



HAL
open science

Caractérisation de complexes protéiques : étude statique et dynamique d'association entre des protéines membranaires

Myriam Reffay

► **To cite this version:**

Myriam Reffay. Caractérisation de complexes protéiques : étude statique et dynamique d'association entre des protéines membranaires. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : . tel-00442387

HAL Id: tel-00442387

<https://theses.hal.science/tel-00442387>

Submitted on 21 Dec 2009

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI -
PIERRE ET MARIE CURIE



UFR de Physique

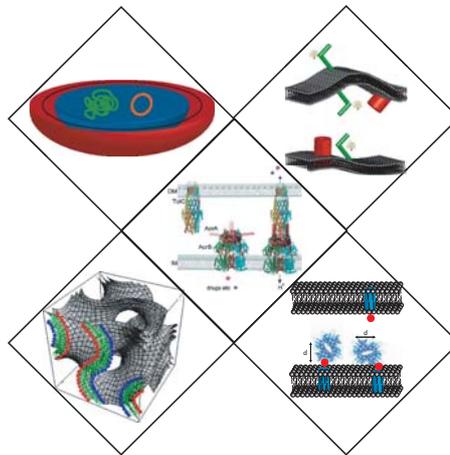
Spécialité :
Constituants Elémentaires et Systèmes Complexes

Présentée par :

Myriam REFFAY

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris VI

**Caractérisation de complexes protéiques :
Etude statique et dynamique d'associations
entre protéines membranaires.**



Soutenue le 18 Septembre 2007
devant le jury composé de :

Mme.	P. BASSEREAU	Rapporteur
M.	M. LE MAIRE	Rapporteur
M.	W. URBACH	Directeur de thèse
M.	D. COTE	Examineur
M.	P. LEVITZ	Examineur
Mme.	L. NAVAILLES	Examineur
M.	A. DUCRUIX	Invité

Remerciements

Un travail scientifique ne se fait jamais seul. Je suis donc heureuse d'avoir ici l'occasion de remercier tous ceux qui ont apporté leur contribution à ce projet.

En premier lieu, je remercie tous les membres de mon jury, notamment mes rapporteurs Marc LE MAIRE et Patricia BASSEREAU qui ont accepté de lire cette thèse alors que les vacances approchaient et ont su, par leurs commentaires, améliorer ce manuscrit. Je tiens à remercier les directeurs du Laboratoire de Physique Statistique Jacques Meunier puis Eric Perez ainsi que ceux du Laboratoire de RMN et Cristallographie Biologiques, Arnaud DUCRUIX et Frédéric DARDEL de m'avoir accueilli au sein de leurs unités.

Pendant ces trois années, j'ai eu la chance d'être heureuse de partir le matin travailler dans l'un ou l'autre des laboratoires qui ont hébergé mes expériences et ce pour deux raisons principales qui sont : d'une part le sujet de ma thèse qui m'a intéressée du premier au dernier jour et continue de m'intéresser encore (j'espère que je continuerai à participer à ce projet passionnant) et d'autre part, les ambiances exceptionnelles que j'ai rencontrées dans chacun de ces laboratoires.

Au Laboratoire de RMN et Cristallographie Biologiques, je tiens à témoigner toute ma gratitude à Arnaud DUCRUIX pour sa confiance, pour ces explications patientes à la non-biologiste que je suis, pour ces questions aussi qui ont permis la démarche que je décris ici sur la dynamique à deux dimensions. Un grand merci à Houssain BENABDELHAK qui m'a appris tout ce que je sais en biochimie et qui a été à l'initiative de ce projet. Travailler avec lui a été très enrichissant et très agréable. Je le considère vraiment comme un magicien, demandez lui une protéine et il vous la fait apparaître... Je remercie Gilles PHAN qui a commencé sa thèse avec moi. Nous avons réalisé beaucoup d'expériences en parallèle, cela aide à se sentir moins seule quand la purification d'une protéine se refuse. J'ai apprécié notre collaboration et notre amitié, je souhaite sincèrement qu'elles perdureront malgré la fin de la thèse. Je remercie aussi Philippe BENAS pour ses conseils et ses idées, Dimitri LEROUGE pour ses leçons de production de OprM et son humour, Xavier MOREEL pour ses cours de rattrapage en vocabulaire biochimique et ses photos du Canada, Isabelle BROUTIN pour ses conseils en interprétations de données cristallographiques, Frédérique MAURICE, Pierre BARRAUD, Marie-Bernard LASCOMBE, Luc PONCHON, Franck BRACHET, Stéphane RETY, Carine TISNE, Valery LARUE pour leur bonne humeur et l'ambiance qu'ils ont su donner au Laboratoire. Je les remercie pour leur gentillesse.

Je voudrais remercier tous ceux qui ont participé à cette aventure au Laboratoire de Physique Statistique. Tout d'abord, je remercie Wladimir URBACH, mon directeur de thèse, pour ce magnifique projet qu'il m'a laissé mener à bien selon mes intuitions. J'ai apprécié la confiance qu'il m'a témoigné. Grâce à lui j'ai appris le métier de chercheur. Je le remercie aussi pour nos discussions non scientifiques sur l'opéra, les spectacles, ... Je vais procéder pour n'oublier personne à un remerciement par ordre géographique. Si on pénètre dans le couloir du grand hall, on rencontre bien vite une porte souvent ouverte qui est le bureau GH28. J'ai passé de très bons moments dans ce bureau et quiconque a déjà contemplé la vue depuis cette pièce sait que le paysage n'y est pour rien. Christine GOURIER est l'âme de ce bureau, j'ai apprécié sa gentillesse, sa disponibilité de tous les

jours, ces délicieuses attentions culinaires et nos discussions botaniques. Eric PEREZ a aussi été très présent lors de ces trois ans, merci pour les sandwiches du midi et les cerises au printemps.

Pour continuer, je remercie le locataire du GH29 Frédéric PINCET pour ses idées, sa compétence scientifique qui ont ouvert de nombreuses nouvelles voies dans ce travail. Les résidants du GH30 sont les victimes suivantes de ma petite dénonciation. Je remercie Erol KURTISOVSKI avec lequel j'ai partagé mon bureau pendant un an et qui m'a tout appris en ce qui concerne les rayons X et les lois de dilution. Antoine JEGOU m'a encouragé dans mes expériences de Biomembrane Force Probe, je lui souhaite bon courage pour la suite. Je remercie Jean-Erik GUET pour sa gentillesse. Je remercie aussi Olivier MARNETTE pour les longues discussions que nous avons pu avoir, Feng LI pour sa compagnie lors des samedis de manip. Je salue bien sûr Yann GAMBIN pour son enthousiasme, Ricardo LOPEZ-ESPARZA pour sa présence au deuxième sous-sol et ses chansons mexicaines, Julien HUSSON pour ses explications sur le Biomembrane Force Probe. Je tiens aussi à remercier tous ceux qui ont fait l'ambiance du deuxième sous-sol comme Geoffroy GUENA, Ulysse DELARBRE, Alberto MOLINA, Clara MARTINEZ, ...

Je tiens aussi à dire un chaleureux Merci à tous ceux que j'ai ennuyés lors de ma thèse avec les questions les plus diverses, j'espère que je n'oublierai personne. David TARESTE m'a appris comment reconstituer des protéines en vésicules. Je lui souhaite de continuer à avoir d'aussi beaux résultats sur les SNARE. Je remercie aussi Faris ALAOUI (Physico-chimie Curie) pour ces conseils sur cette difficile étape de reconstitution de protéines. Nicolas TAULIER est arrivé lors de ma troisième année au Laboratoire d'Imagerie Paramétrique. Il m'a beaucoup apporté dans la rédaction du manuscrit. J'espère qu'il me tiendra au courant de l'évolution des expériences.

La compréhension des phases avec lesquelles nous travaillons a fait l'objet de nombreuses interrogations. Elles ont nécessité la collaboration de multiples personnes dont Raymond OBER au Collège de France, Laurence NAVAILLES et Frédéric NALLET au CRPP, Pierre LEVITZ au LPMC, Amir MALDONADO à l'Université de Sonora, Dominique LANGEVIN au Laboratoire de Physique du Solide, Jean-Marc VERBAVATZ au LPM ainsi que Frédéric MARCHAL et Patrick GUENOUN au LIONS. Je les remercie pour le temps qu'ils ont accepté de consacrer à cette étude, pour leur conseils et leurs idées.

Je voudrais aussi saluer Pierre SENS qui a accepté de travailler sur mes "ressorts membranaires".

Je conclurai en remerciant tous les personnels du Laboratoire de Physique Statistique que je n'ai pas manqué de solliciter pendant ces trois ans. Tout d'abord Mr et Mme GUERARD qui m'accueillaient chaque matin par un sourire. Je loue comme chacun l'efficacité des trois secrétaires du Laboratoire Nora, Marie et Annie. Je tiens à souligner l'adresse de José et d'Olivier qui parviennent toujours à réaliser tous les objets désirés et facilitent grandement les expériences grâce à leur savoir-faire. Je remercie les électroniciens et les électriciens qui ont su répondre à toutes mes demandes.

J'espère n'avoir oublié personne et encore un grand merci pour ces trois années d'intense travail scientifique et d'amitié. Cette thèse a été pour moi une formidable expérience.

Table des matières

Introduction	5
I Résistance aux antibiotiques : Pompes à efflux	15
I.1 L'efflux actif chez les bactéries à double membrane	16
I.1.1 Description d'une bactérie Gram négative : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
I.1.2 Structure d'une pompe à efflux	17
I.2 La protéine de la membrane interne MexB	19
I.2.1 Une protéine homologue chez <i>Escherichia coli</i> : AcrB	19
I.2.2 Caractérisation de MexB	22
I.3 La porine externe OprM	23
I.3.1 Structure de OprM	24
I.3.2 Une protéine analogue de <i>Escherichia coli</i> : TolC	25
I.4 La protéine périplasmique MexA	26
I.4.1 Structure de MexA	26
I.4.2 Oligomérisation de MexA	28
I.5 Fonctionnement de la pompe et questions en suspens	30
II Protéines : Expression et purification	33
II.1 Clonage	33
II.1.1 Vecteur de clonage	34
II.1.2 Construction d'un insert codant pour MexA _{signal}	35
II.1.3 Construction d'un vecteur de clonage	40
II.1.4 Sélection de clones	41
II.2 Préparation d'extraits protéiques chez <i>Escherichia coli</i>	43
II.2.1 Surexpression	43
II.2.2 Obtention d'extraits	44
II.2.3 Vérification de la surexpression	44
II.3 Purification d'une protéine soluble : MexA signal	46
II.3.1 Vérification de la solubilité	46
II.3.2 Préparation de la colonne d'affinité	47
II.3.3 Chargement et collection des protéines	47
II.3.4 Concentration	49
II.4 Purification d'une protéine membranaire : OprM	49
II.4.1 Récupération des membranes	50
II.4.2 Solubilisation	50

TABLE DES MATIÈRES

II.4.3	Séparation et concentration	50
II.5	Résultats obtenus	51
II.5.1	OprM	51
II.5.2	MexA variété native ou soluble	51
II.5.3	MexB	52
II.6	Marquage d'une protéine par la FITC <i>Fluorescéine Isothiocyanate</i>	54
II.6.1	La FITC	54
II.6.2	Marquage des protéines par la FITC : réaction de conjugaison	55
II.6.3	Purification des protéines marquées	55
II.7	Marquage des protéines par un maléimide-biotine	56
II.8	Bilan	57
III	Membranes fluides	59
III.1	Physique des membranes fluides	59
III.1.1	Structures amphiphiles	59
III.1.2	Description mécanique des membranes	61
III.2	Diagramme de phase	64
III.3	Etude des bicouches des phases lamellaires C12E5/ β -OG/ Solution S2	67
III.3.1	Description d'une phase lamellaire	67
III.3.2	Spectres de diffusion des phases lamellaires	68
III.3.3	Loi de dilution des phases lamellaires	70
III.3.4	Loi de dilution	72
III.3.5	Ecart à la loi de dilution	72
III.3.6	Etude de phases lamellaires gonflées avec du dodécane	73
III.4	Caractérisation de la phase éponge C12E5/ β OG/ solution S2	76
III.4.1	Composition des phases éponges	76
III.4.2	Spectre de diffusion d'une phase éponge	76
III.4.3	Cryofracture et microscopie électronique	77
III.4.4	Mesures de conductivité	81
III.4.5	Conclusion	86
III.5	Taille caractéristique de la phase éponge C12E5/ β -OG/S2	86
III.5.1	Loi de dilution d'une phase éponge	86
III.5.2	Etude de l'évolution de la période avec la fraction volumique de membrane	88
III.6	Conclusion	90
III.7	Caractérisation de la phase C12E5/ β -OG-DDM/S2	91
IV	Diffusion de protéines membranaires	95
IV.1	Modèle de Saffman-Delbrück	96
IV.1.1	Hypothèses	96
IV.1.2	Résultats d'une viscosité μ' non nulle	97
IV.1.3	Tests expérimentaux du modèle de Saffman-Delbrück ?	98
IV.2	Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment : FRAPP ou (Fluorescence Recovery After fringe Pattern Photobleaching)	101
IV.2.1	Description de la méthode	101

IV.2.2	Montage	104
IV.2.3	Mesure de coefficient de diffusion pour une espèce diffusante	107
IV.2.4	Mesure de coefficient de diffusion pour deux espèces	108
IV.3	Influence de la taille hydrophobe de l'objet	110
IV.3.1	Description des objets	111
IV.3.2	Loi de variation	112
IV.4	Influence du rayon de l'objet	114
IV.4.1	Description des objets	114
IV.4.2	Loi de variation	115
IV.4.3	Quelques remarques	118
IV.5	Implications de la relation inspirée de Stokes-Einstein	118
IV.5.1	Coefficient de diffusion dans des vésicules de SOPC	120
IV.5.2	Mesures de coefficient de diffusion dans une phase éponge	121
IV.5.3	Bilan	123
V	Interactions protéines-protéines	125
V.1	Principe	125
V.2	Détection d'une interaction forte par la méthode de recouvrement de fluorescence	127
V.2.1	Description d'un lien modèle : Streptavidine-biotine	127
V.2.2	Comportement en fonction de la concentration : mise en évidence d'une liaison latérale	129
V.2.3	Comportement en fonction de la distance d'approche : mise en évidence d'une liaison frontale	130
V.3	Mise en évidence d'interactions entre composants d'une pompe à efflux : MexA et OprM	132
V.3.1	Caractérisation des deux protéines MexA et OprM	132
V.3.2	Mise en évidence d'interactions entre MexA et OprM	133
V.4	Interactions mettant en jeu MexB	138
V.5	Détermination de la stœchiométrie d'une interaction	140
V.5.1	Principe	140
V.5.2	Dénombrement des sites d'interaction de la streptavidine avec la biotine	142
V.5.3	Stœchiométrie du lien entre MexA et OprM	147
V.6	Influence de paramètres tels que le pH sur une interaction	150
V.7	Le gel natif de protéines	151
V.8	Constante d'acidité des sites d'interaction	153
V.9	Conclusion	154
VI	Dynamique du lien entre protéines	155
VI.1	Taux d'association à deux et à trois dimensions	155
VI.1.1	Quelques considérations cinétiques sur l'accrochage entre streptavidine et biotine	158
VI.1.2	Détermination du taux d'association surfacique	161
VI.1.3	Comparaison avec les concentrations effectives	165

TABLE DES MATIÈRES

VI.2	Dynamique d'association entre protéines d'une pompe à efflux	168
VI.2.1	Association de MexA _{signal} et de OprM	168
VI.2.2	Association entre MexB et OprM	174
VI.2.3	Rôle de MexA dans l'association entre MexB et OprM	177
VI.3	Détermination de la constante d'équilibre du lien entre MexA et OprM . . .	179
VI.4	Détermination du taux de dissociation du lien entre MexA et OprM	184
VI.4.1	Principe de la mesure	184
VI.4.2	Résultats obtenus	185
VI.4.3	Vérification numérique	186
VI.5	Mesure de temps de rupture d'une liaison soumise à une force constante . .	190
VI.5.1	Principe	191
VI.5.2	Mesure dynamique de détachement du lien MexA-OprM	193
VI.5.3	Constante de raideur	196
VI	Energie de liaison	199
VII.1	Principe	199
VII.1.1	Variation avec la température	200
VII.2	Confirmations ?	202
	Conclusion	203
A	Tensioactifs et lipides utilisés	207
B	Préparation des échantillons	210
C	Spectres de rayons X	212
D	Résolution des équations cinétiques sur la streptavidine	216
E	Calcul de concentrations protéiques surfaciques	217
F	Retour sur le temps de dissociation avec une force constante	218
G	Expériences réalisées sur le BFP sur le lien OprM-MexA	220
G.1	Biomembrane Force Probe	223
G.1.1	Le capteur de force	223
G.1.2	Préparation des billes fonctionnalisées avec MexA	224
G.1.3	Reconstitution de la protéine OprM en vésicules géantes unilamel- laires (ou GUV)	225
G.1.4	Préparation de la chambre et des pipettes	229
G.1.5	Préparation d'une sonde	230
G.1.6	Expérience de BFP	230
G.2	Résultats obtenus	233
H	Solutions pour les expériences de Biomembrane Force Probe	234

Introduction : Interactions entre protéines membranaires

Après avoir considérablement progressé dans la connaissance du génome, les recherches se focalisent désormais sur les propriétés et la fonction des protéines découvertes. La propriété essentielle de ces protéines réside dans leur capacité à former des complexes avec d'autres protéines. Ces interactions protéines-protéines jouent un rôle majeur dans tous les processus cellulaires (la réplication de l'ADN, la transcription, la sécrétion de neurotransmetteurs, la transduction du signal). Ces assemblages peuvent aussi être transitoires. Ils ont alors différents rôles possibles [1]:

- la modification de la dynamique d'association ainsi l'accrochage coopératif de l'oxygène pour l'hémoglobine est régulé par des interactions avec des protomères [2],
- l'extrusion de substrats hors de la cellule,
- la formation de nouveaux sites d'interactions,
- l'inactivation d'une autre protéine (c'est le cas de l'interaction de répresseur avec leur anti-répresseur),
- la modification de spécificité d'un substrat. De cette façon, l'interaction de facteurs de transcription avec la protéine chargée de la construction de l'ARN la dirige vers des protomères différents.

Identifier et caractériser ce réseau d'interactions est donc un pré-requis pour espérer comprendre les processus cellulaires aux niveaux moléculaire et biophysique. Dans ces processus, les protéines présentes sur la membrane des cellules ont un rôle primordial. Elles entrent en jeu dans tous les mécanismes de liaison avec le milieu extérieur comme le transport d'informations via les phénomènes d'endo et d'exocytose ou la fusion qui utilise les protéines SNARE, l'adhésion entre cellules grâce aux cadhérines, la reconnaissance, la résistance aux toxines comme les pompes à efflux chez les bactéries dont nous parlerons dans ce manuscrit.

Enjeux d'une interaction

Les interactions entre protéines peuvent être analysées de manière très diverses et à plusieurs niveaux d'étude.

Introduction

La première étape est bien sûr la détection et l'identification des partenaires.

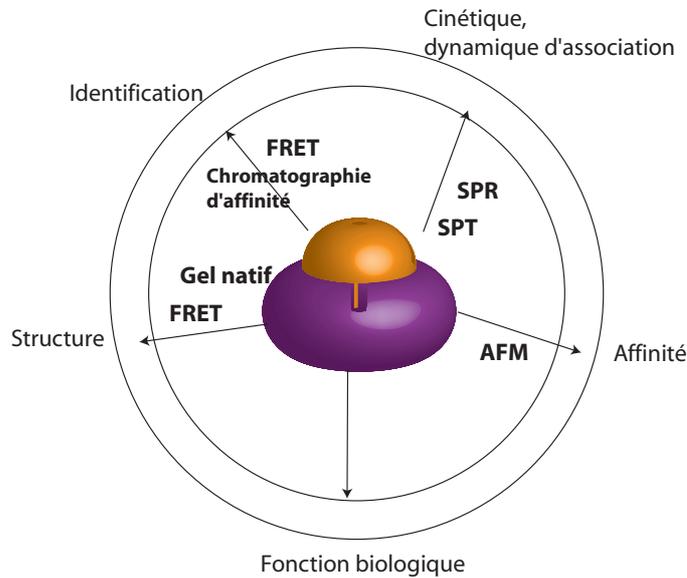


Figure 1: Schéma-bilan sur les grandeurs à déterminer pour définir une interaction. En gras, les techniques que nous allons décrire qui apporte une description possible sont notées. (Abréviations : AFM : microscope à force atomique, SPR : Résonance plasmon de surface, SPT : Suivi de molécules uniques).

Une fois qu'une interaction a été décelée, les propriétés moléculaires de l'objet doivent être obtenues. Les paramètres-clés sont la configuration du lien (frontal ou latéral), l'état d'oligomérisation de chacun des partenaires et les rapports stœchiométriques à l'intérieur du complexe.

La deuxième étape concerne les propriétés biophysiques du complexe. Les taux d'association et de dissociation sont essentiels pour décrire la dynamique du système et caractériser les assemblages transitoires. En outre, l'affinité ou l'énergie de la liaison constitue un élément majeur de cette caractérisation. Ces valeurs d'équilibre soulignent les liens les plus difficiles à rompre.

Enfin, l'ultime étape dans la connaissance d'une liaison est la découverte de sa fonction. La réponse à cette interrogation peut être partiellement suggérée à partir des éléments précédents mais parvenir à recréer *in vitro* une fonction spécifique à partir de protéines isolées reste l'enjeu des études biophysiques. Toutes ces interrogations sont résumées dans la figure 1.

Techniques usuelles de caractérisation des interactions entre protéines

Les méthodes proposées pour répondre à ces questions ont été développées par des physiiciens, des biologistes, des généticiens et des chimistes. Le panel est donc très large. Notre

but n'est pas de les référencer mais seulement de dresser un bilan des techniques les plus utilisées.

Détection d'associations

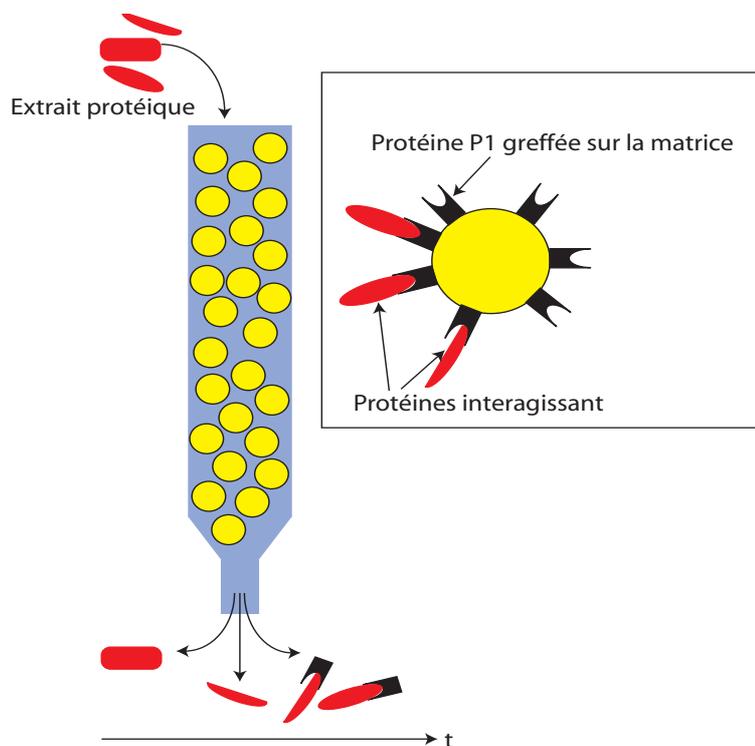


Figure 2: Schéma de principe de la détection d'interaction par étude de chromatographie d'affinité. L'extrait protéique est injecté dans la colonne, les protéines qui vont fortement réagir avec la protéine immobilisée vont être les dernières à sortir. A la fin, on fait une élution qui permet d'obtenir les complexes

Tout d'abord, intéressons-nous aux méthodes de détection des complexes protéiques. Il en existe deux types que l'on peut partager en détection *in vivo* ou détection *in vitro*. Nous évoquerons ici les méthodes *in vitro*. Elles requièrent la purification de protéines.

La chromatographie d'affinité [3] est très répandue car elle est facile à mettre en œuvre. Une protéine est immobilisée sur une matrice généralement composée de billes de silice fonctionnalisées (figure 2). Cette fixation se fait grâce à un marquage de la protéine avec un groupement histidine, par exemple, qui s'accroche aux éléments Nickel greffés sur la bille. Dans la colonne, on fait alors circuler un extrait protéique. Les molécules vont migrer en fonction de la force de liaison vis-à-vis de la protéine immobilisée. Les objets sans interaction vont sortir les premiers, ceux qui sont fortement liés vont avoir une vitesse de migration plus lente. Les complexes les plus fortement liés sortiront ensuite par élution. Cette méthode est très sensible puisque la détection d'interactions ayant des constantes de dissociation de $10^5 M$ est possible. Elle autorise un test en parallèle de plusieurs espèces

d'un extrait et de plusieurs conditions de tampon.

Cependant, la détermination de la stœchiométrie du complexe est difficile par cette

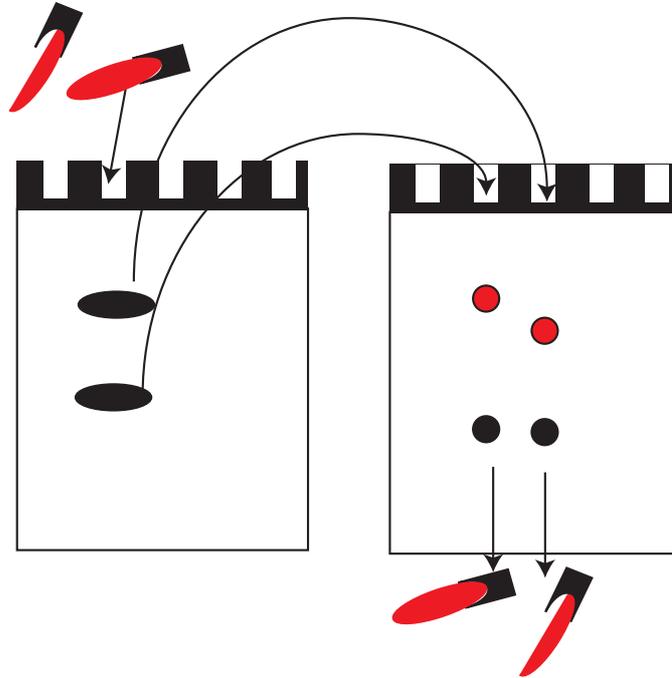


Figure 3: Schéma de principe de la méthode de gel natif pour la détermination de la stœchiométrie d'un complexe. Le premier gel réalisé sous conditions non-dénaturantes isole chaque complexe grâce à une migration par poids moléculaire. Le second gel va séparer chaque élément du complexe et permettre une quantification de chacun pour déduire une stœchiométrie.

méthode c'est pourquoi elle est souvent complétée par une étude du complexe par gel électrophorétique natif ou BN-PAGE [4] [5]. Les complexes formés sur la colonne de chromatographie sont recueillis puis analysés par taille moléculaire en utilisant une migration sur un gel électrophorétique (figure 3). Les conditions utilisées sont des conditions dites natives ce qui signifie que les complexes ne sont pas coupés. La masse du ou des complexes est déterminée par comparaison avec des marqueurs de poids moléculaires connus. Le nombre d'éléments présents est ensuite obtenu en faisant migrer chacun des complexes sous conditions dénaturantes sur un second gel. Les liaisons sont rompues et on peut quantifier la quantité de matière de chaque protéine.

Cette méthode n'est pas une méthode à l'équilibre, on la compare souvent avec une étude par ultracentrifugation analytique [6] [7] [8]. Cette technique permet de séparer les différentes espèces en fonction de leur masse moléculaire. La masse du complexe est ainsi déterminée avec précision. Elle peut aussi apporter des informations quant à l'équilibre de la réaction par la mesure de la constante de dissociation.

La technique du cross-linking détecte les interactions mais elle permet aussi de déduire l'architecture du complexe [9]. Cette méthode utilise un linker de la forme R-S-S-R' pour renforcer les éventuelles interactions (figure 4). Ce linker possède deux radicaux R et R'

qui peuvent réagir avec chacune des protéines P et P' qui interagissent. Les complexes formés sont mis à migrer sur un gel non dénaturant de manière à faire un tri par poids moléculaire. Le complexe plus lourd va migrer plus lentement. Une seconde migration est ensuite effectuée après traitement par un réducteur qui va casser le pont disulfure S-S. Ainsi le complexe est clairement identifié puisqu'il sera le seul élément qui va donner deux traces séparées lors de la seconde migration.

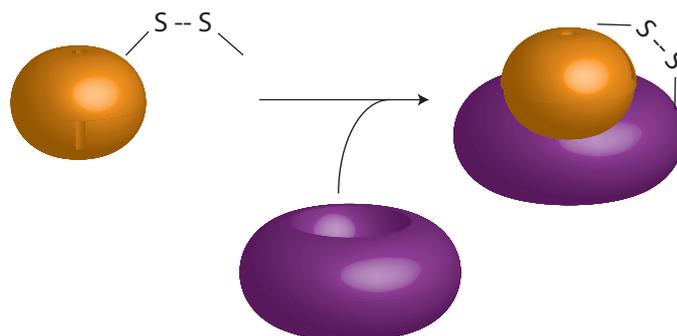


Figure 4: Description de la méthode de Cross-linking. Deux radicaux $/$ et \backslash sont liés par un pont disulfure. Ces radicaux permettent de renforcer la liaison entre les deux protéines.

Le marquage fluorescent des protéines a ouvert la voie à de nouvelles technologies qui sont applicables *in vivo*. Les techniques de détection basées sur le transfert résonant de fluorescence (FRET) [10] sont intéressantes. Cette technique s'appuie sur un échange d'énergie entre deux fluorophores : un donneur et un accepteur. Ce transfert d'énergie a lieu avec une probabilité finie seulement si les fluorophores sont éloignés de moins de 10 nm. La mesure de ce taux de transfert permet de détecter les interactions et de préciser les sites protéiques proches. En outre, la mesure de l'intensité de transfert par rapport à celle d'émission directe donne la stœchiométrie des assemblages [11].

La détection de complexes protéiques est ainsi une voie importante de recherche. La détection par des dispositifs de sélection à grande échelle représente un domaine d'innovation important : la protéomique. Les plateformes de tests sont développées pour tester des interactions [12]. Diverses protéines sont immobilisées sur des supports solides et l'accrochage d'une autre protéine est détectée en parallèle pour chaque puits. On peut ainsi tester un panel de conditions différentes (forces ioniques, pH, ...) mais aussi varier les couples de protéines étudiés. La microfluidique est aussi une des voies de développement possible pour la détermination des conditions optimales pour une réaction.

Caractérisation de protéines

De nombreuses techniques pour la caractérisation *in vitro* d'interactions sont apparues ces dernières années. Certaines ont notamment connues un développement industriel. Ces méthodes requièrent souvent une grande quantité de protéines. Les méthodes de suivi de molécules uniques tiennent une place importante. Une bille d'or ou une boîte quantique [13] peut être greffée sur une protéine et permet d'imager en temps réel les mouvements

Introduction

de cette dernière. Ces expériences donnent des informations sur les premières étapes de la formation du lien [14]. Cependant elles ajoutent un marquage par un élément qui est souvent plus gros que l'objet suivi ce qui peut bloquer les interactions.

Depuis l'arrivée du BiacoreTM dans les années 90, la détection d'interactions entre protéines non marquées par des mesures sur des interfaces solides a connu une grande popularité. La méthode de résonance plasmon de surface (SPR) et les techniques qui sont liées [15] détectent l'interaction entre un ligand soluble et un récepteur immobilisé sur la surface d'un transducteur physico-chimique. Ces mesures sont résolues en temps. De cette manière, les cinétiques d'associations et de dissociation sont décrites. Les taux d'associations varient entre 1 et 10^{-4} s⁻¹. L'avantage principal de ces méthodes est leur absence de marquage. De plus, ces dispositifs peuvent potentiellement être couplés à des architectures de puits de tests afin de varier rapidement les conditions. Cependant, la difficulté majeure reste la maîtrise des méthodes d'immobilisation des récepteurs. Dans le cas des protéines membranaires, les techniques de reconstitution sur de tels types de surface restent difficiles à mettre en œuvre [16].

Forces de rupture et énergie de liaison

Les mesures de force de lien unique sont un domaine qui connaît une expansion considérable en interface physique-biologie. Les méthodes proposées permettent de tester des forces dans une grande gamme. Ces techniques mesurent des forces entre une sonde sur laquelle on applique une force de rappel variable et un substrat. Le microscope à force atomique (AFM) [17] est un de ces dispositifs. Une des protéines est greffée sur une pointe d'AFM tandis que la protéine partenaire est immobilisée sur une surface (figure 5). Sous l'effet des interactions, la force nécessaire pour retirer la pointe va varier. Ces courbes de force en fonction de la distance sont cependant difficiles à interpréter. Notamment les théories diffèrent sur les informations apportées par la spectroscopie dynamique de force, sur la valeur de l'énergie du lien.

Les énergies de liaison sont plus difficiles à obtenir. La technique la plus utilisée reste la calorimétrie isotherme de titration [18]. Lorsqu'un ligand se fixe à un récepteur, il y a, selon le signe de l'enthalpie de la réaction, dégagement ou absorption de chaleur. Ce sont ces modifications de températures qui sont mesurées. Ces changements sont évalués en comparant deux solutions placées dans deux récipients liés par un thermocouple (figure 6). La solution échantillon contient la molécule, la solution de référence ne contient que le tampon. On ajoute alors des fractions connues de ligands et on mesure l'énergie à fournir ou à prélever à la solution échantillon pour que sa température soit identique à celle de la référence. Ce dosage permet de mesurer l'enthalpie de la réaction. En outre, on a accès à la stœchiométrie de la réaction. Cependant, sa mise en oeuvre dans le cas de protéines avec un détergent est difficile.

Nous avons résumé dans le tableau 1, les informations apportées par chacune de ces méthodes sur une interaction de manière à mieux les comparer.

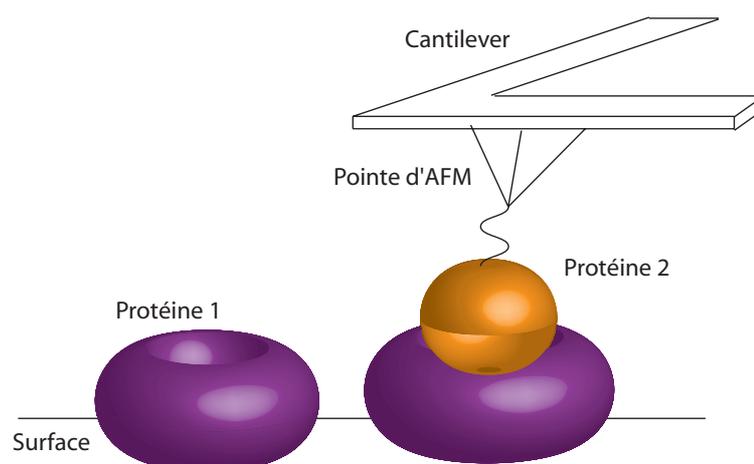


Figure 5: Principe de l'AFM. La pointe sur laquelle est greffée la protéine 1 est retenue par la liaison entre les protéines 1 et 2 quand la pointe se retire. On mesure la force de rupture du lien entre les deux protéines.

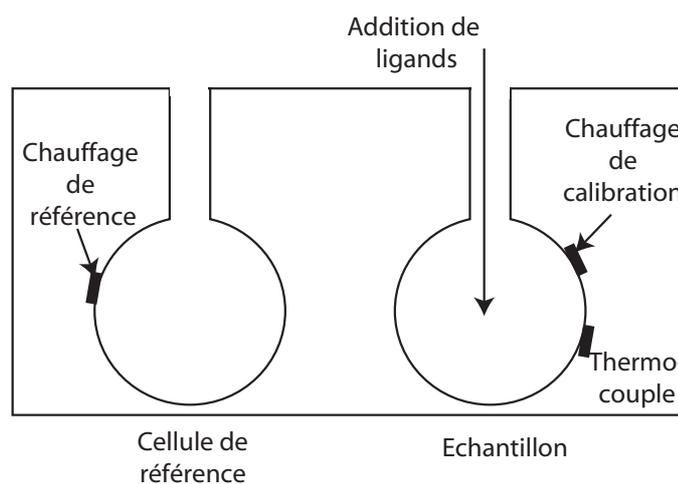


Figure 6: Principe de la calorimétrie isotherme de titration. Les variations de températures de la cellule d'analyse sont obtenues par comparaison avec une cellule de référence. On obtient ainsi des courbes qui sont des courbes de dosage.

Fonction ?

La détermination du lien entre la structure et la fonction d'un assemblage reste l'enjeu de l'étude des interactions. La cristallographie est l'outil essentiel pour répondre à ces interrogations. La structure tridimensionnelle des protéines sous forme complexée permet de déterminer leur rôle dans un assemblage.

La reconstruction des fonctions in vitro est aussi un test de plus en plus développé pour parvenir à déterminer la fonction des protéines et de leur associations.

