a et du mélange équimolaire à un rapport molaire de 5 car la pin-a possède cinq sites d'ancrage aux lipides [42]. En effet, les phases cubiques sont reconnues pour être des structures d'intérêt pour la cristallisation des protéines. Cet essai n'a pas été fructueux mais les conditions expérimentales peuvent éventuellement être améliorées à l'avenir.

II.3 – Microscopie à l’angle de Brewster au-delà du collapse

Comme mentionné au chapitre 4, ce paragraphe sur la microscopie à l’angle de Brewster est intégré à la partie sur les phases liquide-cristallines car les structures formées sont des multicouches ou structures tridimensionnelles donc non relatives au comportement à deux dimensions. Ces expériences ont été réalisées à Bordeaux en utilisant une barrière spéciale permettant de comprimer les molécules au-delà du collapse sans rompre l’interface (chapitre 4).

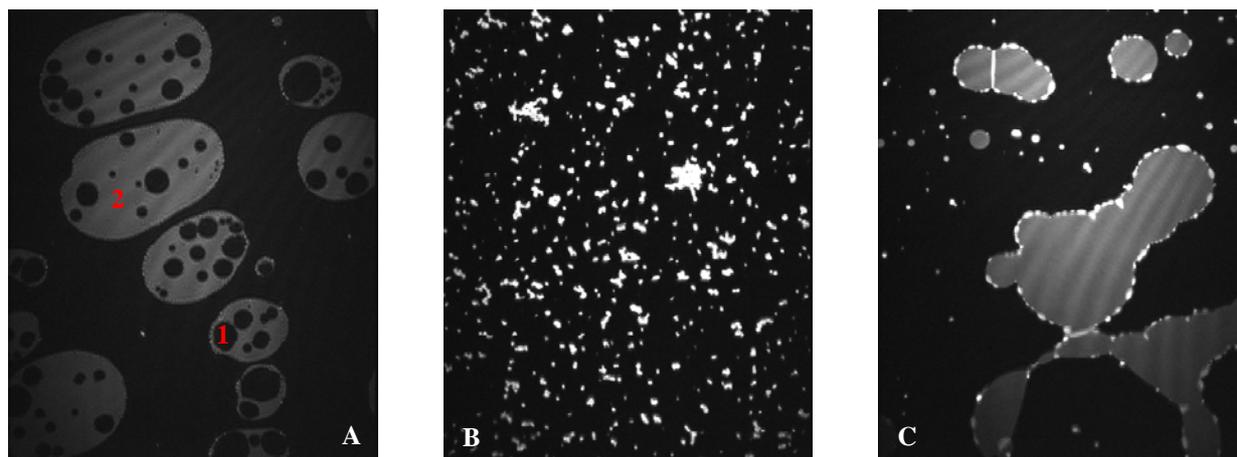


Figure 6.16 : images Brewster ($430 \times 540 \mu\text{m}^2$) enregistrées lors de la surcompression des films mixtes ($R = 180$). A : DGDG/pin-a, vitesse d’obturation de la caméra au $500^{\text{ème}}$ de seconde. B : MGDG/pin-a, vitesse d’obturation au $5000^{\text{ème}}$ de seconde. C : mélange/pin-a, vitesse d’obturation au $500^{\text{ème}}$ de seconde.

La figure 6.16 montre les images de microscopie à l’angle de Brewster enregistrées au cours de la surcompression des films mixtes pin-a/galactolipides. Nous avons travaillé à un rapport molaire lipides/protéines de 180 (1 mole de protéine en interaction avec 180 moles de lipides). Il faut en effet éviter de trop saturer l’interface de protéines afin d’observer les changements induits par la pin-a sur les lipides.

Pour observer l’effet de la pin-a sur l’organisation des lipides, nous présentons à la figure 6.17 les images des lipides seuls.

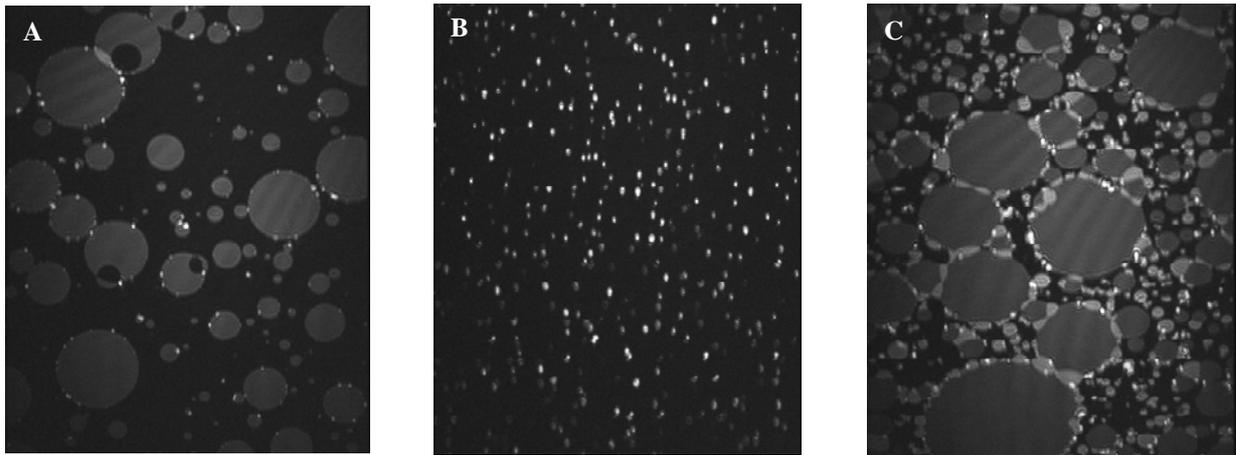


Figure 6.17 : images Brewster des lipides au-delà du collapse. Taille des images : $(430 \times 540) \mu\text{m}^2$, vitesse d'obturation de la caméra au $2000^{\text{ème}}$ de seconde. A : DGDG, B : MGDG, C : mélange équimolaire.

De façon générale, on observe que la pin-a perturbe fortement les organisation lipidiques (figure 6.16). Dans le cas du DGDG (A), on voit apparaître des domaines circulaires (1) au sein des multicouches (2) dont la forme, initialement arrondie, est perturbée. Ainsi, la pin-a semble provoquer la désagrégation des multicouches de DGDG en formant des domaines types monocouches (fond noir). Cela suggère l'insertion de la pin-a dans la multicouche de DGDG entraînant l'expulsion des molécules lipidiques.

Pour MGDG (B), on observe la formation de structures extrêmement hautes. En effet, les protubérances sont très lumineuses malgré une vitesse d'obturation de la caméra très faible. On forme des domaines clairement différents du MGDG seul suggérant une association entre le lipide et la pin-a. Ces domaines semblent se regrouper entre eux au cours de la compression.

Pour le mélange équimolaire, il semble se produire les deux effets décrits ci-dessus. D'une part, la forme des multicouches est fortement perturbée, comme « grignotée » par la pin-a. De plus, la pin-a semble provoquer la désagrégation des multicouches en formant des domaines types monocouches (fond noir).

Bilan intermédiaire

Les images Brewster montrent que la pin-a perturbe fortement les structures lipidiques en s'insérant dans les multicouches de DGDG et en formant des complexes de hauteur très importante avec le MGDG. La pin-a induit aussi des changements importants sur la structure du mélange équimolaire. Finalement, ces images nous montrent clairement l'interaction de la pin-a avec les galactolipides.

Conclusion et discussion relatives au chapitre 6

Tous les résultats à l'interface liquide/air exposés dans ce chapitre (tensiométrie, ellipsométrie, microscopies à l'angle de Brewster et à force atomique, spectroscopie PM-IRRAS) tendent à montrer que les interactions développées avec les galactolipides sont plus fortes avec la pin-a que la pin-b. Malgré les 60% d'homologie, on montre ici que la structure primaire des puroindolines influence fortement les propriétés de celles-ci, comme il a été démontré pour les cardiotoxines [43], des peptides antimicrobiens présentant de nombreuses similitudes avec les puroindolines [44]. Une différence entre les deux isoformes est le domaine hydrophobe riche en tryptophane qui est tronqué pour la pin-b [1, 3]. Ainsi, les deux tryptophanes supplémentaires pour la pin-a semblent jouer un rôle prépondérant dans les propriétés d'association avec les lipides. Cet acide aminé est connu pour être hydrophobe et pour former des liaisons hydrogène avec les composés polaires, c'est pourquoi on le retrouve souvent aux interfaces hydrophile/hydrophobe formées par les lipides [24-27].

Les galactolipides sont des molécules capables de former de nombreuses liaisons hydrogène de par leurs têtes polaires galactosyl possédant de nombreux groupes hydroxyle OH. Néanmoins, la nature du lipide semble jouer un rôle important sur les propriétés d'assemblage des puroindolines. En effet, la présence d'un ou deux groupes galactosyl dans la tête polaire des lipides modifie fortement les propriétés des puroindolines.