Introduction

Technique	Protéines membranaires	Identification	Stoechiométrie	Cinétique	Energie
Chromatographie d'affinité	+/-	-	+	-	-
BN-PAGE	+/-	+	+	-	-
AUC	+/-	+/-	+	+/-	-
Cross-linking	+/-	+	+/-	-	-
FRET	+	+	+	-	-
SPR	+/-	+	+/-	+	+/-
Spectroscopie dynamique de forces	+	+	-	-	+
Calorimétrie	+/-	-	+	-	+

Tableau 1: Tableau-Récapitulatif des différentes techniques mentionnées lors de cette introduction. Les signes - indiquent que la méthode n'est pas adaptée à ce type de mesures. Les signes + indiquent au contraire une bonne adaptation. L'utilisation +/- signifie que la technique est utilisable mais qu'elle n'est pas très adaptée.

Et pour les protéines membranaires ...

Les protéines membranaires sont délicates à étudier du fait de leur caractère hydrophobe. Il faut parvenir à créer un environnement adapté. Les méthodes que nous avons évoquées sont mieux adaptées aux protéines solubles (tableau 1). Certaines sont cependant utilisables pour des micromanipulations de cellules mais peu sont construites pour des interactions entre protéines membranaires.

Cette mauvaise adaptation aux protéines membranaires conduit à multiplier les systèmes d'étude. Les mesures sont effectuées en cellule puis en solution lorsqu'il s'agit d'atteindre des paramètres tels que l'affinité ou les taux de réaction.

En outre, les protéines membranaires sont souvent plus difficiles à produire que les protéines solubles. Les quantités de protéines consommées sont un facteur limitant pour la réalisation de certaines mesures. Une contrainte essentielle pour l'étude de ces objets est donc de limiter la quantité de protéines consommées.

Ces remarques montrent bien toute l'importance du développement d'outil pour les objets membranaires.

Dans ce travail, nous avons développé des outils adaptés à l'étude des protéines transmembranaires. Nous les avons testé en les appliquant à l'étude d'un lien connu : celui entre la streptavidine et la biotine. Une fois notre technique validée, nous avons étudié les interactions entre trois protéines constituant une pompe à efflux d'une bactérie à double membrane : *Pseudomonas aeruginosa* que nous décrivons dans le chapitre 1.

Après avoir décrit la manière dont nous avons surproduit les protéines étudiées lors de

cette thèse (Chapitre 2), nous avons consacré le troisième chapitre à la description du système simplifié de bicouches utilisé pour solubiliser les protéines transmembranaires. Le Chapitre 4 est consacré à la description de la méthode de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAPP) utilisé pour déterminer les coefficients de diffusion des différentes inclusions membranaires. Nous y montrons que, contrairement à l'idée communément admise, le modèle de Saffman-Delbrück qui relie la valeur du coefficient de diffusion au rayon de l'objet diffusant et à l'épaisseur de la membrane n'est pas valable pour des protéines dont le rayon est inférieur à 30 Å. Les résultats de ce chapitre permettent de développer un outil puissant dédié à l'étude des interactions entre les protéines membranaires.

La suite de ce manuscrit présente les résultats obtenus pour la détection et la caractérisation des interactions entre protéines membranaires à l'intérieur d'un système unique. Le cinquième chapitre est consacré à la détection et à la caractérisation géométrique d'une liaison. Nous montrerons que la méthode développée permet de détecter une interaction mais aussi de préciser sa configuration en déterminant si les objets interagissent latéralement ou frontalement (figure 7). Pour cette dernière géométrie, nous pourrions même avoir accès à la distance spécifique entre les membranes qui autorise la création d'un lien. Nous verrons aussi que nous pouvons réaliser dans ces échantillons un dosage des sites d'interaction pour répondre à l'enjeu majeur des rapports stœchiométriques dans un assemblage.

Nous montrerons ensuite au chapitre 6 que nous avons accès aux constantes cinétiques

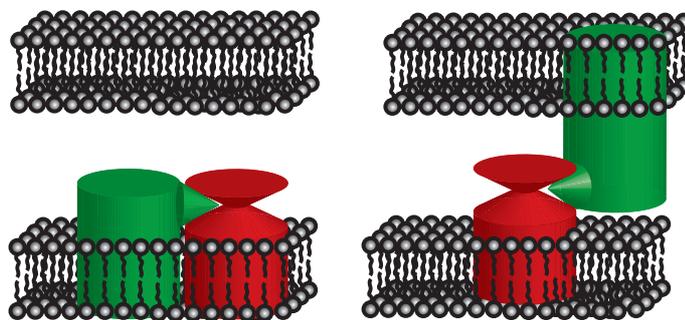


Figure 7: Géométrie des interactions. Deux protéines peuvent interagir latéralement (cas (a)) ou frontalement (cas (b))

de formation et de rupture d'un lien ainsi qu'aux constantes de réactions à l'équilibre. L'énergie de l'interaction entre deux protéines de la pompe à efflux a été déterminée au chapitre 7.

Chapitre I

Résistance aux antibiotiques : Pompes à efflux

Les bactéries sont des organismes procaryotiques en majorité unicellulaires avec une taille allant de 1 à 10 μm . Leur plan d'organisation est simple par rapport aux eucaryotes. De manière générale, les seules membranes existantes sont celles qui les limitent. L'intérieur de la cellule ne possède pas de compartimentation ou d'organites ; le patrimoine génétique n'est pas enfermé dans un système membranaire clos ce qui conduit à une continuité sur la localisation des différentes étapes de l'expression des gènes. La division chez les bactéries conduit à une coordination entre duplication de l'unique chromosome bactérien et croissance. Parmi ces bactéries, le test de Gram permet depuis 1880 de distinguer deux grands groupes correspondants à deux types d'organisation membranaire. On distingue :

- les bactéries à Gram positif qui sont caractérisées par une enveloppe avec une seule membrane limitante : la membrane cytoplasmique doublée d'une épaisse couche de peptidoglycane (il s'agit d'un complexe macromoléculaire réticulé à trois dimensions qui confère à la cellule sa rigidité et sa solidité),
- les bactéries à Gram négatif qui sont caractérisées par deux membranes phospholipidiques limitantes : la membrane cytoplasmique et la membrane externe encadrant le périplasma (figure I.1). Ce dernier est un espace de dimensions inconnues qui inclut une fine couche de peptidoglycane. Les deux membranes ont une composition et une structure très différentes ; ainsi la membrane cytoplasmique ou interne enferme de nombreux transporteurs transmembranaires alors que la membrane externe est percée de nombreux pores qui laissent passer des molécules allant jusqu'à 1500 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (ou 1.5 kDa car $1 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1} = 1 \text{ Da}$) et porte de nombreux résidus glucidiques accrochés à des lipides.

L'avènement de l'antibiothérapie pour lutter contre les bactéries s'est accompagné d'une résistance développée par certaines souches bactériennes. Celle-ci est due à l'activation d'éléments chromosomiques déjà présents dans le génome bactérien ou à l'utilisation d'éléments génétiques mobiles. Cette résistance peut être sélective pour une classe d'antibiotique ou au contraire couvrir un large spectre de toxines - ce sont les systèmes MDR (Multidrug resistance).

Parmi les mécanismes de résistances, trois catégories peuvent être discernées [19] :

- la production d'enzymes inactivatrices des antibiotiques,
- la modification des cibles des antibiotiques ainsi la résistance aux fluoroquinolones est due à la modification de leur cible : les topoisomérases de classe II, qui sont des

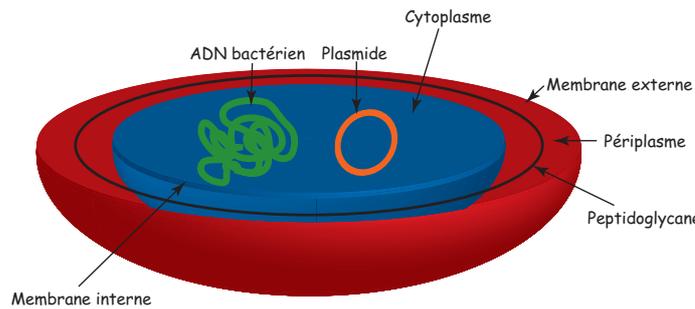


Figure I.1: Bactérie à double membrane ou Gram négative

enzymes jouant un rôle dans le contrôle de la topologie de l'ADN et pouvant créer des coupures transitoires dans la chaîne,

- la réduction de la concentration intracellulaire de toxines grâce à une imperméabilité obtenue par diminution des productions de porines¹ externes ou grâce à un efflux actif.

Nous nous sommes intéressés, dans ce mémoire, à l'efflux actif chez une bactérie Gram-négative : *Pseudomonas aeruginosa*. Ce chapitre présente la pompe à efflux que nous avons étudiée. Nous étudions tour à tour chacune des trois protéines qui la composent : MexB, OprM et MexA afin de mettre en évidence les enjeux d'une telle étude.

I.1 L'efflux actif chez les bactéries à double membrane

I.1.1 Description d'une bactérie Gram négative :

La bactérie *P. aeruginosa* est un agent pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes allant du végétal à l'animal et pouvant toucher l'homme. Chez ce dernier, cet agent pathogène affecte principalement les personnes immunodéprimées comme celles atteintes de mucoviscidose. Dans son environnement naturel, cette bactérie peut être trouvée sous sa forme planctonique ou dans un biofilm et peut se développer dans un spectre de température allant de +4°C à +42°C.

Elle développe une forte résistance aux antibiotiques notamment aux β -lactames et aux fluoroquinolones. Il s'agit d'une bactérie Gram-négative ce qui signifie qu'elle possède une double membrane tout comme une bactérie plus connue et dont elle est proche *Escherichia coli*. Ces deux enveloppes lipidiques sont séparées par un espace estimé à 200 Å nommé périplasma (figure I.1). Cette double barrière permet à la bactérie de s'adapter aux changements de pression osmotique en modifiant la taille de son périplasma mais aussi de bloquer l'entrée des agents indésirables au niveau de ce premier seuil.

À l'intérieur de ces systèmes, l'efflux actif élimine à la fois les antibiotiques mais aussi

¹Porines : Protéines qui traversent la membrane cellulaire et forment un pore suffisamment large pour permettre une diffusion passive. Elles agissent comme des canaux spécifiques ou non.

de nombreuses toxines telles que les métaux lourds, les antiseptiques, les pesticides ou les solvants organiques. Il est aussi essentiel pour la bonne santé de la cellule puisqu'il lui sert à l'exportation des toxines bactériennes et des molécules nécessaires au pouvoir invasif du germe des bactéries pathogènes. Ce mécanisme doit mener au passage des deux membranes pour conduire le substrat du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire.

I.1.2 Structure d'une pompe à efflux

A l'intérieur de bactéries Gram-positives, le système d'efflux ne met en jeu qu'un seul transporteur mais pour les bactéries à double membrane, celui-ci est généralement un complexe protéique tripartite [20] [21] constitué des trois éléments suivants (figure I.2) :

- un moteur qui va fournir l'énergie pour l'exportation. On en dénombre deux classes principales qui sont, d'une part les transporteurs utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate ou ATP (ces transporteurs sont nommés transporteurs ABC pour *ATP-binding cassette*, ils sont peu présents chez les procaryotes), et d'autre part, les transporteurs fonctionnant grâce à la force proto-motrice ou par dissipation de tout autre gradient d'ions (la famille principale est la famille RND pour *Resistance-Nodulation Cell Division*). Ce moteur est une protéine transmembranaire avec des boucles périplasmiques impliquées dans la reconnaissance du substrat.
- une porine de la membrane externe ou OMF (*Outer Membrane Factor*) qui va être chargée du transport entre le périplasme et le milieu extracellulaire.
- une protéine périplasmique ou MFP (*Membrane Fusion Protein*) dont le rôle est inexpliqué. Plusieurs hypothèses sont avancées. Ainsi cette protéine pourrait être essentielle au recrutement de la protéine de la membrane externe, elle pourrait faire fusionner les deux membranes localement pour faciliter le passage des antibiotiques de la protéine de la membrane interne vers celle de la membrane externe [22].

Ces trois protéines sont généralement codées par le même opéron.

Chez *P. aeruginosa*, on dénombre douze pompes identifiées par analyse bioinformatique du génome complet de la bactérie et quatre de ces systèmes ont été biochimiquement caractérisés.

On constate immédiatement à la lecture du tableau I.1 que le spectre de substrats de ces pompes est très large car différentes classes d'antibiotiques peuvent être effluées grâce à ce mécanisme. L'enjeu de l'étude de ces systèmes est alors évident. La compréhension de cette réponse immunitaire de la bactérie permettrait de pouvoir cibler des inhibiteurs de cet efflux afin d'augmenter l'action des antibiotiques.

Lors de cette thèse, nous nous sommes intéressés au système tripartite majeur de *P. aeruginosa* : MexAB-OprM où MexB est une protéine de la membrane interne fonctionnant sur la force proto-motrice, MexA est une protéine périplasmique et OprM une protéine de la membrane externe. Ce système est constitutif c'est-à-dire exprimé en permanence

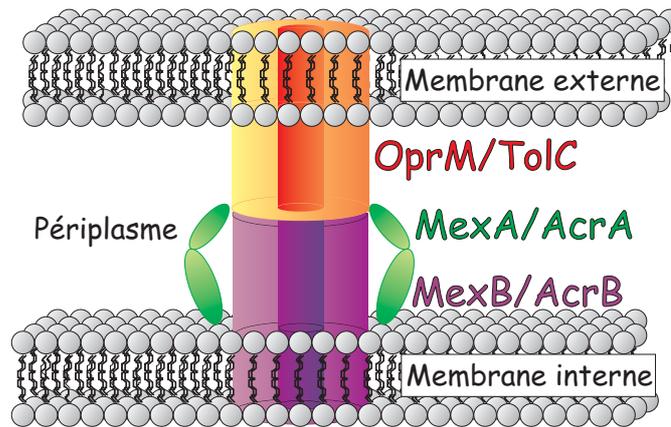


Figure I.2: Pompe à efflux chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*.

Pompe	MexAB/OprM	MexXY/OprM	MexCD/OprJ	MexEF/OprN
Protéine de la membrane externe	OprM	OprM	OprJ	OprN
Protéine de la membrane interne	MexB	MexY	MexD	MexF
Protéine périplasmique	MexA	MexX	MexC	MexE
Principaux substrats antibiotiques	C, TC, FQ, L, Nov, ML, Tmp, Sul	TC, ML, AG	C, TC, FQ, C4G, ML, Nov, Tmp	C, FQ, Tmp, Ipm

Tableau I.1: Pompes à efflux identifiées chez *Pseudomonas aeruginosa*. Les abréviations utilisées pour les substrats antibiotiques sont les suivants : AG = aminosides, L = β -lactamines, C = chloramphénicol, C4G = céfépine, FQ = fluoroquinolones, Ipm = imipénème, ML = macrolides-lincosamides, Nov = novobiocine, Sul = sulfamides, TC = tétracyclines, Tmp = triméthoprime

contrairement aux trois autres qui sont seulement inductibles (ils ne s'expriment que dans des conditions spécifiques de stress). Il est responsable de différents types de résistance comme indiqué dans le tableau I.1.

Cette organisation protéique est très proche de l'association AcrAB-TolC présente chez *E. coli*, il s'agit d'un système homologue². Dans ce système AcrAB-TolC chez *E. coli*, les protéines des membranes externes et internes ont été cristallisées seules et avec des antibiotiques. Pour l'association MexAB/OprM de *P. aeruginosa*, seules les protéines MexA et OprM sont connues d'un point de vue structural. Nous nous référons donc aux deux systèmes pour décrire l'assemblage qui nous intéresse. Ce croisement des références est aussi justifié par le fait que des pompes non existantes *in vivo* telles que les associations AcrAB-OprM ou MexAB-TolC peuvent être créées même si elles sont non fonctionnelles,

²homologue : analogie de structure avec un ancêtre commun

ce qui traduit une homologie entre ces deux systèmes. Dans la suite, nous allons présenter chacune de ces protéines MexB, OprM et MexA et nous croiserons les références en évoquant aussi le système AcrAB-TolC.

I.2 La protéine de la membrane interne MexB

MexB, la protéine de la membrane interne, est une protéine mal connue. Sa carte d'identité est la suivante : elle possède 1046 acides aminés et a une masse moléculaire de 113 kDa. Douze segments transmembranaires la composent ainsi que deux grands domaines hydrophiles orientés vers le périplasma. Cette protéine n'a pas été cristallisée. Nous étudierons donc d'abord les résultats obtenus pour AcrB, la protéine homologue de MexB chez *Escherichia coli* puis nous évoquerons les résultats obtenus pour MexB.

I.2.1 Une protéine homologue chez *Escherichia coli* : AcrB

AcrB est une protéine proche de MexB au niveau fonctionnel et structurel, les études menées sur elle sont principalement des études cristallographiques qui ont révélé son fonctionnement de pompe péristaltique.

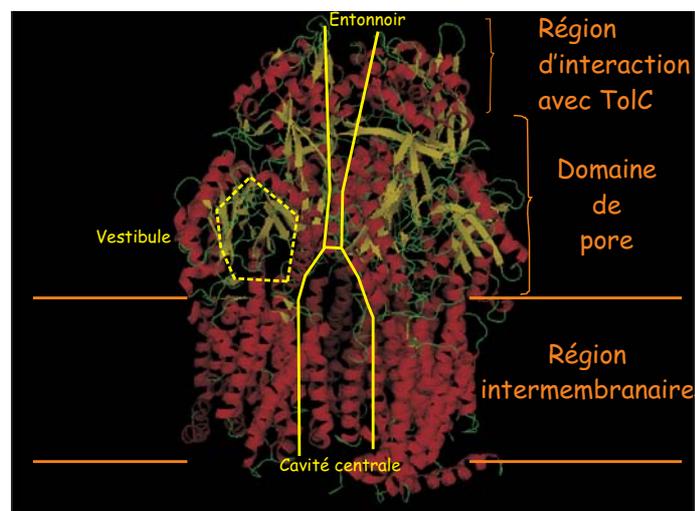


Figure I.3: Structure de AcrB. L'entonnoir assurant le lien avec la protéine de la membrane externe est mis en évidence ainsi que la cavité transmembranaire. Les ouvertures vers le périplasma sont identifiées en pointillés. La vue de dessus permet de souligner l'importance de ces vestibules et la structure symétrique de fissure qui pourrait assurer le lien avec AcrA.

Tout d'abord, intéressons-nous à la structure cristallographique symétrique de AcrB [27] [28]. Cette protéine est organisée en trimère pour former un pore (figure I.3). Elle possède un segment transmembranaire de 50 Å de haut et de 80 Å de diamètre surmonté

par un segment hydrophile de 70 Å de haut sur 100 Å de diamètre. Cette dernière partie est elle-même composée de deux régions identifiables facilement qui sont :

- d'une part le pore long de 40 Å,
- d'autre part, la région supposée d'interaction avec TolC (protéine de la membrane externe homologue à OprM). Cette région a une taille de l'ordre de 30 Å.

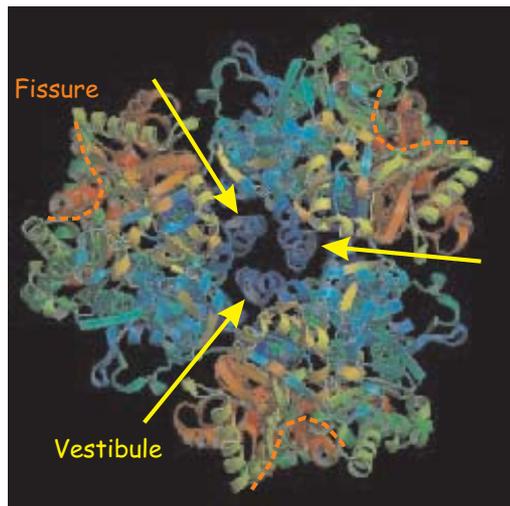


Figure I.4: Étude de l'entonnoir de AcrB.

Vue du périplasma, la partie supérieure du trimère, s'ouvre en entonnoir (figure I.4). Le diamètre interne ouvert de ce "conduit" est de 30 Å environ. TolC, la protéine de la membrane externe, définit elle aussi une ouverture centrale dont le rayon est du même ordre de grandeur. L'interaction entre ces deux éléments paraît probable. Trois hélices α forment un pore au centre de l'édifice qui assure la connection avec une cavité centrale dans la partie transmembranaire dont le diamètre est de 30 Å. Des études en présence de substrats [29] ont révélé au niveau de la frontière entre parties hydrophile et hydrophobe, la présence d'une voie protégée par un repliement et donnant accès depuis le périplasma au pore. On nomme cette région le vestibule. Selon des résultats de mutagenèse dirigée sur ces sites, cette zone de la protéine, est en lien avec la spécificité du substrat (résultats identiques à ceux obtenus pour MexB). On en vient à supposer que les antibiotiques sont en fait recrutés soit dès le périplasma et soit à l'intérieur du cytoplasme.

Intéressons-nous maintenant plus en détail à chaque unité. La partie transmembranaire de chaque monomère est composée de douze segments transmembranaires en hélices α . L'organisation de ces segments possède une quasi-symétrie d'ordre 2 à l'intérieur de chaque monomère. Une hélice supplémentaire entre les segments 6 et 7 est présente à l'intérieur même du cytoplasme. Cette partie transmembranaire définit une cavité centrale de 30 Å de diamètre ; à l'intérieur d'une telle cavité, des phospholipides peuvent être présents mais le passage de substrats à ce niveau est aussi envisageable. Cette section de la protéine est liée avec son activité proto-motrice.

La partie hydrophile assure le passage des substrats depuis la cavité centrale ou le périplasma. Le pore est formé de quatre sous-domaines. Ces derniers délimitent une cavité centrale liée au périplasma par trois vestibules et entourée de trois sillons de 40 Å de long qui pourraient être les sites d'interactions avec AcrA (protéine périplasmique homologue de MexA). La cavité est aussi reliée à un entonnoir présent dans la partie haute de la protéine ainsi qu'avec la cavité transmembranaire.

Afin de déterminer la fonction de AcrB, il fallait lever la symétrie au niveau du trimère, pour cela l'utilisation de substrats co-cristallisés ou d'inhibiteurs de la pompe a été testée [30] [31] [32]. Ces études identifient le chemin emprunté par les substrats à l'intérieur de la pompe. Ces derniers pénètrent par les vestibules à partir du périplasma, ils sont conduits au niveau du pore puis rejetés par l'entonnoir vers la protéine de la membrane externe.

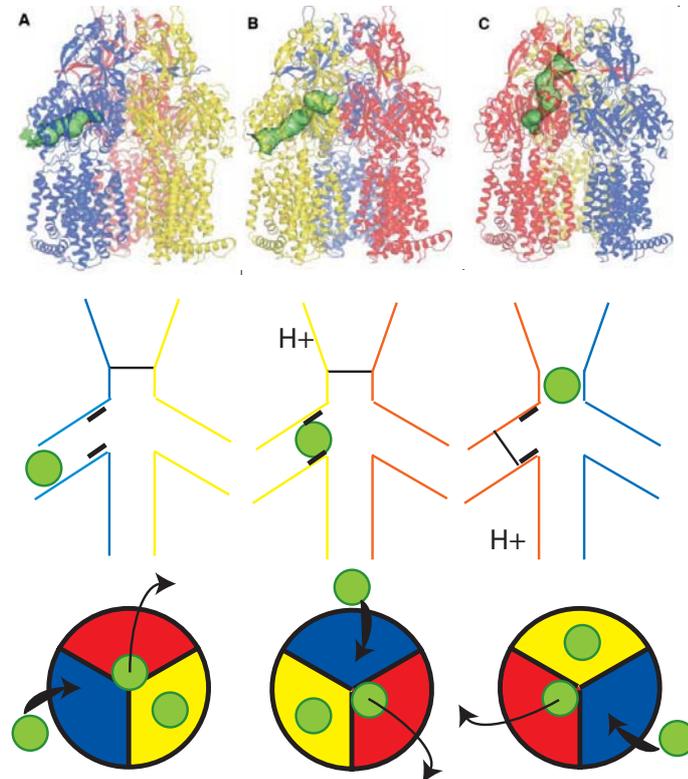


Figure 1.5: Schéma du fonctionnement de AcrB [31] [32]. On distingue trois états symbolisés par trois couleurs différentes, le premier est une configuration ouverte vers le périplasma qui voit l'arrivée d'un substrat (en bleu), le second est caractérisé par l'accrochage du substrat sur un site d'interaction et par l'entrée d'un proton qui va protoner l'hélice fermant l'accès à l'entonnoir (en jaune), le dernier voit l'ouverture de l'entonnoir alors que l'accès au vestibule est clos et que le proton est relâché vers la cytoplasme (en rouge).

Le schéma proposé du fonctionnement de la pompe rappelle celui d'un moteur à trois temps pour lequel chaque élément du trimère jouerait un rôle différent alternativement (figure I.5). On définit donc les unités A, B et C obtenues par cristallographie. Le synopsis de fonctionnement proposé est alors le suivant [32]. Le substrat s'accroche tout d'abord à l'unité B en passant du périplasma au vestibule de AcrB. Les changements de protonation induits au niveau des résidus des hélices du vestibule conduisent à une ouverture vers le pore et à la fermeture du vestibule. On parvient donc à la configuration de l'unité C. Le substrat est alors largué vers le conduit menant à TolC pour atteindre le milieu extérieur. La déprotonation a alors lieu au niveau de l'hélice précédemment modifiée afin qu'elle revienne à son état initial noté A.

I.2.2 Caractérisation de MexB

L'expression de MexB est difficile car cette protéine est toxique pour la bactérie lorsqu'elle est surexprimée chez *E. coli*. En effet, la membrane interne est essentielle à la bactérie afin de réguler ces échanges avec le milieu extérieur, elle est le dernier rempart pour protéger la cellule. Si les porines sont trop nombreuses à ce niveau, la bactérie est plus fragile. La bactérie peut soit mourir du fait de la surproduction, soit tenter de modifier le plasmide inséré, soit encore synthétiser des protéases permettant de lyser les protéines produites. La majeure partie des travaux réalisés sur MexB est donc constituée d'études *in vivo* et de mutations génétiques. Trois rôles majeurs de MexB ont été mis en évidence : son interaction avec MexA, son action dans la translocation de protons et dans la spécificité de substrat. Les premières interactions identifiables par ce type d'analyses ont été des interactions entre MexA et MexB obtenues par des méthodes de *cross-linking* [24]. Cette méthode repose sur le renforcement d'un lien entre protéines grâce à un agent cross-linkant. Ce dernier est greffé sur une des protéines à étudier au départ, mais présente aussi une affinité pour un site de la seconde protéine identifié comme étant proche de la zone d'interaction spécifique entre les deux objets étudiés. Le complexe ainsi formé, est mis en évidence par une migration sur gel qui sépare les protéines selon leur poids moléculaire. Ces études ont montré que les régions impliquées dans les interactions avec MexA sont situées au niveau du domaine du pore. La mutation T587I a révélée l'importance de ce résidu pour la création d'un lien entre les deux protéines [25].

Des mutations réalisées au niveau du domaine membranaire [26] ont démontré que cette région était impliquée dans la translocation du proton. Enfin, à la frontière entre partie membranaire et pore, des modifications dans les résidus entraînent une modification dans la spécificité de substrat. On observe une augmentation de la sensibilité au chloramphénicol et à la carbenicilline lorsque les modifications touchent des résidus appartenant aux ouvertures périplasmiques. Une perte de résistance est notée quand des résidus appartenant au repliement devant le pore de liaison entre la cavité centrale et le périplasma sont mis en jeu.

Pour parvenir à compléter ces informations, la purification de ces protéines est nécessaire. Le groupe du Pr Taiji Nakae (Department of Molecular Life Science, Takai University, Isehara, Japan) y est parvenu [23]. Leur étude réalisée avec un détergent nommé dodécyl-maltoside (ou DDM-voir annexe A) a révélé que cette protéine existait en solution sous une forme trimérique. Elle a montré l'influence sur la dégradation de facteurs tels que la

salinité et le pH témoignant de la grande fragilité de MexB.

I.3 La porine externe OprM

La protéine de la membrane externe est elle aussi trimérique et chacun de ces monomères a une masse de 50 kDa. Elle semble assurer le transport des substrats pompés par la protéine de la membrane interne, de l'extrémité périplasmique de OprM vers le milieu extérieur. La membrane externe possède de nombreuses porines mais la structure de celles intervenant dans les pompes est très différente (figure I.6). La première différence réside

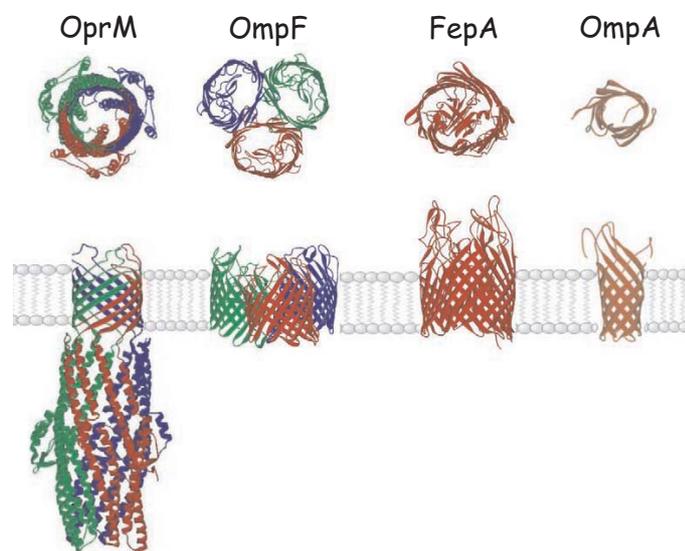


Figure I.6: Structure de OprM et d'autres porines de la membrane externe de *E. coli*. On a représenté les protéines à l'intérieur de la bicouche lipidique et vues de dessus. OprM est remarquable de par sa longueur de l'ordre de 130\AA alors que les autres porines ne dépassent pas les 60\AA de longueur. L'organisation trimérique autour d'un pore central est aussi inhabituelle.

dans la longueur de leur partie périplasmique qui dépasse généralement 100\AA alors que la plupart des autres porines assurent seulement le passage à travers la membrane avec des segments hydrophiles très courts. Cette porine organisée en trimère délimite un seul canal par trimère. Or, la majorité des porines existantes définissent sous l'état de monomère un pore mais peuvent parfois s'assembler pour donner des structures plus grandes comme OmpF (figure I.6).

Cette porine n'est pas spécifique du couple MexAB mais peut aussi fonctionner avec d'autres partenaires comme MexXY chez *P. aeruginosa*. Ce recrutement non spécifique est aussi un enjeu de la compréhension de ces systèmes.

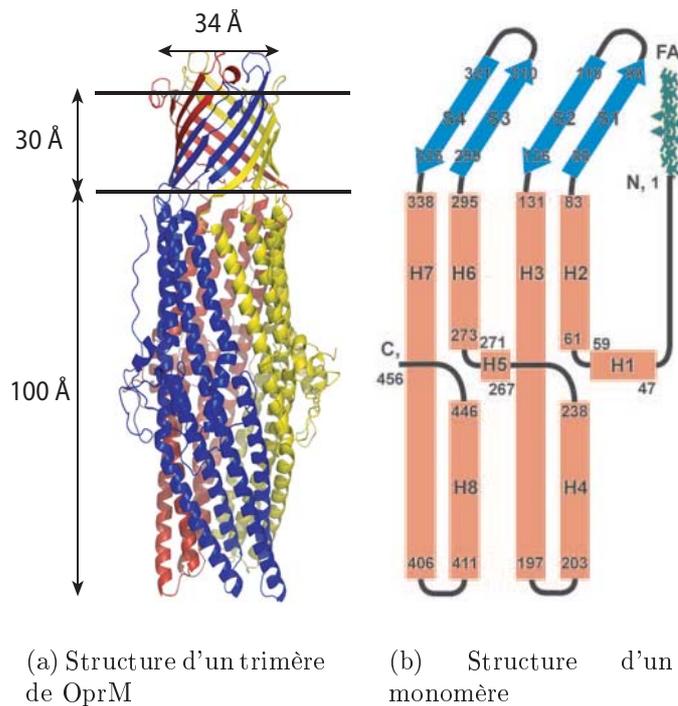


Figure I.7: Structure de OprM d'après [34]

I.3.1 Structure de OprM

La protéine OprM forme un trimère définissant un pore central de 17 Å de rayon. On peut décomposer chaque monomère en deux grands domaines (figure I.7) qui sont d'une part 4 feuillets β localisés dans la membrane et d'autre part les feuillets α dans la partie hydrophile [34]. Les homologies de séquence interne, e.g. H2/H6 laissent à penser à une duplication de séquence.

L'ancrage à la membrane se fait au moyen des quatre feuillets β mais aussi par un acide gras situé au niveau de l'extrémité N-terminale notée FA sur la figure I.7. La partie hydrophile est constituée de deux hélices α longues et quatre courtes. Les hélices numérotées 3 et 4 sont orientées vers l'extérieur de la structure et sont supposées être le site d'interaction privilégié de MexB selon des études comparatives de structure entre AcrB et OprM [34], les hélices 7 et 8 sont plus internes.

La structure globale de OprM fait apparaître deux régions :

- la région transmembranaire organisée en un tonneau β long de 30 Å et ayant un diamètre de 34 Å. Les feuillets β font un angle de 55° par rapport au plan de la membrane, ils délimitent un pore interne ayant un diamètre de 6 à 8 Å insuffisant pour le passage d'un substrat tel qu'un antibiotique.
- un tonneau formé d'hélices α , long de 105 Å. Les hélices courtes et leurs liaisons forment un renflement équatorial. Finalement ce trimère définit une cavité centrale dont le rayon varie le long de l'axe longitudinal pour atteindre 25 Å de diamètre

au niveau de l'équateur avant de se resserrer à l'extrémité périplasmique pour être totalement close.

Cette structure pose donc immédiatement le problème de l'ouverture de la porine puisque d'une part la frontière entre MexB et OprM est fermée et que d'autre part le pore membranaire n'est pas assez important pour permettre un export vers l'extérieur. Cependant, la taille de ce pore pourrait être augmentée grâce à la flexibilité des feuilletts mais le moteur de cette ouverture n'est pas connu. En ce qui concerne l'ouverture de la partie périplasmique, le schéma proposé [43] est le suivant (figure I.8) : MexA pourrait se lier aux hélices internes 7 et 8 et les orienter dans la continuité des hélices 3 et 4 afin d'augmenter le rayon du canal défini par ces hélices. L'ouverture aurait alors un rayon de l'ordre de 15 à 20 Å ce qui s'accorderait bien avec les valeurs du rayon de la région en entonnoir de AcrB. Or, MexB étant une protéine analogue, son rayon doit être proche de celui de AcrB. Ainsi l'accrochage MexB-OprM est possible grâce à ce mécanisme. Des ex-

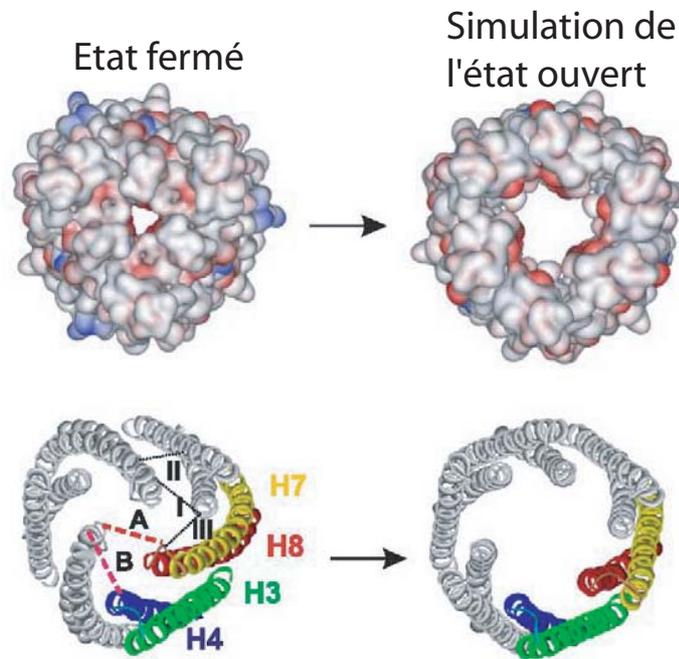


Figure I.8: Simulation de l'ouverture du pore de OprM par modification de la position des hélices 7 et 8. Les surfaces de charges sont représentées en haut ainsi que le schéma en rubans du pore en bas. ([43])

périences supplémentaires ont été conduites dans le système AcrAB/TolC sur la protéine de la membrane externe. Nous allons les mentionner car elles permettent une meilleure connaissance de OprM.

I.3.2 Une protéine analogue de MexB : TolC

TolC est une protéine analogue de OprM, sa différence majeure réside dans son mode d'accrochage à la membrane qui ne met en jeu que les feuilletts β et n'utilise pas d'acide

gras supplémentaire. OprM ne peut pas remplacer TolC dans son assemblage avec AcrA et AcrB. Même si le complexe AcrAB-OprM peut être formé, l'association n'est pas fonctionnelle. La reconnaissance entre TolC et AcrA ou AcrB doit mettre en jeu cette région de la protéine.

La structure de OprM laissait voir une construction d'ensemble identique à celle de TolC [35] résolue en 2000. La structure de TolC n'a pu être obtenue que sur des protéines correspondant à un trimère fermé. Ces données ont été complétées par des simulations. Ces dernières montrent qu'en déplaçant les hélices internes au niveau périplasmique terminal, pour qu'elles aient la même configuration que les hélices externes, l'ouverture obtenue est de l'ordre de 30 Å ce qui permet le passage d'antibiotiques à l'intérieur du canal [43].