La pin-a montre clairement plus d'affinité pour le mono-tête MGDG que pour le bi-tête DGDG. Le MGDG a une tête moins volumineuse et des chaînes acyl plus insaturées que le DGDG ce qui est propice à la courbure du film et donc à la création de zones d'instabilité qui pourrait favoriser l'adsorption de la protéine dans le film [17, 18]. Cette hypothèse est confirmée par le fait que l'insertion de la pin-a devient soudainement beaucoup plus forte dans le MGDG que dans le DGDG à partir de 20-25 mN/m, pressions de surface à partir desquelles le décalage entre les têtes du MGDG est détecté.

Les images AFM ont révélé que la pin-a s'organise en réseau interconnecté de hauteur très régulière dans le MGDG. L'absence d'agrégats dans ces structures indique une bonne stabilité de la protéine. De plus, la présence d'alvéoles dans ce réseau indique que la pin-a tend à maximiser la surface de contact avec le lipide tout en conservant une continuité protéine/protéine. Ainsi, il semble que la stabilité de la pin-a est déterminée par une balance entre les contacts qu'elle développe avec le lipide et avec les autres molécules protéiques. Cette hypothèse est supportée par les images AFM du film pin-a/DGDG sur lesquelles on observe des domaines non connectés et moins alvéolés ainsi que la présence de plusieurs

agrégats protéiques. Finalement, la pin-a adopte une organisation intermédiaire dans le phospholipide DPPC avec la formation d'un réseau bien alvéolé ainsi que plusieurs points d'agrégation [19]. On peut alors « quantifier » l'état d'organisation dans le film de pin-a, comme indiqué à la figure 6.18.

Ces différences peuvent être corrélées aux observations faites par spectroscopie PM-IRRAS, en particulier à l'orientation des quatre hélices α de la pin-a dans les films de galactolipides. Le faisceau d'hélices s'oriente à plat par rapport à l'interface dans le MGDG tandis qu'il est fortement redressé dans le DGDG. Aucune donnée n'est disponible quant à l'orientation de ce faisceau dans les phospholipides. Néanmoins, nous proposons que la stabilité de la pin-a dans les films lipidiques dépend grandement de l'orientation du faisceau d'hélices par rapport au plan de l'interface. Plus précisément, la pin-a sera d'autant mieux structurée que les hélices s'orienteront parallèlement à l'interface.

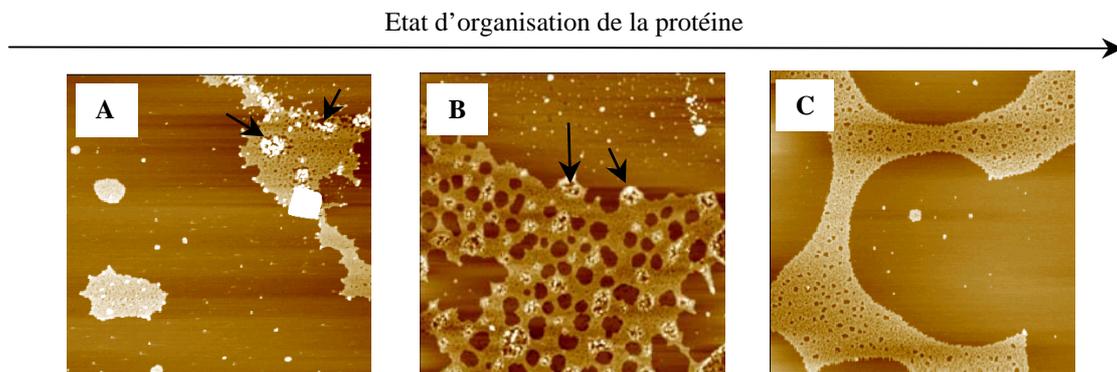


Figure 6.18 : organisations de la pin-a dans trois lipides différents. Taille des images : $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. A : pin-a/DGDG. B : pin-a/DPPC, d'après [19]. C : pin-a/MGDG. Les flèches indiquent les zones agrégées.

Concernant les résultats sur les dispersions de pin-a/galactolipide, la spectroscopie Raman a révélé que la protéine favorise l'hydratation des structures lipidiques et qu'elle perturbe fortement les chaînes acyl des lipides ce qui se traduit par une augmentation du désordre. Ces effets sont particulièrement importants pour le mélange équimolaire par rapport aux lipides purs. La microscopie à l'angle de Brewster confirme que la pin-a désorganise les structures lipidiques en s'insérant dans les multicouches de DGDG et en formant de nouveaux complexes avec le MGDG. Finalement, les clichés de diffusion des rayons X ont montré que le signal de la pin-a seule est radicalement différent de ceux des mélanges pin-a/lipide suggérant la formation de nouveaux complexes, a priori plus gros que les objets sphériques formés par la pin-a en solution.

Bibliographie du chapitre 6

1. Blochet, J.-E. 1991. Isolement, caractérisation et études structurales de protéines de blé effectrices des lipides amphiphiles. *Thèse de doctorat de l'université de Nantes*.
2. Blochet, J.-E., C. Chevalier, E. Forest, E. Pebay-Peyroula, M.-F. Gautier, P. Joudrier, M. Pézolet, and D. Marion. 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Letters*. 329:336-340.
3. Gautier, M.-F., M.-E. Aleman, A. Guirao, D. Marion, and P. Joudrier. 1994. Triticum aestivum puroindolines, two basic cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Mol. Biol.* 25:43-57.
4. Dubreil, L., T. Gaborit, B. Bouchet, D.J. Gallant, W.F. Broekaert, L. Quillien, and D. Marion. 1998. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of Triticum aestivum seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Science*. 138:121-135.
5. Krishnamurthy, K., C. Balconi, J.E. Sherwood, and M.J. Giroux. 2001. Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Mol. Plant Microbe Interactions*. 14:1255-1260.
6. Mattei, C., K. Elmorjani, J. Molgo, D. Marion, and E. Benoit. 1998. The wheat proteins puroindoline-a and [alpha]1 purothionin induce nodal swelling in myelinated axons. *NeuroReport*. 9:3803-3803.
7. Charnet, P., Gérard Molle, D. Marion, M. Rousset, and V. Lullien-Pellerin. 2003. Puroindolines form ion channels in biological membranes. *Biophysical Journal*. 84:2416-2426.
8. Turnbull, K.M. and S. Rahman. 2002. Endosperm texture in wheat. *Journal of Cereal Science*. 36:327-337.
9. Douliez, J.P., T. Michon, K. Elmorjani, and D. Marion. 2000. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *Journal of Cereal Science*. 32:1-20.
10. Morris, C.F. 2002. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol. Biol.* 48:633-647.
11. Clark, D.C., P.J. Wilde, and D. Marion. 1994. The protection of beer foam against lipid induced destabilization. *J. Inst. Brew.* 100:23-25.

12. Husband, F., P.J. Wilde, D. Marion, and D.C. Clark. 1994. A comparison of the foaming and interfacial properties of two related lipid binding proteins from wheat in the presence of a competitive surfactant. *In Food Macromolecules and Colloids. E. Dickinson, and D. Lorient, editors. Royal Society of Chemistry, London, UK.* 285-296.
13. Wilde, P.J., D.C. Clark, and D. Marion. 1993. Influence of competitive adsorption of a lysopalmitoylphosphatidylcholine on the functional properties of puroindoline, a lipid-binding protein isolated from wheat flour. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 41:1570-1576.
14. Dubreil, L., J.-P. Compoin, and D. Marion. 1997. Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 45:108-116.
15. Brockman, H. 1999. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:438-443.
16. Maget-Dana, R. 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462:109-140.
17. Cruzeiro-Hansson, L., J.H. Ipsen, and O.G. Mouritsen. 1989. Intrinsic molecules in lipid membranes change the lipid-domain interfacial area: cholesterol at domain interfaces. *Biochim. Biophys. Acta.* 979:166-176.
18. Mouritsen, O.G. and K. Jorgensen. 1997. Small-scale lipid-membrane structure: simulation versus experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:518-527.
19. Dubreil, L., V. Vié, S. Beaufile, D. Marion, and A. Renault. 2003. Aggregation of puroindoline in phospholipid monolayers spread at the air-liquid interface. *Biophys. J.* 85:2650-2660.
20. Quioco, F.A. 1989. Protein-carbohydrate interactions: Basic molecular features. *Pure Appl. Chem.* 61:1293-1306.
21. Toone, E.J. 1994. Structure and energetics of protein-carbohydrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4:719-728.
22. Elgavish, S. and B. Shaanan. 1997. Lectin-carbohydrate interactions: Different folds, common recognition principles. *Trends Biochem. Sci.* 22:462-467.
23. Sundari, C.S. and D. Balasubramanian. 1997. Hydrophobic surfaces in saccharide chains. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 67:183-216.
24. Schiffer, M., C.H. Chang, and F.J. Stevens. 1992. The functions of tryptophan residues in membrane proteins. *Protein Eng.* 5:213-214.