Cette étude a été complétée par des mesures de patch-clamp sur des mutants [36] pour lesquels les ponts salins et les liaisons hydrogènes entre les douze hélices α sont peu à peu coupés au niveau terminal. A mesure que ces liaisons sont ôtées, on observe une conduction plus importante. L'ouverture de ce segment nécessite donc la rupture de ces liaisons. La protéine périplasmique AcrA paraît être le bon agent pour effectuer cette transition.

I.4 La protéine périplasmique MexA

Les protéines périplasmiques de ces pompes sont celles dont le rôle et l'organisation sont le moins bien compris. Leur fonction n'est pas évidente même si les hypothèses sont nombreuses : recrutement de la protéine de la membrane externe, fusion des membranes interne et externe, ouverture du pore de la protéine de la membrane externe, couplage énergétique des deux protéines membranaires...

La seule certitude est que ces protéines sont nécessaires pour rendre l'assemblage fonctionnel. Pour parvenir à découvrir leur fonction des études biochimiques et cristallographiques ont été menées.

I.4.1 Structure de MexA

MexA est une protéine de 45 kDa dont le degré d'oligomérisation n'est pas défini. Tout d'abord intéressons-nous à la structure cristallographique de MexA [37] [38]. Cette protéine est circonscrite dans un cylindre de 110 Å de longueur et de 30 Å de large environ. Elle possède trois domaines facilement identifiables et un quatrième domaine peu structuré difficilement visible en cristallographie qui regroupe les segments N et C-terminaux (figure I.9). Ce dernier fragment est un acide palmityl c'est-à-dire un acide gras de seize atomes de carbones obtenu par une modification au niveau de l'extrémité N-terminale. Il représente l'unique partie hydrophobe de la protéine qui pourrait ancrer celle-ci à la membrane interne [39] et l'orienter.

Pour cette protéine, le premier segment identifiable est un domaine α qui clôt la partie périplasmique par une épingle à cheveux constituée de deux hélices α longues de 50 Å et formant un cylindre de 18 Å de diamètre (figure I.9). Cette zone est donc orientée vers la protéine de la membrane externe et pourrait constituer la zone d'interaction avec les hélices 7 et 8 de la porine. Cette hypothèse semble appuyée par le fait que l'angle défini

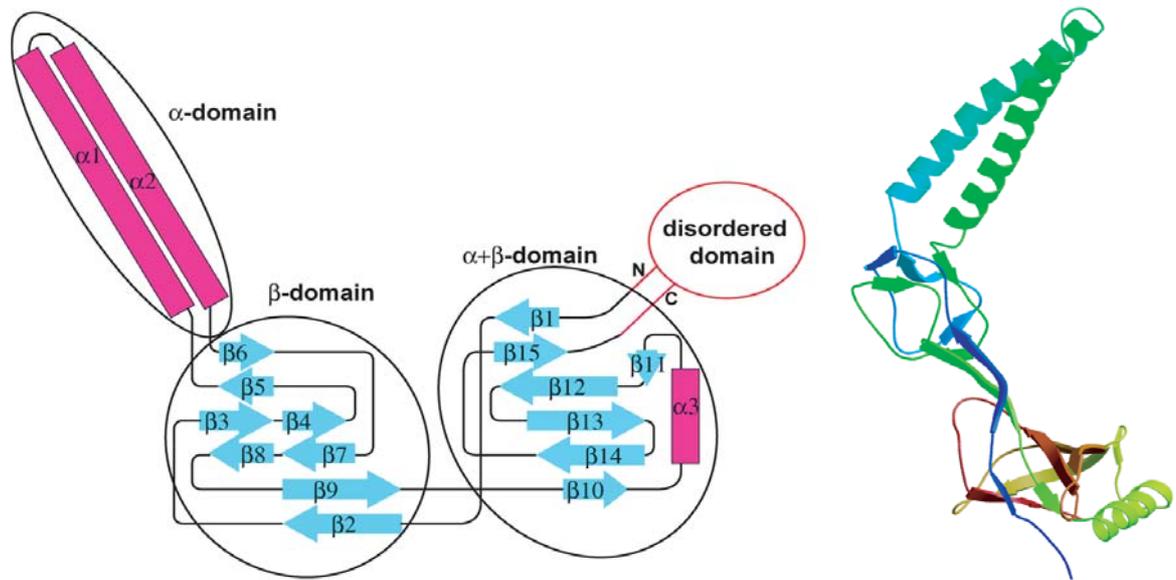


Figure I.9: Structure globale et représentation en ruban de MexA. On voit clairement apparaître le domaine coiled-coil en épingle ainsi que les autres régions globulaires moins structurées. [37]

par la pointe que dessinent les hélices α de MexA est égal à celui de l'inclinaison des hélices de OprM c'est-à-dire 20° .

Un domaine globulaire qui suit, s'inscrit dans une ellipsoïde avec des axes de $25 \times 25 \times 30 \text{ \AA}$. Cette région est constituée de huit courts feuilletts β . Elle fait un angle de 60° par rapport aux hélices α . La position relative de ces deux domaines semble pouvoir évoluer. Des simulations de dynamique moléculaire concluent à une variation de cet angle de 15° [40] sous l'effet de l'agitation thermique. Ceci confère à la protéine une élasticité puisqu'elle peut s'allonger de 25 \AA .

Un troisième domaine, lui aussi globulaire, est composé de sept courts feuilletts β et d'une petite hélice α formant une région ellipsoïdale de $35 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$ nommé domaine $\alpha + \beta$. Cette dernière région pourrait être impliquée dans l'association avec MexB [37].

Comme MexA est localisée au niveau de la membrane interne, et que la palmylation du fragment N-terminal constitue son unique partie hydrophobe, il est naturel de postuler que le domaine $\alpha + \beta$ est proche de MexB et que le domaine α est orienté vers OprM. Ces hypothèses sont étayées par des tests réalisés sur AcrA la protéine homologue de MexA chez *Escherichia coli*. Ils montrent que AcrA et AcrB ont une interaction obtenue par cross-linking [24]. Ces expériences soulignent que le segment C-terminal est important pour cette interaction par comparaison avec des chimères de cette même protéine [41]. MexA interagit donc avec les deux protéines MexB et OprM même si aucune liaison entre MexA et OprM n'a été observée.

Les différentes études cristallographiques réalisées sur MexA ont aussi lancé un débat important sur l'organisation de la pompe. En effet si la trimérisation de OprM et de MexB ne fait aucun doute, le degré d'oligomérisation de MexA reste inconnu.

I.4.2 Oligomérisation de MexA

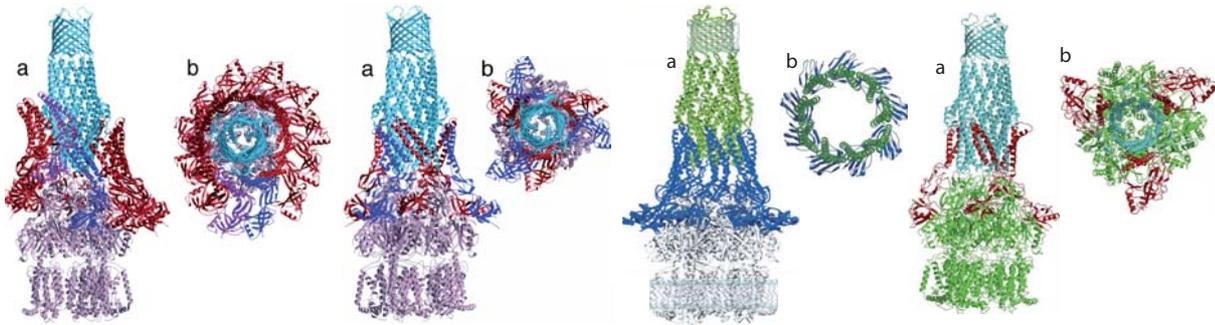


Figure I.10: Récapitulatif des différentes stœchiométries proposées dans l'assemblage MexA/B-OprM. On présente la vue de l'ensemble formé entre les deux membranes (vue a) puis celle vue autour du noyau central (vue b). Les deux premiers modèles sont proposés par [37] avec 12 et 6 MexA, le modèle suivant est celui défendu par [38] avec 9 MexA et le dernier est obtenu par [43] et met en place 3 MexA autour de la construction.

L'organisation de MexA à l'intérieur de la pompe n'est pas définie et les hypothèses sont nombreuses. Elles proposent 3, 6, 9 ou 12 MexA pour chaque pompe (figure I.10). En solution aqueuse, MexA apparaît sous une forme monomérique avec présence de dimères en faible quantité. Les premières études réalisées ont compté le nombre de protéines présentes à l'intérieur de la bactérie afin de comparer cette numération avec celles de OprM et de MexB [42]. Cette détermination a été réalisée par chimioluminescence des protéines dans une cellule sauvage : 2500, 1000 et 1200 molécules de MexA, MexB et OprM par cellules ont ainsi été relevées conduisant donc à une stœchiométrie 6:3:3. Les cristaux de MexA obtenus [37][38] présentent des structures avec 13 protéines assemblées et organisées en heptamère et hexamère joints par leurs hélices α sous la forme d'une spirale de 240 Å (figure I.11). L'hexamère a la forme d'un fer à cheval et définit un canal de 28 Å de diamètre trop petit pour permettre l'insertion de MexB mais cette structure pourrait peut-être s'élargir en présence d'une protéine au centre. L'heptamère est une structure fermée qui encercle une zone de même diamètre.

Ces structures mises en relation avec celles de OprM ou TolC, et de AcrB, ont conduit à plusieurs modèles. Le premier propose que les protéines MexA forment une sorte de manchon s'enroulant autour du canal constitué de l'assemblage MexB-OprM ce qui nécessite la présence de 12 MexA par pompe [37]. Ce modèle est toutefois considéré comme peu probable du fait des stœchiométries relevées par comptage.

Le second modèle reprend ces résultats pour proposer une organisation avec 6 MexA présents autour de la pompe. Cette proposition donne alors aux protéines périplasmiques un rôle d'interaction avec la protéine de la membrane externe grâce à des interactions entre hélices α pour chacune de ces protéines. Le reproche principal qui peut être fait à ces propositions est qu'elles n'utilisent pas les fortes interactions latérales entre monomères mises en évidence par les résultats de cristallographie, une troisième hypothèse a donc été

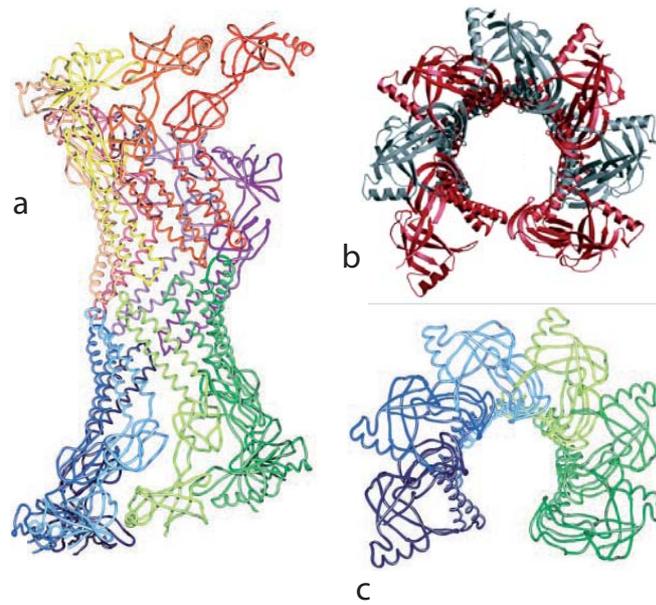


Figure I.11: Spirale de MexA constituée de 13 monomères (a). Cette structure permet d'isoler un anneau à 7 éléments (b) [37] et un autre avec 6 MexA (c) [38].

émise.

Les structures d'hexamère et d'heptamère présentes au niveau cristallographique n'existent *a priori* pas *in vivo* où l'accrochage de MexA avec la membrane interne n'autorise pas la spirale des protéines autour d'un axe. Toutefois pour tenir compte de cette propension des protéines MexA à interagir latéralement les unes avec les autres, un modèle d'anneau fermé de 9 MexA est suggéré [38] dans lequel les domaines α des protéines sont accolés pour créer un canal dont le diamètre est conciliable avec la taille de OprM et qui pourrait ainsi stabiliser la structure de la pompe ou induire l'ouverture de OprM.

Pour les pompes à efflux, on ne possède que les structures cristallographiques de MexA en ce qui concerne les protéines périplasmiques, AcrB pour les protéines de la membrane interne ainsi que OprM et TolC pour les protéines de la membrane externe. La structure cristallographique d'une pompe entière n'est pas résolue. Cependant certaines études se sont penchées sur la comparaison de structures en considérant les protéines analogues. Ainsi des simulations ont été réalisées sur des interactions entre MexA, AcrB et TolC [43]. Elles ont conduit enfin à une dernière proposition : une stœchiométrie de 3:3:3 pour chacun des éléments [43]. Cette proposition s'appuie sur des calculs d'interactions entre sites qui mettent en évidence des zones préférentielles d'interaction entre les différents éléments. Ce modèle prédit l'interaction directe des protéines des membranes internes et externes TolC et AcrB ainsi que des associations entre TolC et MexA (donc AcrA par extrapolation). Ces interactions auraient lieu entre le domaine coiled-coil de MexA et le domaine équatorial de TolC. MexA serait placée entre les hélices α du trimère à l'intérieur des fissures présentes entre chaque monomère. Ce modèle autorise l'assemblage de AcrB après le recrutement par MexA de TolC. En revanche, les interactions entre MexA et AcrB ne sont pas prises en compte. La construction est établie à partir de la liaison MexA-TolC

et soulève l'hypothèse d'une allostérie qui, une fois la pompe mise en place, amènerait à une structure stabilisatrice avec un nombre de MexA plus important.

I.5 Fonctionnement de la pompe et questions en suspens

Les protéines constitutives des pompes à efflux sont bien caractérisées par cristallographie; ces premières données, complétées par des études de mutants et de leur fonctionnalité ont démontré plusieurs points essentiels :

- Le moteur de cette pompe est constitué par la protéine de la membrane interne, MexB, qui fonctionne, d'après les résultats obtenus pour AcrB, comme un moteur à trois temps. Cette protéine extrait les antibiotiques depuis le périplasme ou depuis le cytoplasme pour les porter dans un conduit. Ce dernier est en contact probable avec la porine de la membrane externe. La force utilisée est la force proto-motrice.
- La protéine de la membrane externe est une porine définissant un canal entre périplasme et milieu externe. Ce canal est fermé par des hélices α au niveau de son segment périplasmique.
- La protéine périplasmique est liée à la membrane interne et pourrait interagir avec les deux autres entités.

Le point d'ombre le plus important concerne la protéine périplasmique puisque son rôle n'est pas identifié. Les interrogations à son sujet sont donc : combien d'éléments MexA sont-ils présents dans la pompe ? l'ancrage de cette protéine à la membrane interne a-t-il un rôle ? MexA interagit-elle directement avec MexB ou avec OprM ?

Des associations AcrA-AcrB ont été relevées [24] par cross-linking ce qui suppose une interaction directe entre MexA et MexB. En revanche, les deux autres interactions possibles sont controversées. Certaines mesures ont révélé des interactions directes entre TolC et AcrB alors que d'autres réfutent cet accrochage. De la même façon, pour les interactions entre AcrA et TolC, on peut noter des contradictions.

La première question soulevée par ce système est donc : quelles sont les interactions existantes entre les protéines de cet assemblage ?

Le mécanisme de formation de la pompe est aussi un enjeu important pour la compréhension de son fonctionnement. Plusieurs schémas sont proposés :

- Les deux protéines MexB et OprM forment un canal et MexA ne fait que consolider l'ensemble.
- MexA permet le recrutement de la protéine de la membrane externe et facilite l'accrochage de MexB.
- MexB et OprM s'accrochent et MexA vient ouvrir le canal en faisant passer OprM à l'état ouvert.

Le dernier enjeu reste la compréhension du fonctionnement de cet nano-pompe à l'intérieur de la bactérie. Cette connaissance pourrait permettre de mieux cibler des inhibiteurs potentiels afin d'améliorer l'efficacité des antibiotiques.

Chapitre II

Protéines : Expression et purification

Dans ce chapitre, nous présentons les différentes techniques de biologie moléculaire utilisées lors de cette thèse. Ce travail a été réalisé au Laboratoire de R.M.N. et Cristallographie Biologiques (Université Paris Descartes) sous la direction d'Arnaud Ducruix. Nous donnerons les résultats obtenus sur le clonage et la purification de cinq protéines. Il s'agit, d'une part, des trois protéines natives de la pompe étudiée c'est-à-dire les protéines MexA, MexB et OprM sous leur forme sauvage et, d'autre part, des deux mutants de MexA. L'une de ces protéines est nommée MexA_{signal}, elle ne possède pas de cystéine, ni de peptide signal (ce peptide permet la sécrétion de la protéine native dans le périplasme, il se clive lors du passage de la membrane). Elle a été créée afin de vérifier le rôle de l'acide palmityl dans l'accrochage à la membrane car elle ne possède pas d'ancre lipidique contrairement à la protéine MexA sous sa forme native. L'autre protéine modifiée est baptisée MexA_{CNP}. Elle possède une cystéine libre et pas de peptide signal. Elle va pouvoir réagir avec un maléimide-biotine et permettre de réaliser des expériences de Biomembrane Force Probe décrites en annexe G.

La production de protéines s'articule autour de deux axes principaux qui sont le clonage et la purification. La première étape est celle qui va permettre la construction d'un vecteur génétique codant pour la protéine d'intérêt. Au terme de cette partie, des bactéries surproduisant la protéine d'intérêt sont sélectionnées. J'ai choisi de présenter cette construction sur l'exemple du clonage de MexA_{signal}. La seconde étape est celle de la production et de la purification de la protéine surproduite qui sera décrite avec la purification d'une protéine soluble : MexA_{signal} et celle d'une protéine membranaire OprM.

II.1 Clonage

Pour faire synthétiser une protéine par une bactérie, on utilise le clonage [44]. Le clonage consiste à introduire un vecteur codant pour la protéine dans le patrimoine génétique de la bactérie.

Les plasmides sont des molécules d'ADN extra-chromosomiques qui existent dans les bactéries à l'état naturel. L'ADN plasmidique est circulaire, double brin et super-enroulé ; ce sont d'ailleurs ces propriétés qui permettront de l'isoler de l'ADN chromosomique. Ces plasmides portent souvent des gènes de résistance à un antibiotique et leur répllication à l'intérieur de la bactérie est indépendante de celle du chromosome bactérien. On utilise des plasmides comme vecteur de clonage car ils sont capables de transporter l'ADN d'intérêt et de faire en sorte qu'il soit répliqué.

L'objectif est alors de placer à l'intérieur du plasmide, un gène codant pour la protéine désirée pour construire un nouveau plasmide hybride. Une fois ce plasmide construit, il faut l'insérer dans le matériel génétique d'une bactérie afin qu'elle puisse, sous certaines conditions, surexprimer cette protéine. Les étapes de construction d'un plasmide codant pour la protéine MexA_{signal} sont résumées dans la figure II.1

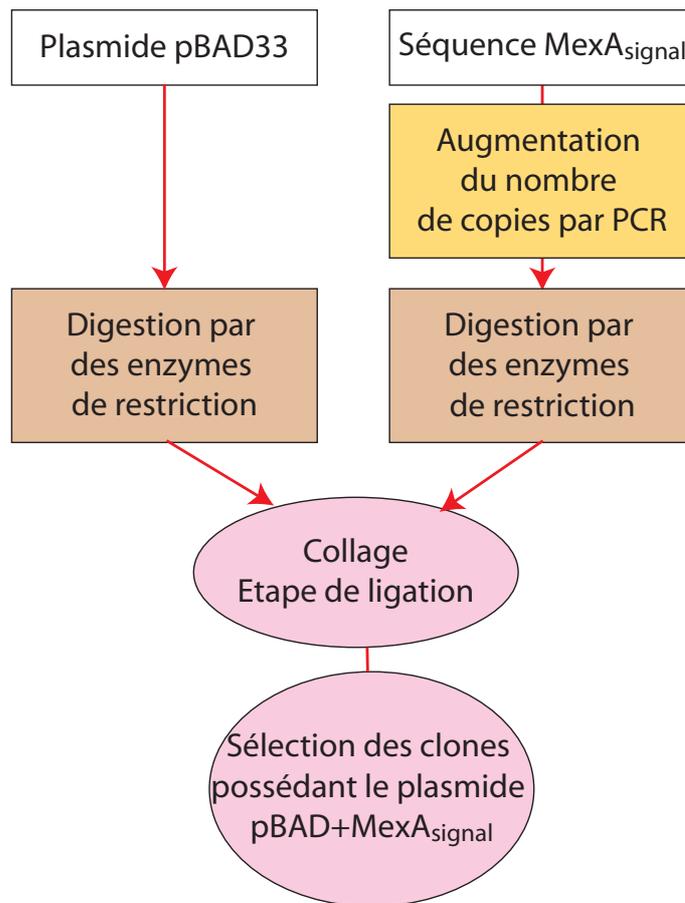


Figure II.1: Synopsis des étapes de construction d'un vecteur pour la protéine MexA_{signal} et sélection de clones.

II.1.1 Vecteur de clonage

Afin de construire le plasmide comportant la séquence de MexA_{signal}, il faut insérer cette séquence à l'intérieur d'un vecteur de clonage, c'est-à-dire un plasmide produit industriellement que nous allons modifier afin qu'il soit le vecteur de MexA_{signal}. On utilise un vecteur pBAD33 [45] (figure II.2), celui-ci est issu de la conjugaison d'un plasmide pBR322 qui appartient au patrimoine génétique de *Escherichia coli* et de phages M13 et T7 qui confèrent au plasmide des sites efficaces de recircularisation en cas d'ouverture.

Ce plasmide long de 5356 kilobases possède comme tous les vecteurs, trois régions majeures qui sont :

- une origine de réplication pour initier le processus de réplication à l'intérieur de la cellule.
- un gène de résistance aux antibiotiques afin de sélectionner les bactéries ayant incorporé le plasmide des autres bactéries. Dans notre cas, le gène de résistance est celui de la résistance au chloramphénicol, antibiotique qui se lie aux ribosomes des mitochondries et inhibe la peptidyl-transférase.

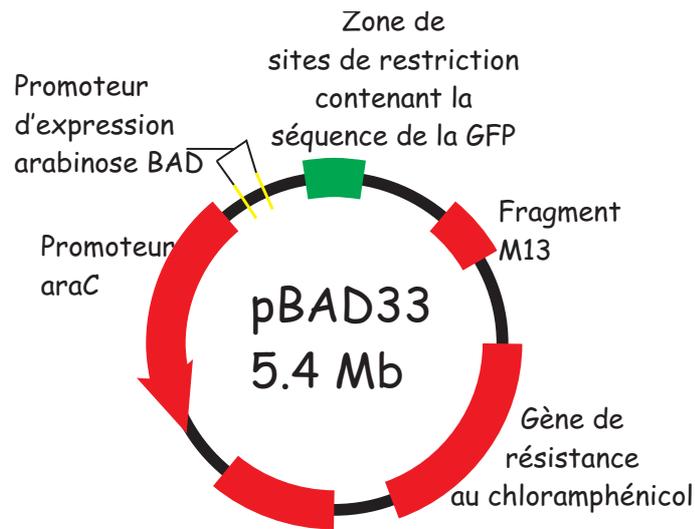


Figure II.2: Plasmide d'origine pBAD33

- un ou des sites de restriction, c'est-à-dire des sites qui pourront être coupés par des enzymes, pour insérer un fragment d'ADN. Le plasmide pBAD33 contient à ce niveau une séquence codant pour la synthèse de la protéine de fusion verte (Green Fusion Protein ou GFP). Nous allons remplacer cette séquence par l'insertion d'une séquence codant pour $MexA_{signal}$. On peut ainsi tester si l'insertion a été réalisée avec succès. Lorsque des clones posséderont un plasmide dans lequel l'échange entre insert GFP et insert $MexA_{signal}$ n'aura pas été fait, ils apparaîtront fluorescents par illumination aux UV : ils seront des clones négatifs.

On contrôle ensuite l'expression du plasmide grâce à un système de régulation qui peut activer ou inhiber la transcription. Pour le plasmide pBAD33, le système de régulation utilisé met en jeu le couple glucose-arabinose. Le glucose agit comme un répresseur alors que l'arabinose agit comme un activateur en l'absence de glucose. En effet, le plasmide contient un segment qui code pour la protéine *araC*. Celle-ci se fixe à l'ADN à proximité du promoteur pBAD et empêche la transcription des gènes de structure de l'opéron contrôlé par pBAD, en l'occurrence, la protéine à synthétiser. Cependant, la protéine *araC* peut fixer l'arabinose si celui-ci est présent dans le milieu, dans ce cas, la transcription aura lieu car l'ARN polymérase pourra se fixer sur le promoteur et initier la transcription. Ce système peut être finement régulé en jouant sur les quantités d'arabinose introduites. Sa réponse est très rapide.

II.1.2 Construction d'un insert codant pour $MexA_{signal}$

La séquence d'ADN qui va nous servir d'insert a été construite par Houssain Benabdellhak (Laboratoire de RMN et Cristallographie Biologiques, Université Paris Descartes). Cet ADN comporte la séquence codant pour $MexA_{signal}$ à laquelle on ajoute en position N-terminale un groupement de six histidines (un tag poly-histidines ou His-Tag) afin de

pouvoir purifier cette protéine ultérieurement. Ce fragment contient à ses extrémités des sites de restriction. Le choix de ces sites doit être tel qu'ils existent sur le plasmide pBAD33 afin d'autoriser l'insertion de notre insert dans le plasmide. Cet insert a été donné par le Dr Köhler (Genève).

Le nombre de copies construites est très faible, l'ADN plasmidique est donc amplifié par une réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR). Cette réaction permet d'isoler et d'augmenter le nombre de copies d'une séquence d'ADN spécifique. Ce processus s'appuie sur des enzymes de répllication : les ADN polymérases. Même si l'incorporation d'un nucléotide dans une chaîne d'ADN est énergétiquement favorable, l'ADN polymérase sert à choisir le bon nucléotide en lisant le brin complémentaire. La polymérisation se fait à partir d'oligonucléotides. Ces oligonucléotides sont de courtes séquences d'ADN simples brins qui sont des amorces pour la séquence à amplifier.

En pratique, le protocole expérimental est le suivant. On ajoute au fragment d'ADN à amplifier des oligonucléotides hybridant sur chacun des deux brins de l'ADN (ils vont initier la construction de la copie), ainsi qu'une polymérase (cette enzyme va permettre de construire les segments complémentaires d'ADN à partir d'une amorce) et quatre bases ADN (A, T, C, G). La réaction se déroule en plusieurs cycles. Le tube réactionnel est chauffé à 95°C pendant 15 minutes pour le premier cycle puis pendant 1 minute pour les suivants, le chauffage sépare les deux brins (figure II.3) : c'est la dénaturation. Lors du premier cycle, il s'agit de dénaturer l'ADN surenroulé, la réaction est donc plus lente. Pour les cycles suivants, la renaturation n'a été que partielle donc le temps pour séparer les deux brins est moins important.

La température est ensuite baissée au-dessous de la température de fusion de l'ADN à 45°C ou à 58°C selon le cycle réalisé. Cette étape permet aux nucléotides de s'hybrider à l'ADN sur les sites reconnus (figure II.3). Le phénomène d'hybridation dépend de la concentration. La concentration en oligonucléotides ($\simeq 1\mu\text{M}$) est beaucoup plus élevée que celle en ADN, l'hybridation se fait en majorité entre oligonucléotide et ADN alors que l'hybridation de l'ADN n'a pas lieu. Toutefois pour les 5 premiers cycles, on se place à 45°C quand on réalise cette étape car le nombre d'oligonucléotides par rapport au nombre de molécules d'ADN est très grand. Lors des 21 cycles suivants, la température est fixée à 58°C. Cette élévation permet de favoriser l'hybridation avec les oligonucléotides même si le nombre de copies d'ADN commence à devenir plus important. La spécificité des oligonucléotides est l'élément essentiel qui régit leur conception. Pour un génome bactérien, la longueur minimale assurant une bonne spécificité est de 16 nucléotides, aussi les oligonucléotides choisis comportent-ils entre 20 et 25 nucléotides appariés spécifiques du gène à cloner. En outre, ils ont été conçus afin de pouvoir introduire des sites de restriction à chaque extrémité du fragment obtenu par PCR. Ces sites sont des séquences qui peuvent être reconnues par certaines enzymes. Pour faciliter l'hybridation, on ajoute des ions magnésium. Ces derniers vont se lier aux groupements chargés négativement comme les groupements phosphates du squelette et ainsi diminuer les forces de répulsion entre l'amorce et la matrice.

La température est ensuite élevée à 72°C, température de fonctionnement de la polymérase qui est une enzyme de répllication de l'ADN. Nous utilisons une ADN polymérase thermostable : la Taq ADN polymérase dont le taux d'erreur est d'environ 10^{-4} par base dupliquée et dont la vitesse de synthèse est de 1000 bases par minute. L'utilisation d'une

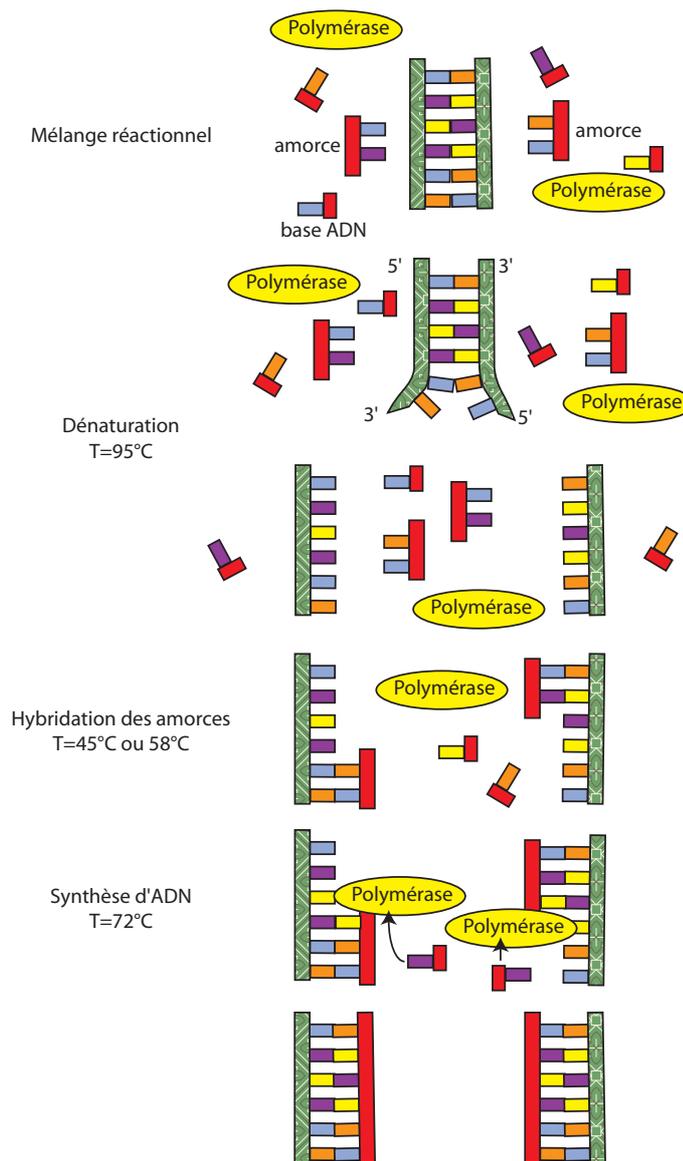


Figure II.3: Principe de la réaction de polymérisation en chaîne. Lors de chaque cycle, les étapes sont la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. A chaque cycle, le nombre de copies est multiplié par 2.

polymérase thermostable permet de l'introduire dès le début de l'expérience sans qu'elle soit dénaturée par le chauffage lors de l'étape de séparation des brins. La synthèse et l'incorporation des nucléotides ont lieu pour conduire à la fabrication d'un nouveau brin d'ADN (figure II.3) qui va lui-même pouvoir servir de matrice lors d'un nouveau cycle. Le temps d'élongation dépend de la longueur du fragment à amplifier. Dans notre expérience, il est choisi égal à 1 minute et cinquante secondes car notre fragment est long de 1500 bases. Lors du dernier cycle, ce temps est augmenté à 10 minutes afin de terminer l'élongation des fragments. En effectuant 26 cycles de 4 minutes chacun, on atteint un nombre de copies de $2^{26} = 6 \cdot 10^7$ par brin d'ADN initial.

Les fragments de PCR sont alors purifiés grâce à un kit Qiagen (QIAquick PCR purification kit) afin de les séparer des nucléotides libres. On fait migrer le mélange sur des colonnes de chromatographie composées de billes de silice de telle sorte que les molécules soient séparées par taille moléculaire. Les lavages s'effectuent avec de l'éthanol à 70%. Les fragments d'ADN sont séchés puis repris dans un tampon d'éluion (Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 1mM).

Afin de quantifier les fragments obtenus ainsi que leur pureté, on réalise une électrophorèse. Cette opération consiste à faire migrer des molécules dans un gel sous l'action d'un champ électrique. Suivant la taille des molécules, l'amplitude de la migration est différente. On peut ainsi séparer les différents acides nucléiques. A pH neutre ou basique, les acides nucléiques sont chargés négativement et migrent vers l'anode. Le tampon de migration utilisé est un tampon de TBE. La migration s'effectue sur des gels réticulés d'agarose à 1% qui sont peu résolutifs mais permettent une analyse de molécules de taille très différentes. Les acides nucléiques sont ensuite détectés par incorporation de bromure d'éthidium (ou BET) à l'intérieur du gel. Cet intercalant des acides nucléiques fluoresce sous UV (figure II.4).

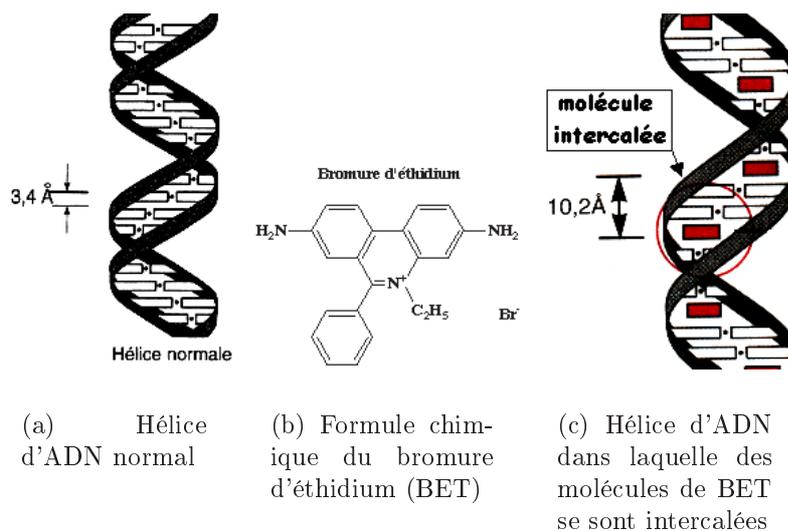
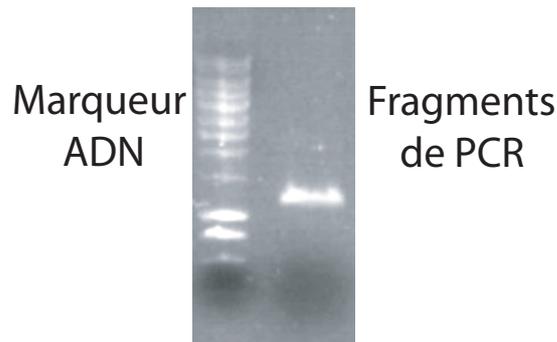


Figure II.4: Insertion de molécules de BET à l'intérieur des hélices d'ADN, la présence de cet agent intercalant augmente le pas de l'hélice.

On va pouvoir repérer la présence du fragment recherché et d'éventuels produits de PCR contaminants. On peut aussi définir leurs tailles par comparaison avec un marqueur d'ADN comportant des échantillons de tailles variées (le seuil de détection est de 1 ng d'ADN). En outre, l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN, ce qui permet de mesurer les quantités d'ADN produites. Dans le cas de MexA_{signal} (figure II.5), les quantités d'ADN obtenues sont de 60 ng/ μ L par comparaison avec les quantités d'échantillons sur l'échelle de marquage.

Le fragment d'ADN plasmidique ainsi que le plasmide dans lequel on doit placer l'insert



(a) Analyse des fragments issus de la PCR après purification



(b) Analyse des fragments après digestion

Figure II.5: Analyse de l'insert dupliqué par PCR et digéré par les enzymes NdeI et XbaI. On peut voir que l'ADN plasmidique est pur, on ne relève pas de présence de contaminant. En outre le segment qui doit faire 1170 paires de bases migre à la bonne taille par comparaison avec l'échelle de poids moléculaire. La comparaison avec les intensités portées par chacun des marqueurs conduit à une concentration en ADN de 60 ng/ μ L après la PCR et de 50 ng/ μ L après digestion.

doivent ensuite être digérés par des enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont des molécules qui coupent l'ADN au niveau ou à proximité d'un site spécifique qui peut être placé au milieu du polymère. Elles reconnaissent certaines séquences et libèrent deux fragments : l'un se terminant par un 3' OH et l'autre par un 5' phosphate. Les fragments vont ainsi présenter des coupures spécifiques identiques qui pourront être appariées de manière complémentaire car on utilise des enzymes qui produisent des bouts complémentaires en laissant des petits morceaux d'ADN simple brin aux extrémités. Cette étape va autoriser dans un second temps, la recombinaison de l'insert dans le plasmide pBAD33. La coupure est spécifique, les fragments de restriction issus de l'insert et du plasmide pBAD33 pourront être "réappariés" car leurs extrémités sont compatibles. En

outre, ils sont choisis de telle sorte que la ligation ne soit pas possible entre ces deux sites de manière à éviter toute fermeture du plasmide sur lui-même. Les enzymes de restriction que nous avons utilisés, sont les enzymes NdeI et XbaI. NdeI possède la cible CA/TATG (le caractère / désigne le site de coupure) et XbaI le site de restriction T/CTAGA. Ces deux coupures ne peuvent pas être recollées ensemble.