25. Landolt-Marticorena, C., K.A. Williams, C.M. Deber, and R.A.F. Reithmeier. 1993. Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J. Mol. Biol.* 229:602-608.
26. Hu, W., N.D. Lazo, and T. A.Cross. 1995. Tryptophan dynamics and structural refinement in a lipid bilayer environment: solid state NMR of the gramicidin channel. *Biochemistry.* 34:14138-14146.
27. Yau, W.-M., W.C. Wimley, K. Gawrisch, and S.H. White. 1998. The Preference of tryptophan for membrane interfaces. *Biochemistry.* 37:14713-14718.
28. Killian, J.A., I. Salemink, M.R.R. de Planque, G. Lindblom, R.E. Koeppe, and D.V. Greathouse. 1996. Induction of nonbilayer structures in diacylphosphatidylcholine model membranes by transmembrane alpha-helical peptides: importance of hydrophobic mismatch and proposed role of tryptophans. *Biochemistry.* 35:1037-1045.
29. Persson, S., J.A. Killian, and G. Lindblom. 1998. Molecular ordering of interfacially localized tryptophan analogs in ester- and ether-lipid bilayers studied by H-2-NMR. *Biophys. J.* 75:1365-1371.
30. Kooijman, M., R. Orsel, M. Helsing, R.J. Hamer, and A.C.A.P.A. Bekkers. 1997. Spectroscopic characterisation of the lipid-binding properties of wheat puroindolines. *Journal of Cereal Science.* 26:145-159.
31. Demel, R.A., W.S. Geurts van Kessel, R.F. Zwaal, B. Roelofsen, and L.L. van Deenen. 1975. Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 406:97-107.
32. Nagle, J.F. 1976. Theory of monolayer and bilayer phase transitions: effect of headgroup interactions. *J. Membr. Biol.* 27:233-250.
33. Feng, S.S. 1999. Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure area measurement of the monolayer at the air-water interface or oil-water interface. *Langmuir.* 15:998-1010.
34. Saccani, J. 2003. Réalisation de systèmes membranaires modèles et étude de leur organisation par microscopie à l'angle de Brewster, spectroscopie PM-IRRAS et dichroïsme circulaire vibrationnel. *Thèse de doctorat de l'université Bordeaux 1.*
35. Blaudez, D., J.-M. Turlet, Dufourcq, D. Bard, T. Buffeteau, and B. Desbat. 1996. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 92:525-530.

36. Costin, I.S. and G.T. Barnes. 1975. Two-component monolayers. II. Surface pressure-area relations for the octadecanol-docosyl sulfate system. *J. Colloid Interface Sci.* 51:106-121.
37. Gaines, G.L.J. 1966. In *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*. Prigorine, I., Ed. Interscience. New York, Chapter 6.
38. Gaber, B.P. and W.L. Peticolas. 1977. On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta.* 465:260-274.
39. Snyder, R.G., J.R. Scherer, and B.P. Gaber. 1980. Effects of chain packing and chain mobility on the raman spectra of biomembranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 601:47-53.
40. Bunow, M.R. and I.W. Levin. 1977. Comment on the carbon-hydrogen stretching region of vibrational raman spectra of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 487:388-394.
41. Huang, C., J.T. Mason, and I.W. Levin. 1983. Raman spectroscopic study of saturated mixed-chain phosphatidylcholine multilamellar dispersions. *Biochemistry.* 22:2775-2780.
42. Wilde, P.J., D.C. Clark, and D. Marion. 1993. Influence of competitive adsorption of a lysopalmitoylphosphatidylcholine on the functional properties of puroindoline, a lipid-binding protein isolated from wheat flour. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 41:pp 1570 - 1576.
43. Bougis, P., H. Rochat, G. Piironi, and R. Verger. 1981. Penetration of phospholipid monolayers by cardiotoxins. *Biochim. Biophys. Acta.* 20:4915-4920.
44. Le Guernevé, C., M. Seigneuret, and D. Marion. 1998. Interaction of the wheat endosperm lipid-binding protein puroindoline-a with phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 360:179-186.

Au niveau expérimental, cette thèse s'est articulée en trois grandes parties. La première étape a concerné l'extraction à partir du grain de blé et la purification du matériel biologique, à savoir, les galactolipides, MGDG et DGDG, et les deux isoformes des puroindolines, pin-a et pin-b. La seconde étape de cette étude a consisté en l'étude des différentes propriétés des composés lipidiques et protéiques à l'interface et en solution. Les résultats obtenus ont permis, dans la dernière étape concernant l'étude des interactions lipide/protéine, de discriminer les contributions des deux constituants et de mettre en évidence les changements par rapport aux systèmes purs. Les données fondamentales acquises ont conduit également à tirer quelques informations concrètes concernant certaines propriétés du grain de blé.

Les galactolipides MGDG et DGDG sont les lipides majoritaires des membranes des amyloplastides et de l'albumen du blé [1]. Les propriétés de ces lipides aux interfaces et en solution peuvent être reliées au comportement de ces molécules amphiphiles dans le grain de blé. En effet, l'étude de ces lipides en monocouche aux interfaces a mis en évidence des interactions particulières entre les têtes polaires galactosyl, particulièrement dans le mélange équimolaire des deux lipides. Ces fortes interactions influencent également les propriétés en solution. Ces lipides forment des mésophases liquide-cristallines très distinctes. Les reconstructions des densités électroniques pour les lipides purs ont apporté des informations quant à l'organisation des molécules et en particulier des têtes galactosyl. Le DGDG forme une phase lamellaire ($d_{\text{lam}} = 54.9 \text{ \AA}$) où les têtes di-galactosyl s'orientent parallèlement au plan de la bicouche, ce qui est conforme à des observations antérieures [2]. Le MGDG forme une phase hexagonale inverse ce qui est classique pour ce type de molécule [3, 4]. Toutefois, le paramètre de maille est étonnamment grand ($d_{\text{hex}} = 67.2 \text{ \AA}$) ce qui s'explique par un décalage des têtes mono-galactosyl les unes par rapport aux autres. Finalement, le mélange équimolaire se stabilise en une phase cubique du type $Im3m$ ($d_{\text{cub}} = 202 \text{ \AA}$), phase rarement observée avec des chaînes contenant majoritairement 18 carbones.

Ce polymorphisme semble être directement relié aux observations faites dans les grains secs. En effet, durant la dernière étape du développement du grain, un processus de déshydratation programmée a lieu, induisant des dommages concernant l'intégrité des membranes des cellules de l'albumen. Ce dernier événement apoptotique* programmé dans le cycle de la vie du grain de blé conduit à une accumulation d'amas membranaires entre la matrice protéique et les granules

* apoptose : mort cellulaire génétiquement programmée

d'amidon [5]. Ces amas lipidiques proviennent des membranes des vacuoles protéiques et des amyloplastés et le couplage microscopie/cryofracture a permis de montrer que ces membranes lipidiques forment plusieurs types de mésophases : lamellaires, hexagonales et cubiques [5]. Ainsi, ce comportement de phase des membranes dans les grains secs est probablement relié à celui de leurs constituants lipidiques, MGDG et DGDG.

Ce polymorphisme peut également jouer un rôle au cours du pétrissage de la pâte à pain. Dès que la farine est hydratée, les lipides peuvent coexister sous forme de cristaux, phases huileuses ou micelles. La pâte peut alors être assimilée à une dispersion colloïdale dans laquelle plusieurs phases dispersées sont individualisées (cellules gazeuses, particules lipidiques, levures, grains d'amidon...) au sein d'une matrice continue. Les phases liquide-cristallines jouent des rôles distincts aux interfaces des différents milieux. La phase lamellaire est un agent dispersant et lubrifiant efficace, tandis que la phase hexagonale se comporte comme une greffe plastique. De plus, ce polymorphisme pourrait aussi jouer un rôle sur la répartition des puroindolines à la surface des granules d'amidon, un phénomène qui détermine le caractère « Hard » ou « Soft » des blés [6, 7].

Nous avons caractérisé les propriétés des deux isoformes a et b de la puroindoline aux interfaces : l'activité à la surface, la structure secondaire (qui diffère de celle en solution, [8]) et l'orientation de certains groupements moléculaires. Dans l'ensemble, les deux isoformes ont des comportements relativement similaires à l'interface liquide/air. Pourtant, des différences importantes ont été mises en évidence en présence des films lipidiques.

En effet, la pin-a interagit plus fortement que la pin-b avec les galactolipides. Cela se traduit par une plus forte pénétration et par une meilleure organisation des molécules de pin-a dans les films lipidiques. De plus, la stabilité de la protéine dans les films lipidiques est intimement reliée à l'orientation du faisceau d'hélices α par rapport à l'interface. Ces observations peuvent être directement corrélées au fait que les variétés de blé ne comportant pas de pin-a sont toujours des blés « Hard » [9, 10]. En effet, si les puroindolines s'insèrent plus fortement dans les galactolipides, cela se traduit par une déstabilisation des membranes des amyloplastés. Ce phénomène pourrait induire une moins bonne adhésion entre la matrice protéique et l'amidon et en conséquence une plus grande friabilité de l'albumen lors du broyage. En ce qui concerne l'étude des dispersions mixtes protéine/lipide dans l'eau, les images Brewster au-delà du collapse ont montré que la pin-a perturbe fortement les multicouches de DGDG en

s'insérant à l'intérieur de celles-ci. Ces observations corroborent l'activité biologique de type antifongique mise en évidence pour les puuroindolines [11]. Il a déjà été suggéré que cette activité serait reliée à l'augmentation de la perméabilité des membranes [12] ce que confirment nos résultats.