Les enzymes de restriction reconnaissent 4, 6 ou 8 bases (dans notre cas 6 bases). La fréquence de reconnaissance sera d'autant plus faible que le nombre de bases à reconnaître est élevé : une enzyme reconnaissant 4 bases coupera toutes les $4^4 = 256$ bases en moyenne, une enzyme reconnaissant 6 bases comme celles qui ont été choisies, toutes les 4096 bases et une enzyme reconnaissant pour 8 bases toutes les 65536 bases. Ainsi pour un fragment d'ADN ayant 1170 paires de bases comme notre insert, on obtient une seule bande bien individualisée après séparation sur un gel d'électrophorèse (figure II.5).

On réalise la digestion des fragments de PCR en mélangeant ceux-ci avec un tampon, de l'albumine de sérum bovin (ou BSA) et les enzymes NdeI et XbaI puis en laissant le mélange au repos 2 heures. Les enzymes sont alors inactivées par chauffage à 65°C pendant 15 minutes. Les fragments obtenus sont à nouveau purifiés sur colonne Qiagen afin de séparer les acides nucléiques des enzymes et de la BSA.

Une étape identique est réalisée pour le plasmide pBAD33. Les deux coupures vont avoir lieu au niveau de la zone comportant les sites de restriction et la séquence codant pour la GFP. On va ainsi obtenir deux fragments d'ADN : l'un qui est le plasmide coupé que l'on va isoler, l'autre qui comprend l'insert de GFP que nous allons éliminer grâce à une colonne. Comme son poids moléculaire est plus faible que le vecteur lui-même, ces deux objets seront séparés sur la colonne.

Les quantités d'insert et de plasmide sont ensuite évaluées sur gel par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire (figure II.5).

II.1.3 Construction d'un vecteur de clonage

La dernière étape est la ligation de l'insert et de son plasmide. Ces deux fragments d'ADN possèdent à ce stade des extrémités de séquence complémentaires, on utilise donc certaines enzymes, les ligases, afin de souder les morceaux obtenus. Ces enzymes fonctionnent grâce à l'ATP et rétablissent les liaisons phosphodiester covalentes sur des molécules d'ADN double brin. Cette étape a lieu à 18°C pendant une nuit (figure II.6).

L'ADN plasmidique est alors purifié par la méthode d'extraction éthanolique. La précipitation des polymères d'acides nucléiques s'effectue par l'addition d'un sel monovalent (l'acétate de sodium pH 5.2) et d'éthanol. Les sels détruisent les liaisons entre les nucléotides et l'eau qui les solvate. Les sels d'acide nucléiques obtenus sont insolubles dans l'alcool et précipitent donc. La réaction a lieu pendant 20 minutes à -80°C . On centrifuge ensuite pendant 45 secondes à 13 000 g puis on ôte le surnageant. Le précipité de sels d'acides nucléiques est lavé deux fois avec de l'éthanol 70% (v/v), puis il est isolé grâce à des centrifugations de 20 minutes à 13 000 g. Enfin le précipité est séché sous évaporateur rotatif pour éliminer l'éthanol. A ce stade, un petit trouble est visible sur les tubes. Enfin les sels précipités sont resuspendus dans 10 μL d'eau stérilisée.

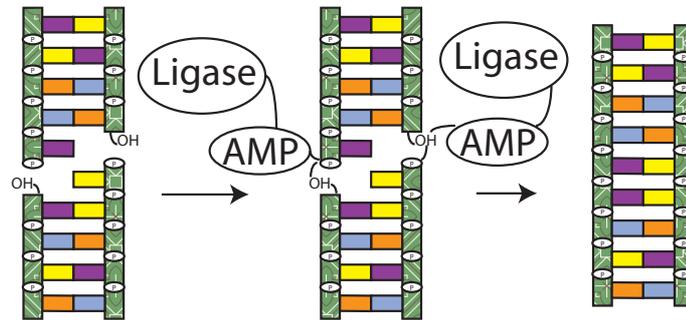


Figure II.6: Principe de la ligation de deux brins d'ADN coupés par une même enzyme de restriction.

Nous avons donc un plasmide pBAD qui peut posséder en insert :

- le fragment d'ADN codant pour MexA_{signal}.
- le fragment GFP initial si la coupure par l'enzyme ne s'est pas faite ou si ce fragment n'a pas pu être séparé par chromatographie.
- un autre plasmide pBAD si deux plasmides ont été accolés.

Afin de sélectionner les bons plasmides recombinants il faut donc avoir recours à une sélection de colonies.

II.1.4 Sélection de clones

Cette sélection consiste en l'injection dans des bactéries compétentes du ou des plasmides obtenus. Le premier test sera de déceler la production de GFP. Les clones qui la synthétisent sont éliminés. Le second test vérifie la présence de l'insert.

La souche d'*Escherichia coli* utilisée est une souche DH5 α . A l'intérieur des bactéries est mis en place un système de protection de leur ADN. Ce système repose sur une activité méthylase ; l'ADN "étranger" est reconnu et subit une méthylation. Ce mécanisme permet ainsi aux bactéries de se défendre contre une infection par des bactériophages. Dans la souche DH5 α , ce phénomène est absent. On choisit donc cette souche pour souche crible. En outre, cette souche permet de réaliser une α -complémentation : en présence du plasmide, les colonies paraîtront donc blanches alors qu'elles seraient bleues dans le cas où aucun plasmide ne serait inséré. On peut donc sélectionner immédiatement les bactéries contenant le plasmide.

Pour effectuer le criblage, il faut tout d'abord injecter l'ADN plasmidique dans les bactéries, c'est la transformation. On effectue cette transformation par électroporation. Le plasmide est mélangé dans les tubes de DH5 α (2 μ L de plasmide pour 100 μ L de bactéries). Un échantillon de 90 μ L est transféré dans des cuves de 2 mm d'épaisseur

(Gene Pulser BioRad). On lui applique une différence de potentiel de 2.5 kV ce qui conduit à des champs de l'ordre de 10^6 V.m^{-1} . Ce choc électrique va ouvrir des pores à l'intérieur de la membrane de la bactérie, perméabiliser transitoirement la membrane des cellules et permettre l'entrée du plasmide. Les quantités d'ADN plasmidique utilisées sont inférieures aux quantités de cellules car il ne faut avoir au plus qu'une seule copie par bactérie. L'efficacité de cette technique est de l'ordre de 10^8 bactéries transformées par μg d'ADN. Les bactéries sont ensuite placées dans un milieu de culture riche le LB (ou Luria Bertani) composé de Bacto-tryptone 10 g.L^{-1} , d'extraits de levure 5 g.L^{-1} , NaCl 10 g.L^{-1} . Elles sont laissées en incubateur à 37°C pendant 1 heure.

Il faut ensuite tester ces bactéries que l'on étale sous conditions stériles sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB en présence de chloramphénicol afin d'éviter toute contamination et pour ne conserver que les bactéries DH5 α transformées par le plasmide qui leur confère une résistance à cet antibiotique. Après une journée de croissance de bactéries, on repique les colonies présentes sur deux boîtes de Pétri possédant des emplacements numérotés : l'une contient du milieu LB en présence de chloramphénicol, l'autre du milieu LB en présence de chloramphénicol et d'arabinose (0.02%), le promoteur utilisé dans notre plasmide. Cette seconde condition est une condition d'induction. On a donc deux boîtes contenant le même échantillon de colonies mais sous deux conditions différentes. Au terme de cette croissance, on observe les différentes colonies obtenues par croissance sur la seconde boîte de Pétri sous une lumière UV. Aucune de nos colonies ne fluoresce ce qui signifie que ces colonies possèdent soit le plasmide recombinant de MexA_{signal}, soit un plasmide refermé sur un autre, ... mais aucune ne contient l'insert GFP initial du plasmide pBAD33.

Afin de discriminer ces possibilités, il faut tester la présence de l'insert, on réalise donc une PCR sur colonie. Trois colonies sont sélectionnées pour un premier test. Elles sont prélevées à partir de la boîte de Pétri sans condition d'induction, resuspendues dans de l'eau puis mises en présence d'oligonucléotides. La procédure de PCR est ensuite lancée. L'analyse sur gel d'agarose des prélèvements effectués fournit trois résultats positifs. Les plasmides semblent donc être présents dans ces trois colonies.

Un second test de confirmation est le test de digestion de l'ADN plasmidique. L'ADN plasmidique est extrait des bactéries en suivant le protocole des kits Nucleospin qui repose sur le principe de la lyse alcaline. Les bactéries sont cultivées en milieu LB en présence de chloramphénicol puis sont collectées par centrifugation. Elles sont resuspendues dans une solution qui contient des RNases (Tris-HCl 25mM pH8, EDTA 25mM, RNase sans DNase $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). La lyse des bactéries est provoquée par l'ajout de sodium dodécylsulfate (SDS). L'addition de soude dénature les ADN tant plasmidiques que chromosomiques. Après réaction, on ajoute une solution d'acétate de potassium 3M qui va neutraliser le mélange et permettre la renaturation rapide de l'ADN alors que les protéines précipitent. ADN et protéines sont séparés. L'ADN plasmidique surenroulé renaturé reste soluble alors que l'ADN chromosomique partiellement renaturé est entraîné avec les protéines lors de la centrifugation. Le surnageant est alors placé sur colonne. L'ADN va s'accrocher à la résine de silice. On lui fait subir trois lavages avant de sécher la membrane et de faire l'élution de l'ADN plasmidique.

L'ADN est ensuite digéré par une enzyme. Nous avons choisi l'enzyme RsaI car elle

coupe 5 fois le plasmide recombinant de MexA_{signal} pour donner des fragments de 2824, 1863, 1234, 538 et 17 bases alors qu'elle coupe 7 fois le plasmide pBAD33 pour donner des fragments de 2055, 1863, 1184, 538, 306, 149 et 17 bases. La comparaison entre les coupures obtenues pour pBAD33 directement et pour le plasmide supposé de MexA_{signal} extrait des bactéries confirme la présence du plasmide contenant MexA_{signal}. La différence est visible au niveau du premier fragment.

Ainsi on possède désormais de l'ADN plasmidique recombinant qui permet de coder pour la production de MexA_{signal}.

La dernière étape est alors l'insertion du plasmide dans une souche compétente C43 [46]. Cette souche est sélectionnée car elle autorise la surproduction de protéines membranaires toxiques comme celle des pompes à efflux. On réalise la transformation par électroporation de cette bactérie à partir de l'ADN plasmidique obtenu par purification des colonies positives.

II.2 Préparation d'extraits protéiques chez

A ce stade, nous disposons de colonies de bactéries qui possèdent le matériel génétique nécessaire à la production de la protéine MexA_{signal}. La seconde étape de la synthèse protéique est la production au sein de la bactérie clone de la protéine d'intérêt. Le plasmide inséré est sous le contrôle d'un activateur de la synthèse. L'inducteur arabinose va initier la surexpression de la protéine MexA_{signal}. Il va falloir vérifier que la surexpression a bien lieu c'est-à-dire que le plasmide inséré est lu. D'autre part, nous allons devoir isoler cette protéine avant la purification.

II.2.1 Surexpression

Les bactéries sont tout d'abord cultivées dans un milieu de culture riche : le LB en présence de chloramphénicol à 37°C ou à 40°C dans les conditions optimales de croissance pour *Escherichia coli*. Le volume de culture désiré (généralement de l'ordre de 3 à 5 litres) estensemencé à partir d'une préculture faite sur un petit volume (200 mL) pendant la nuit. Lorsque les bactéries sont en phase stationnaire de croissance, c'est-à-dire pour une concentration bactérienne correspondant à une absorbance de 2 à 600 nm, l'expression des protéines recombinantes est induite par addition d'arabinose (la concentration finale en arabinose est de 4 mM). La surproduction a alors lieu pendant trois heures à 37°C.

Si la protéine est hautement toxique pour la bactérie, comme c'est le cas de MexB, on arrête la croissance bactérienne en milieu de phase exponentielle à une absorbance à 600 nm de 0.6 par refroidissement 15 minutes dans la glace. On procède ensuite à l'induction mais à la température de 25°C afin de diminuer les risques de dénaturation de la protéine et en présence d'éthanol.

II.2.2 Obtention d'extraits

Les bactéries sont collectées par centrifugation (6000 g, 10 min., 4°C). Afin d'éliminer les protéases excrétées, les culots bactériens sont rincés deux fois dans le tampon A (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, glycérol 10%), et peuvent ensuite être conservés à -80°C. Les bactéries sont resuspendues dans le tampon A auquel on ajoute des protéases et des ions magnésium. La lyse est réalisée par passages successifs à la French Press (10000 Psi, Power Laboratory Press; American Instrument). Les bactéries subissent une pression très forte qui vient rompre leurs membranes notamment aux points faibles que constituent les porines. Cette technique est préférée à la sonication qui dénature souvent les protéines membranaires. Les bactéries non lysées sont éliminées par centrifugation (10 min., 6000 g, 4°C).

A ce niveau, on récupère après centrifugation (14000g, 30 min., 4°C) sur centrifugeuse Beckman, le surnageant qui contient les protéines solubles mais aussi les protéines membranaires protégées par une sorte de bouée de lipides arrachés à la membrane.

II.2.3 Vérification de la surexpression

L'induction de la production protéique est vérifiée sur un gel électrophorétique en conditions dénaturantes (ou SDS-PAGE). L'électrophorèse sépare des molécules chargées sous l'effet d'un champ électrique à travers un gel. Les gels de protéines ont pour but de séparer les protéines selon leur masse moléculaire. Il faut donc préparer les protéines de telle sorte que ces dernières soient chargées pour migrer sous l'action d'un champ électrique et il faut que cette charge soit proportionnelle à la masse moléculaire de l'objet.

Pour cela, l'échantillon est réalisé en mélangeant une fraction de la solution d'intérêt avec du β -mercaptoéthanol, celui-ci réduit les ponts disulfures à l'intérieur de la protéine. Puis on ajoute du sodium dodécylsulfate ou SDS qui est un détergent anionique fort. Ce détergent va entourer les chaînes polypeptidiques de charges négatives : une molécule de SDS s'associe à un acide aminé sur deux en moyenne. Le SDS va finalement masquer la charge effective de la protéine qui va avoir une charge négative proportionnelle à sa masse moléculaire. On ajoute aussi du bleu de bromophénol comme marqueur de la distance de migration dans le gel.

La phase stationnaire est un gel réticulé d'acrylamide organisé en chaînes pontées par du bi-acrylamide. Cette réaction est initiée par des radicaux libres fournis par le persulfate d'ammonium et catalysée par un agent réticulant, le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane). Le pourcentage d'acrylamide contrôle la densité du maillage. Selon le poids moléculaire des protéines à étudier, on utilise donc des gels avec un pourcentage différent d'acrylamide (tableau II.1). Les échantillons protéiques sont placés dans les puits d'un gel plus dense (20%) appelé stacking gel permettant d'augmenter la résolution en amincissant la largeur de la bande correspondant à l'extrait. Le gel est ensuite placé dans une cuve électrophorétique (figure II.7) pour la migration des espèces sous un champ constant contrôlé par un générateur de courant (courant fixé à 25 mA par gel). La cuve est remplie d'un tampon contenant du SDS. Lorsque le bleu de bromophénol sort du gel, on arrête la migration.

Pourcentage d'acrylamide	Poids Moléculaire des protéines à séparer (kDa)
7.5	45-400
10	22-300
12	13-200
15	2.5-100

Tableau II.1: Gamme d'utilisation des gels d'acrylamide en fonction des objets à séparer

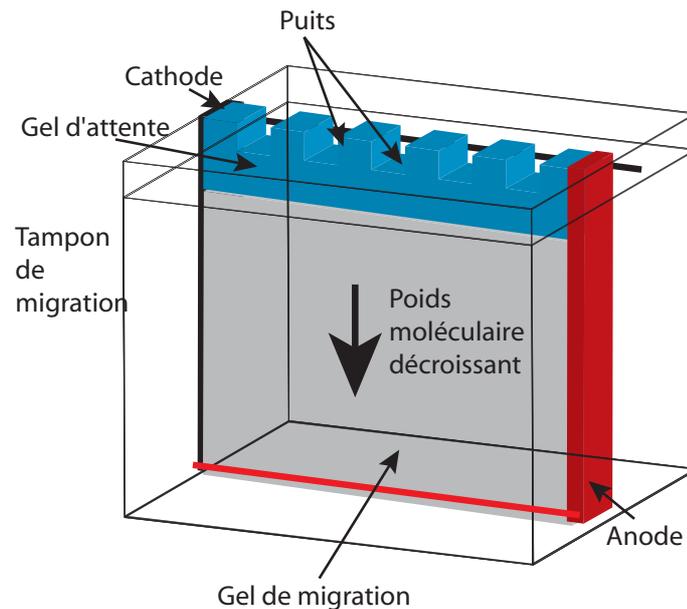


Figure II.7: Réalisation d'un gel protéique afin de séparer les protéines par poids moléculaire.

Les gels sont alors révélés par du bleu de Comassie, un colorant organique qui se fixe sur les protéines par adsorption.

Pour cette étape, les extraits obtenus à partir de la bactérie avant et après induction sont comparés (pistes 2 et 3 de la figure II.8). La surexpression est effective, on remarque une différence entre les deux échantillons : celui correspondant à l'induction présente une bande importante en dessous du marqueur correspondant à 45 kDa. Or, l'objet recherché MexA_{signal} a un poids moléculaire de 41 kDa. De plus, cette bande est absente de l'extrait obtenu sur bactérie avant induction. Les résultats obtenus pour MexA (figure II.8) et OprM (figure II.11) sont identiques. Toutefois il faut remarquer que pour les protéines membranaires, la surexpression est moindre. Ceci tient au fait que les protéines membranaires sont souvent surproduites avec un plus faible rendement. D'autre part, ces protéines sont toujours entourées d'importants segments de membranes, elles sont souvent moins visibles après coloration.

A ce stade, nous avons donc des clones capables de surproduire une protéine d'intérêt. La dernière étape est alors celle de la purification des protéines qui diffère selon que l'on

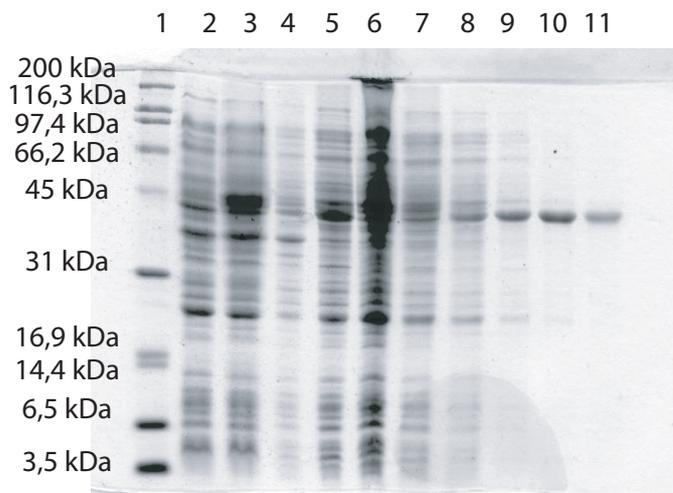


Figure II.8: Gel récapitulatif de la purification de *MexA_{signal}*. Les pistes d'électrophorèse représentent respectivement 1: Marqueur protéique, 2: Echantillon de C43 non induit 3: Echantillon de C43 après induction par l'arabinose 4: Fraction insoluble 5: Fraction soluble dans le β -OG 6: Fraction non fixée sur la colonne 7: Lavage à 10mM en Imidazole 8: Fractions correspondant à une élution de 30 mM en Imidazole, 9: Fractions correspondant à une élution à 50 mM en Imidazole, 10: Fractions correspondant à une élution à 100 mM en Imidazole, 11: Fractions correspondant à une élution à 400 mM en Imidazole.

s'intéresse à des protéines solubles ou insolubles.

II.3 Purification d'une protéine soluble : MexA signal

L'exemple des protéines solubles va permettre d'introduire la technique de purification des protéines. En ce qui concerne les protéines membranaires, le déroulement sera le même mais la solubilisation sera à considérer.

La protéine mutante *MexA_{signal}* est une protéine soluble puisqu'elle ne possède aucun segment hydrophobe.

II.3.1 Vérification de la solubilité

L'étape préliminaire est de vérifier la solubilité de cette protéine. En effet, certaines protéines sans segment hydrophobe sont parfois insolubles. Une ultracentrifugation est réalisée pendant une heure à 4°C à 150 000 g afin de séparer la fraction soluble de la fraction insoluble. Le surnageant est recueilli puis analysé sur gel. Il est comparé à l'échantillon obtenu à partir de l'extrait insoluble de façon à repérer la protéine. La bande identifiée comme étant celle de la protéine est bien présente dans la fraction soluble (figure II.8, piste 5) mais légèrement décalée vers les poids moléculaires plus faibles. Nous avons donc

réalisé un séquençage de la protéine afin de vérifier qu'elle n'était pas dénaturée.

MexA_{signal} est ainsi présente dans un cocktail protéique contenant des protéines solubles avec des tailles très variables. La protéine MexA_{signal} a été construite avec un marquage moléculaire poly-histidines en position C-terminale. Or les histidines sont des acides aminés contenant un groupe imidazole qui possède une forte affinité pour les ions métalliques divalents comme Ni²⁺ ou Co²⁺. Nous allons utiliser cette étiquette histidine afin de séparer notre protéine des autres. En effet, la protéine d'intérêt va se fixer sur les billes fonctionnalisées avec du Nickel qui compose la colonne alors que la plupart des autres protéines ne sera pas retenue. L'élution va ensuite jouer sur la compétition de ces liaisons avec de l'imidazole. Cette molécule va peu à peu remplacer les protéines liées aux billes de Nickel par ordre croissant d'affinité. Cette technique va éliminer les protéines qui contiennent des groupes imidazoles et séparer ainsi la protéine d'intérêt des autres qui manifestent pour le Nickel une affinité moins forte.

II.3.2 Préparation de la colonne d'affinité

Nous avons utilisé une colonne de chromatographie liquide à haute performance (ou HPLC) avec une résine d'affinité Nickel (Fast flow Sepharose-Amersham). Cette technique utilise comme support des particules de faible diamètre. Ceci augmente son pouvoir de séparation mais, parallèlement, cette diminution de la taille des grains qui constituent la phase stationnaire conduit à une pression d'élution plus élevée. La présence d'un module de commande pour contrôler les pompes, la pression à l'intérieur de la colonne ainsi que la température est alors nécessaire. Cette technique offre la possibilité de travailler avec une faible quantité d'échantillon et possède une extrême sensibilité ainsi qu'un grand pouvoir séparateur.

Une colonne d'affinité est composée d'un volume de billes fonctionnalisées avec du Nickel et délimitée par un tube en verre pouvant supporter de hautes pressions ainsi que par deux disques de délimitation dont la position est ajustable (figure II.9). La colonne est préparée en introduisant une solution contenant le volume requis (20-25 mL) de billes fonctionnalisées avec du Nickel ou du Cobalt dispersées dans un solvant de même densité. On utilise alors les pompes afin de faire circuler à l'intérieur de la colonne le solvant sous une pression de quelques bars pour tasser les grains. Le disque de la partie supérieure est descendu au fur et à mesure en évitant de créer des bulles d'air qui empêcheraient l'écoulement.

Il faut équilibrer la colonne de façon à charger ensuite l'échantillon. Le tampon d'équilibration est le tampon dans lequel on souhaite obtenir les protéines auquel on ajoute 20 mM en imidazole. Cette quantité d'imidazole permet d'éviter lors du chargement les associations non spécifiques avec la matrice de billes de nickel. On utilise donc la solution S2 (5% glycérol, 100 mM NaCl, 50 mM tampon phosphate de sodium).

II.3.3 Chargement et collection des protéines

L'extrait protéique soluble précédemment obtenu est alors chargé dans la colonne. La partie non fixée sur la colonne est conservée pour analyse (figure II.8, piste 6). On procède

ensuite à un lavage avec la même solution sur deux volumes de colonne de manière à éliminer les protéines qui interagissent de façon non spécifique avec la matrice (figure II.8, piste 6).

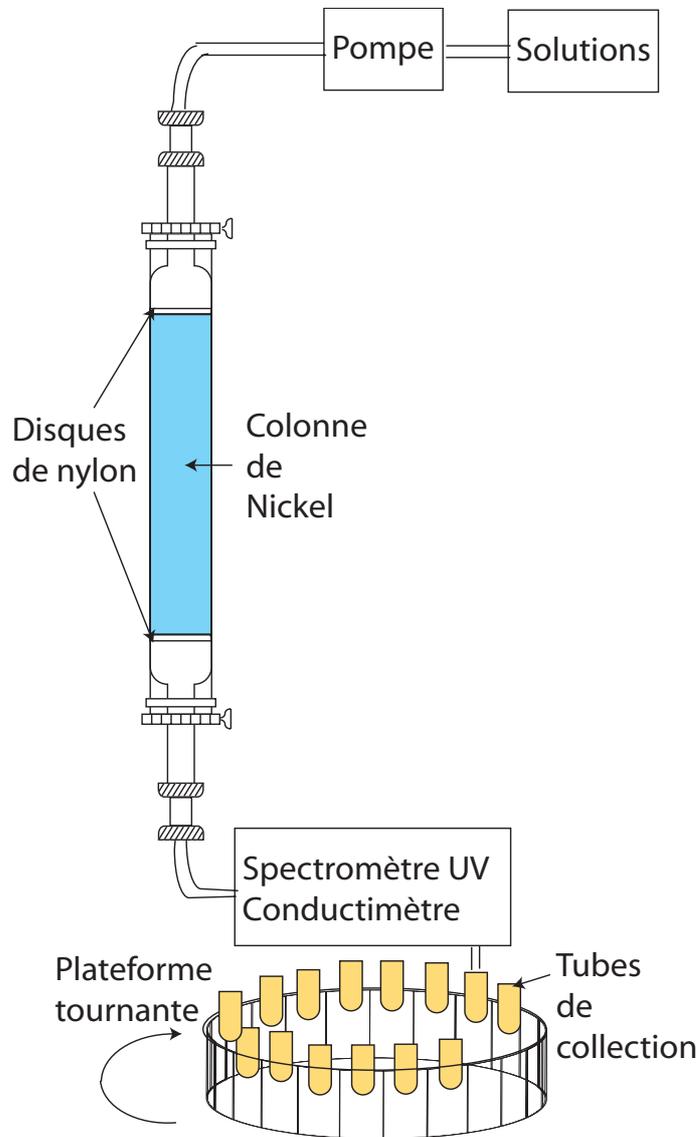


Figure II.9: Colonne d'affinité dans un système de chromatographie liquide haute performance. Les pompes permettent de faire passer avec une pression élevée les différentes solutions d'équilibration, de chargement de l'échantillon, de lavage et d'éluion. Les fractions sont collectées en sortie après un système de détection UV qui met en évidence les pics dus au passage de protéines.

L'éluion commence alors en créant un gradient d'imidazole entre 20 mM et 400 mM. On surveille l'éluion des protéines au moyen d'un spectromètre ultraviolet (figure II.9)

qui va détecter la présence d'éventuelles protéines avant collection. En ce qui concerne MexA_{signal}, on peut facilement repérer des pics qui s'étalent entre des concentrations en imidazole de 50 et 200 mM. Les fractions correspondantes aux pics sont ensuite analysées

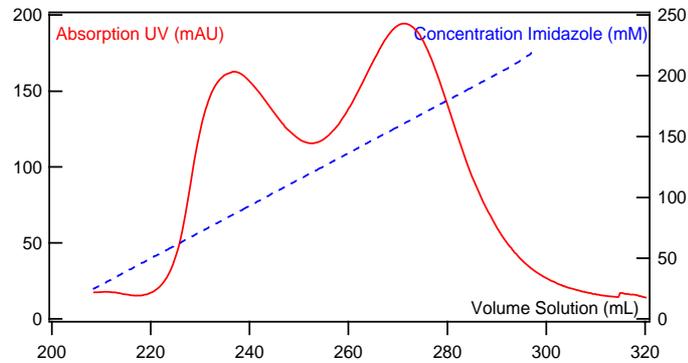


Figure II.10: Courbe d'absorption ultra-violet à la sortie du spectromètre pour l'élution de la protéine MexA_{signal}. La droite montante représente la concentration en imidazole.

pour vérifier la présence de la protéine et connaître sa pureté. Pour ce faire, on précipite avec du sulfate d'ammonium une quantité de 1 ng de protéine. Le précipité est séché et resuspendu dans le tampon d'analyse. On peut constater sur le gel (figure II.8) que la protéine est presque pure notamment dans les fractions du second pic. Seuls des contaminants de plus faibles poids moléculaires demeurent. Ils pourront donc être éliminés par concentration s'ils sont inférieurs au seuil des concentrateurs.

II.3.4 Concentration

Cette dernière étape permet d'éliminer encore quelques contaminants ainsi que l'imidazole qui serait gênante dans nos expériences mais aussi d'augmenter la concentration de la protéine. On utilise des concentrateurs Centricon dont la membrane possède un seuil de poids moléculaire à 30 kDa. Le concentrateur est équilibré avec la solution contenant le tampon final désiré c'est-à-dire la solution S2 (glycérol 5% (v/v), 100mM NaCl, 50mM tampon phosphate de sodium pH 7.5). Puis on charge l'échantillon sur ces colonnes jusqu'à obtenir une concentration augmentée d'un facteur 25. L'échantillon ainsi obtenu est lavé trois fois avec la solution tampon afin de diminuer la concentration en imidazole jusqu'à une valeur inférieure à 80 μ M. La solution finale a une concentration de 150 μ M en protéine.

II.4 Purification d'une protéine membranaire : OprM

Pour les protéines membranaires qui possèdent un segment hydrophobe, la question clef reste la solubilisation dans un détergent. Les principaux détergents utilisés sont le β -octylglucoside (ou β -OG) qui a été choisi pour solubiliser MexA sous sa forme native et OprM et le dodécylmaltoside (ou DDM) utilisé pour solubiliser MexB. L'obtention

d'extraits protéiques est effectuée avec un protocole identique à celui de MexA_{signal} (proposé à la section II.2.2).

II.4.1 Récupération des membranes

A partir des extraits protéiques obtenus, on va sélectionner les membranes dans lesquelles s'ancrent les protéines (ici pour OprM, il s'agit des membranes externes). Les deux membranes des bactéries Gram-négatives ne possèdent pas la même composition lipidique. Elles n'ont donc pas la même densité. C'est cette propriété qui est utilisée pour parvenir à les séparer. On prépare donc un gradient de sucrose en superposant dans un tube de centrifugation de 13 mL, 3 mL d'une solution de sucrose à 1.5 M et 3 mL d'une solution de sucrose à 0.5 M. Le surnageant précédemment obtenu est placé sur ce palier de sucrose (7 mL).

Une centrifugation à 200 000 g est alors réalisée pendant 2h45 à 4°C. Au terme de celle-ci, on obtient deux anneaux très visibles : le moins dense correspond aux membranes internes, le plus dense à la membrane externe qui forme un culot au fond du tube. On enlève le surnageant jusqu'à l'anneau de la membrane cytoplasmique compris. Le culot est récupéré et lavé dans le tampon A. Une centrifugation à 8 000 g pendant 10 minutes suit afin d'éliminer les structures les plus importantes qui auraient pu ne pas être bien lysées. Enfin un cycle d'ultracentrifugation à 100 000 g et de resuspension du culot obtenu est réalisé de manière à laver l'échantillon. Sur le gel, la bande correspondant à la protéine apparaît clairement pour une taille proche de 45 kDa (figure II.11, piste 4). La masse moléculaire d'OprM attendue est de 52 kDa. Cependant la présence résiduelle de détergent lié pourrait modifier la quantité de SDS associé et donc les charges et la migration de la protéine. Les échantillons des extraits de bactéries avant et après induction montrent aussi une bande plus marquée pour le cas de l'échantillon induit.

II.4.2 Solubilisation

Pour la solubilisation, on laisse réagir sur la nuit le culot resuspendu dans le tampon S4 de solubilisation (Tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, glycérol 10%, β -OG 2%) sous agitation. Les phases solubles et non solubles sont ensuite séparées par une centrifugation à 50 000 g de 20 minutes. Les échantillons solubles et non solubles sont prélevés pour analyse (figure II.11, pistes 5 et 6). On peut remarquer qu'une fraction importante de OprM est soluble dans le tampon.

II.4.3 Séparation et concentration

Comme pour la protéine soluble, l'étape de séparation de la protéine OprM se fait sur une colonne d'affinité au Nickel en mettant à profit le marquage poly-histidine de la protéine. La fraction soluble est donc fixée sur une colonne en utilisant le tampon S1 (Tampon Phosphate 50 mM, NaCl 150 mM, glycérol 5%, β -OG 0.9%) dans lequel on ajoute 10 mM d'imidazole. Les lavages ont lieu à la même concentration en imidazole. L'élution se fait avec un gradient linéaire d'imidazole entre 10 et 450 mM. On observe un pic d'UV indiquant une forte concentration protéique pour une concentration d'élution entre 100 et

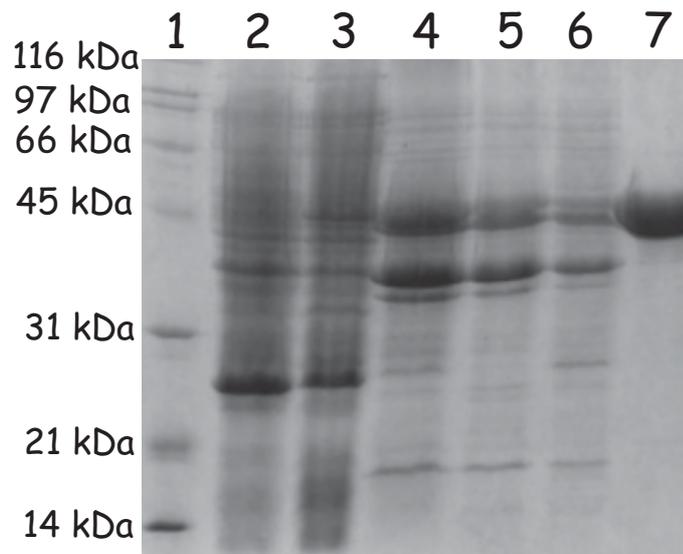


Figure II.11: Gel électrophorétique des différentes fractions prélevées au cours de la purification. 1: Marqueur de poids moléculaire, 2: extraits totaux de bactéries avant induction, 3: extraits totaux de bactéries après induction, 4: Membrane externe après lyse et séparation sur un gradient de sucrose, 5: Fraction soluble dans le β -OG 2%, 6: Fraction insoluble dans le détergent, 7: OprM purifiée et concentrée.

250 mM en imidazole. Les fractions correspondantes sont collectées et concentrées dans la solution S4 sur des concentrateurs Amicon Ultra avec une seuil de 30 kDa. La protéine purifiée et concentrée est analysée sur gel (figure II.11 piste 7).

II.5 Résultats obtenus

II.5.1 OprM

La protéine OprM a été surexprimée, purifiée et cristallisée au Laboratoire de R.M.N. et Cristallographie Biologiques. Nous avons reproduit le protocole déjà mis en place par Houcine Benabdelhak et Dimitri Lerouge [47] [48]. La concentration finale de protéine obtenue est de 2mg/mL soit $4,0 \cdot 10^{-5}$ M. On ne note aucun contaminant majeur comme en témoigne le gel final (figure II.11 piste 7).

II.5.2 MexA variété native ou soluble

Nous avons obtenu de bons résultats pour la protéine MexA. Pour la protéine native, j'ai là encore reproduit le protocole obtenu par Houcine Benabdelhak et Xavier Moreel au Laboratoire de R.M.N. et Cristallographie Biologiques. MexA sous sa forme native est une protéine ancrée à la membrane via une ancre lipidique. Le détergent utilisé est le même que celui d'OprM, la solution de solubilisation S4 est identique. Pour la purification

de MexA, un seul détail diffère par rapport à OprM : le procédé de concentration. Celle-ci a lieu sous courant d'azote. La concentration finale obtenue est de 9.4 mg/mL soit $2.3 \cdot 10^{-4}$ M.

En ce qui concerne les protéines mutantes MexA_{signal} et MexA_{CNP}, elles sont toutes deux des protéines solubles pour lesquelles nous avons construit les clones. Nous avons utilisé un protocole classique de purification pour la protéine MexA_{signal}. Gilles Phan a mis en place un protocole pour MexA_{CNP}. La pureté des échantillons est très bonne comme en témoigne le gel figure II.8. On obtient une concentration finale de l'ordre de 7.4 mg/mL soit $1.5 \cdot 10^{-4}$ M.

II.5.3 MexB

J'ai réalisé le clonage de la protéine MexB, toutefois les tests de surexpressions se sont avérés négatifs ou peu probants malgré les améliorations apportées au protocole de surproduction. Les bactéries sont désormais placées à une température de 25°C pendant l'induction et cette étape commence après un arrêt de leur phase exponentielle par refroidissement dans la glace. En outre, on ajoute de l'éthanol afin de placer les cellules sous stress éthanolique ce qui les rend plus productives. Cependant, l'effet toxique de production de la protéine se fait ressentir ; on repère notamment une diminution de la population dont la densité optique passe de 2 à 1.8 ($\lambda = 280$ nm) en fin de surexpression.