Un dernier point intéressant qui doit être souligné est la formation d'un réseau continu de pin-a dans le film de MGDG. Ce réseau est homogène à grande échelle (figure 1.A), il a une hauteur régulière ~ 2.5 nm (figure 1.B et 1.C) et surtout, on ne détecte aucun agrégat. De plus, il présente une structure alvéolée (figure 1.B) indiquant des interactions fortes à la fois protéine/protéine et protéine/lipide pouvant stabiliser ces molécules aux interfaces liquide/air. Cela est en accord avec la très bonne stabilité des mousses de pin-a en présence de glycolipides [13].

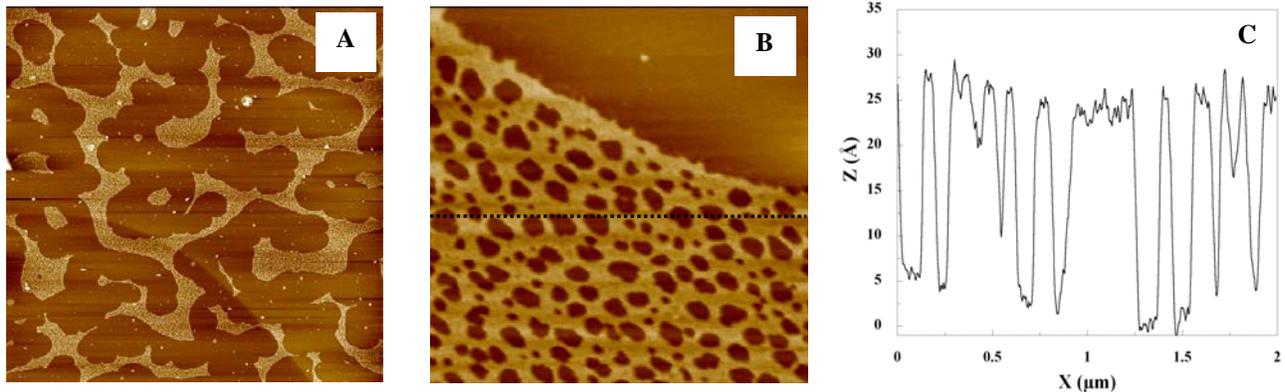


Figure 1 : images de microscopie à force atomique réalisées lors de l'adsorption de la pin-a sous une monocouche de MGDG. A : $40 \times 40 \mu\text{m}^2$. B : $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. C : section horizontale correspondant au trait pointillé sur l'image B.

Echelle en z : $\Delta z = 100\text{\AA}$.

Bibliographie

1. Fishwick, M.J. and A.J. Wright. 1980. Isolation and characterization of amyloplast envelope membranes from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*. 19:55-59.
2. McDaniel, R.V. 1988. Neutron diffraction studies of digalactosyldiacylglycerol. *Biochim. Biophys. Acta*. 940:158-164.
3. Shipley, C.G., J.P. Green, and B.W. Nichols. 1973. The phase behavior of monogalactosyl, digalactosyl, and sulphoquinovosyl diglycerides. *Biochimica et Biophysica Acta*. 311:531-544.
4. Larsson, K. and S. Puang-Ngern. 1979. The aqueous system of monogalactosyl diglycerides and digalactosyl diglycerides - Significance to the structure of the thylakoid membrane. In *Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids*, L. Å. Appelqvist and C. Liljenberg, editors, Elsevier/North Holland Biomedical press. 27-33.
5. Al Saleh, A., D. Marion, and D.J. Gallant. 1986. Microstructure of mealy and vitreous wheat endosperms (*Triticum durum* L.) with special emphasis on location and polymorphic behavior of lipids. *Food Microstructure*. 5:131-140.
6. Turnbull, K.M. and S. Rahman. 2002. Endosperm texture in wheat. *Journal of Cereal Science*. 36:327-337.
7. Douliez, J.P., T. Michon, K. Elmorjani, and D. Marion. 2000. Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *Journal of Cereal Science*. 32:1-20.
8. Le Bihan, T., J.-É. Blochet, A. Désormeaux, D. Marion, and M. Pézolet. 1996. Determination of the secondary structure and conformation of puroindolines by infrared and Raman spectroscopy. *Biochemistry*. 35:12712-12722.
9. Dubreil, L., S. Méliande, H. Chiron, J.P. Compoint, L. Quillien, G. Branlard, and D. Marion. 1998. Effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour. *Cereal Chem*. 75:222-229.
10. Giroux, M.J. and C.F. Morris. 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. *PNAS*. 95:6262-6266.
11. Dubreil, L., T. Gaborit, B. Bouchet, D.J. Gallant, W.F. Broekaert, L. Quillien, and D. Marion. 1998. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTP1e1) of

- Triticum aestivum seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Science*. 138:121-135.
12. Mattei, C., K. Elmorjani, J. Molgo, D. Marion, and E. Benoit. 1998. The wheat proteins puroindoline-a and [α]1 purothionin induce nodal swelling in myelinated axons. *NeuroReport*. 9:3803-3803.
 13. Dubreil, L., J.-P. Compoin, and D. Marion. 1997. Interaction of puroindolines with wheat flour polar lipids determines their foaming properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45:108-116.

ANNEXES

| | |
|---|-----|
| Annexe 1 : composition des tampons et des gels utilisés pour la purification des puroidolines..... | 197 |
| Annexe 2 : procédures expérimentales relatives au chapitre 4..... | 199 |
| Annexe 3 : mesures d'ellipsométrie sur des solutions de saccharose..... | 205 |
| Annexe 4 : mesure du coefficient d'absorption des protéines..... | 207 |
| Annexe 5 : procédures expérimentales relatives au chapitre 5..... | 209 |
| Annexe 6 : procédures expérimentales relatives au chapitre 6..... | 213 |

Annexe 1 : composition des tampons et des gels utilisés pour la purification des puroidolines

EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acid

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate [$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_3^- ; \text{Na}^+$]

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

TEMED : N, N, N, N'-tetramethyl-ethylenediamine

TFA : acide TriFluoroAcétique

TRIS : Tris(hydroxymethyl)methylamine [$\text{H}_2\text{NC(CHOH)}_3$]

1) Composition du tampon de solubilisation pour l'électrophorèse SDS-PAGE

| | |
|------------------------------|--------|
| Tris | 0.757g |
| SDS | 2g |
| H ₂ O | 85mL |
| Ajuster pH à 6.8 avec HCl 6N | |
| Glycérol | 10mL |
| Bleu de bromophénol | 7mg |
| H ₂ O | 100mL |

2) Composition des gels de concentration et de séparation utilisés pour l'électrophorèse

| Composition | Gel de concentration 6% | Gel de séparation 15% |
|--|-------------------------|-----------------------|
| Protogel* 30% | 2 mL | 8 mL |
| TRIS 0.5M pH = 6.8 (6.06g dans 100mL) | 1.32 mL | 3.6 mL |
| SDS 10% (5g dans 50 mL) | 110 µL | 160 µL |
| H ₂ O | 6.46 mL | 4.13 mL |
| TEMED | 12 µL | 12 µL |
| Persulfate d'ammonium 10% 100mg dans 1mL H ₂ O | 100 µL | 100 µL |

* Protogel : 30% acrylamide, 0.8% N, N' méthylène bisacrylamide.

3) Composition du tampon de migration

| | |
|------------------|--------|
| Tris 25 mM | 9 g |
| SDS 0.1% | 3 g |
| Glycine 192 mM | 43.2 g |
| H ₂ O | 3 L |

4) Composition des solutions colorante et décolorante

| | Solution colorante | Solution décolorante |
|--------------------------------|--------------------|----------------------|
| Bleu de coomassie (R250 serva) | 400 mg | - |
| MeOH | 100 mL | 400 mL |
| H ₂ O | 100 mL | 400 mL |
| Acide acétique | 20 mL | 80 mL |

Annexe 2 : procédures expérimentales relatives au chapitre 4

I – Etude des monocouches lipidiques aux interfaces liquide/air et solide/air

Pour toutes les expériences présentées dans cette première partie, la sous-phase est une solution aqueuse de NaCl à 0.1 M. La température est maintenue à 19.0 ± 0.5 °C tandis que le papier filtre utilisé pour la mesure de la tension de surface est changé avant chaque expérience (des molécules peuvent s'adsorber sur le papier et être relarguées dans la sous-phase à l'expérience suivante).

Les solutions de galactolipides sont préparées à une concentration de 1.10^{-3} mol/L à partir des solutions mères obtenues après purification. Le solvant utilisé pour réaliser les solutions lipidiques est un mélange de chloroforme/méthanol (2:1 v/v).