Stratégie 1 : Sélection de clones sous conditions d'induction

Une stratégie différente a alors été envisagée : sélectionner des clones en condition d'induction ce qui est la technique utilisée pour obtenir des souches sélectionnées C43 [46]. Des colonies transformées par le plasmide de MexB ont été étalées sur boîtes de Pétri contenant du LB en présence de chloramphénicol et d'arabinose. Parmi les quelques colonies qui apparaissent, on peut supposer que certaines doivent surproduire la protéine MexB. Nous avons sélectionné 5 clones potentiels et avons testé, mais sans résultat probant, leur surproduction en comparant pour chacun de ces clones des extraits de membranes lysées pour des échantillons de bactéries avant et après induction. La surexpression n'est pas décelable mais ce résultat peut signaler d'une part la faible production de la protéine ce qui est probable puisqu'elle est toxique, d'autre part un manque de visibilité car nous étudions des extraits membranaires. Nous avons essayé de solubiliser la protéine dans différents détergents : le dodécyl-maltoside (DDM) ou le β -octylglucoside (β -OG) puis de faire une mini-purification. Un échantillon est purifié sur résine de Nickel dans un tube de 15 mL : on réalise une élution à 100 mM en imidazole après des lavages à 10 mM et à 20 mM. Les gels protéiques sont difficiles à analyser. La protéine semble présente et solubilisée avec un meilleur rendement dans le DDM, en revanche aucune fraction n'est fixée sur la résine.

Stratégie 2 : Protocole publié

Nous avons alors suivi le protocole publié [23] de purification de MexB. Nous avons purifié la protéine mais avec un contaminant majeur présent à 45 kDa. Ce contaminant ne

disparaît pas malgré les tentatives de l'éliminer en utilisant un concentrateur à 30 kDa ou par chromatographie sur gel filtration. Ce comportement a été expliqué grâce la réalisation d'un immuno-transfert (ou Western Blot) [49] sur les gels de séparation des protéines.

A partir des gels précédents, on effectue un transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est placée face au gel et un courant électrique est appliqué aux plaques sur lesquelles reposent le gel et la membrane. Les protéines chargées migrent vers le gel en conservant leur organisation spatiale. Au terme de ce transfert, les protéines sont présentes sur une surface mince et donc plus exposées pour une interaction avec des anticorps. Cependant, la membrane de nitrocellulose interagit de manière non-spécifique avec les protéines par des interactions hydrophobes et ioniques. Il faut bloquer ces sites d'interaction si on veut que les anticorps se lient seulement aux zones contenant leur ligand. Cette passivation du reste de la membrane est obtenue en ajoutant de la BSA. Ainsi, lorsque les anticorps sont appliqués lors de l'étape suivante, ils réagissent avec les sites de la protéine cible.

Dans notre cas, l'anticorps anti-histidine s'accroche sur le contaminant. Nous avons donc à faire soit à une protéolyse dont le site reste non identifié mais qui a lieu au niveau N-terminal, soit à un contaminant possédant un groupement histidine comme AcrB. Une possibilité d'amélioration aurait été l'utilisation d'inhibiteurs des protéases à sérine comme le PMSF ou l'AEBSF.

Stratégie 3 : Synthèse

La tentative suivante repose sur des expériences de bio-réacteur en vésicules [50] [51]. Noireaux et al. ont introduit à l'intérieur d'une vésicule des extraits de *Escherichia coli* ainsi que des plasmides codant pour la protéine GFP et pour une protéine l' α hémolysine qui est une porine. Cette protéine membranaire s'incorpore à la membrane et permet des échanges avec le milieu extérieur. Le temps d'expression est allongé à quatre jours ce qui est très supérieur aux temps obtenus par les systèmes de culture *in vitro* qui, de plus, ne donnent pas de résultats pour les protéines membranaires.

Après discussions avec A. Libchaber, la tentative de créer des vésicules porteuses de MexB sur leur membrane a donc été testée. Nous avons introduit le plasmide pBAD33-MexB dans des vésicules constituées d'un lipide la phosphatidylcholine de l'oeuf (EYPC). Au bout d'une journée, nous avons examiné sur gel les éventuelles protéines obtenues mais aucune trace n'était visible sur gels. Les résultats obtenus à partir du plasmide commercial codant pour la GFP, le plasmide pIVex et fourni avec les extraits protéiques ont été positifs. Nous avons donc essayé de créer un nouveau plasmide en remplaçant le fragment codant pour la GFP dans ce plasmide par l'insert correspondant au codage de MexB. Les protéines ne sont pas visibles sur le gel. Une dernière hypothèse peut être que la protéine est produite en faible quantité. En effet, pour des protéines dont le poids moléculaire excède 40 kDa, la synthèse *in vitro* est très difficile. Pour le vérifier, il faudrait la marquer par une construction ajoutant la GFP. On aurait ainsi une détection par mesure de fluorescence comme dans le cas de la synthèse de la GFP seule.

Stratégie 4 : Le courrier électronique ou la collaboration internationale

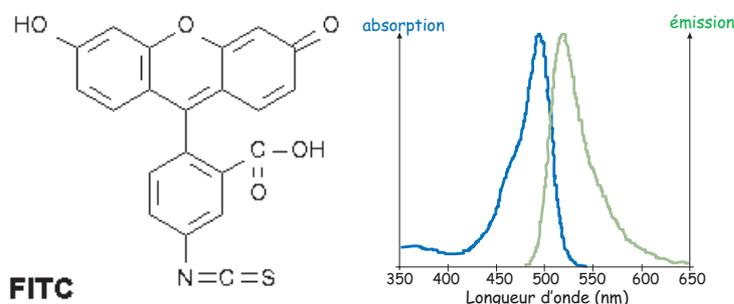
Finalement, la solution la plus avantageuse s'est révélée être la demande directe au groupe de T. Nakae (Department of Molecular Life Science, Takai University, Isehara, Japan).

II.6 Marquage d'une protéine par la FITC

Afin d'étudier ces protéines, nous avons dans un premier temps utilisé la technique de la mesure de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment en franges. Opter pour cette méthode demande de marquer des protéines avec un fluorophore dont la fluorescence puisse être détruite par un éclairage fort : nous avons choisi la Fluorescéine Isothiocyanate ou FITC.

II.6.1 La FITC

La FITC est un marqueur fluorescent dont les caractéristiques sont les suivantes : on note un pic d'absorption à 494 nm, il peut donc être excité par la raie à 488 nm d'un laser Argon, et un pic d'émission à 518 nm, on récupère donc ce signal en ajoutant en sortie de notre microscope un filtre dichroïque avec une longueur d'onde de coupure à 510 nm (figure II.12).



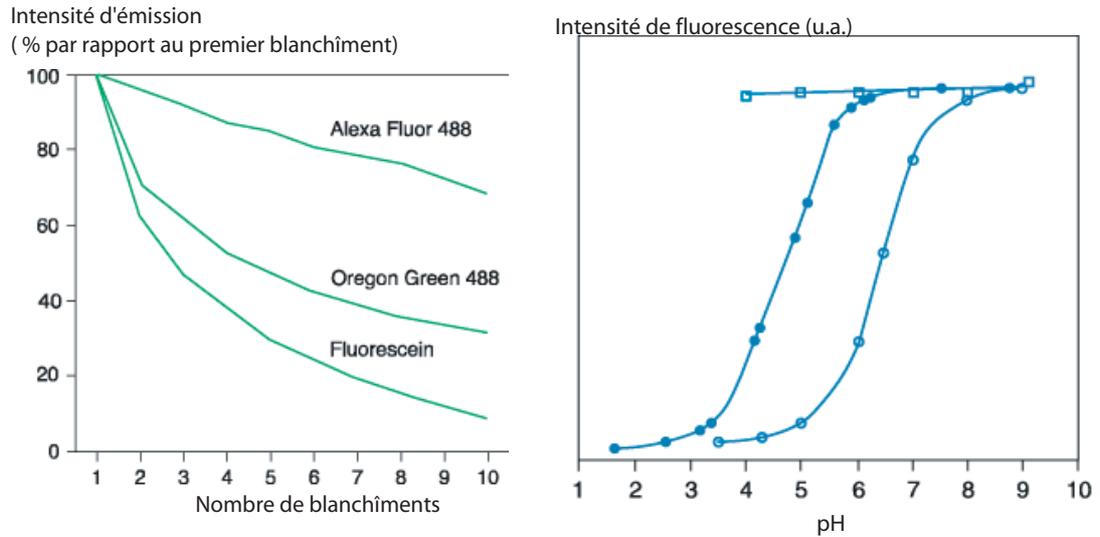
(a) Formule chimique de la FITC.

(b) Spectres d'absorption et d'émission de la FITC.

Figure II.12: Données spectrométriques sur le fluorophore FITC.

Ce marqueur est préféré aux autres marqueurs correspondant aux mêmes longueurs d'onde d'excitation pour ses propriétés de photoblanchiment : sa fluorescence est fortement diminuée quand un laser de forte puissance l'illumine (figure II.13). Un des inconvénients majeurs de ce fluorophore est que son intensité dépend fortement du pH du milieu ; en dessous d'un pH de 5, la fluorescence de la FITC est éteinte. Les protéines que nous utilisons sont elles aussi sensibles au pH et un pH trop acide les fait précipiter. La gamme de pH compatible avec la FITC est donc suffisante.

La FITC a été obtenue chez Molecular Probes, Invitrogen.



(a) Courbe de photoblanchiment de la FITC comparée à celle obtenue pour d'autres marqueurs.

(b) Intensité de fluorescence en fonction du pH pour la FITC comparée aux courbes obtenues pour Alexa Fluor (disques pleins) et Oregon Green Fluor (carrés vides).

Figure II.13: Caractéristiques de la FITC fournies par Invitrogen.

II.6.2 Marquage des protéines par la FITC : réaction de conjugaison

Le protocole de marquage de la FITC est proche de celui proposé par les kits *Fluoreporter FITC Labeling Kit* produit chez Molecular Probes mais a été adapté à nos protéines notamment en ce qui concerne la séparation des protéines marquées et du marqueur.

Le marquage repose sur le fait que la FITC réagit avec les sites amines primaires des protéines. Les protéines ont été concentrées à 3mg/mL dans un tampon phosphate pH 7.5 qui ne possède pas de sites amines primaires. La FITC est dissoute dans du DMSO avec une concentration finale de 10 mg/mL. On mélange 500 μL de protéines avec 50 μL d'une solution tampon de bicarbonate à 1M, pH 9 et 42 μL de la solution de FITC. Dans le mélange réactionnel, on a donc 30 FITC pour 1 protéine ce qui augmente les chances de marquage.

La solution est placée sous agitation par un barreau magnétique miniature dans le noir pendant 3 heures.

II.6.3 Purification des protéines marquées

Il faut ensuite séparer les protéines marquées et le fluorophore. Pour cela, on utilise une colonne gel-filtration. Ces colonnes sont constituées de grains de silice qui forment une matrice. Les molécules sont séparées selon leur poids moléculaires. Les objets les plus petits peuvent s'insérer dans les pores de la matrice ce qui ralentit leur progression. On

parvient facilement à résoudre la protéine marquée qui a un poids moléculaire de 45 kDa de la FITC qui a un poids moléculaire de 389 Da. La protéine marquée est très pure mais sa concentration est plus faible, le passage par la colonne conduit à une dilution par un facteur 10.

Le degré de marquage final est une donnée importante. Il est obtenu en mesurant les absorptions à 280 nm et à 494 nm d'une solution diluée des protéines marquées. L'absorption à 280 nm permet de déduire la concentration en protéines de l'échantillon mais il faut corriger ceci par l'absorption due à la fluorescéine. L'absorption à 494 nm permet de doser les fluorescéines présentes. Finalement, on a les formules suivantes qui permettent de déduire les concentrations en protéines c et le degré de marquage d :

$$c = \frac{[A_{280} - (A_{494} \times 0.30)] \times (\text{facteur de dilution})}{\epsilon}$$

où 0.30 est un facteur correctif et ϵ est le coefficient d'extinction molaire à 280 nm.

$$d = \frac{A_{494} \times (\text{facteur de dilution})}{\epsilon_{FITC} \times c}$$

où $\epsilon_{FITC} = 68000$ est le coefficient d'extinction molaire de la FITC à 494 nm et à pH 8. Pour les différentes protéines que nous avons marquées, nous avons obtenu les concentrations et les degrés de marquage suivants :

- MexA est marquée avec 3.7 FITC par protéine et la concentration est de 0.33 mg/mL soit 7.9 μM ,
- MexA_{signal} est marquée avec 4.6 FITC en moyenne, sa concentration est de 0.5 mg/mL soit 12 μM ,
- OprM est marquée par 1.7 FITC en moyenne, sa concentration finale est de 0.45 mg/mL soit 9.1 μM ,
- MexB présente une faible efficacité de marquage avec seulement 0.5 molécules par protéine pour une concentration finale de 0.5 mg/mL soit 4.4 μM .

II.7 Marquage des protéines par un maléimide-biotine

Les mesures de forces d'interaction décrites au chapitre VII entre les protéines nécessitent qu'une protéine soit fixée sur une bille fonctionnalisée par de la streptavidine. La streptavidine réagit avec la biotine avec une forte constante d'affinité ($K = 10^{-14} \text{ M}^{-1}$) ainsi si notre protéine est marquée par une biotine, l'accrochage sur la bille pourra avoir lieu. Pour pouvoir ancrer les protéines sur une bille, il est plus facile d'utiliser des protéines solubles afin d'éviter tout effet d'écrantage dû au détergent. Le choix s'est donc porté sur MexA que nous avons exprimé sans sa modification lipidique mais avec une cystéine libre unique en position N-terminale, MexA_{CNP}. On fait réagir la cystéine avec un groupement maléimide couplé à une biotine (Uptima - FT-UP48198).

La réaction commence par la conjugaison du maléimide-biotine avec la cystéine libre de

la protéine MexA_{CNP}. On prépare une solution de maléimide-biotine à 40 mM et une de protéine à 1 mM. On mélange 1 mL de la solution protéique avec 25 μ L de solution de maléimide-biotine et l'échantillon est mis à réagir 1 à 2 heures.

La purification des protéines est réalisée avec deux méthodes différentes qui ont fourni sensiblement les mêmes résultats. La première méthode suggérée par la notice était d'utiliser une colonne gel-filtration afin de séparer la protéine de 45 kDa du maléimide n'ayant pas réagi de 451 Da. Cette méthode comme nous l'avons dit, permet de contrôler la pureté de la protéine directement. Toutefois, elle dilue celle-ci d'où la nécessité d'utiliser ensuite des concentrateurs à 10 kDa de seuil (calculé pour une particule sphérique). La seconde méthode consiste en l'utilisation directe de ces concentrateurs qui laissent passer toutes les molécules avec un poids moléculaire inférieur à 10 kDa dont le maléimide-biotine. Cette méthode donne une pureté identique par comparaison sur gel et une concentration plus importante en une seule étape. Elle est rendue possible par le fait que le marqueur ne réagit pas avec la membrane du concentrateur.

II.8 Bilan

Nous avons donc obtenu et purifié 4 protéines : MexA et ses mutants MexA_{signal}, MexA_{CNP} ainsi que OprM. Seule la purification de MexB a été problématique.

Nous sommes parvenus à marquer toutes ces protéines avec un fluorophore : la FITC. Les concentrations obtenues après le marquage sont suffisamment importantes pour permettre d'enregistrer un signal lors des expériences de photoblanchiment. La protéine MexA_{CNP} a été marquée par un maléimide-biotine pour des expériences de micromanipulations.

Cette partie a pour but de montrer aussi toutes les techniques qui s'offrent au physicien pour parvenir à constituer des objets d'études avec des propriétés choisies. La biologie moléculaire est un outil très précieux pour le biophysicien.

Chapitre III

Membranes fluides

Les membranes biologiques sont décrites comme des bicouches lipidiques fluides qui constituent un "solvant" pour les protéines membranaires [52]. Ces membranes permettent aux protéines de diffuser et d'interagir en surface [53] (figure III.1). L'étude de protéines membranaires et notamment des interactions entre protéines membranaires peut se faire dans un milieu simplifié équivalent à une membrane biologique. C'est l'option que nous avons choisie.

Dans cette partie, nous présenterons les propriétés d'une membrane fluide. Nous décrivons ensuite le système que nous avons choisi. Nous nous focaliserons alors sur la détermination des propriétés de la bicouche en étudiant une phase lamellaire puis nous aborderons la caractérisation de la phase éponge dans laquelle nous avons réalisé nos expériences.

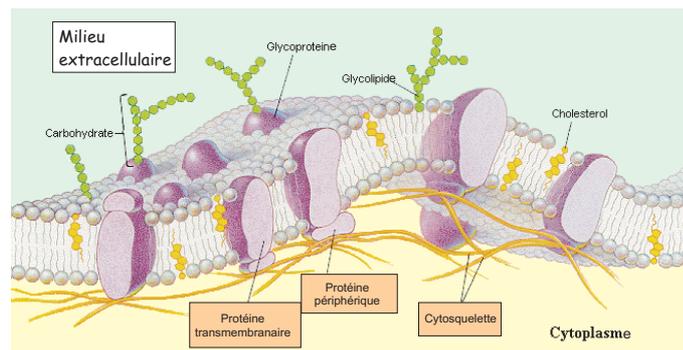


Figure III.1: Schéma de la membrane plasmique dans laquelle évolue des protéines, d'après Greg Geibel (<http://sun.menloschool.org/cweaver/cells>).

III.1 Physique des membranes fluides

III.1.1 Structures amphiphiles

Les tensioactifs (que nous avons nommé détergents dans les premiers chapitres car cette dénomination est plus souvent utilisée en biologie) sont des molécules dites amphiphiles ce qui signifie qu'elles possèdent à la fois une partie polaire hydrophile (nommée tête polaire) et une partie apolaire hydrophobe (baptisée queue aliphatique) composée de chaînes carbonées. Les lipides sont des molécules tensioactives avec deux chaînes aliphatiques, les savons n'en possèdent qu'une.

Parmi les tensioactifs, on distingue trois catégories selon la nature de leur tête polaire :

- les tensioactifs ioniques dont la tête est ionisée par solubilisation ce qui conduit à la libération d'un contre-ion en solution. Parmi ces tensioactifs, on peut citer le SDS (voir annexe A).
- les tensioactifs zwitterioniques présentant une double polarité avec un groupement basique au niveau du raccordement entre la tête polaire et la queue aliphatique et acide au niveau de la tête. Globalement neutres, ces tensioactifs vont présenter une charge effective selon le pH de la solution. Le C14DMAO (tetradécyl diméthyl aminoxide) appartient à ce groupe (annexe A).
- les tensioactifs non-ioniques auxquels nous nous sommes intéressés. Ils demeurent neutres. La famille la plus connue est celle des tensioactifs CiEj. Ces tensioactifs sont composés d'une chaîne carbonée à i atomes de carbones et d'une tête polyéthylène glycol avec j groupements éthylène glycol. Nous avons travaillé avec le C12E5 ou pentaoxyéthylène,monododécyl-éther (annexe A).

La partie polaire est soluble dans tout milieu aqueux alors que la partie apolaire préférera un solvant organique. Ce caractère amphiphile est à l'origine de la diversité des structures adoptées par les ensembles de molécules de manière à minimiser leur énergie d'interaction avec le milieu. Selon la concentration de ces objets, on voit apparaître au-delà de la concentration micellaire critique (concentration au delà de laquelle est présent en volume sous forme d'agrégats), les assemblages suivants :

- des micelles globulaires ou cylindriques,
- des phases de bicouches parmi lesquelles on distingue une phase anisotrope de bicouches planes (c'est la phase dite lamellaire ou L_α) et des phases isotropes de bicouches multiconnectées comme la phase cubique ou la phase éponge (L_3),
- des vésicules qui sont des bicouches refermées sur elles-mêmes. Elles peuvent être unilamellaires ou multilamellaires.

Un modèle géométrique développé par J. Israelachvili [54], [55] explique ce polymorphisme à partir de la propension des éléments à avoir une courbure. Une molécule de tensioactif peut géométriquement être modélisée par un cône de section σ correspondant à l'aire occupée par tête polaire, une longueur l_0 de sa chaîne aliphatique et un volume v de cette partie hydrophobe (figure III.2a). La section moyenne de la queue hydrophobe est donnée par v/l_0 . Selon le rapport $p = \frac{v}{l_0\sigma}$, la courbure spontanée de la molécule sera différente et favorisera un type de structure (figure III.2b). Si $p < 1/2$, des micelles seront présentes, si $p \in [1/2, 1]$, une phase de vésicules est la plus probable, si $p \approx 1$, on aura une phase plane de bicouches, si $p > 1$, des micelles inverses apparaîtront.

Ce raisonnement explique aussi les modifications des phases obtenues selon la température : à mesure que celle-ci augmente, l'hydratation de la tête polaire et donc la valeur de σ va être modifiée ainsi la courbure spontanée va être changée.

Ce modèle permet de prévoir l'action d'une molécule tensioactive ajoutée en plus faible proportion qui sera nommée cotensioactif. Cette addition modifie la courbure spontanée du système et donc son organisation.

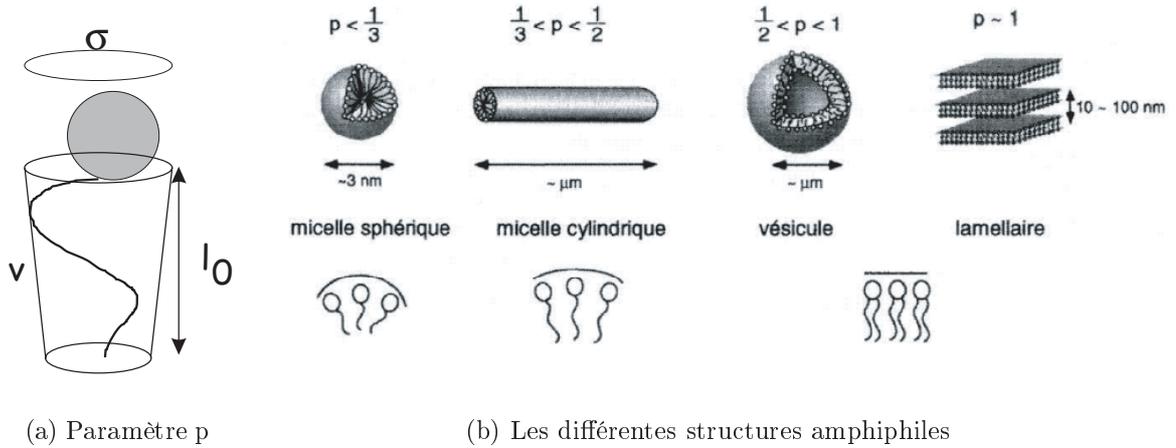


Figure III.2: Interprétation géométrique des phases de tensioactifs en fonction du paramètre p [55].

Cependant, cette description n'explique pas la transition entre les phases fluides de bicouches que sont les phases lamellaire et éponge.

III.1.2 Description mécanique des membranes

Pour expliquer ce passage d'une phase lamellaire à une phase éponge, il faut considérer la membrane d'un point de vue thermodynamique [56]. Tout d'abord, du fait des fluctuations thermiques, il faut distinguer dans ces structures deux variables [57] : l'aire totale A et l'aire projetée A_0 (figure III.10). Des expériences réalisées sur des vésicules ont montré que ces dernières étaient très résistantes aux compressions et dilatations ce qui implique que les bicouches peuvent être considérées comme incompressibles. L'aire totale A est alors associée au potentiel chimique des tensioactifs, l'aire projetée A_0 dépend des contraintes appliquées. L'aire projetée s'adapte de sorte que l'énergie soit minimisée.

Quand on considère un fil de section constante, son énergie élastique est donnée par [58] :

$$dE = \frac{1}{2} \kappa c^2 d\ell$$

où c est la courbure locale imposée à l'élément $d\ell$ de fil et κ est le module de rigidité. A partir de cette équation, une longueur de persistance λ intervient due au fait que cette énergie élastique est le résultat de fluctuations thermiques ainsi $\lambda = \kappa/k_B T$. En deçà de cette taille, le fil peut être considéré comme un bâton rigide, au-delà il adopte une structure aléatoire.

Par analogie, Helfrich s'est intéressé à l'énergie élastique d'un film [59]. Dans ce cas bidimensionnel, il faut décrire la membrane en introduisant les deux courbures principales locales c_1 et c_2 selon deux axes définissant l'élément de surface dA considéré ainsi que la courbure spontanée c_0 . D'après la géométrie différentielle dans le cas bidimensionnel, il existe deux sortes de déformations à prendre en compte : la courbure gaussienne ou intrinsèque et la courbure extrinsèque. Une feuille de papier est ainsi intrinsèquement plate

même si elle peut être courbée en cylindre. Une sphère est, quant à elle, intrinsèquement courbe.

Le produit c_1c_2 désigne la courbure dite gaussienne. Le théorème de Gauss-Bonnet relie cette quantité au degré de connectivité de la structure :

$$\int dS c_1c_2 = 2\pi(2 - 2g)$$

où g est le degré de connectivité de la surface, c'est-à-dire le nombre de connexions par cellules. g est nul pour une sphère et égal à 1 pour un tore. La quantité $2-2g$ désigne la caractéristique d'Euler de la phase.

La courbure c_1+c_2 représente la courbure moyenne qui doit être comparée à la courbure spontanée pour accéder à la courbure extrinsèque. Pour chacune de ces courbures, on fait intervenir un module élastique.

Helfrich introduit donc deux modules élastiques κ et $\bar{\kappa}$ qui ont la dimension d'une énergie et sont relatifs respectivement à la courbure moyenne et à la courbure gaussienne. Helfrich propose un développement limité aux faibles déformations de l'énergie de courbure à partir de l'expression de l'énergie libre de Landau. L'expression de l'énergie d'Helfrich est alors :

$$dE = [\frac{1}{2}\kappa(c_1 + c_2 - c_0)^2 + \bar{\kappa}c_1c_2]dA \quad (\text{III.1})$$

Ce développement est valable tant que les rayons de courbure principaux sont grands devant l'épaisseur de la bicouche et la portée des interactions entre molécules tensioactives. L'étude de cette expression de l'énergie témoigne du rôle très différent de chacun des modules de rigidité. κ représente l'énergie nécessaire pour créer une déformation cylindrique sur la surface, il est l'analogie du module de rigidité introduit à une dimension, c'est lui qui va contrôler les fluctuations thermiques de la membrane. $\bar{\kappa}$ a un rôle différent, il représente le potentiel chimique pour le degré de connectivité de la structure [61].

Des valeurs négatives pour $\bar{\kappa}$ favorisent la formation de structures sans connexion (figure III.4) comme les vésicules, si la valeur absolue de $\bar{\kappa}$ est grande, ou les phases lamellaires pour des valeurs absolues faibles de $\bar{\kappa}$. Des valeurs positives conduisent à l'apparition de systèmes multiconnectés comme les phases éponge. Les structures lamellaires et éponges diffèrent donc par la valeur de leur module de rigidité gaussienne $\bar{\kappa}$.

L'amplitude des fluctuations de la membrane dépend de la rigidité de celle-ci. Si on veut avoir accès, comme au cas unidimensionnel, à une échelle caractéristique de persistance, on doit introduire une fonction $h(x,y)$ qui va repérer la déviation de la membrane en tout point (x,y) par rapport au plan de référence [56]. La courbure moyenne est alors simplifiée [62] en ∇^2h [62] et la courbure gaussienne en $\frac{\partial^2h}{\partial x^2} \frac{\partial^2h}{\partial y^2} - (\frac{\partial^2h}{\partial x\partial y})^2$. En introduisant la représentation de Fourier à deux dimensions, l'énergie s'écrit [56] :

$$H = \frac{\kappa}{2} \int \frac{d\mathbf{q}}{(2\pi)^2} \bar{h}(\mathbf{q})\bar{h}(-\mathbf{q})q^4 \quad (\text{III.2})$$

Les fluctuations de position sont données par le théorème de l'équipartition de l'énergie :

$$\langle \bar{h}(\mathbf{q})\bar{h}(-\mathbf{q}) \rangle = A \frac{k_B T}{\kappa q^4} \quad (\text{III.3})$$

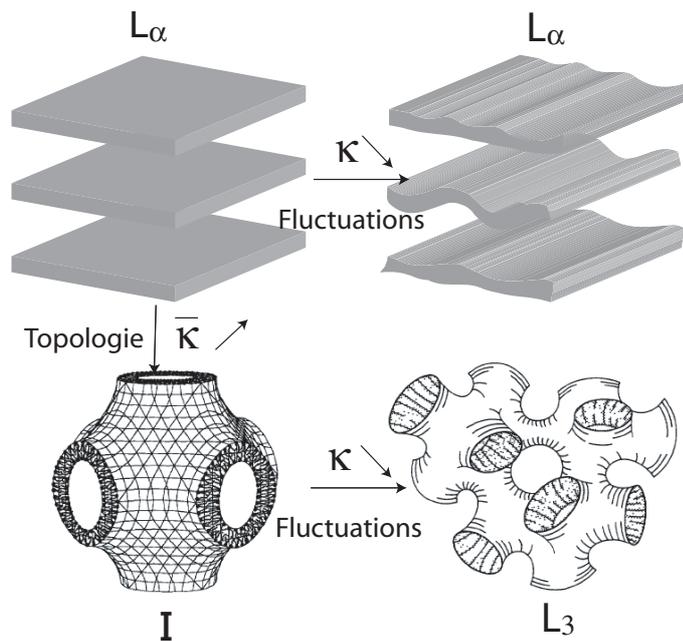


Figure III.3: Illustration du rôle de κ et $\bar{\kappa}$ sur l'exemple des phases éponges et des phases lamellaires. κ donne l'amplitude des fluctuations. La diminution de κ permet de passer d'une phase lamellaire (L_α) sans fluctuation à une phase avec fluctuations ou d'une phase cubique (I) à une phase éponge (L_3). $\bar{\kappa}$ est lié à la topologie de la phase, il donne le nombre de connexions. L'augmentation de $\bar{\kappa}$ permet la transition d'une phase lamellaire à une phase cubique. Ce schéma est inspiré de [61].

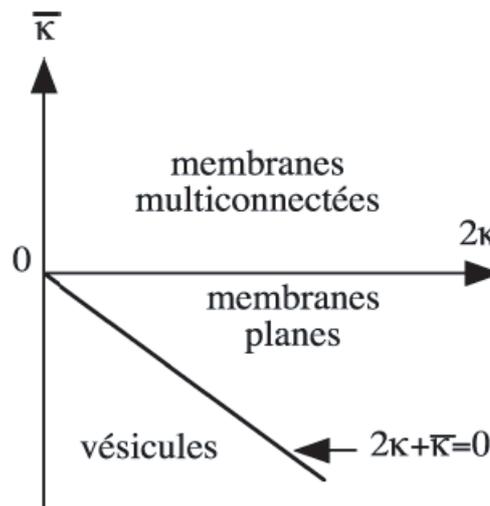


Figure III.4: Diagramme donnant l'influence de κ et $\bar{\kappa}$ sur la topologie des phases.

Ceci conduit à :

$$\langle (\nabla h)^2 \rangle \propto \frac{k_B T}{\kappa} \ln\left(\frac{L}{a}\right) \quad (\text{III.4})$$

où a est le rayon d'une tête polaire de tensioactif et L l'extension latérale de la membrane. Une longueur nommée longueur de persistance par de Gennes et Taupin apparaît [63] :

$$\xi_p = a \exp\left(-\frac{4\pi\kappa}{3k_B T}\right) \quad (\text{III.5})$$

La notion de membrane plane n'a de sens que pour des tailles L très supérieures à ξ_p . Cette longueur est la longueur caractéristique sur laquelle disparaissent les corrélations d'orientation de la membrane. C'est une notion essentielle pour comprendre la dynamique des phases de membranes fluides.

III.2 Diagramme de phase

Nous allons dans cette section décrire la phase dans laquelle nous avons travaillé ainsi que le diagramme de phases du système tensioactif/cotensioactif/solution choisi.

Notre but est l'étude de protéines membranaires dans des phases fluides. Il est nécessaire de choisir un tensioactif qui ne dénature pas les protéines. Nous avons donc opter pour un tensioactif non-ionique. Ce type de tensioactif présente aussi l'avantage de supporter une grande gamme de forces ioniques sans modification. La taille du périplasma chez les bactéries est de l'ordre de 200 Å, nous voulons donc faire varier les périodes de nos structures entre 50 et 400 Å. Eric Freyssingéas [64] s'est intéressé à des phases lamellaire et éponge d'un système ternaire C12E5/hexanol/eau dont la période recouvrait de telles valeurs (figure III.5). Nous avons donc opté pour le C12E5 (Annexe A). Les monocouches de C12E5 ont été étudiées et leur épaisseur peut être modifiée par l'addition de dodécane [65]. Cette propriété conduit à une adaptabilité plus importante de ce système. Nous allons pouvoir adapter la taille de la membrane à l'objet qu'on souhaite insérer en ajoutant la quantité de dodécane requise du moins pour des objets ayant une taille hydrophobe supérieure à 16 Å qui est la taille d'une bicouche de C12E5 sans addition de dodécane.

Cependant, l'utilisation de l'hexanol comme cotensioactif est à proscrire car les protéines que nous étudions précipitent en sa présence. Les protéines membranaires utilisées sont solubles dans deux types de détergents qui sont : d'une part, le β -octylglucopyranoside (β -OG) pour les protéines MexA et OprM et d'autre part, le dodécylmaltoside (DDM) pour la protéine MexB (les caractéristiques de ces détergents sont données en annexe A). Le DDM possède une chaîne aliphatique longue de 12 atomes de carbone identique à celle du C12E5. Ce détergent va difficilement s'insérer entre les chaînes de C12E5. Il ne va pas être un bon cotensioactif pour le C12E5. Le β -OG possède une queue aliphatique de 8 carbones plus courte que celle du C12E5. Nous l'avons utilisé comme cotensioactif à l'intérieur de nos phases.

Pour la phase aqueuse, nous avons choisi de conserver le tampon des protéines (solution S2 annexe A).

Plus précisément, comme le β -OG est commercialisé sous forme solide, on réalise des solutions aqueuses contenant différentes concentrations massiques en détergent :

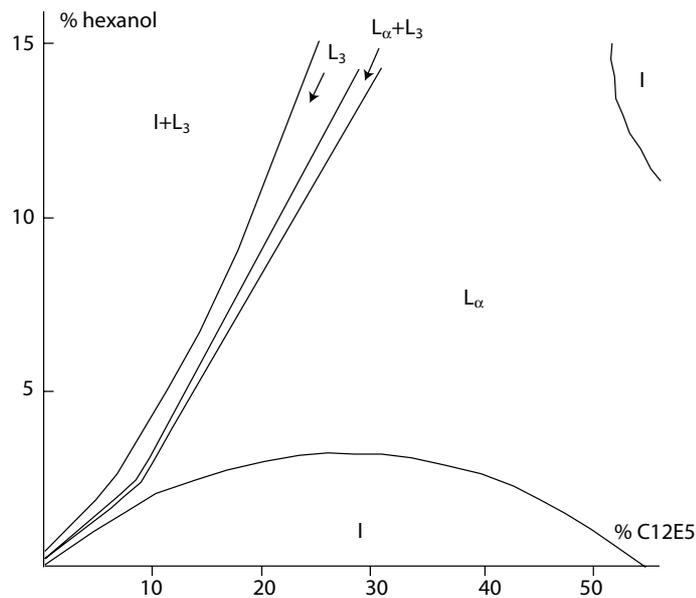


Figure III.5: Diagramme de phase du système C12E5/hexanol/eau. En abscisse, la fraction volumique de C12E5 est représentée et en ordonnée, la fraction volumique en hexanol. Ces résultats sont extraits de [64].

- S1 qui est une solution identique à la solution de solubilisation des protéines (0.9 % β -OG (pourcentage massique), 100mM NaCl, 50mM tampon phosphate pH 7.5, 5 % glycérol (pourcentage volumique)),
- une solution S2 sans β -OG (100mM NaCl, 50mM tampon phosphate pH 7.5, 5 % glycérol (pourcentage volumique)),
- une solution S3 contenant une concentration dix fois plus importante en β -OG (9 % β -OG (pourcentage massique), 100mM NaCl, 50mM tampon phosphate pH 7.5, 5 % glycérol (pourcentage volumique)).

En mélangeant ces trois solutions, on parvient à faire varier à la fois la fraction volumique de C12E5 et celle de β -OG. L'ordre dans lequel le tensioactif et les solutions S1, S2 et S3 sont ajoutés est indifférent. Lorsque des échantillons avec des protéines vont être réalisés, la solution contenant les protéines est la solution S1. Il suffit de remplacer dans les échantillons une fraction du volume de S1 par un volume de solution protéique. De plus, comme le tampon des protéines contient aussi du cotensioactif, les protéines sont ajoutées en même temps que le cotensioactif qui permet de créer les phases. Ceci conduit *a priori* à une meilleure incorporation des protéines à l'intérieur des bicouches.

Nous avons tout d'abord exploré le diagramme de phase du système ternaire C12E5/ β -OG/eau en faisant varier la quantité de cotensioactif ajouté. Ces résultats ont été obtenus grâce à une observation sous microscope polarisé. La phase lamellaire est biréfringente. Entre polariseur et analyseur croisés, des figures telles que des coniques focales, des stries huileuses...sont visibles. La phase éponge est isotrope : elle apparaît noire. Cependant, sous l'effet de cisaillement, elle acquiert une orientation transitoire et donc des propriétés

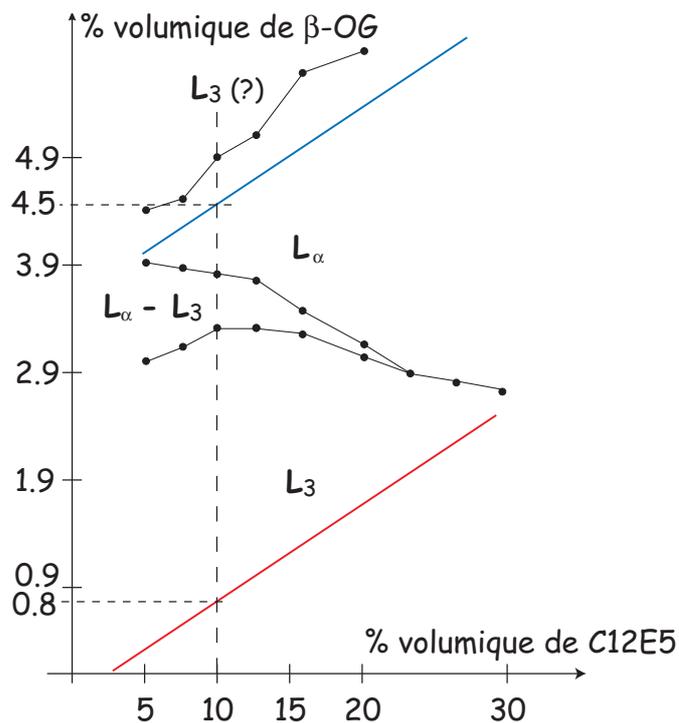


Figure III.6: Diagramme de phase du système C12E5/ β -OG/solution à une température de 20°C. En abscisse, la fraction volumique de C12E5 est représentée et en ordonnée, la fraction volumique en β -OG. Les lignes de dilution utilisées lors des expériences suivantes sont indiquées en rouge pour la phase éponge et en bleu pour la phase lamellaire.

biréfringentes.

Ces observations ont été complétées par des enregistrements de spectres de rayons X, des mesures de conductivité ou des clichés de cryofracture comme nous le verrons par la suite. Les résultats auxquels nous sommes parvenus sont présentés sur la figure III.6. Nous pouvons constater la présence, dans la gamme étudiée, de différents types de phases : une phase éponge et une phase lamellaire sont notables.

Quand on augmente la fraction volumique de cotensioactif, c'est-à-dire en suivant la ligne verticale en pointillés de la figure III.6 de bas en haut, on a tout d'abord une phase L_3 . Quand le rapport molaire cotensioactif-tensioactif est augmenté, on trouve un système biphasique puis on obtient une phase lamellaire. Habituellement, l'ajout de cotensioactif fait passer d'une phase lamellaire à une phase éponge. Nous avons donc ici une phase éponge "anormale". A partir de la phase lamellaire, si la fraction de cotensioactif est augmentée, on trouve une phase isotrope biréfringente sous cisaillement donc il s'agit certainement d'une phase L_3 mais nous n'avons pas fait d'études complémentaires dans cette région.

Ainsi par rapport à la phase utilisant l'hexanol comme cotensioactif (figure III.5), le cotensioactif β -OG permet d'obtenir une phase éponge à la place de la phase cubique. L'utilisation de ce cotensioactif stabilise cette phase éponge sur une grande gamme de

température (entre 6 et 30°C).

Nous avons choisi de travailler avec la phase éponge correspondant à l'addition de 1 molécule de β -OG pour 9 molécules de C12E5 c'est-à-dire un rapport volumique de 0.08 entre ces composés qui correspond à la ligne rouge notée sur la figure III.6. Notre étude va s'attacher à étudier des protéines membranaires grâce à la mesure de leur coefficient de diffusion. Les principales méthodes d'orientation de phases lamellaires sont les cycles chauffage-relaxation ou l'addition d'hexanol [66]. Or l'utilisation de l'une ou l'autre de ces méthodes serait dommageable pour les protéines insérées à l'intérieur de la bicouche. Nous avons donc opté pour une phase éponge car cette phase est isotrope. Elle n'a pas à être orientée pour permettre la mesure. Ce système est stable sur une gamme importante de dilution (pour une fraction volumique de membrane ϕ entre 3 et 30%) (figure III.6) et de température entre 6 et 30°C .

III.3 Etude des bicouches des phases lamellaires C12E5/ β -OG/ Solution S2

Nous allons tout d'abord nous intéresser à la phase lamellaire du système C12E5/ β -OG/Solution S2 (Annexe B) contenant environ 10 molécules de cotensioactif β -OG pour 16 de tensioactif. La ligne de dilution étudiée est tracée en bleu sur la courbe III.6. Nous avons fait ce choix afin de décrire les propriétés de la bicouche mais aussi car la description d'une phase lamellaire est plus simple que celle d'une phase éponge. Les concepts introduits dans cette partie seront utilisés pour la phase éponge car localement une phase L_3 peut être assimilée à une phase lamellaire.

Nous parlerons des techniques utilisées pour la caractérisation de ces phases lamellaires puis nous donnerons les résultats obtenus sur la propriété de la bicouche : son épaisseur et sa rigidité κ .

III.3.1 Description d'une phase lamellaire

Dans un tel système, les bicouches de taille infinie sont diluées dans une phase aqueuse et sont régulièrement espacées. Trois paramètres sont essentiels dans cette phase (figure III.7) : en premier, l'épaisseur de la bicouche d_m ; deuxièmement, la distance qui sépare deux bicouches (cette distance est notée d_W), ensuite la période de la structure nommée d_B qui vérifie $d_B = d_W + d_m$.

L'empilement de ces lamelles est stabilisé par quatre types d'interactions :

- L'interaction attractive de Van Der Waals entre bicouches voisines créée par leur moment dipolaire.
- L'interaction répulsive d'hydratation. Elle est liée au déplacement de la couche d'eau autour des groupes hydrophiles. Cette force est à courte portée.
- L'interaction électrostatique qui intervient notamment lors de l'utilisation de tensioactifs ioniques ou si la solution aqueuse contient des sels.

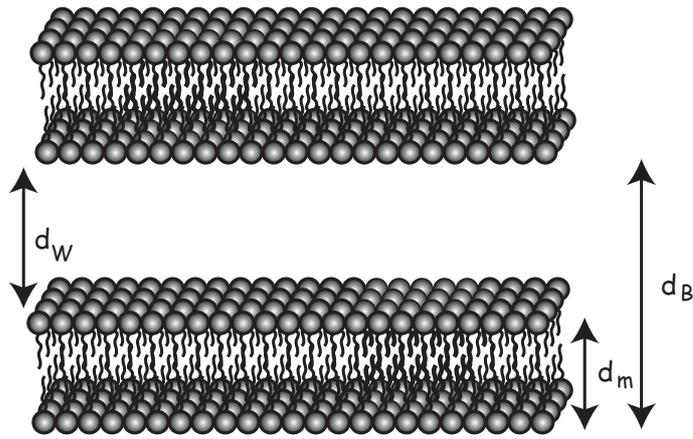


Figure III.7: Représentation d'une phase lamellaire. Ce schéma met en évidence les paramètres de la phase lamellaire qui est faite d'un empilement de membranes d'épaisseur d_m avec une période d_B

- L'interaction d'ondulation pour les systèmes dans lesquels κ est de l'ordre de l'énergie thermique $k_B T$. Cette interaction est liée à la présence de l'empilement de membranes. Elle a été comprise par Helfrich. Si on considère une membrane isolée, sa position est libre de fluctuer dans tout l'espace. Grâce aux fluctuations thermiques, elle va explorer un volume important, du moins si κ est de l'ordre de $k_B T$. Si maintenant elle est confinée entre deux membranes voisines qui peuvent être considérées comme des murs, le nombre de configurations possibles diminue ainsi que l'entropie de configuration. Cette énergie libre de configuration est liée à une interaction répulsive stérique entre membranes. C'est cette énergie qui est responsable de l'invariance d'échelle de telles structures.

Cette propriété d'invariance d'échelle est essentielle pour ce type de phases. Elle explique le fait que, si on conserve la même composition de membrane en se contentant de modifier le rapport entre la fraction volumique de composés hydrophobes par rapport au volume total (cette fraction est notée ϕ et se nomme la fraction volumique de membrane), la phase ne subit qu'une homothétie (dans une certaine limite de ϕ). Ainsi, en changeant la valeur de ϕ , la taille caractéristique de la structure est modifiée ; l'évolution de d_B est inversement proportionnelle à ϕ comme nous le verrons lorsque nous aborderons les lois de dilution de ces phases fluides.

III.3.2 Spectres de diffusion des phases lamellaires

Les systèmes que nous étudions présentent des structures pseudo-périodiques que se soit la période de la structure de la phase lamellaire ou la taille caractéristique des canaux pour la phase éponge. Cette périodicité se traduit par un pic de diffusion pour un vecteur de diffusion $q_{max} = \frac{2\pi}{d_B}$ qui sera visible aux rayons X.

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est celui du Laboratoire de Physique de la Matière Condensée situé au Collège de France sous la direction de Dr Raymond Ober.

Une anode tournante en Cuivre est la source de rayonnement X. En sortie, après filtrage, le rayonnement correspond à une longueur d'onde de 1.54 \AA .

Le faisceau est focalisé sur l'échantillon. La solution à étudier est placée dans des capillaires en verre (Marckröcher) de 10 cm de long et 1 mm de diamètre avec une paroi de $100 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Ils sont scellés par passage rapide au bec bunsen de manière à faire fondre le verre au niveau de l'extrémité. Les échantillons sont déposés dans un porte-échantillon thermostaté. Le faisceau diffusé (figure III.8) est enregistré au niveau d'un détecteur linéaire composé de 512 canaux séparés de $115 \mu\text{m}$. Le vecteur de diffusion q est lié à l'angle de diffusion θ par $q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\frac{\theta}{2})$. La distance échantillon-détecteur est de 80 cm ce qui autorise des vecteurs d'onde entre 0.01 et 0.35 \AA^{-1} . La résolution de l'appareil est obtenue en mesurant la largeur à mi-hauteur du faisceau direct, elle est de 0.0017 \AA^{-1} .

Tous les spectres enregistrés sont normalisés selon le temps d'exposition et sont corrigés

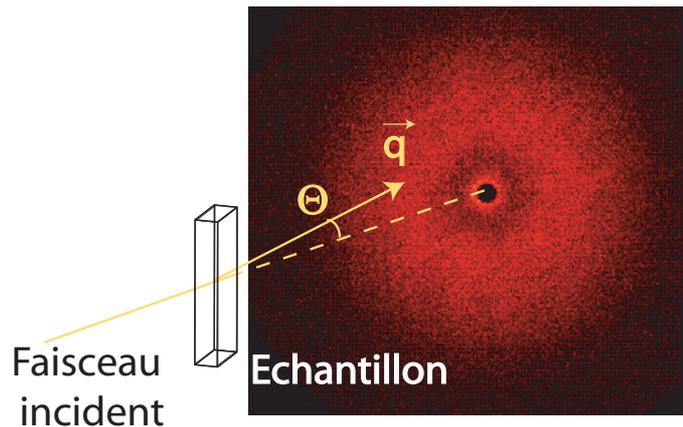


Figure III.8: Diffraction par une phase éponge

en fonction du facteur de transmission. On peut ainsi tenir compte du nombre de photons reçus et comparer différents échantillons. La contribution de la solution aqueuse est éliminée en enregistrant le spectre de la solution seule et en soustrayant ce spectre à celui obtenu pour l'échantillon et réalisé dans les mêmes conditions.

Spectre de diffusion

Les phases lamellaires présentent un ordre smectique. Leur spectre de diffusion comporte des pics de Bragg dont les positions correspondent aux vecteurs :

$$q_n = nq_0 = n \frac{2\pi}{d_B} \quad (\text{III.6})$$

Cependant, les fluctuations thermiques vont élargir ces spectres. Les spectres obtenus ont l'allure suivante (figure III.9) :

- un pic de Bragg dont la position du maximum q_0 correspond à la période de la phase lamellaire d_B . La largeur de ce pic est liée aux fluctuations thermiques de la membrane.
- une remontée aux petits angles témoin des interactions répulsives d’Helfrich.
- de la diffusion aux grands vecteurs d’onde qui correspond au facteur de forme d’une membrane isolée.

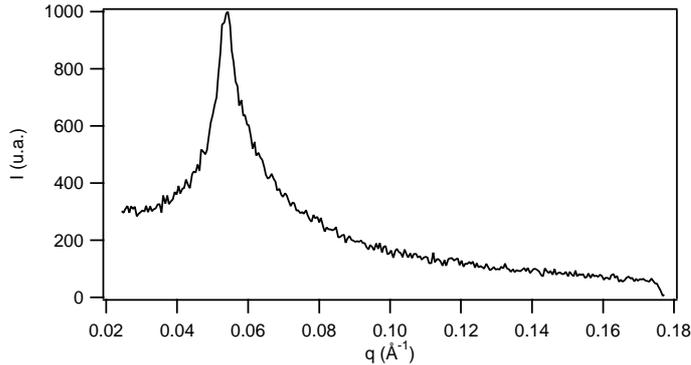


Figure III.9: Spectre de diffusion obtenu pour une phase lamellaire avec une fraction volumique de membrane de 10% et un rapport molaire $\rho = \frac{N_{\beta-OG}}{N_{C12E5}}$ égal à 0.63.

Nous avons étudié la phase lamellaire du système ternaire C12E5/ β -OG/solution S2 dans le but de caractériser la bicouche de ces systèmes c’est-à-dire l’épaisseur de la membrane et son module de rigidité κ . Nous nous focaliserons sur la détermination de la loi de dilution de cette phase lamellaire c’est-à-dire l’étude des variations de sa période en fonction de la fraction volumique de membrane. Nous ne parlerons donc pas des modèles d’ajustement des spectres qui apportent des informations supplémentaires sur les paramètres élastiques de cette membrane.

III.3.3 Loi de dilution des phases lamellaires

Dans une première approximation, la phase lamellaire peut être représentée par un empilement de bicouches avec une période d_B . Le paramètre qui va permettre de décrire l’évolution de cet empilement est la fraction volumique de membrane ϕ qui se définit comme le rapport entre le volume de membrane (ou volume des composés hydrophobes introduits) V_m et le volume total de solution V_{tot} soit $\phi = \frac{V_m}{V_{tot}}$. Géométriquement, on a la relation suivante entre la fraction volumique de membrane et les tailles de ces structures :

$$\phi = \frac{d_m}{d_B} \tag{III.7}$$

Toutefois, les membranes de la phase lamellaire fluctuent. Ces fluctuations sont gouvernées par la constante de rigidité de courbure moyenne κ . L’aire de la surface libre de

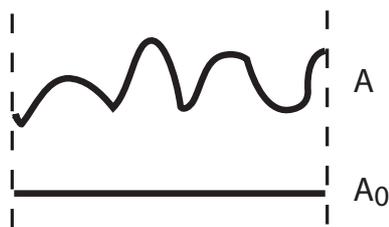


Figure III.10: Représentation de l'aire réelle A et de l'aire projetée A_0 pour une membrane fluctuante.

la bicouche notée A n'est pas égale à l'aire projetée A_0 sur un plan moyen de position (figure III.10). D'après Helfrich, le rapport des deux aires est donné par la relation suivante [59] :

$$\frac{A}{A_0} = 1 + \frac{k_B T}{4\pi\kappa} \ln\left(\frac{\xi_{\parallel}}{\ell_{min}}\right) \quad (\text{III.8})$$

ℓ_{min} correspond à la taille des plus petites fluctuations observables c'est-à-dire à la taille d'une tête polaire de tensioactif alors que ξ_{\parallel} représente la plus grande échelle de fluctuations. Cette grandeur dépend de l'espace libre pour les membranes c'est-à-dire de la distance entre membranes égale à $d_B - d_m$. D'après Golubovitch et Lubensky [70], on a :

$$\xi_{\parallel} = \sqrt{\frac{32\kappa}{3\pi k_B T}} (d_B - d_m)$$

Ainsi la présence de fluctuations conduit à une surestimation de l'épaisseur de la membrane et cet effet est d'autant plus important que la phase est plus diluée. L'expression III.7 est corrigée par ce facteur et devient alors :

$$\phi = \frac{d_m}{d_B} (Y + Z \ln(d_B - d_m)) \quad (\text{III.9})$$

où

$$Y = 1 + \frac{k_B T}{4\pi\kappa} \ln\left(\sqrt{\frac{32\kappa}{3\pi k_B T}} \frac{1}{\ell_{min}}\right)$$

et

$$Z = \frac{k_B T}{4\pi\kappa}$$

Si on trace la loi de dilution d_B en fonction de ϕ^{-1} , on observe pour les points correspondants à une phase concentrée une droite puis une déviation à cette droite quand la phase est plus diluée (figure III.12).

En conclusion, la courbe de dilution peut fournir deux informations qui sont :

- d'une part, l'épaisseur de la membrane en ajustant pour les premiers points, la courbe d_B en fonction de ϕ^{-1}
- d'autre part, la rigidité de la membrane en traçant l'écart à la loi de dilution c'est-à-dire $d_B \phi$ en fonction de $\ln(d_B - d_m)$ puis en l'ajustant avec la loi donnée en III.9.

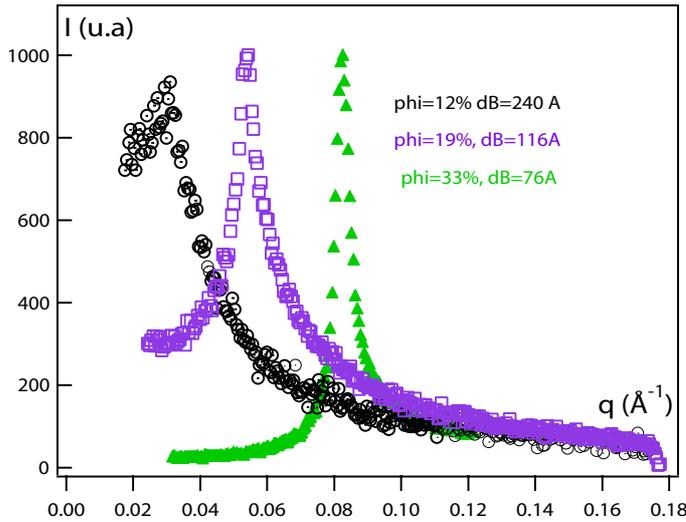


Figure III.11: Exemples de spectres renormalisés de phases lamellaires correspondant à des fractions volumiques variant entre 12 et 33%. Les périodes correspondantes sont notées en encart.

III.3.4 Loi de dilution

La phase lamellaire que nous avons étudiée est représentée par la droite bleue dans le diagramme de phase de la figure III.6. Nous avons enregistré les spectres de phases lamellaires correspondant à différentes valeurs de fraction volumique de membrane comprises entre 0.11 et 0.36. À mesure que la fraction volumique de membrane diminue (figure III.11), les pics s'élargissent ce qui traduit des fluctuations plus importantes. La valeur de l'intensité obtenue en $q \simeq 0$ diminue quand la fraction volumique de membrane augmente ; ce phénomène témoigne d'un renforcement de l'ordre smectique.

La loi de dilution pour la phase lamellaire sans addition de dodécane permet de déterminer l'épaisseur de la membrane (figure III.12). En ajustant les points correspondants aux fractions volumiques de membrane entre 20 et 36 % par la loi III.7, nous obtenons une épaisseur d_m de 31.8 Å qui est en bon accord avec les expériences précédentes réalisées sur le C12E5 : 32 Å pour Lu et al. [65] et 28 Å pour Freyssingéas et al. [64] dans des systèmes avec l'hexanol comme cotensioactif. L'épaisseur des têtes polaires est de 16 Å donnée par [65], ce qui conduit à une épaisseur hydrophobe, h , de 15.8 Å .

III.3.5 Ecart à la loi de dilution

Pour les phases les plus diluées, les périodes mesurées sont supérieures à la prédiction obtenue par le modèle géométrique de l'équation III.7. L'écart à la loi de dilution est positif comme prévu par l'équation III.9.

On trace alors l'écart à la loi de dilution en fonction de la quantité $\ln(d_B - d_m)$ de manière à déduire κ de ces courbes. L'ajustement linéaire de cette courbe fournit une valeur de module de rigidité (figure III.13) de $(0.6 \pm 0.2) k_B T$.

Cette valeur du module de rigidité est inférieure à celle obtenue pour une bicouche de

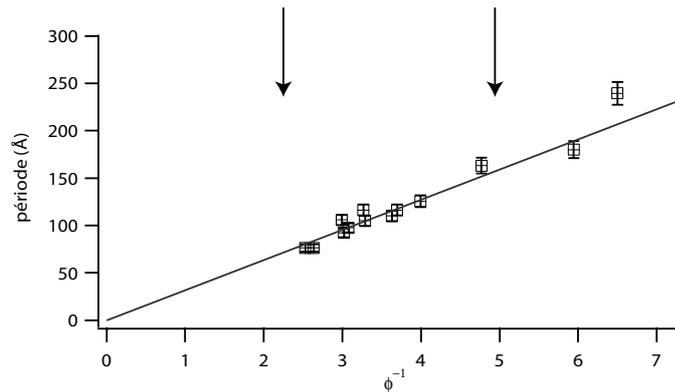


Figure III.12: Loi de dilution pour une phase lamellaire de C12E5 sans addition de dodécane. L'ajustement linéaire sur les 11 premiers points (les points pris en compte sont compris entre les deux flèches) permet de déduire l'épaisseur de la bicouche c'est-à-dire 31.8 \AA .

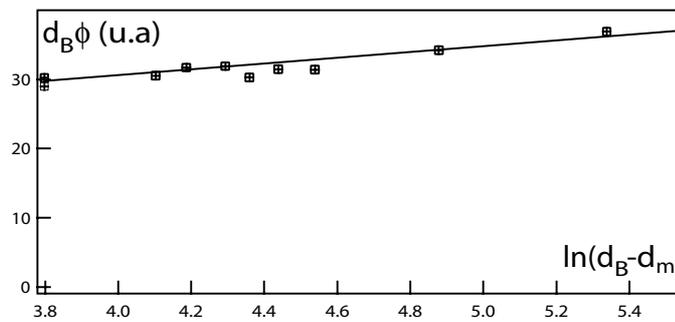


Figure III.13: Ecart à la loi de dilution tracée pour une phase lamellaire sans dodécane. De la valeur de la pente de la droite d'ajustement, on déduit une valeur de κ de $0.6 k_B T$.

C12E5 sans β -OG qui est de l'ordre de $1.5 k_B T$ [71]. L'addition de cotensioactif diminue donc la rigidité de la membrane.

III.3.6 Etude de phases lamellaires gonflées avec du dodécane

Nous avons étendu cette étude au cas de phases gonflées avec du dodécane. Malgré l'addition de dodécane, la phase reste lamellaire. En revanche, on voit les pics de Bragg se déplacer. A mesure que du dodécane est ajouté, on relève une augmentation de la pente de la courbe de dilution (figure III.14), c'est-à-dire une augmentation de l'épaisseur de la membrane qui atteint 47.9 \AA pour un rapport entre volume de dodécane et de C12E5 de 0.5. On vérifie que cette augmentation de l'épaisseur hydrophobe est proportionnelle au volume de dodécane ajouté (figure III.15). Plus précisément, le dodécane va s'insérer entre les deux monocouches, il va donc augmenter l'épaisseur hydrophobe de la membrane alors que la taille des têtes polaires va rester constante.

En outre, l'influence du dodécane sur la rigidité est étudiée en traçant l'évolution du

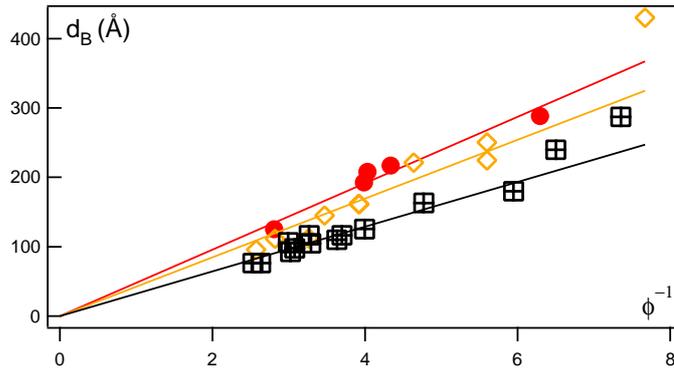


Figure III.14: Loi de dilution pour des phases lamellaires gonflées au dodécane. Le dodécane est ajouté avec une fraction volumique de 0.25 (\diamond) et une fraction volumique de 0.50 (\bullet) par rapport au tensioactif. Les épaisseurs de membranes déduites sont respectivement de 42 et de 48 Å . Les résultats obtenus dans le cas d'une phase sans dodécane sont rappelés (\boxplus)

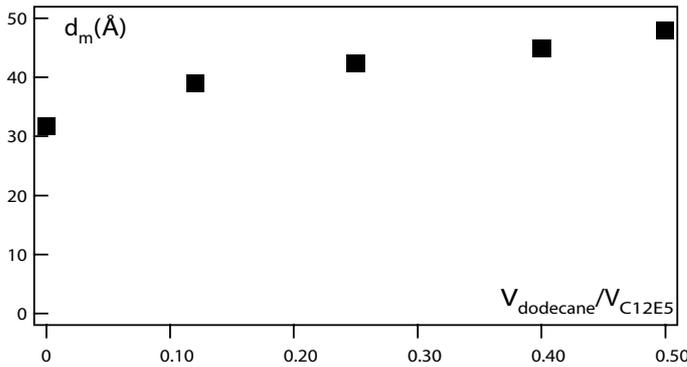


Figure III.15: Augmentation de la taille de la membrane en fonction de l'addition de dodécane

rapport $\frac{d_B \phi}{d_m}$ en fonction de $\ln(d_B - d_m)$ (figure III.16). On choisit d'étudier le rapport $\frac{d_B \phi}{d_m}$ car son évolution ne dépend pas de la taille de la membrane qui est différente pour chacune de nos expériences. De cette façon la comparaison de la pente renseigne immédiatement sur la valeur du module de rigidité de la membrane. Sur les différentes courbes obtenues, on ne note pas de modifications importantes de la pente (figure III.16). Un relevé plus attentif nous donne les variations de la constante de rigidité κ en fonction de la quantité de dodécane ajoutée (figure III.17). La constante de rigidité n'est que peu affectée par l'addition de dodécane. Le dodécane est donc introduit dans la bicouche comme un fluide amorphe. Il diminue légèrement la valeur de la constante de rigidité qui passe de $(0.6 \pm 0.2) k_B T$ à $(0.4 \pm 0.1) k_B T$. Ce résultat est expliqué par Kurtisovski et al. [71]. Quand l'épaisseur de la membrane est faible, les fluctuations de deux monocouches sont couplées. Pour des valeurs plus importantes de la taille de la bicouche, le couplage entre les deux monocouches est moins fort et les monocouches peuvent évoluer

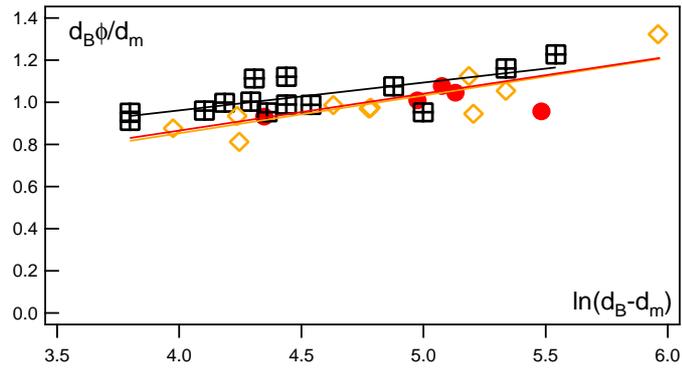


Figure III.16: Ecart à la loi de dilution pour des phases lamellaires gonflées au dodécane (fractions volumiques de 0.25 (\diamond) et de 0.50 (\bullet) par rapport au C12E5. La rigidité reste presque constante pour la gamme de fractions volumiques étudiées (elle est égale à $0.6 \pm 0.2 k_B T$).

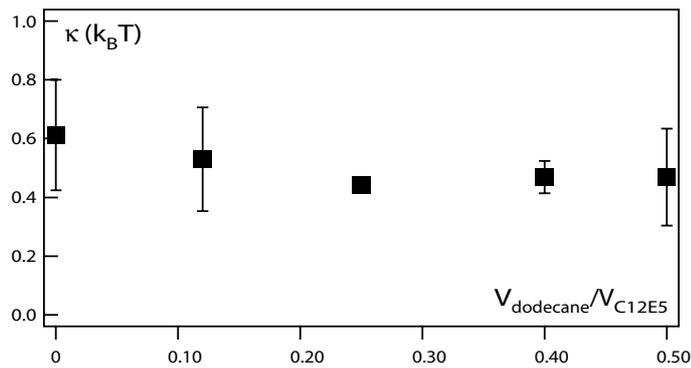


Figure III.17: Evolution de la constante de rigidité de la phase en fonction de la quantité de dodécane introduite. La constante de rigidité diminue légèrement à mesure que du dodécane est introduit.

de manière indépendante. Dans ces expériences réalisées sur des systèmes inverses, la diminution du module de rigidité intervient pour des épaisseurs entre 10 et 20 Å. Au-delà de cette valeur, le module de rigidité atteint une valeur limite seuil interprétée comme la constante de rigidité d'une monocouche. Dans nos expériences, il faudrait continuer la dilution pour savoir si nous avons atteint la valeur limite correspondant à la rigidité d'une monocouche.

Nous avons donc un moyen simple pour modifier continuellement l'épaisseur des bicouches afin qu'elle s'adapte aux objets qui vont être insérés dans cette membrane fluide modèle dans la limite d'une épaisseur de membrane de 48 Å.

L'étude des phases lamellaires nous a permis de caractériser nos bicouches. Nous connaissons désormais leur épaisseur ainsi que la rigidité de ces membranes modèles.

III.4 Caractérisation de la phase éponge C12E5/ β OG/ solution S2

Notre objectif est d'insérer des protéines dans des bicouches dont la séparation puisse être contrôlée. Pour les expériences de diffusion, nous avons utilisé une phase éponge afin d'éviter les problèmes liés à l'orientation de la phase. Une première étape est donc de bien caractériser cette phase car elle sera essentielle pour nos expériences.

Une phase éponge peut être vue comme une structure cubique "fondue". Les connexions qui existent entre membranes forment un réseau à trois dimensions. Localement, cette phase est assimilable à une phase lamellaire mais à grande échelle, c'est une structure multiconnectée. On peut définir dans cette structure des tailles caractéristiques qui sont l'épaisseur de la membrane d_m , mais aussi un diamètre moyen des connexions ou des passages qui sera noté \bar{d} et qui correspond localement au d_W des phases lamellaires. En comparant cette structure avec une phase cubique, une taille de cellule ξ pourra être introduite. Cette distance sera de l'ordre de la distance caractéristique \bar{d} .

La phase éponge sépare l'espace en deux sous-espaces aqueux séparés par une bicouche.

III.4.1 Composition des phases éponges

Nos phases sont constituées de C12E5 auquel on ajoute comme cotensioactif du β -OG à raison de 1 cotensioactif pour neuf tensioactifs. Cette répartition correspond à la ligne rouge dans le domaine L_3 de la figure III.6. Comme nous préparons nos phases grâce à des mélanges avec des volumes fixés de chacun des composants, il est plus facile de raisonner de manière volumique. Nos phases sont faites en mélangeant un volume V de C12E5 avec un volume $0.08 \times V$ de β -OG et un complément de solution aqueuse S2 (Annexe B) de manière à atteindre une valeur de ϕ donnée. La préparation de ces phases est résumée en annexe B. Elle utilise en fait le mélange des solutions S1, S2 et S3 comme nous l'avons dit plus haut.

III.4.2 Spectre de diffusion d'une phase éponge

La première étude faite sur ce diagramme de phase a été effectuée grâce à un microscope polarisé. La phase L_3 est isotrope, elle apparaît noire entre polariseur et analyseur croisés. Toutefois, les spectres de diffusion restent la véritable signature d'une phase éponge. Nous avons donc étudié ces phases par rayons X. Le spectre de diffusion d'une phase éponge met en évidence ses paramètres géométriques et thermodynamiques. Le profil fait apparaître les trois régions suivantes (figure III.18) [72] :

- Une bosse de corrélation centrée sur un vecteur d'onde q_0 correspondant à la taille caractéristique \bar{d} du système (c'est-à-dire à la taille des pores).
- Une remontée aux petits angles dont l'importance augmente avec la dilution jusqu'à occulter la bosse de corrélation pour certaines dilutions. Cette partie du signal est dominée par les corrélations entre membranes.

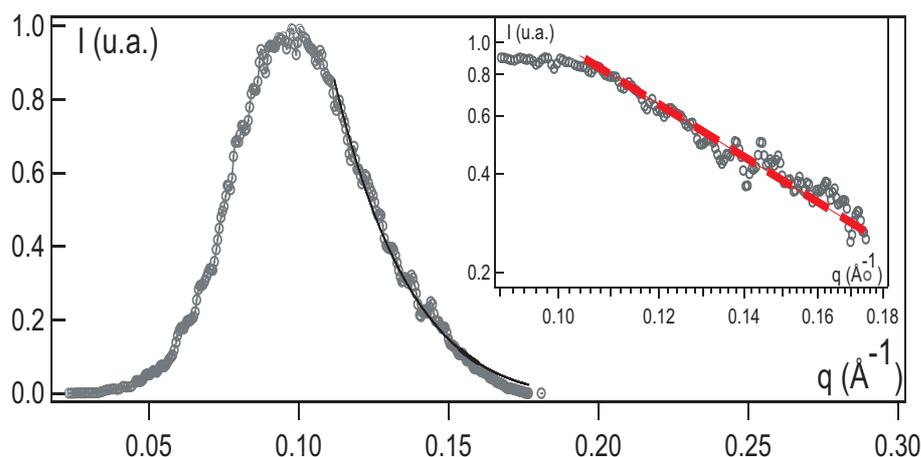


Figure III.18: Spectre de diffusion obtenu pour une phase éponge de C12E5 avec une fraction volumique en C12E5 de 0.25 et une fraction volumique de membrane de 28%. Pour les grands vecteurs d'onde, on ajuste ce spectre avec le modèle de Gazeau et al. (équation III.10) en prenant une épaisseur de membrane de 15.9 Å (l'ajustement est tracé en noir). Ce modèle s'accorde avec nos spectres. L'encart est un zoom du spectre pour de grands vecteurs d'onde, la loi asymptotique en q^{-2} est vérifiée.

- Un signal aux grands angles lié à la composition de cette phase de membranes d'épaisseur d_m orientées aléatoirement. Loin de la bosse de corrélation, le spectre est décrit par le facteur de forme suivant [73] :

$$I(q) \propto \frac{1}{q^2} \left[\frac{\sin(qd_m/2)}{qd_m/2} \right]^2 \quad (\text{III.10})$$

Cette loi est utilisée pour ajuster nos valeurs en prenant une épaisseur de membrane de 31.8 Å qui a été obtenue pour la phase lamellaire. Cet ajustement est en bon accord avec nos données (figure III.18). De plus, cette loi de variation conduit à une asymptote correspondant à une variation de l'intensité en q^{-2} puis en q^{-4} . Ceci est vérifié sur nos spectres comme le montre l'encart de la figure III.18.

Ces spectres nous ont permis d'accéder à la loi de dilution de cette phase éponge pour des fractions volumiques en C12E5 supérieures à 0.1. En deçà de cette valeur, la bosse de corrélation est cachée par la remontée aux petits angles (voir Annexe C). Nous avons ainsi complété ces données par l'étude en cryofracture de nos échantillons de manière à vérifier que la phase obtenue était bien une phase éponge.

III.4.3 Cryofracture et microscopie électronique

La cryomicroscopie permet d'avoir des clichés d'une coupe réalisée dans la phase éponge. C'est donc la technique idéale pour avoir des informations sur la topologie d'une phase. Ces expériences ont été réalisées dans deux laboratoires : le laboratoire du trafic membranaire (CEA-Science du Vivant - Gif-sur-Yvette) et le département de Physique (Uni-

versité de Sonora - Hermosillo, Sonora - Mexique). Les clichés ont été obtenus par Dr Jean-Marc Verbavatz et Pr Amir Maldonado respectivement.