Les solutions lipidiques sont déposées à l'interface à l'aide de différentes micro-seringues de volumes variables. A la fin des expériences, les molécules à l'interface sont aspirées grâce à une trompe à eau munie d'un embout plastique. La cuve est ensuite vidée complètement et nettoyée avec du chloroforme. Des cycles de rinçage à l'eau et compression des barrières permettent de se débarrasser des impuretés. La propreté est jugée acceptable lorsque la pression de surface n'excède pas 0.2 mN/m (incertitude de la mesure) à la fin de la compression sur de l'eau pure.

I.1 – Isothermes de compression

Les isothermes de compression ont été réalisées sur une cuve de Langmuir de dimensions (70×10 cm²) remplie avec 425 mL de sous-phase. Les lipides sont déposés à l'interface sur une aire d'environ 700 cm². En moyenne, on utilise $\sim 3.10^{-8}$ mole de matière, ce qui revient à déposer environ 30 µL de solution lipidique. Après le dépôt, 10 minutes d'attente permettent d'évaporer le solvant. On comprime alors les molécules à l'aide des deux barrières mobiles réglées à une vitesse de 20 cm²/min et on enregistre simultanément la pression de surface. Dans ces conditions, l'acquisition d'une isotherme dure une trentaine de minutes.

I.2 – Ellipsométrie et microscopie à l'angle de Brewster (BAM)

Les mesures ellipsométriques et de microscopie à l'angle de Brewster ont été réalisées sur une cuve de Langmuir de dimensions (10×7 cm²) munie d'une seule barrière et remplie avec 65 mL de sous-phase. Afin d'éviter les réflexions parasites du faisceau laser sur la cuve en Téflon, un verre fritté noir, sur lequel le faisceau est réfléchi, est placé au fond de la cuve.

Avant de commencer l'expérience d'ellipsométrie, on vérifie la propreté de l'interface en mesurant pendant 10 minutes l'évolution de l'angle de l'analyseur. Une propreté acceptable correspond à des déviations maximales de l'ordre de $\pm 0.2^\circ$. Les lipides sont ensuite étalés à l'interface puis comprimés à une vitesse de 2 cm²/min. On enregistre alors l'évolution des angles ellipsométriques delta et psi en fonction de l'aire moléculaire moyenne.

Pour les images Brewster, une certaine quantité de lipides est déposée à l'interface de façon à ce que la pression de surface ne dépasse pas 0 mN/m (état gaz), puis on comprime les lipides à une vitesse de 2 cm²/min.

I.3 – Spectroscopie PM-IRRAS

Le montage dont nous avons disposé permet une mesure *in situ*, directement sur la cuve de Langmuir de dimensions (10 × 7 cm²) (figure 3.13). Les lipides sont épanchés à la surface puis comprimés, après l'évaporation du solvant (~ 10 minutes), à une vitesse de 2 cm²/min à l'aide d'une seule barrière. Durant la mesure, les films lipidiques sont maintenus à une pression de surface relativement forte, 35 mN/m, pour obtenir un signal suffisamment important. Les spectres ont une résolution spectrale de 8 cm⁻¹ obtenue en co-ajoutant 600 spectres (cela correspond à un temps d'acquisition de 10 minutes environ). Les spectres que l'on présente sont le résultat de la soustraction du spectre de la sous-phase au spectre expérimental. Il faut ensuite travailler la ligne de base du spectre différence (logiciel : Omnic) et finalement, on lisse le spectre afin de minimiser le bruit de fond (logiciel : Kaleidagraph).

I.4 – Microscopie à force atomique (AFM)

Les prélèvements de Langmuir-Blodgett ont été réalisés sur une cuve de Langmuir de dimensions (70 × 10 cm²). Pour cela, un morceau de mica fraîchement clivé maintenu par la pince de prélèvement est plongé dans la sous-phase, dans le trou placé au centre de la cuve. Les lipides sont ensuite déposés à l'interface et comprimés à 15 et 35 mN/m. Après stabilisation de la monocouche lipidique à la pression de surface désirée, le morceau de mica est remonté à la vitesse de 1 mm/min en se plaçant dans le mode « Target Pressure » qui permet de maintenir la pression de surface constante durant le prélèvement. La perte de matière à l'interface est compensée par une diminution de l'aire entre les barrières. On peut juger de la qualité du prélèvement en calculant le taux de transfert qui correspond au rapport de la différence d'aire de la cuve entre le début et la fin du prélèvement sur l'aire du mica multipliée par deux (le prélèvement est réalisé sur les 2 faces du substrat). Plus le taux de transfert sera proche de 1, plus le film sera homogène sur le substrat. Pour tous les

échantillons présentés ici, le taux de transfert était proche de 0.9 témoignant d'une bonne qualité de transfert des molécules sur le substrat.

I.5 – Rhéologie de surface

Avant chaque expérience, on enregistre un spectre sur la sous-phase en fréquence variable afin de s'assurer que le montage est correctement réglé. Puis, les lipides sont déposés à l'interface par ajouts successifs de matière jusqu'à une pression de surface de 35 mN/m (mesurée grâce à un tensiomètre). Lorsque le film est stabilisé, le tensiomètre est enlevé et la cuve est recouverte d'un capot pour éviter les déstabilisations dues aux mouvements d'air dans la pièce. Les courbes des lipides sont enregistrées à fréquence variable.

II – Etude des mésophases liquide-cristallines en milieu aqueux

II.1 – Diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS)

Les mesures de diffraction des rayons X aux petits angles (SAXS, Small Angle X-ray Diffraction) ont permis d'identifier les mésophases liquide-cristallines adoptées par les galactolipides en milieu aqueux. Pour cela, les échantillons (1 mg de lipide hydraté avec 200 μ L d'eau) ont été déposés dans des capillaires en verre de diamètre calibré ($1.4 < \phi < 1.5$ mm, Müller) scellés avec de la paraffine.

Les expériences ont été menées sur les lignes haute brillance ID2A de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France) et D43 de LURE (Laboratoire pour l'Utilisation du Rayonnement Electromagnétique, Orsay, France). Sur ID2A [1], la distance échantillon/détecteur appliquée pour les mesures SAXS était de 1.4 m. Les profils de diffraction ont été détectés et enregistrés via une caméra CCD (Chip Charge-coupled Device) pour des distances réciproques q variant de 0.02 à 0.5 \AA^{-1} . Sur la ligne D43, un faisceau de rayons X focalisé monochromatique (1.45 \AA) sélectionné par un cristal de germanium parabolique (111) a été utilisé. Le faisceau était défini par un collimateur de 500 mm.

Les profils de diffraction X sont enregistrés pour des temps d'exposition variant de 30 à 50 minutes en utilisant une plaque de dimensions (15×20 cm²) numérisée pour l'analyse [2]. Deux distances échantillon/détecteur (140 et 268 mm) ont été utilisées pour déterminer soit l'organisation supra-moléculaire des systèmes lipide/eau soit la fluidité des chaînes. Sur les deux lignes, le même échangeur d'échantillons a été utilisé. Il peut contenir jusqu'à sept échantillons simultanément et est thermostaté par ordinateur à $20^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ [3].

Les longueurs de diffraction ont été calibrées grâce à un cristal de bécénate d'argent ($d = 58.380$ \AA). Tous les échantillons présentent des profils de diffraction de poudre et les

intensités de diffraction ont été déterminées par intégration circulaire en fonction du vecteur d'onde radial, c'est-à-dire : $q = (4\pi/\lambda) \times \sin(\theta)$ [4].

II.2 – Microscopie à l'angle de Brewster au-delà du collapse

Nous avons déposé une quantité de matière importante à l'interface de façon à ce que la pression de surface de départ soit proche de 45 mN/m, puis les lipides ont été comprimés à une vitesse de 20 cm²/min. Au fur et à mesure que le niveau de gris augmente, il faut diminuer la vitesse d'obturation, i.e le temps d'exposition, pour ne pas saturer la caméra. Les expériences ont été réalisées à $19.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

II.3 – Spectroscopies Raman et infrarouge (FT-IR)

Les spectres Raman des dispersions de galactolipides dans D₂O contenus dans des capillaires (5% w/v) ont été enregistrés à $20.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ en utilisant le montage décrit à la figure 3.20. Ils ont été obtenus par l'acquisition de 40 spectres avec un temps d'intégration de 20 secondes chacun. Le faisceau laser est réglé à 100 mW et focalisé avec un objectif 10× (0.25 NA-Olympus) ce qui génère une intensité d'environ 20 mW sur l'échantillon. Le trou confocal et les fentes d'entrées du monochromateur sont fixées à 300 et 100 μm respectivement. En utilisant un réseau holographie de 600 lignes/mm, on collecte des fenêtres spectrales de 2000 cm⁻¹ via un détecteur CCD refroidi par effet Peltier. Les spectres sont corrigés avec logiciel GRAMS (ligne de base), ils sont lissés avec 5 ou 9 points et corrigés de la fluorescence par une ligne de base polynomiale.