Principe

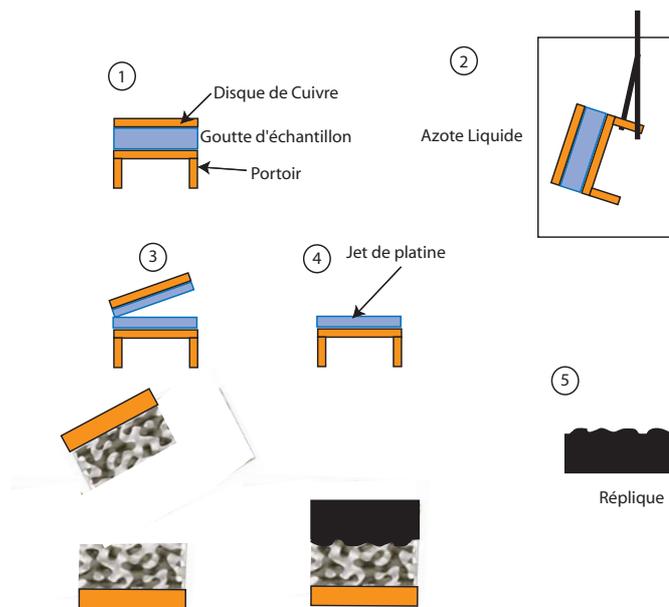
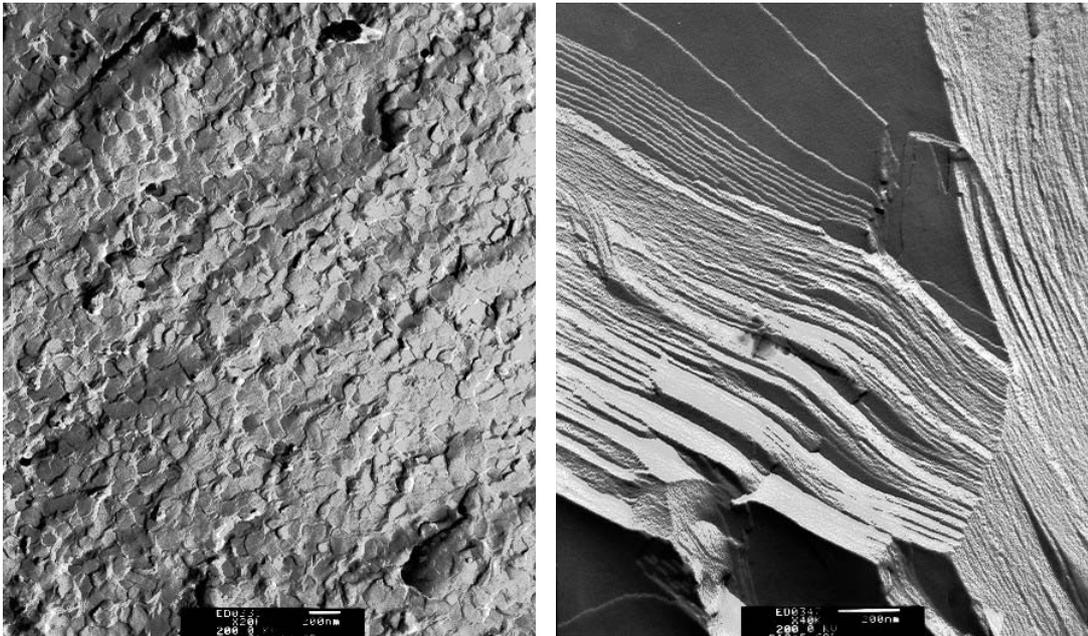


Figure III.19: Résumé de la préparation d'échantillons de cryofracture. Les deux premières étapes permettent de cryofixer l'échantillon placé entre deux disques conducteurs et plongé dans l'azote liquide. L'étape 3 est celle de la fracture de l'échantillon. La gravure de la réplique en platine a alors lieu.

Il faut tout d'abord produire une réplique à partir d'un plan de coupe d'un échantillon comme le résume la figure III.19. Les solutions échantillons sont déposées sur un portoir en métal conducteur généralement du cuivre. La goutte est ensuite prise en sandwich entre le portoir et un disque du même conducteur. L'échantillon est alors plongé très rapidement dans l'azote liquide. Cette étape est une étape clef, il ne faut pas que les échantillons subissent de changement de phase. Pour augmenter l'efficacité du processus, on ajoute généralement un agent cryoprotecteur, le glycérol, à une concentration de 30 %. Cependant dans notre cas, l'addition de glycérol déstabilise la phase. La quantité de glycérol n'a donc pas pu être élevée au-dessus de 5 % pour les phases possédant une fraction volumique en C12E5 inférieure à 0.33 et au-dessus de 10% pour les phases possédant une fraction volumique en C12E5 supérieure. Ceci introduit une difficulté supplémentaire. Une fois l'échantillon cryofixé, on introduit ce dernier à l'intérieur d'un graveur cryogénique stabilisé à 123 K. L'échantillon est fracturé en ôtant le disque de cuivre supérieur. On réalise ainsi une coupe à l'intérieur de notre échantillon. Un film de platine est déposé sur l'interface puis couvert par une couche de carbone pour solidifier la réplique ainsi créée. C'est l'étape de gravure lors de laquelle on crée un négatif de la coupe.

Cette réplique est ensuite étudiée par microscopie électronique. On atteint des résolutions de l'ordre du nanomètre sur les structures présentes.

Résultats de cryofracture



(a) Phase éponge (fraction volumique de C12E5 de 0.25 soit $\phi=0.28$).

(b) Phase lamellaire (fraction volumique de C12E5 de 0.6 soit $\phi=0.66$).

Figure III.20: Clichés de cryofracture obtenus le long de la ligne de dilution étudiée pour différentes valeurs de fraction volumique de membrane. La phase éponge correspondant à une fraction volumique de membrane de 0.28 permet d'imaginer la structure multiconnectée de la phase éponge. Sur le cliché correspondant à la phase lamellaire, on voit clairement se dessiner des lamelles qui sont empilées, la période de cette structure est de 35 Å, ce qui est en bon accord avec les données de SAXS.

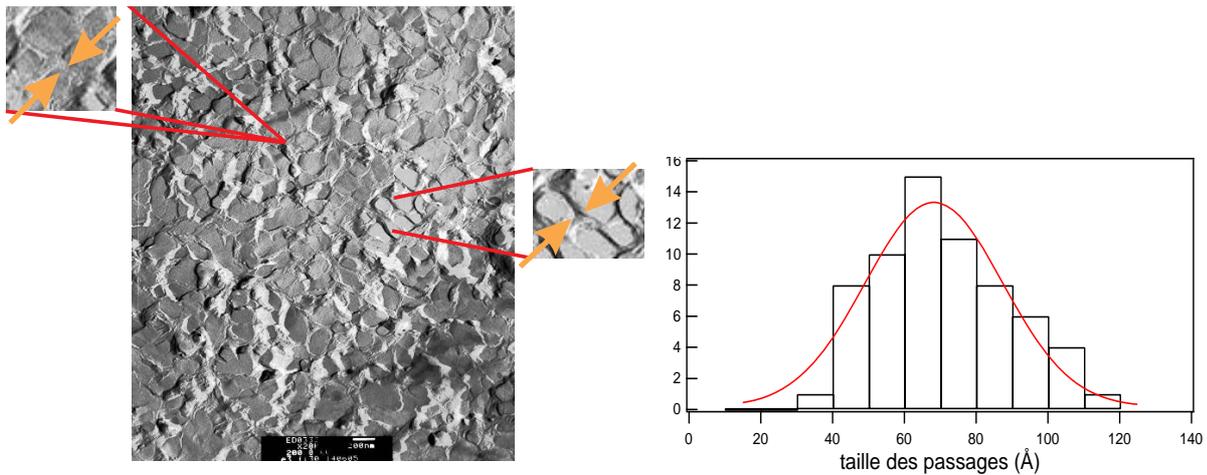
Nous avons obtenu des clichés pour 7 phases éponge avec des fractions volumiques de membranes entre 3.3 et 44 % environ puis pour des phases lamellaires correspondant sur cette ligne de dilution à des fractions volumiques de membranes de 55 et 66 %. Tout d'abord, ces résultats confirment notre diagramme de phase. Au delà de 0.45 de fraction volumique de membrane, on note une transition de phase vers une phase lamellaire. Les rayons X montrent en fait la présence de deux phases dès une fraction volumique de membrane de 0.38.

Les clichés de phases lamellaires sont faciles à interpréter (figure III.20 b). On voit que le plan de fracture est oblique par rapport au plan des bicouches. Quand le plan de coupe suit le plan médian de la bicouche, on voit facilement des ondulations. Nous avons ainsi

pu mesurer la période de cette structure en estimant la distance entre 10 lamelles. Nous avons obtenu une période de 35 Å ce qui corrobore nos résultats de SAXS.

Sur les clichés relatifs à la phase éponge (figure III.20 a), on relève des frontières qui sont des passages entre phases aqueuses mais on peut aussi mettre en évidence la présence de canaux quand le plan de fracture a permis de les couper [74]. Toutes les structures visibles sont des structures fermées.

Pour les différentes phases éponge dont nous possédons des clichés, la position des canaux



(a) Phase éponge ($\phi=0.33$)

(b) Histogramme des tailles de passages

Figure III.21: Sur les clichés de phase éponge, il faut tout d'abord identifier les canaux qui ont été coupés par la fracture. Les encarts montrent deux de ces coupes de passages. La distribution en taille de canaux est ensuite relevée. La précision sur les mesures est de l'ordre du nanomètre. A partir de cette distribution, on donne une taille caractéristique de la structure en utilisant un ajustement par une gaussienne. Cette valeur est comparée aux données obtenues par SAXS (figure III.29).

dans la coupe est identifiée (figure III.21 a). Les tailles des canaux sont relevées grâce à un programme de traitement d'images : Scion Image. A partir de l'histogramme des valeurs mesurées (figure III.21), une taille caractéristique est alors déduite. Ces données viennent ainsi compléter nos résultats issus des spectres de rayons X. Les valeurs trouvées pour des phases déjà étudiées sont en bon accord avec les mesures de position du pic de corrélation (figure III.29).

Ces résultats permettent d'étendre la gamme de caractérisation de la phase éponge. Cependant, les données obtenues ne représentent que quelques points. Nous avons complété ces résultats par des mesures de conductivité afin de vérifier qu'il n'y avait pas de transition de phase le long de la ligne de dilution.

III.4.4 Mesures de conductivité

La phase éponge est composée d'une surface, la membrane, et d'un volume, le solvant. Dans la phase C12E5/ β -OG/solution S2 (Annexe B), la membrane est isolante et le solvant est conducteur car il contient des ions. La fraction volumique de milieu conducteur est alors donnée par $(1-\phi)$ où ϕ est la fraction volumique de membrane. Les propriétés de ces milieux sont celles d'un système mixte de charges libres dans le solvant et de charges liées à l'intérieur de la membrane mais aussi dans le solvant [75]. Les propriétés diélectriques des phases éponge vont être décrites par deux paramètres essentiels qui sont leur conductivité σ d'une part et leur constante diélectrique ε d'autre part.

Cellule plan de mesure

Afin d'étudier le comportement conducteur des phases éponge, nous avons réalisé une cellule plan. Pour cela, nous avons construit une chambre en téflon ce qui évite une

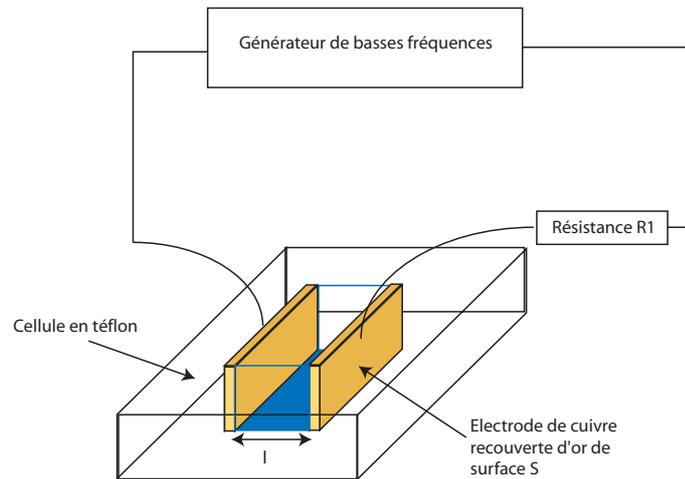


Figure III.22: Schéma du montage utilisé afin de mesurer la conductivité d'une solution de phase éponge. Les électrodes ont une surface de 1.1 cm^2 et sont séparées de 1 mm .

interaction avec les solutions. Dans cette chambre, des électrodes de cuivre recouvertes d'or sont installées. L'utilisation d'une fine couche d'or évite toute réaction entre la solution et la surface (figure III.22). Ces électrodes ont une surface S de $1,1 \text{ cm}^2$ et définissent une chambre de longueur $l = 1 \text{ mm}$. Cette chambre est alimentée par un générateur basses fréquences.

Modèle équivalent

Le circuit équivalent le plus simple permettant de décrire le comportement de l'ensemble cellule + solution est l'association en parallèle d'un condensateur de capacité C et d'une résistance R (figure III.23). L'admittance du système est alors donnée par :

$$Y = \frac{1}{R} + jC\omega \quad (\text{III.11})$$

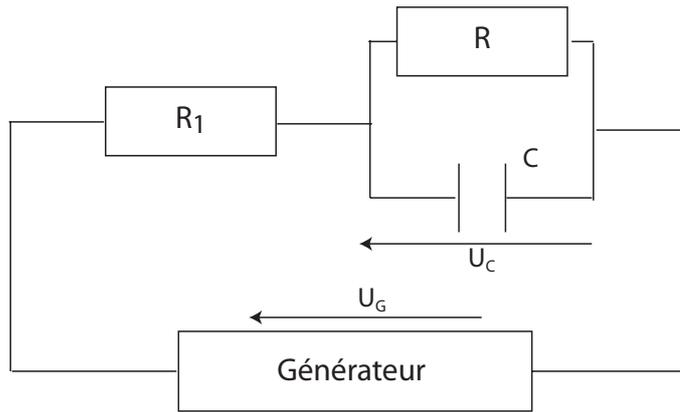


Figure III.23: Modèle équivalent au circuit réalisé. Le système cellule + solution est décrit comme l'association en parallèle d'une résistance R et d'un condensateur C

Les valeurs de la capacité et de la résistance sont liées aux constantes diélectriques par les relations suivantes :

$$\begin{cases} R = \frac{1}{\sigma \lambda_R} \\ C = \epsilon \lambda_C \end{cases} \quad (\text{III.12})$$

où λ_R et λ_C sont les constantes de cellule. Dans le cas idéal, elles sont égales et sont données par le rapport entre la surface des électrodes et la distance entre les électrodes $\frac{S}{l}$. Cependant, dans un circuit réel, une partie du courant peut être déviée vers la masse et le couplage est alors essentiellement capacitif.

La cellule est placée en série avec une résistance R_1 de 500 Ω . Les deux tensions mesurées sont la tension aux bornes du générateur (U_g) ainsi que celle aux bornes de la cellule (U_c). On réalise ainsi un filtre passe-bas. La fonction de transfert H s'écrit :

$$H = \frac{U_c}{U_g} = \frac{1}{1 + R_1 \cdot Y} = \frac{1}{1 + R_1/R + jR_1C\omega}$$

Le module de la fonction de transfert doit diminuer avec la fréquence (pente de -20 dB/décade) et atteindre une valeur de $R/(R + R_1)$ à fréquence nulle. La phase doit diminuer entre 0 et $-\pi/2$.

Les mesures du module $|H|$ et de la phase φ_H de la fonction de transfert permettent de déduire les valeurs de la résistance R et de la capacité C . Les formules suivantes sont obtenues :

$$\begin{cases} \frac{1}{R} = \frac{1}{R_1} \left(-1 + \frac{1}{|H|} \cos(\varphi_H) \right) \\ C\omega = \frac{-1}{|H| \cdot R_1} \sin(\varphi_H) \end{cases} \quad (\text{III.13})$$

Nous avons donc un moyen de déterminer la conductivité d'une solution de phase éponge. Nous allons tout d'abord caractériser notre système de mesure en étudiant la résistance équivalente du système cellule-solution S2 car S2 est le solvant de notre phase éponge.

Etude de la solution S2

Pour toute la suite, les mesures sont effectuées à une température de 23 °C. Dans cette expérience, on place 200 μL de solution S2 dans la chambre. La fréquence du générateur est variée entre 5 Hz et 200 kHz. On relève les tensions U_c et U_g ainsi que leur déphasage puis on déduit le module et la phase de la fonction de transfert (figure III.24).

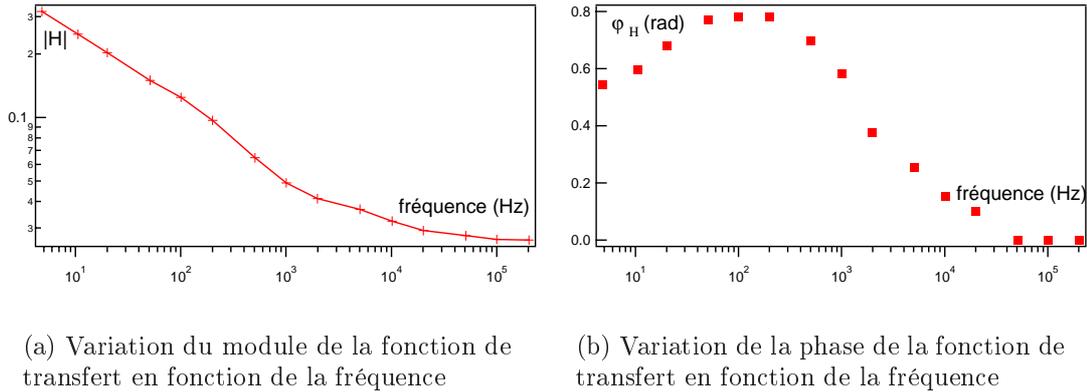


Figure III.24: Détermination de la fonction de transfert en fonction de la fréquence pour la solution S2 qui est le solvant de la phase éponge.

Le module de cette fonction de transfert diminue avec la fréquence. L'admittance du système cellule+solution augmente donc avec la fréquence. Le déphasage passe par un maximum pour une fréquence de l'ordre de la centaine de Hz et s'annule à haute fréquence. Ce comportement est différent de celui attendu d'après notre modèle. Ceci indique un maximum pour la capacité équivalente et donc pour la constante diélectrique du milieu. Le modèle utilisé n'est pas valable en ce qui concerne la capacité.

Considérons les variations de la valeur de l'inverse de la résistance et de la capacité équivalente en fonction de la fréquence obtenues grâce aux relations III.13 (figure III.25). Si le modèle utilisé est valable, on aura une conductance $1/R$ constante et une capacitance $C\omega$ qui augmente linéairement en fonction de la fréquence.

Les variations de la partie imaginaire de l'admittance présentent trois régions distinctes. A basses fréquences, la capacité effective augmente rapidement avec la fréquence. Elle atteint un maximum autour d'une fréquence de 1 kHz. Enfin, elle diminue à haute fréquence pour atteindre une valeur nulle.

On observe une augmentation rapide de la conductance ($1/R$) quand on se déplace vers les hautes fréquences. On a donc une résistance qui varie en fonction de la fréquence. Au-delà de 100 kHz, la conductance atteint un plateau. La valeur de ce plateau est de $(7.3 \pm 0.6) \cdot 10^{-2} \Omega^{-1}$. Si on applique la formule III.12 dans le cas idéal pour lequel $\lambda_R = \frac{S}{l}$, on obtient une conductivité maximale mesurée de $6.6 \pm 0.5 \cdot 10^{-1} \text{ S.m}^{-1}$. Or la solution S2 contient des ions Na^+ et Cl^- à la concentration de 100 mM, un tampon phosphate (3 Na^+ , PO_4^{3-}) à 50 mM. La conductivité molaire (λ) des ions sodium est de $5 \cdot 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1}$,

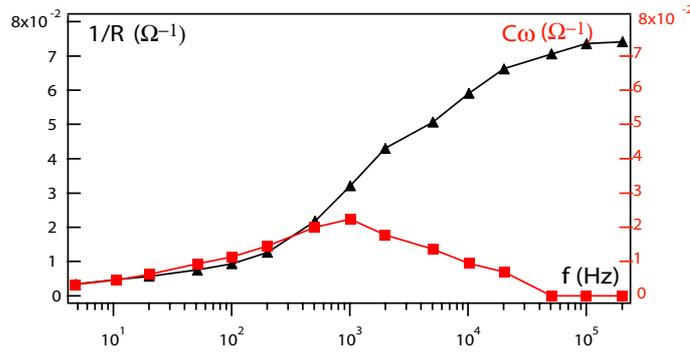


Figure III.25: Variation de l'admittance pour une solution S2 en fonction de la fréquence. La droite avec les triangles donne les variations de la partie réelle de l'admittance ($1/R$) et celle avec les carrés, celles de la partie imaginaire ($C\omega$).

celle des ions chlorure est de $7.6 \cdot 10^{-3} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1}$ et celle des ions phosphate est de $2.8 \cdot 10^{-2} \text{ S.m}^2.\text{mol}^{-1}$. La conductivité totale de la solution est alors donnée par la somme :

$$\sigma = c_{Na} \cdot \lambda_{Na} + c_{Cl} \cdot \lambda_{Cl} + 3c_{PO_4} \cdot \lambda_{PO_4}$$

On trouve une valeur de 5.7 S.m^{-1} . Ainsi, la valeur obtenue à haute fréquence est inférieure à celle attendue pour une conductivité constante en fonction de la fréquence. La constante de cellule λ_R est plus faible que celle attendue. En effet, à haute fréquence, les effets de propagations sont à prendre en compte et la surface effective de l'électrode plan est plus faible que celle considérée dans le cas simple. Pour vérifier cet effet, on utilise plusieurs solutions de salinité différentes. On compare la conductance seuil obtenue à la conductivité des solutions (figure III.26). La constante de cellule mesurée est alors $\lambda_R = (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-2} \text{ m}$.

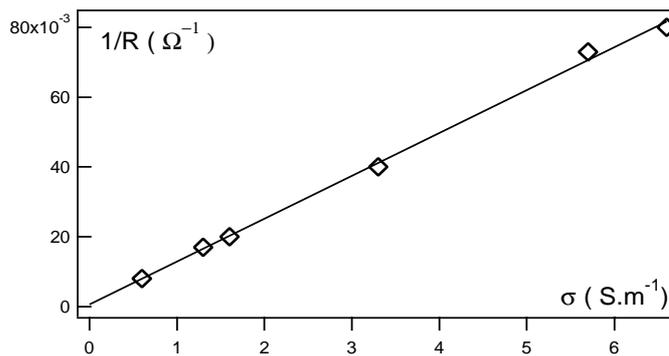


Figure III.26: Variation de la conductance seuil mesurée en fonction de la conductivité. La pente donne la constante de cellule $\lambda_R = (1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-2} \text{ m}$.

Les excès de résistances et de capacité observés à basse fréquence proviennent des phénomènes de polarisation aux électrodes. En effet, même si aucune réaction d'oxydo-réduction n'a lieu au niveau des électrodes, certains ions s'adsorbent sur la surface de

l'électrode [76]. Ceci induit un masquage partiel des électrodes ce qui se traduit par une chute supplémentaire de potentiel. Tout se passe donc comme si une impédance supplémentaire était ajoutée au système. Il faut corriger cet effet. Nous avons donc repris la méthode donnée par Corinne Vinches dans sa thèse [75] pour corriger nos données. Cette méthode repose sur l'hypothèse que le couple électrolyte/électrode diffère peu pour la solution S2 seule et pour celle des échantillons de phase éponge. La solution S2 sert alors de calibration pour la correction de ces effets, elle autorise la détermination de l'impédance supplémentaire pour chaque fréquence par simple différence avec la valeur attendue.

Mesure du facteur d'obstruction

La tortuosité des phases influence la conductivité du milieu. On définit alors le facteur d'obstruction \mathcal{S} par la relation suivante :

$$\mathcal{S} = \frac{\sigma_{DC}}{\sigma_{S2}(1 - \phi)} \quad (\text{III.14})$$

où σ_{DC} et σ_{S2} désignent respectivement les conductivités de la phase à étudier et celle de la solution S2. Le facteur $1 - \phi$ corrige le fait que seule cette fraction de volume est conductrice. Ce facteur quantifie l'obstacle du milieu à la diffusion.

Nous avons testé deux types de phases : d'une part une phase lamellaire du système C12E5/ β -OG/solution S2 correspondant à une fraction volumique de membrane de 0.5, et d'autre part des phases identifiées comme phases L_3 dont la fraction volumique de membrane varie entre 0.033 et 0.33. En ce qui concerne la phase lamellaire, nous obtenons un facteur d'obstruction de 0.68 ± 0.05 (figure III.27) proche de la valeur de $2/3$ attendue pour de tels systèmes. Ce résultat permet de valider notre méthode de mesure.

Pour les échantillons correspondants à des fractions volumiques comprises entre 0.033

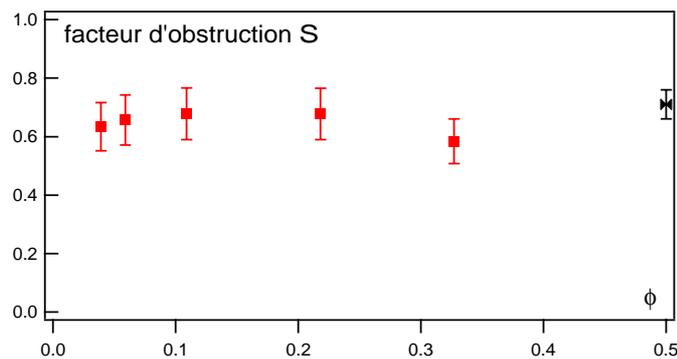


Figure III.27: Variation du facteur d'obstruction en fonction de la fraction volumique de membrane des échantillons le long de la ligne de dilution de la figure III.6. Les ■ indiquent une phase L_3 et le x indique la phase lamellaire étudiée.

et 0.33, le facteur d'obstruction est constant et égal à 0.62 ± 0.08 (figure III.27). Cette valeur est proche de celles trouvées pour des phases éponge symétriques [73] [77]. Ces articles concluent à une valeur de 0.6 pour ce type de phases.

En conclusion, les mesures de conductivité sur la phase de C12E5/ β -OG/solution S2 suivant la ligne de dilution en rouge de la figure III.6 confirment que la phase étudiée est une phase éponge pour des fractions ϕ comprises entre 0.033 et 0.33. En outre, elles permettent de conclure que la phase étudiée est symétrique. En effet, pour une phase asymétrique, la conductivité augmente pour atteindre la valeur de 1 [77] correspondant au solvant ce qui indique une phase moins obstruée qu'une phase éponge.

III.4.5 Conclusion

Ces résultats permettent de déduire que sur la gamme de fraction volumique de C12E5 comprise entre 0.033 et 0.3, la phase étudiée est bien une phase éponge et qui plus est, une phase éponge symétrique. Il nous reste donc à connaître les tailles caractéristiques de cette structure pour pouvoir l'employer dans nos expériences. Nous devons en effet vérifier que cette gamme de variation de la fraction volumique de membrane autorise un encadrement de la taille du périplasme d'une bactérie (200 Å) pour pouvoir réaliser nos expériences sur les protéines d'une pompe à efflux.

III.5 Taille caractéristique de la phase éponge C12E5/ β -OG/S2

Nous avons mesuré selon la fraction volumique de C12E5, et donc selon la fraction volumique de membrane ϕ , la taille caractéristique de la phase éponge par deux méthodes qui sont :

- la diffusion de rayons X. La taille caractéristique est déduite de la position de la bosse de corrélation.
- la détermination de la taille des canaux sur les clichés de cryofracture.

Ces résultats ont été comparés aux principales théories existantes sur les lois de dilution de telles structures.

III.5.1 Loi de dilution d'une phase éponge

Dans une première approche, l'étude des lois de dilution des phases éponges ou L_3 s'appuie sur les mêmes arguments que ceux évoqués pour la phase lamellaire et on obtient la loi de dilution suivante :

$$\phi = \frac{\alpha d_m}{d} \quad (\text{III.15})$$

avec α une constante égale à 1 pour la phase lamellaire et à 1.5 pour une phase éponge. Des résultats expérimentaux [67], [68], [69] annoncent un coefficient α compris entre 1.4 et 1.6.

Si on reprend le formalisme développé pour les phases lamellaires, ce résultat est modifié par la prise en compte des fluctuations. Si les différences entre les surfaces réelles et

projetées sont modélisées, le rapport entre ces deux grandeurs est toujours donné par la relation III.8. ℓ_{min} a la même signification que pour une phase lamellaire. En revanche, ξ_{\parallel} n'a pas la même origine. Dans une phase lamellaire, cette grandeur représente l'échelle spatiale au-delà de laquelle la rigidité de la membrane est renforcée par les répulsions stériques entre membranes adjacentes. Dans le cas de la phase éponge, la situation est différente. Les déplacements sont de l'ordre de $\sqrt{\frac{k_B T}{\kappa} \bar{d}}$, pour des rigidités de l'ordre de $0.6 k_B T$. Ces déplacements sont donc légèrement supérieurs à \bar{d} et les interactions stériques ont un poids moins important que pour la phase lamellaire. Toutefois, comme la phase éponge est multiconnectée, les déplacements de deux points distants de \bar{d} sont corrélés. Il faut bien introduire une taille maximale ξ_{\parallel} pour les fluctuations qui doit être reliée à \bar{d} mais par un préfacteur différent de celui obtenu pour une phase lamellaire. La relation entre \bar{d} et ϕ s'écrit :

$$\phi = \frac{1.5d_m}{\bar{d}}(Y' + Z' \ln(\phi)) \quad (\text{III.16})$$

Z' est identique au résultat obtenu pour la phase lamellaire soit :

$$Z = \frac{k_B T}{4\pi\kappa}$$

Y' est, quant à lui, différent de celui obtenu pour la phase lamellaire.

Si le pic de corrélation des phases éponge est assez précisément déterminé, il est donc possible de mesurer le module de rigidité de la bicouche de manière analogue à la détermination faite pour une phase lamellaire. Cependant on peut voir sur nos spectres (figure III.18) que la largeur de la bosse est trop importante pour espérer une telle estimation. Une approche différente de la phase éponge a été faite par Engblom et Hyde [78]. Ces derniers ont pris en compte le fait que la membrane n'est pas localement plane. Leur hypothèse est que le plan neutre qui correspond à la surface sur laquelle l'aire par molécule reste constante au cours de la dilution est maintenu à une certaine distance t de la surface médiane de la bicouche. Ils sont parvenus à une correction par un terme cubique dans la loi de dilution :

$$\phi = \alpha_1 \bar{d}^{-1} + \alpha_2 \bar{d}^{-3} \quad (\text{III.17})$$

α_1 et α_2 sont des constantes reliées à des caractéristiques topologiques de la phase. Elles font apparaître sa caractéristique d'Euler-Poincaré $\chi = 2(1 - g)$ avec g le degré de connectivité de la phase, la constante d'homogénéité H . Cette dernière constante relie l'aire d'une cellule élémentaire de surface minimale A_{uc} , la taille caractéristique de la structure ξ et la caractéristique d'Euler-Poincaré χ par la relation :

$$H = \frac{A_{uc}^{3/2}}{(-2\pi\chi)^{1/2}\xi^3}$$

α_1 et α_2 font aussi intervenir des paramètres comme v le volume d'un tensioactif ou $\Omega(t)$ la surface d'une molécule de surfactant au niveau du plan dit neutre. On a les relations suivantes :

$$\alpha_1 = \frac{(-16\pi\chi H^2)^{1/3}v}{\Omega(t)}$$

et

$$\alpha_2 = \frac{-4\pi\chi vt^2}{\Omega(t)}$$

Cette modélisation nous permet d'accéder à la topologie de la phase à partir de sa loi de dilution. Cette loi de dilution est reprise par les auteurs pour étudier des données déjà publiées et donne de bons résultats. Ce modèle a été confronté à des résultats obtenus par d'autres techniques [79]. Amir Maldonado a déterminé la topologie d'une phase éponge de C14DMAO grâce à l'étude de la loi de dilution. Ses conclusions ont été confirmées par des mesures de diffusion de tensioactif à l'intérieur de cette même phase [79].

III.5.2 Etude de l'évolution de la période avec la fraction volumique de membrane

En SAXS, on obtient une bosse qui se dégage de la remontée aux petits angles dès que la fraction volumique de membrane est supérieure à 10%. Par rapport aux phases lamellaires, le fait que nous ayons une bosse et non un pic rend la détermination de la taille caractéristique de ces phases plus difficile. Toutefois, on parvient à voir un déplacement net de la position de la bosse quand on passe d'une fraction volumique de membrane de 0.32 à 0.11 % comme en témoigne la figure III.28. La forme de ces pics n'est pas la même selon la fraction volumique en membrane ϕ . A mesure que le pic se déplace vers les faibles vecteurs d'onde, on observe une remontée de l'intensité aux petits angles.

On représente ϕ en fonction de la position du pic de corrélation pour ces phases éponge

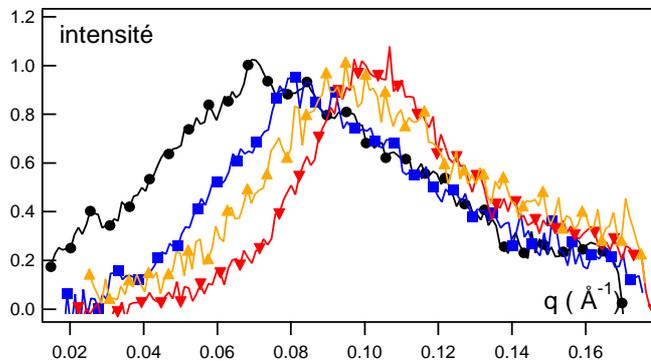


Figure III.28: Spectres obtenus pour des phases éponge de C12E5/ β -OG/H2O correspondant à des fractions volumiques de membranes de 0.11 (●), 0.17 (■), 0.29 (▲) et 0.32 (◆)

(figure III.29). Ces résultats sont complétés par ceux obtenus grâce à nos clichés de cryofracture. Les mesures effectuées par ces deux méthodes donnent de bonnes corrélations. En outre, elles permettent d'atteindre une gamme de fraction volumique ϕ plus importante.

La première observation de l'étude de cette loi de dilution est que l'ajustement linéaire n'est pas adéquat pour décrire le comportement de cette phase. Même si on peut parvenir à ajuster par une droite les points obtenus grâce l'étude des spectres de rayons X de ces structures, celle-ci ne passe pas par l'origine. L'ajustement par une loi de la forme

$\phi = \alpha \frac{d_m}{d} + \beta$ (ligne en pointillés sur la figure III.29) donne une valeur de α de 1.4, en supposant que l'épaisseur de membrane d_m déterminée pour la phase lamellaire est inchangée (soit $d_m = 31.8 \text{ \AA}$). La dépendance entre fraction volumique et taille est identique aux résultats obtenus sur des phases éponges. Cependant, dans notre cas, nous avons une valeur non nulle du coefficient β . Ce résultat interdit toute détermination du module de rigidité par l'étude de l'écart de la loi de dilution.

Une approche alternative est donc de considérer le modèle de Engblom et Hyde. Ce modèle donne de bons résultats pour l'ajustement de nos données. Cependant l'ajustement proposé requiert une valeur positive pour χ . Cela signifie que le nombre de connexions de cette phase éponge est inférieur à 1 par cellule. Ce résultat n'est pas acceptable pour une phase éponge.

Certains résultats établis sur les phases de C12E5 montrent que les chaînes s'interpénètrent

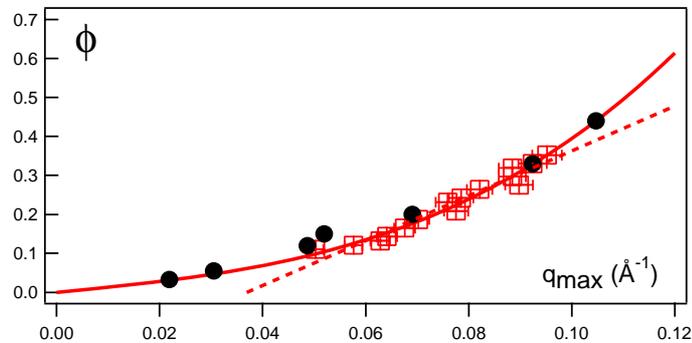


Figure III.29: Variation de la fraction volumique de membrane en fonction du vecteur de diffusion correspondant à la taille caractéristique de la phase éponge. Deux types de résultats sont comparés : les carrés vides représentent les résultats obtenus avec les spectres de rayons X et les disques pleins ceux obtenus à partir des clichés de cryofracture. L'ajustement linéaire (en traits pointillés) est comparé à l'ajustement proposé par Engblom et Hyde [78] pour les phases éponge. Ce dernier modèle décrit mieux nos données. Il conduit aux valeurs suivantes de α_1 et α_2 de 8.1 \AA et de $6.6 \cdot 10^4 \text{ \AA}^3$.

[71]. Il est possible que l'épaisseur de la bicouche ne soit pas constante au cours de la dilution. Si l'épaisseur de la bicouche augmente à mesure que la fraction volumique de membrane augmente ϕ alors la courbe représentant ϕ en fonction du vecteur d'onde q_{max} sera concave. Ceci peut expliquer nos variations (figure III.30). Toutefois cette hypothèse semble infirmée par le fait que pour les phases lamellaires étudiées, la loi de dilution donne un écart positif à cette loi c'est-à-dire un comportement sans interdigitation. En effet, si à mesure que la fraction volumique de membrane augmente, la taille de la bicouche diminue alors la période de la structure sera inférieure à la valeur extrapolée à partir de la loi linéaire de variation. Ceci conduirait à un écart négatif. Mais cela n'est pas vérifié (figure III.12). Dans le cas des phases éponge, le rapport entre cotensioactif et tensioactif est moins important que celui utilisé dans les phases lamellaires. Le comportement de ces phases est donc plus proche de celui de phases binaires de C12E5.