Les mesures infrarouge à transformée de Fourier ont été réalisées sur les lipides hydratés dans H₂O (4 % w/v). Expérimentalement, les lipides sont déposés à la surface du cristal ATR de germanium disposé à l'horizontale. Après l'évaporation du solvant (10 minutes), les lipides sont hydratés avec H₂O. On recouvre la dispersion obtenue d'un capuchon spécial pour éviter l'évaporation de l'eau due à la purge du spectromètre. Un total de 400 spectres avec une résolution de 4 cm⁻¹ est suffisant pour atteindre un bon rapport signal/bruit. La ligne de base des spectres est corrigée avec le logiciel GRAMS.

1. Narayanan, T., O. Diat, and P. Bösecke. 2001. SAXS and USAXS on the high brilliance beamline at the ESRF. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. 467-468:1005-1009.
2. Hauet, N., F. Artzner, F. Bouchery, C. Grabielle-Madelmont, I. Cloutiery, G. Keller, P. Lesieur, D. Durand, and M. Paternostre. 2003. Interaction between artificial

- membranes and enflurane, a general volatile anesthetic: DPPC-enflurane interaction. *Biophysical Journal*. 84:3123-3137.
3. Valéry, C., M. Paternostre, B. Robert, T. Gulik-Krzywicki, T. Narayanan, J.-C. Dedieu, G. Keller, M.-L. Torres, R. Cherif-Cheikh, P. Calvo, and F. Artzner. 2003. Biomimetic organization: Octapeptide self-assembly into nanotubes of viral capsid-like dimension. *PNAS*. 100:10258-10262.
 4. Zantl, R. 2001. Flüssigkristalle aus DNA und kationischen lipidmembranen. *Ph.D. Thesis. Technische Universität, Munich. Germany.*

Annexe 3 : mesures d'ellipsométrie sur des solutions de saccharose

Les expériences d'ellipsométrie sur des solutions de saccharose ont été réalisées dans le but d'observer la dépendance des angles Δ et Ψ en fonction de l'indice de réfraction. Les mesures ont été réalisées sur des solutions à différentes concentrations dont les indices ont été mesurés grâce à un réfractomètre et en accord avec la littérature [1]. Nous présentons à la figure 1.A les variations des angles Δ et Ψ en fonction de l'indice de réfraction et nous reportons dans le tableau 1 les variations des angles ellipsométriques Ψ et Δ au cours de la compression des galactolipides, d'après la figure 1.B.

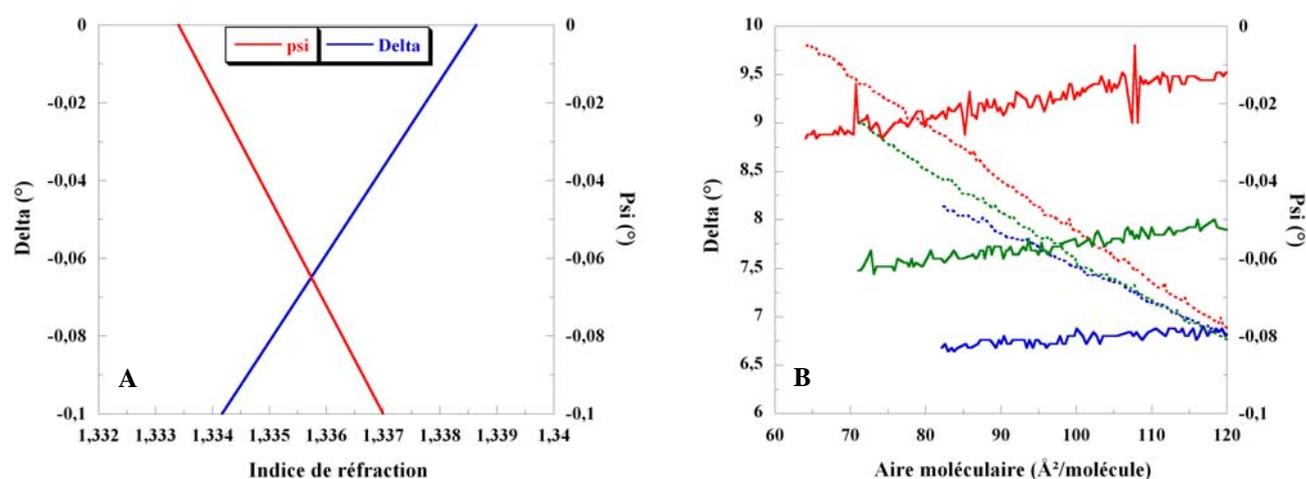


Figure 1 : A : évolution des angles Δ et Ψ en fonction de l'indice de réfraction d'une solution de saccharose.

B : évolution des angles ellipsométriques Δ (trait pointillé) et Ψ (trait plein) en fonction de l'aire moléculaire moyenne pour le MGDG (bleu), le DGDG (rouge) et le mélange équimolaire (vert).

| | Variation de Ψ | Variation de Δ |
|---------------------|---------------------|-----------------------|
| MGDG | -0.0083 | 2.5 |
| DGDG | -0.0193 | 3.7 |
| mélange équimolaire | -0.0139 | 2.7 |

Tableau 1 : variations des angles Ψ et Δ entre le début et la fin de la compression des lipides

D'après les variations de Ψ au cours la compression (figure 1.B) qui sont de l'ordre de 10^{-3} , on peut remonter, en s'appuyant sur la figure 1.A, aux variations de l'angle Δ correspondantes qui sont au maximum de l'ordre de 0.02° . Nous avons mesuré pour les galactolipides des variations de Δ de 2.5 à 3.7° , au minimum cent fois plus grandes. Nous en concluons alors que la forte variation de l'angle Δ observée lors de la compression des galactolipides est surtout dépendante de la variation d'épaisseur et très peu de la variation d'indice de réfraction.

1. Weast, R.C. and M.J. Astle. 1966. Handbook of Chemistry and Physics, 43^{ème} édition. *CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.*3027-3028.

Annexe 4 : mesure du coefficient d'absorption des protéines

Pour préparer les solutions de protéine, on dilue 0.5 à 1 mg de matière dans 1 mL de sous-phase. Ces très faibles masses sont difficiles à peser avec précision. La détermination du coefficient molaire d'absorption ϵ ($\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de la solution fraîchement préparée à 280 nm permet de remonter à la concentration exacte de la solution de protéine ; les droites obtenues pour pin-a et pin-b sont présentées à la figure 2.

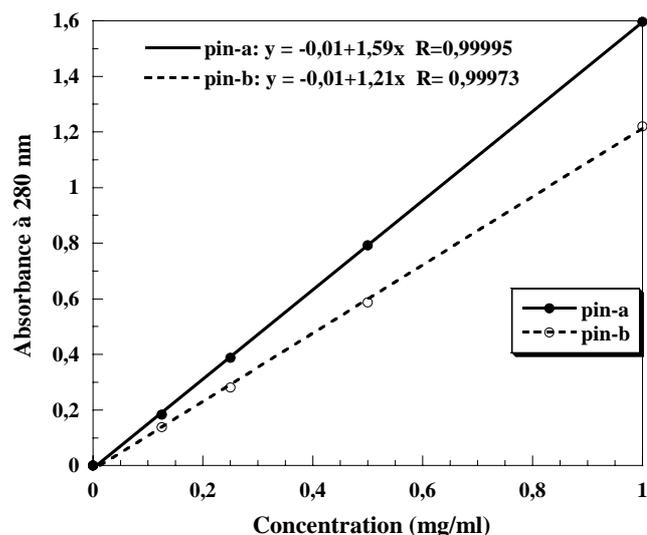


Figure 2 : détermination de la concentration des solutions protéiques en fonction de l'absorbance à 280 nm.

Le coefficient d'absorption molaire correspond à la pente de la droite obtenue. Nous trouvons : $\epsilon_a = 1.59$ et $\epsilon_b = 1.21 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour pin-a et pin-b, respectivement.

Annexe 5 : procédures expérimentales relatives au chapitre 5**I – Etude aux interfaces liquide/air et solide/air**

Pour les expériences présentées dans cette partie, la sous-phase utilisée est une solution aqueuse de NaCl concentrée à 0.1 M et la température est maintenue à $19^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ tandis que le papier filtre utilisé pour la mesure de la tension de surface est changé avant chaque expérience.

Les solutions protéiques sont déposées à l'interface à l'aide de différentes micro-seringues de volumes variables. A la fin des expériences, les molécules à l'interface sont aspirées grâce à une trompe à eau munie d'un embout plastique. La cuve est ensuite vidée complètement et nettoyée avec une solution de détergent. Des cycles de rinçage à l'eau et compression des barrières permettent de se débarrasser des impuretés. La propreté est jugée acceptable lorsque la pression de surface n'excède pas 0.2 mN/m (incertitude de la mesure) à la fin de la compression sur de l'eau pure.

I.1 – Adsorption des protéines à l'interface liquide/air: suivi par tensiométrie et ellipsométrie

Pour ces expériences, nous avons utilisé une petite cuve circulaire en Téflon remplie avec 8 mL de sous-phase. La lame de Wilhelmy (papier filtre) permettant les mesures de tensiométrie est plongée dans la sous-phase et la pression de surface est réglée à 0 mN/m. Avant de commencer l'expérience, on vérifie la propreté de l'interface en mesurant pendant 10 minutes l'évolution de l'angle de l'analyseur. Une propreté acceptable correspond à des déviations maximales de l'ordre de $\pm 0.2^{\circ}$. La solution de protéine est ensuite injectée dans la sous-phase avec une micro-seringue à travers un petit trou dans la paroi de la cuve. Les variations de la pression de surface π et de l'angle ellipsométrique Δ sont enregistrées en fonction du temps.

I.2 – Dépôt des protéines à la surface : isothermes et ellipsométrie

Pour réaliser les isothermes de compression, nous avons travaillé sur la cuve de Langmuir de dimensions ($70 \times 10 \text{ cm}^2$) remplie avec 425 mL de sous-phase. On dépose des quantités de matière de l'ordre de 10^{-9} mole à l'interface par petites gouttes pour éviter la formation d'agrégats à la surface puis les molécules sont comprimées à une vitesse de 20 cm^2/min .

Les expériences d'ellipsométrie ont été réalisées sur une cuve de Langmuir plus petite munie d'une seule barrière de dimensions ($7 \times 10 \text{ cm}^2$) remplie avec 65 mL de sous-phase. Avant de commencer l'expérience, on vérifie la propreté de l'interface en mesurant pendant 10 minutes l'évolution de l'angle de l'analyseur. Une propreté acceptable correspond à des déviations maximales de l'ordre de $\pm 0.2^\circ$. Les molécules protéiques sont ensuite étalées à l'interface et comprimées à une vitesse de $2 \text{ cm}^2/\text{min}$.

I.3 – Morphologie des films de protéines à différentes échelles

I.3.1 – Microscopie à l'angle de Brewster

Nous avons travaillé sur une cuve de Langmuir à une seule barrière de dimensions ($70 \times 10 \text{ cm}^2$). Dans un premier temps, la protéine est injectée en sous-phase à une concentration de 8.10^{-8} mol/L . A la fin de la cinétique d'adsorption, lorsque la pression de surface n'augmente plus, les molécules adsorbées à l'interface sont comprimées à une vitesse de $2 \text{ cm}^2/\text{min}$.

I.3.2 – Microscopie à force atomique

Nous avons travaillé sur la cuve de Langmuir ($10 \times 70 \text{ cm}^2$). Le film de protéine est formé par dépôt des molécules à l'interface liquide/air puis compression à différentes pressions de surface. Une fois la couche de protéines stabilisée à une pression de surface constante, un morceau de mica fraîchement clivé est plongé à travers l'interface dans le trou situé au milieu de la cuve à une vitesse de $1 \text{ mm}/\text{min}$. Si le mica est plongé avant la formation du film, les protéines risquent de s'accrocher au substrat. Une fois le mica entièrement plongé dans la sous-phase, on le remonte à une vitesse de $1 \text{ mm}/\text{min}$ en mode « Target Pressure » pour réaliser le prélèvement à pression constante.

I.4 – Spectroscopie PM-IRRAS

Nous avons utilisé une cuve de Langmuir à une barrière de dimensions ($7 \times 10 \text{ cm}^2$). Les solutions de protéines sont déposées à l'interface à l'aide d'une micro-seringue puis les molécules sont comprimées à la pression de surface voulue à une vitesse de $2 \text{ cm}^2/\text{min}$. Les spectres ont une résolution spectrale de 8 cm^{-1} obtenue en co-ajoutant 600 spectres (temps d'acquisition de 10 minutes environ). Les spectres que l'on présente sont le résultat de la soustraction du spectre de la sous-phase au spectre expérimental. Il faut ensuite travailler la ligne de base du spectre différence (logiciel : Omnic) et finalement, on lisse le spectre afin de diminuer un peu le bruit de fond (logiciel : Kaleidagraph).

II – Etude en dispersion aqueuse

II.1 – Spectroscopie Raman

Les spectres Raman des solutions protéiques dans D₂O (5% w/v) contenues dans des capillaires ont été enregistrés à $20.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ en utilisant le montage décrit à la figure 3.20. Ils ont été obtenus par l'acquisition de 40 spectres avec un temps d'intégration de 20 secondes chacun. Le faisceau laser est réglé à 250 mW et focalisé avec un objectif $10 \times$ (0.25 NA-Olympus) ce qui génère une intensité d'environ 20 mW sur l'échantillon. Le trou confocal et les fentes d'entrée du monochromateur sont fixées à 300 et 100 μm respectivement. En utilisant un réseau holographique de 600 lignes/mm, on collecte des fenêtres spectrales de 2000 cm^{-1} via un détecteur CCD refroidi par effet Peltier. Les spectres sont corrigés avec logiciel GRAMS (ligne de base), ils sont lissés avec 5 ou 9 points et corrigés de la fluorescence par une ligne de base polynomiale.

II.2 – Diffusion des rayons X aux petits angles sur une solution de pin-a

La solution de protéine (10% w/v) est introduite dans un capillaire en verre de diamètre $\sim 1.6 \text{ mm}$ scellé avec de la paraffine. Les expériences ont été menées sur la ligne SAXS de l'ENSCR à Rennes à température ambiante. La distance échantillon/détecteur appliquée pour les mesures est de 742 mm. Les profils de diffusion sont détectés et enregistrés via une « image plate » circulaire de dimension 34.5 cm^2 pour des distances réciproques q variant de 0.02 à 0.5 \AA^{-1} et pour des temps d'exposition de 1800 s. Le faisceau de rayons X focalisé monochromatique (1.54 \AA) est défini par deux fentes séparées de 220 mm et ouvertes de $500 \mu\text{m}$.

Annexe 6 : procédures expérimentales relatives au chapitre 6

I – Etude aux interfaces liquide/air et solide/air

Pour les expériences présentées dans cette partie, la sous-phase utilisée est une solution aqueuse de NaCl à 0.1 M. Les lipides MGDG et DGDG sont dilués dans un mélange de chloroforme/méthanol (v/v 2:1). Les solutions protéiques sont préparées à partir de 1 mg de poudre de protéine diluée dans 1 mL de sous-phase puis la concentration est vérifiée par une mesure de densité optique (annexe 4). Les solutions de protéines sont conservées jusqu'à une semaine après leur préparation. Les expériences sont réalisées à $T = 19.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

I.1 – Mesure de tensiométrie lors de l'adsorption des pueroindolines dans des monocouches de galactolipides

La cuve de Langmuir (10×70) cm^2 est remplie avec 425 mL de sous-phase puis les lipides sont déposés à l'interface liquide/air. Après 10 minutes permettant l'évaporation du solvant, les lipides sont comprimés à l'aide des barrières mobiles à une vitesse de $20 \text{ cm}^2/\text{min}$. Après stabilisation du film lipidique à la pression de surface désirée, la solution de protéine est injectée juste sous la monocouche grâce à une micro-seringue puis on enregistre la cinétique d'adsorption. La micro-seringue est équipée d'une longue aiguille permettant de répartir de façon homogène les molécules protéiques entre les barrières. Nous avons choisi de travailler à une concentration de protéine valant 7.10^{-8} mol/L . Pour conserver cette concentration constante à chaque expérience, il faut ajuster le volume de protéine injecté en fonction de l'aire accessible entre les barrières lorsque la monocouche lipidique est stabilisée. La profondeur de la cuve de Langmuir est de 0.5 cm à laquelle il faut ajouter la hauteur du ménisque lorsque la cuve est remplie. D'après le volume de sous-phase dans la cuve, le ménisque est estimé à 0.1 cm. Le volume de protéine à injecter dans la cuve est donc défini de la façon suivante :

$$V_{\text{prot}} (\text{L}) = [\text{aire entre les barrières} (\text{cm}^2) \times 0.6 (\text{cm}) \times 10^{-3} \times C_{\text{travail}} (\text{mol/L})] / C_{\text{mère}} (\text{mol/L})$$

où C_{travail} a été choisie précédemment à 7.10^{-8} mol/L et $C_{\text{mère}}$ est la concentration de la solution de protéine utilisée, soit 1 mg/mL. Pour pin-a, $C_{\text{mère}} (\text{mol/L}) = 1/12750 = 7.85.10^{-5}$ et pour pin-b, $C_{\text{mère}} (\text{mol/L}) = 1/13082 = 7.65.10^{-5}$. Les volumes de solution protéique injectés sont de l'ordre de plusieurs dizaines de μL .

I.2 – Rhéologie de surface sur des films mixtes à l'interface air/liquide

Ces expériences ont été menées sur une petite cuve ronde en Téflon de diamètre 4 cm remplie avec 8 mL de sous-phase. Le flotteur est placé sur la surface du liquide. Le film lipidique est ensuite formé à l'interface par dépôt successifs des molécules avec une micro-seringue. Lorsque l'on atteint la pression de travail, 20 mN/m, le tensiomètre est enlevé puis la protéine est injectée en sous-phase à une concentration de $7 \cdot 10^{-8}$ mol/L. La cuve est recouverte d'un capot pour éviter les mouvements d'air et on commence la mesure.

I.3 – Morphologie des films mixtes puroindoline/galactolipide

I.3.1 – Suivi des cinétiques d'adsorption par ellipsométrie et Brewster (BAM)

Ces expériences ont été menées sur une cuve de Langmuir de dimensions (7×10 cm²) remplie avec 65 mL de sous-phase. Au départ, l'angle ellipsométrique est réglé à zéro sur la sous-phase et le niveau de gris est réglé au minimum (image noire). On forme le film lipidique à l'interface liquide/air par dépôt des molécules puis compression à la pression de surface désirée, 20 mN/m. Après stabilisation de la monocouche, la pin-a est injectée en sous-phase à une concentration de $7 \cdot 10^{-8}$ mol/L. On enregistre les variations de l'angle ellipsométrique Δ au cours de l'adsorption des protéines dans le film lipidique et on réalise des images Brewster à différents stades de l'adsorption.

I.3.2 – Observation par AFM des films mixtes de Langmuir-Blodgett

Ces expériences ont été réalisées sur une cuve de Langmuir de dimensions (7×10 cm²) remplie avec 65 mL de sous-phase. Les lipides sont étalés à l'interface liquide/air puis 10 minutes d'attente sont nécessaires pour évaporer le solvant. On comprime les lipides à une vitesse de 20 cm²/min jusqu'à une pression de surface de 20 mN/m. Lorsque la monocouche est stabilisée à cette pression de surface, les puroindolines sont injectées à une concentration de $7 \cdot 10^{-8}$ mol/L. Les molécules s'adsorbent dans le film jusqu'à atteindre un maximum de pression de surface puis celle-ci diminue jusqu'à redevenir constante (fin de la relaxation). On réalise alors le prélèvement de Langmuir-Blodgett en plongeant un morceau de mica fraîchement clivé à travers l'interface puis en le remontant à une vitesse de 1 mm/min. Les prélèvements ainsi réalisés sont placés dans un dessiccateur pendant 2 à 3 jours avant de les observer par AFM.

I.4 – Mesures de PM-IRRAS sur des films mixtes déposés à l’interface

Ces expériences ont été réalisées sur une cuve de Langmuir de dimensions (7×10 cm²) remplie avec 65 mL de sous-phase et munie d’une seule barrière. Le mode opératoire a été le suivant : la solution de lipides est étalée à l’interface puis on attend 10 minutes pour laisser le solvant s’évaporer. La monocouche de lipides préalablement formée est dans la phase liquide expansé afin que les protéines puissent s’insérer dans la monocouche. La solution de protéines est ensuite déposée sur le film de lipides de façon à obtenir un rapport lipides/protéines égal à 20. Le film mixte est alors comprimé jusqu’à une pression de surface légèrement inférieure à la pression de surface du plateau π_p de chaque isoforme (soit 11 mN/m pour pin-a et 9 mN/m pour pin-b) afin d’éviter de former des surépaisseurs à la surface.

Les spectres PM-IRRAS ont une résolution spectrale de 8 cm^{-1} obtenue en co-ajoutant 600 spectres (cela correspond à un temps d’acquisition de 10 minutes environ). Les spectres que l’on présente sont le résultat de la soustraction du spectre de la sous-phase au spectre expérimental. Il faut ensuite travailler la ligne de base du spectre différence (logiciel : Omnic) et finalement, on lisse le spectre afin de diminuer un peu le bruit de fond (logiciel : Kaleidagraph).

I.5 – Isothermes réalisées sur des films mixtes déposés à l’interface

Ces expériences ont été réalisées sur une cuve de Langmuir de dimensions (70×10 cm²) remplie avec 425 mL de sous-phase. Les lipides sont étalés à l’interface puis on laisse le solvant s’évaporer pendant dix minutes. Les protéines sont ensuite déposées à l’interface en appliquant différents rapports lipide/protéine et on comprime le mélange à une vitesse de 20 cm²/min. On enregistre alors les variations de la pression de surface et de l’aire entre les barrières.

II – Etude en solution des systèmes pin-a/galactolipide

II.1 – Spectroscopie Raman

Les spectres Raman des dispersions lipide/protéine dans D₂O contenues dans des capillaires (5% w/v) ont été enregistrés à $20.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ en utilisant le montage décrit à la figure 3.20. Pour préparer la dispersion du mélange, le solvant des lipides est évaporé puis on les hydrate avec la solution de pin-a. Le rapport molaire lipide/protéine est de 20. Le faisceau laser réglé à 250 mW est focalisé avec un objectif 10× (0.25 NA-Olympus) sur l’échantillon. Le trou confocal et les fentes d’entrée du monochromateur sont fixés à 300 et 100 μm ,

respectivement. Le réseau holographie utilisé est de 600 lignes/mm. Les spectres sont obtenus par 40 acquisitions de 20 secondes chacune.

II.2 – Diffusion des rayons X aux petits angles

Pour préparer la dispersion du mélange, on évapore le solvant des lipides puis on les hydrate avec la solution de pin-a. Le rapport molaire lipide/protéine est de 20. La solution ainsi obtenue (10% w/v) est introduite dans un capillaire en verre de diamètre ~ 1.6 mm scellé avec de la paraffine. Les expériences ont été menées sur la ligne SAXS de l'ENSCR à Rennes à température ambiante. La distance échantillon/détecteur appliquée pour les mesures est de 742 mm. Les profils de diffusion sont détectés et enregistrés via une « image plate » circulaire de dimension 34.5 cm^2 pour des distances réciproques q variant de 0.02 à 0.5 \AA^{-1} et pour des temps d'exposition de 1800 s. Le faisceau de rayons X focalisé monochromatique (1.54 \AA) est défini par deux fentes séparées de 220 mm et ouvertes de $500 \text{ }\mu\text{m}$.

II.3 – Microscopie à l'angle de Brewster au-delà du collapse

Ces expériences ont été réalisées à Bordeaux. Nous avons déposé une quantité de matière importante à l'interface de façon à ce que la pression de surface de départ soit proche de 35 mN/m . Les lipides sont déposés en premier, puis le solvant est évaporé pendant 10 minutes. On dépose ensuite la solution de pin-a en ajustant le rapport molaire à 180. Les molécules sont alors comprimées à une vitesse de $20 \text{ cm}^2/\text{min}$. Au fur et à mesure que le niveau de gris augmente, il faut diminuer la vitesse d'obturation, i.e le temps d'exposition, pour ne pas saturer la caméra. Les expériences ont été réalisées à $19.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

Caractérisation des puroindolines, des galactolipides du blé et de leurs interactions : mesures physiques aux interfaces

Résumé : Les puroindolines (isoformes a et b) sont des protéines extraites du grain de blé et dont la structure est stabilisée par cinq ponts disulfure. La pin-a possède un domaine unique riche en tryptophane (WRWWKWWK) qui est tronqué dans le cas de la pin-b (WPTKWWK). Les deux galactolipides majeurs de l'endosperme du blé, MGDG et DGDG, ont été extraits et purifiés. Les études ont été réalisées à l'interface liquide/air et en dispersion aqueuse grâce à des techniques appropriées : tensiométrie, ellipsométrie, microscopies à l'angle de Brewster et à force atomique, techniques spectroscopiques (PM-IRRAS, Raman, ATR), et diffraction des rayons X. Les lipides ainsi que leur mélange équimolaire montrent des propriétés spécifiques attribuées aux fortes interactions entre les têtes polaires galactosyl. La pin-a et la pin-b présentent des propriétés similaires, en particulier une forte activité à l'interface. Finalement, l'étude des interactions protéine/lipide montre que la pin-a interagit plus fortement avec les galactolipides en formant des structures (réseaux) qui pourraient être à l'origine de la forte stabilité des mousses pin-a/lipide.

Mots-clés : Protéines végétales ; Glycolipides ; Langmuir-Blodgett, Couches de ; Spectroscopie infrarouge ; Microscopie à force atomique.

Characterisation of the puroindolines, the wheat galactolipids and their interactions : physical measures at the interfaces

Abstract : Puroindolines (isoforms a and b) are proteins isolated from wheat seed. Their structure is stabilized by five disulfide bridges. Pin-a has a unique tryptophan-rich domain (WRWWKWWK). This domain is truncated in pin-b (WPTKWWK). Both major galactolipids from wheat endosperm, MGDG and DGDG, were extracted and purified. The studies have been performed at the air/liquid interface and in aqueous dispersion thanks to suitable techniques: tensiometry, ellipsometry, Brewster angle and atomic force microscopies, spectroscopic techniques (PM-IRRAS, Raman, ATR) and X-ray diffraction. The lipids and their equimolar mixture display specific properties attributed to strong interactions between the galactosyl polar headgroups. Pin-a and pin-b present similar properties, particularly a strong activity at the interface. Finally, the study of the protein/lipid interactions shows that pin-a interacts more strongly with the galactolipids by forming structures (networks) which could be the cause of the high stability of the foams of pin-a/lipid.

Key-words : Plant proteins ; Glycolipids ; Thin films, Multilayered ; Infrared spectroscopy ; Atomic force microscopy.