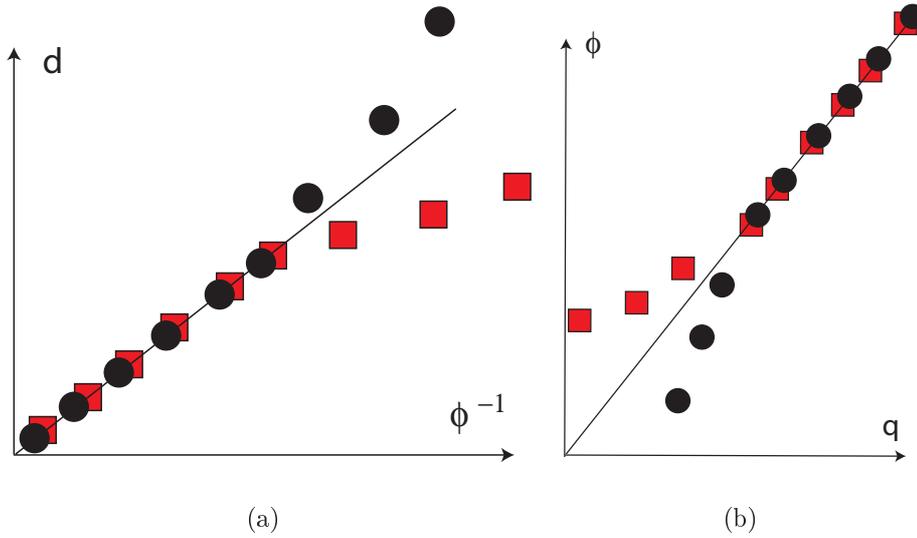


Figure III.30: Comparaison entre la loi de dilution obtenue pour une phase d'un tensioactif dont les chaînes interdigitent (■) et un tensioactif sans interpénétration des chaînes (●). Les représentations $d = f(\phi^{-1})$ et $\phi = f(q)$ sont utilisées.

De plus, nous avons essayé de déterminer les caractéristiques topologiques de la phase C12E5/ β -OG/solution S2 par une théorie de champ gaussien développée par Pierre Levitz [80] [81]. Ce modèle utilise des coupes à deux dimensions comme les clichés de cryofracture afin d'obtenir une construction tri-dimensionnelle de la phase en supposant que celle-ci est symétrique et qu'elle suit une surface minimale. Les résultats obtenus pour une phase correspondant à une fraction ϕ de 0.3 ne permettent pas une reconstruction en accord avec les clichés de départ. Ainsi deux théories qui supposent une surface minimale ne s'appliquent pas à la phase L_3 que nous étudions : la théorie de champ moyen et celle sur la dilution développée par Engblöm et Hyde. Cette hypothèse est peut-être à remettre en cause pour l'étude de nos systèmes.

III.6 Conclusion

Nous avons étudié des phases de bicouches constituées de C12E5 et de β -OG dispersées dans un tampon phosphate (solution S2 Annexe B).

Pour une concentration en β -OG de 10 molécules pour 16 molécules de C12E5, on observe une phase lamellaire dont les bicouches peuvent être gonflées par du dodécane entre $d_m = 31.9$ et 47.9 Å.

L'écart à la loi de dilution a permis de déterminer le module de rigidité de cette bicouche $\kappa = 0.6 \pm 0.2 k_B T$ lorsque la phase n'est pas gonflée et $\kappa = 0.4 \pm 0.1 k_B T$ pour une épaisseur $d_m = 47.9$ Å.

Pour des concentrations en β -OG de 1 molécule pour 9 molécules de tensioactif C12E5, la phase devient isotrope. Les mesures de conductivité permettent de mesurer un facteur d'obstruction de 0.62 ± 0.08 proche de la valeur mesurée dans d'autres systèmes pour une phase éponge [73]. La cryofracture révèle des textures typiques d'une phase éponge. L'analyse de ces clichés permet de déterminer la variation de la taille caractéristique ξ avec la dilution et ce en bon accord avec les résultats de SAXS.

Toutefois, la loi de dilution (figure III.29) ne suit ni le modèle de Porte et al. [67], ni celui de Engblom et Hyde [78]. Ce comportement pourrait être dû au fait qu'en L_3 , l'épaisseur de la bicouche n'est pas constante lors de la dilution. Ce phénomène a été observé pour des phases lamellaires de C12E5. Cette phase L_3 est particulière puisqu'habituellement l'ajout de cotensioactif à une phase lamellaire induit une transition vers une phase L_3 .

III.7 Caractérisation de la phase C12E5/ β -OG-DDM/S2

La protéine MexB est soluble dans un détergent : le DDM. Les essais réalisés pour une solubilisation dans du β -OG prouvent que la protéine MexB n'est pas stable [23]. Pour l'étude de la protéine MexB, nous avons dû changer le cotensioactif utilisé. Plus précisément, nous utilisons toujours du β -OG mais une molécule de β -OG sur 10 est remplacée par du DDM. Cette quantité a été choisie car elle représente la quantité minimale de protéines MexB fluorescentes pouvant être placée dans la solution et dont le signal de fluorescence soit mesurable. En effet, la protéine MexB est nécessairement ajoutée avec son détergent le DDM à l'intérieur de la solution. La quantité minimale de protéine pouvant être ajoutée fixe ainsi la quantité minimale de DDM. L'addition de DDM ne semble pas modifier la phase, celle-ci reste isotrope entre polariseur et analyseur croisés.

Les échantillons ont alors été étudiés par diffusion de rayons X pour des fractions volumiques de membranes comprises entre 0.03 et 0.3. Ces résultats ont été obtenus par Laurence Navailles (CRPP-Bordeaux). Pour les phases très diluées (figure III.31), le pic de corrélation n'est pas visible du fait de la remontée aux petits angles. A partir d'une fraction volumique de 0.11, une bosse apparaît. Cependant la position de cette bosse ne change pas malgré l'augmentation de la fraction volumique de tensioactif. L'intensité du pic se contente d'augmenter. On peut remarquer un épaulement qui apparaît aux grands vecteurs d'onde comme si deux phases co-existaient. Une explication possible est que la phase contiennent des micelles faiblement polydisperses dont la concentration augmente avec la fraction volumique de membrane. Le DDM est un détergent ayant une très faible concentration micellaire critique (Annexe A). Il est donc possible qu'il encourage la formation de micelles. De plus, ce détergent a la même longueur de chaîne que le tensioactif. Son insertion dans la bicouche n'est donc pas facilitée. Ces résultats montrent que le changement d'un cotensioactif est très sensible pour l'existence de la phase éponge.

La conductivité de ces phases a été mesurée avec la même méthode que celle décrite à la section III.4.4. Le facteur d'obstruction est égal à 0.6 pour des phases dont la fraction volumique de membrane varie entre 0.03 et 0.11 (figure III.32). L'hypothèse d'une phase éponge pour cette gamme de ϕ est donc envisageable. Pour des fractions volumiques supérieures à 0.12 (figure III.32), le facteur d'obstruction diminue. Si la solution contient

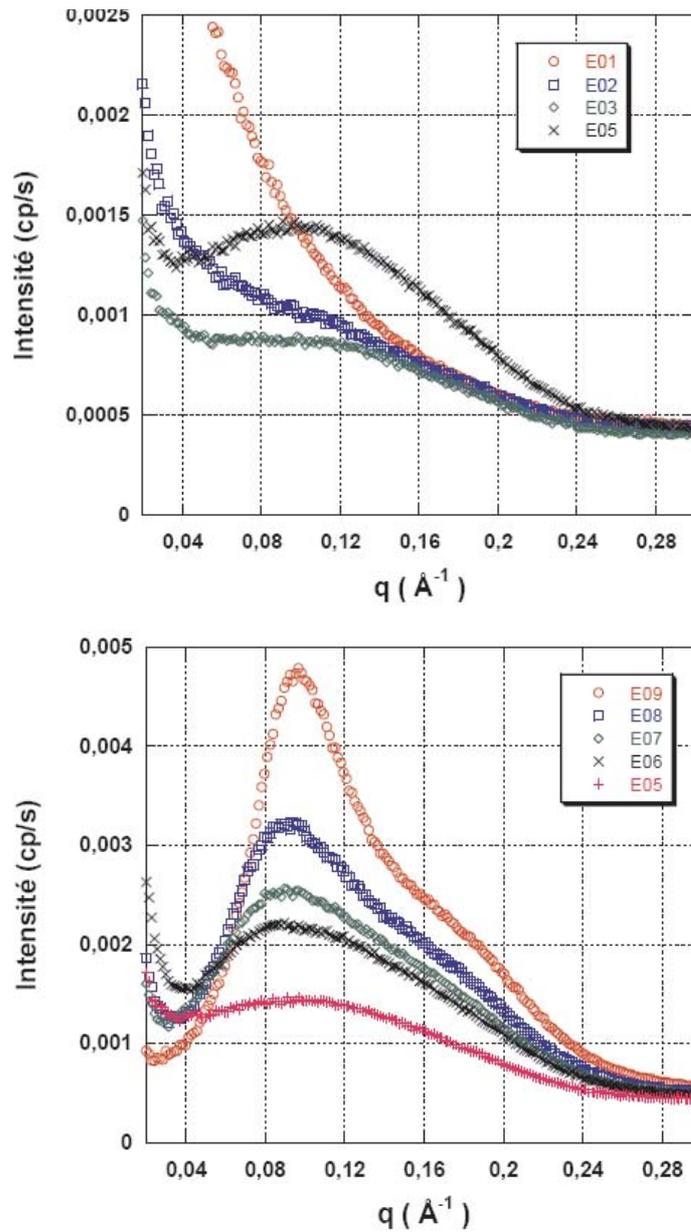


Figure III.31: Spectres de SAXS obtenus pour la phase contenant du DDM. Les fractions volumiques de membranes sont de 0.033, 0.055, 0.077 et 0.11 pour les spectres E01 à E04 du haut et de 0.13, 0.165, 0.187, 0.22 et 0.275 pour les échantillons E05 à E09 sur la figure du bas.

des micelles, la fraction volumique qui participe à la conduction est inférieure à $(1 - \phi)$. Ainsi le facteur d'obstruction n'est pas bien corrigé mais il est sous-estimé. Ceci pourrait expliquer nos résultats.

Pour les expériences que nous allons réaliser, ce sont les phases les plus diluées qui nous intéressent. Il faudrait compléter ces résultats par des données de cryofracture afin de connaître la nature exacte des phases pour des valeurs de ϕ entre 0.033 et 0.11. Ces échan-

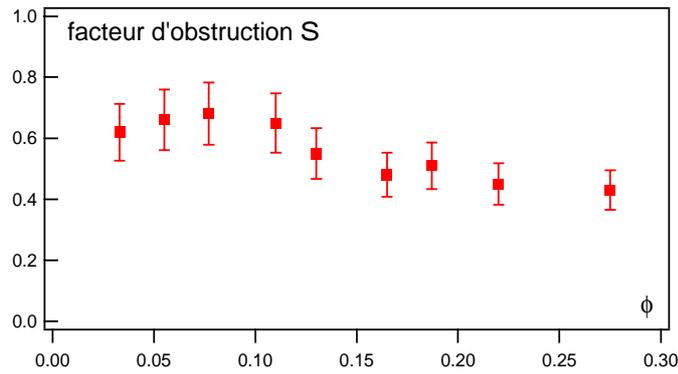


Figure III.32: Variation du facteur d'obstruction pour la phase C12E5/ β -OG-DDM/solution S2 en fonction de la fraction volumique de membrane. Pour des valeurs de ϕ inférieures à 0.11, on retrouve le même facteur d'obstruction que dans le cas d'une phase éponge [77]. Pour des valeurs supérieures de ϕ , le facteur d'obstruction diminue.

tillons sont en cours d'étude par Pr Amir Maldonado (Université de Sonora-Hermosillo-Mexique).

La phase C12E5/ β -OG-DDM/solution S2 est une phase qui est isotrope pour des fractions volumiques comprises entre 0.033 et 0.25. Dans cette gamme, les rayons X révèlent que le système obtenu pour des valeurs de ϕ entre 0.12 et 0.25 n'est pas une phase éponge simple. Pour des fractions volumiques de membranes inférieures, la nature de la phase n'est pas identifiée. Toutefois, les mesures de conductivité mettent en évidence une transition de phase autour d'une valeur de ϕ de 0.12. Le facteur d'obstruction des phases dont la fraction volumique de membrane appartient à l'intervalle 0.03-0.11 est compatible avec celui d'une phase éponge. Dans l'attente de résultats complémentaires, nous avons supposé pour les expériences qui vont suivre que la phase utilisée est bien une phase éponge dont les caractéristiques sont identiques à la phase L₃ du système C12E5/ β -OG/solution S2 que nous avons étudié lors de ce chapitre.

Chapitre IV

Diffusion de protéines membranaires

La diffusion brownienne a été découverte grâce aux observations de grains de pollen par Brown [82]. Einstein [83] en a proposé une interprétation et Perrin [84] l'a vérifiée. La diffusion d'un objet de rayon R est décrite par :

$$D = \frac{k_B T}{f} \quad (\text{IV.1})$$

où f est le coefficient de friction qui s'exerce sur l'objet. Ce coefficient est égal à $6\pi\eta R$ dans le cas d'une sphère diffusant à l'intérieur d'un milieu de viscosité η . Ce modèle hydrodynamique et statistique considère le fluide environnant comme un milieu continu. Dès les années 70, les membranes ont été modélisées sous la forme de milieux fluides [52]. Une question intéressante a alors été de déterminer le coefficient de diffusion latérale d'un objet dans une bicouche. L'enjeu était de comprendre la diffusion de protéines sur une membrane. Si on se place dans un régime de faible nombre de Reynolds¹, le problème se réduit à la détermination du coefficient de friction f d'un cylindre en translation dans un écoulement. Toutefois ce problème à deux dimensions n'a pas de solution. Ceci est dû au fait que les perturbations de vitesse sur le fluide divergent avec la distance au cylindre [85] [86]. C'est ce qui est nommé le paradoxe de Stokes. Saffman et Delbrück en 1975 [87] ont proposé un nouveau modèle prenant en compte la viscosité du fluide environnant que nous décrirons dans la première partie de ce chapitre. Ce modèle conduit à un coefficient de diffusion qui varie très faiblement en fonction du rayon de l'objet (dépendance logarithmique). Cette dépendance est peu sensible aux interactions entre des objets. En effet, une variation de rayon d'un facteur 20 conduit à une variation de 10% seulement sur le coefficient de diffusion. Les mécanismes membranaires tels que l'export, les échanges d'informations entre cellules ou les voies de transduction font appel à des assemblages transitoires au sein de la membrane mais selon le modèle de Saffman-Delbrück, la mobilité n'est pas modifiée. Cependant, les outils tels que les mesures de recouvrement de fluorescence [88], le suivi de molécules uniques [89] ou la corrélation de fluorescence [90] qui s'attachent à mesurer des coefficients de diffusion sont toujours employés afin de mettre en évidence des structures transitoires.

Nous avons étudié ce modèle à l'intérieur de systèmes modèles de bicouches : les phases éponge. Les objets diffusants sont des protéines et des peptides couvrant des gammes de rayons entre 5 et 30 Å . Après avoir introduit le modèle de Saffman et Delbrück, nous verrons les résultats obtenus sur la vérification expérimentale de ce modèle. Nous utiliserons alors ces résultats pour apporter un nouveau point de vue sur le mésappariement

¹Le nombre de Reynolds qualifie le régime d'un écoulement. Il compare les forces d'inertie et les forces de viscosité. Pour un faible nombre de Reynolds (< 1), l'écoulement est laminaire et les phénomènes visqueux sont prépondérants.

hydrophobe, c'est-à-dire l'inadéquation entre la taille d'un objet et l'épaisseur du milieu dans lequel il diffuse.

IV.1 Modèle de Saffman-Delbrück

IV.1.1 Hypothèses

Saffman et Delbrück ont envisagé la diffusion d'objets cylindriques de rayon "a" libres de se déplacer à l'intérieur d'une membrane de viscosité μ entourée de part et d'autre d'un fluide de viscosité μ' (figure IV.1). L'épaisseur hydrophobe de la membrane notée h est égale à la hauteur du cylindre qui diffuse. Comme Saffman et Delbrück s'intéressent au cas de membranes biologiques qui sont des objets très visqueux entourés d'eau, ils supposent que $\mu' \ll \mu$ (des valeurs de μ cent fois supérieures à celles de μ' sont supposées).

Dans le cas limite où la viscosité du fluide environnant est négligée, aucune friction n'est

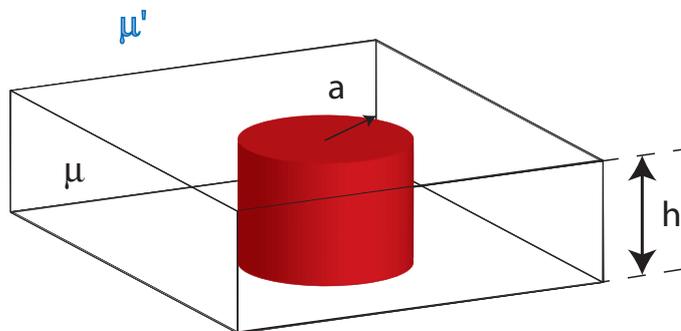


Figure IV.1: Modèle hydrodynamique de diffusion d'un objet incorporé dans une membrane de viscosité μ et entouré d'un fluide de viscosité μ' .

transmise de part et d'autre de la membrane. Le problème est celui de la diffusion d'un cylindre dans un fluide d'extension infinie qui n'est pas soluble : c'est le paradoxe de Stokes [85].

Saffman et Delbrück proposent alors trois solutions correspondant à trois hypothèses distinctes :

- la membrane possède une taille finie, cette extension est notée R ,
- la viscosité du fluide environnant μ' est prise en compte,
- la traînée due au cylindre est décrite par les équations des écoulements turbulents

Pour les deux premières situations, ils ajoutent aussi une hypothèse de non-glissement aux frontières entre l'objet et le fluide environnant. Cependant ils soulèvent l'interrogation sur la justesse de cette hypothèse dans des milieux tels que les membranes biologiques. Le second cas est celui qui décrit *a priori* le mieux la situation d'une protéine incorporée dans une membrane et diffusant à l'intérieur de celle-ci.

IV.1.2 Résultats d'une viscosité μ' non nulle

Le problème étant à deux dimensions, les mouvements dans la direction perpendiculaire au plan de la membrane sont interdits.

Nous allons ici introduire les étapes principales du raisonnement de Saffman [91] [92] afin d'obtenir les différentes dépendances mises en jeu puis nous donnerons directement les résultats obtenus par Saffman et Delbrück. On considère un cylindre de rayon "a" se déplaçant avec la vitesse U à l'intérieur d'une membrane de viscosité μ entourée d'un fluide de viscosité μ' [91]. La perturbation de vitesse du fluide en fonction de la distance au cylindre peut s'exprimer de manière classique comme [86] :

$$\Delta u(r) \approx \frac{F}{\mu h} \ln\left(\frac{r}{a}\right)$$

Il faut ensuite estimer la taille de fluide sur laquelle le frottement exercé par le fluide environnant sur la membrane n'est pas négligeable. On nomme l cette longueur. La force de friction surfacique exercée par le fluide sur la membrane est donnée par $\mu' \frac{\partial u}{\partial r} \simeq \mu' \frac{\Delta u}{l}$. Or si on suppose que cette force est distribuée sur toute l'épaisseur h , la force volumique de viscosité qui en découle peut être estimée par $\mu' \frac{\Delta u}{hl}$. Parallèlement, la force visqueuse exercée par le cylindre sur le fluide est $\mu \frac{\partial^2 u}{\partial r^2} \simeq \mu \frac{\Delta u}{l^2}$. l est estimée en égalant ces deux forces, on trouve ainsi :

$$l \simeq \frac{\mu}{\mu'} h$$

Le rapport des viscosités entre la membrane et le fluide environnant est compris entre 100 et 1000 selon Saffman. L'épaisseur h de la membrane étant de l'ordre de 10 à 30 Å, l est de l'ordre de 0.1 à 3 μm . Le rayon "a" d'une protéine est de l'ordre du nanomètre. Le rapport $\frac{a}{l}$ est négligeable. Ceci signifie que l'objet ressent l'influence du fluide environnant. Les forces qui s'exercent sur le cylindre sont dominées par les variations de vitesse qui interviennent sur une longueur caractéristique de l'ordre de $a \ln(\frac{l}{a})$ [92]. L'ordre de grandeur de la force qui s'exerce sur le cylindre est alors :

$$F = \mu S \frac{\partial u}{\partial r} \approx \mu 2\pi a h \frac{U}{a \ln(l/a)} = \frac{2\pi \mu' a U}{\frac{a}{l} \ln(\frac{l}{a})}. \quad (\text{IV.2})$$

D'après la formule de Stokes-Einstein, comme le coefficient de friction est donné par F/U , le coefficient de diffusion qui s'en déduit est :

$$D = \frac{k_B T}{2\pi \mu h} \ln\left(\frac{\mu h}{\mu' a}\right)$$

Cette formule montre que le rayon a de l'objet a peu d'importance. Les dépendances les plus importantes sont celles en épaisseur hydrophobe h et en viscosité de membrane μ . Saffman utilise la méthode perturbative [91] afin d'obtenir la force exercée sur le cylindre :

$$F = \frac{4\pi \mu' a U}{\frac{a}{l} \left[\ln\left(\frac{l}{a}\right) - \gamma \right]}. \quad (\text{IV.3})$$

et en déduire la constante de diffusion translationnelle :

$$D_T = \frac{k_B T}{4\pi\mu h} \left[\ln\left(\frac{\mu h}{\mu' a}\right) - \gamma \right] \quad (\text{IV.4})$$

où γ est la constante d'Euler égale à 0.5772.

Contrairement au cas de la diffusion en volume où le coefficient de diffusion est inversement proportionnel au rayon hydrodynamique de l'objet, la formule de Saffman ne donne qu'un faible poids au rayon a de l'objet du fait de la dépendance logarithmique. Si un objet est un dimère, alors son coefficient de diffusion n'est modifié que de 5% par rapport au monomère. Les mesures de coefficient de diffusion ne renseignent pas sur la détection des interactions et les assemblages au niveau cellulaire n'ont qu'un faible rôle dynamique.

Des études ont été menées pour résoudre cette équation dans le cas plus général où les viscosités de la membrane et du fluide environnant ne soient pas négligeables l'une par rapport à l'autre [93]. Leur conclusion est que le modèle de Saffman est valable tant que le rapport $\epsilon = \frac{2\mu' a}{\mu h}$ est inférieur à 0.1. Le développement de la formule aux ordres supérieurs en ϵ donne l'expression suivante :

$$D = \frac{k_B T}{4\pi\mu h} \left[\ln\left(\frac{2}{\epsilon}\right) - \gamma + \frac{4\epsilon}{\pi} - \frac{\epsilon^2}{2} \ln\left(\frac{2}{\epsilon}\right) \right] \quad (\text{IV.5})$$

Ce résultat conclut toujours à une influence faible du rayon.

En outre, certains modèles dérivés ont envisagé l'influence de membranes à une distance H de celle sur laquelle diffuse les objets [94] [95], ce qui signifie que l'espace de fluide environnant est fini. Les corrections envisagées sont là encore peu importantes par rapport à la formule de Saffman-Delbrück.

Le modèle de Saffman-Delbrück a été étendu au cas d'objets possédant une partie hydrophile de longueur L qui dépasse dans le fluide environnant [96]. La formule proposée reprend le modèle de Hughes (équation IV.5) en posant $\epsilon = \frac{2\mu' a}{\mu h + \mu' L}$.

Le modèle de Saffman-Delbrück a donc été décliné sous de nombreuses formes. Il vient proposer un cadre théorique aux observations *in vivo* ou *in vitro*. Ceci explique son succès.

IV.1.3 Tests expérimentaux du modèle de Saffman-Delbrück ?

Ce modèle a été largement utilisé pour déterminer des viscosités de membrane [97] [98], pour mettre en évidence des interactions d'objets solubles avec une membrane [99] ou pour déceler des changements de configurations des objets [100].

Il a aussi fait l'objet d'études plus approfondies de certains paramètres comme par exemple la viscosité du fluide qui entoure la membrane [98] ou encore le rayon [101] [102] [103] [104] [105].

Tout d'abord, examinons les variations en fonction de la viscosité du fluide environnant. Cette viscosité est modifiée en ajoutant au milieu du sucrose ou du glucose. Les études menées [98] concluent à une adéquation avec la loi de Saffman-Delbrück. Toutefois ces résultats considèrent que seule la viscosité du fluide environnant est modifiée par l'addition de sucrose. Or le sucrose a tendance à s'accrocher aux membranes [106] [107]. Pour valider

la loi de Saffman-Delbrück, il faudrait donc utiliser une sonde afin de tester la viscosité de la membrane. La dépendance de l'équation de Saffman par rapport à la viscosité du fluide environnant n'est donc pas vérifiée.

Les études réalisées pour étudier l'influence du rayon [101] [102] [103] [104] [105] ont soulevé un problème. Dans la majeure partie des expériences, le coefficient de diffusion des protéines est comparé à celui d'une sonde insérée dans la membrane - il s'agit généralement d'un lipide marqué par un fluorophore. Le rapport entre ces deux coefficients de diffusion est de l'ordre de 3 à 4, ce qui conduirait à des rapports de rayons entre les objets de l'ordre de 100. Mais aucun agrégat n'est visible. Cette remarque a fait naître deux réponses distinctes :

- Tout d'abord, les lipides ne sont pas transmembranaires. Leur nature est différente de celle des protéines et surtout, on ne peut pas les considérer comme des cylindres parfaits incorporés dans une membrane de même taille hydrophobe. Le modèle de Saffman-Delbrück ne peut leur être appliqué [108]. Cette objection peut donc aussi expliquer l'écart important entre protéines et lipides. La diffusion d'objets plus proches de cylindres a alors été examinée. Il s'agit de peptides dont le degré d'oligomérisation est modulable. Ces résultats (figure IV.2) ont reproduit les mêmes écarts à l'équation IV.4 que pour les lipides. En effet, le modèle de Saffman peut expliquer l'évolution du coefficient de diffusion pour des objets dont la surface est supérieure à 2 nm^2 , c'est-à-dire à un rayon supérieur à 8 \AA . En revanche, pour des valeurs de rayons inférieures, l'ajustement par l'équation IV.4 donne des résultats aberrants. Cette explication n'est donc pas satisfaisante pour expliquer ces variations.
- La nécessité d'une théorie différente selon le rayon des objets étudiés est alors apparue.

Cette démarche résumée par [109] distingue deux régimes :

- un régime de diffusion par sauts lorsque les objets qui diffusent ont le même rayon que les lipides ou les tensioactifs qui composent la membrane. Dans ce cas, l'hypothèse hydrodynamique est remise en question. Un modèle de diffusion d'aire libre développé par Cohen et Turnbull [110] a été avancé. Cette théorie reprend la théorie cinétique des gaz parfaits pour estimer le coefficient de diffusion de disques durs diffusant dans un plan. Elle utilise une approche probabiliste et schématise le mouvement d'une particule par trois étapes. Les fluctuations de membranes engendrent des espaces libres à proximité de l'objet qui diffuse. Si l'aire libre est suffisamment importante, la particule aura une certaine probabilité de se déplacer. L'aire libre laissée par la particule est alors comblée par les fluctuations de la bicouche. Cette approche introduit des notions relatives au milieu dans lequel le phénomène diffusif a lieu avec d^* , le diamètre moyen disponible à la molécule qui diffuse, a_f l'aire libre par tête polaire, mais aussi des caractéristiques de l'objet comme a^* sa section ou m sa masse. Le résultat final donne la formule suivante :

$$D = Gd^* \sqrt{\frac{2k_B T}{m}} \exp\left(-\frac{\gamma a^*}{a_f}\right) \quad (\text{IV.6})$$

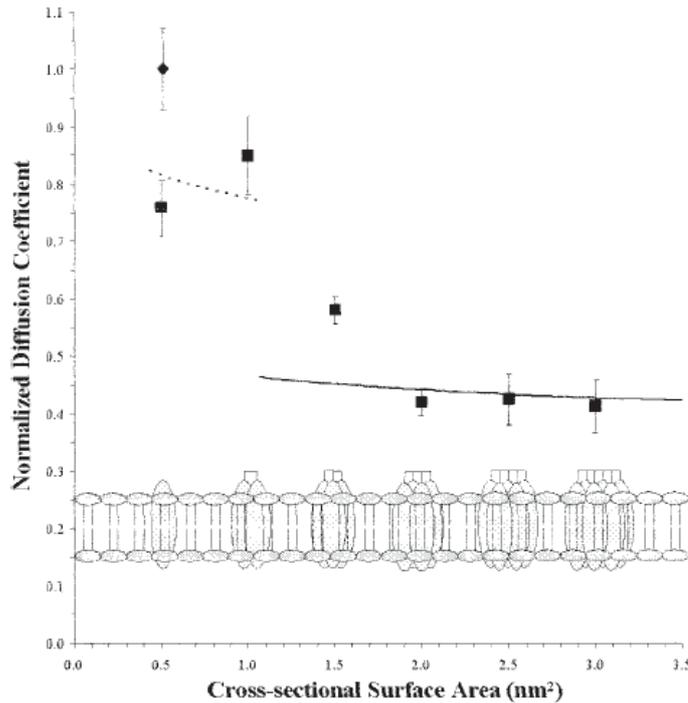


Figure IV.2: Résultats obtenus pour la diffusion de peptides à différents degrés d'oligomérisation [105]. La courbe en gras donne l'ajustement par le modèle de Saffman (équation IV.4) en utilisant une hauteur $h=3$ nm, une viscosité du milieu aqueux de $7.3 \cdot 10^{-2}$ poise. Cette courbe permet de déduire une viscosité de la membrane de 1.75 poise. La courbe en pointillés indique l'ajustement obtenu à partir du modèle de Cohen et Turnbull (équation IV.6) pour des peptides sous forme monomérique et dimérique en posant $\gamma a^*/a_f = 0.4$.

avec G un facteur lié à la géométrie de la membrane et γ un facteur correctif sur le recouvrement entre aires libres ($\gamma = 1$ si les aires libres ne se recouvrent pas).

- le modèle de Saffman et Delbrück reste valable pour les objets dont le rayon est supérieur à la taille d'un lipide ou d'un tensioactif.

La zone de transition semble mise en évidence par des mesures faites sur des molécules amphiphiles dont la tête polaire est modifiable [103]. La surface obtenue varie entre 0.3 et 3 nm² soit une variation de rayon équivalent entre 3 et 10 Å, la taille d'un lipide étant de l'ordre de 4-5 Å. Les deux régimes sont mis en évidence avec une limite pour des tailles de molécules deux fois supérieures à celle des lipides.

La conclusion de ces études est donc qu'il faut distinguer deux régimes selon la taille de l'objet, un régime moléculaire si le rayon "a" du cylindre diffusant est de l'ordre de celui du lipide ou du tensioactif constituant la membrane et un régime hydrodynamique dans le cas contraire. La limite intervient pour un rapport de taille de 2 entre l'objet diffusant et le lipide.

Ainsi le modèle de Saffman-Delbrück n'a jamais été remis en cause mais sa gamme d'utilisation a simplement été déplacée. Aucun examen comparé des valeurs de coefficients de diffusion n'a donc été fait puisque les lipides qui étaient généralement les molécules sondes de la membrane n'étaient pas décrits par la même théorie. Toutefois, certains faits sont troublants. Si on compare les coefficients de diffusion d'un lipide et de la bactériorhodopsine dans l'expérience de Peters et al. [98], on trouve un rapport de 3 environ. Si on compare les rayons de la bactériorhodopsine et du lipide, on atteint un rapport de 3.3. Les résultats obtenus par Lee et al. semblent mettre en évidence une zone de transition entre ces deux modèles. Le coefficient de diffusion du trimère (figure IV.2) n'est en effet décrit ni par le modèle moléculaire ni par le modèle de Saffman. Nous avons donc voulu étudier les variations du coefficient de diffusion D d'objets transmembranaires avec leur rayon. La précision de la mesure est essentielle afin de discriminer si le modèle de Saffman-Delbrück est vérifié. En effet, une précision sur la mesure moins bonne que 5% induit une variation du rayon calculé avec la formule de Saffman-Delbrück d'un facteur 10. Nous avons opté pour la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment en franges présentée dans la section suivante.

IV.2 Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment : FRAPP ou (Fluorescence Recovery After fringe Pattern Photobleaching)

Cette méthode [111] nécessite des objets marqués par un groupement fluorescent. Ce marquage est facile à réaliser comme nous l'avons décrit au chapitre II et ne nécessite pas d'avoir recours à la biologie moléculaire. Le groupement fluorescéine isothiocyanate (FITC) vu au Chapitre II est plus petit que 5 \AA . Il a une influence peu importante sur la dynamique des objets et sur leurs interactions.

Nous allons présenter ici le principe du FRAPP puis nous décrirons rapidement le montage réalisé par Y. Gambin [107]. Enfin, nous préciserons les performances atteintes.

IV.2.1 Description de la méthode

Le principe de la technique de FRAPP est simple. On étudie un échantillon contenant des molécules marquées par un groupement fluorescent. A l'intérieur de cet échantillon, un gradient de concentration est créé par photoblanchiment (figure IV.3). En effet, sous l'action d'un faisceau de forte intensité, les molécules peuvent perdre leur fluorescence. On obtient une inhomogénéité de concentrations de molécules fluorescentes. La géométrie de cette distribution peut être radiale pour le montage de FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) ou en franges pour le FRAPP. L'évolution de cette distribution est alors suivie au cours du temps en utilisant un faisceau de faible intensité (environ un millième par rapport au faisceau de forte intensité) présentant la même géométrie. On mesure le temps mis par les molécules non photoblanchies pour pénétrer dans la zone éclairée. Dans le montage de FRAPP, afin d'améliorer le rapport signal à bruit, le faisceau de lecture est modulé à la fréquence f . L'information est ainsi détectée à une

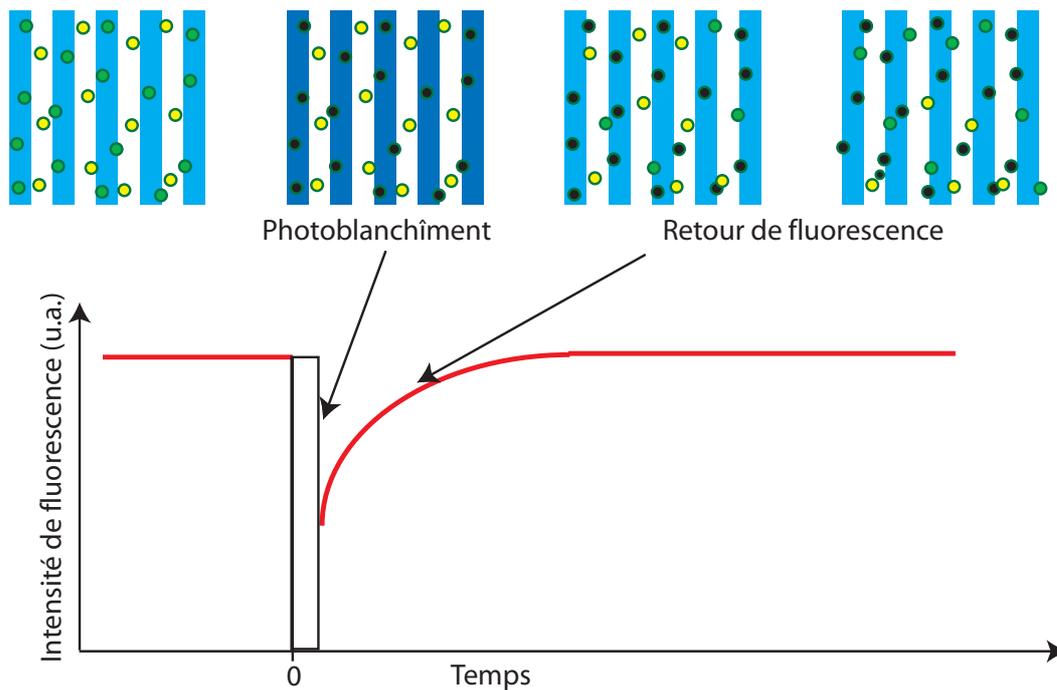


Figure IV.3: Principe de la mesure de coefficient de diffusion par recouvrement de fluorescence après photoblanchiment en franges. Un laser éclaire une région de l'échantillon suivant des franges rectilignes et détruit la fluorescence des molécules à un instant $t = 0$ créant ainsi une distribution inhomogène de molécules marquées. Le retour de fluorescence est dû à la mobilité des molécules marquées non blanchies.

fréquence double ce qui permet de s'affranchir d'une partie du bruit grâce à une détection synchrone.

Pourquoi opter pour une distribution en franges avec un montage de FRAPP ? Trois raisons essentielles guident ce choix :

- tout d'abord, les équations qui décrivent les solutions de ce retour de fluorescence sont simples. Cette géométrie permet de faire une projection suivant une base de Fourier alors que la géométrie radiale utilise une base de fonctions de Bessel plus difficile à manipuler.
- on mesure le coefficient de diffusion suivant la direction perpendiculaire aux franges. Dans le cas de milieu anisotrope, cette technique permet d'identifier différentes composantes [112] du tenseur de diffusion des molécules marquées.
- ce dispositif permet de moduler la lecture et ainsi d'améliorer le rapport signal sur bruit.

La théorie de cette méthode a été décrite par l'article de Davoust et al. [111]. Le profil d'intensité lors du photoblanchiment est sinusoïdal de période i l'interfrange :

$$I(\vec{r}, t) = \frac{I_0}{2}(1 + \cos(\vec{q}_0 \cdot \vec{r}))$$

où I_0 représente l'intensité maximale atteinte à l'intérieur de l'échantillon éclairé par le faisceau de forte intensité et $q_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ est le vecteur d'onde de la figure d'interférence. Lors de la phase de recouvrement, le faisceau a une intensité plus faible d'un facteur Λ de l'ordre de 1000. Ce faisceau est modulé en phase. L'intensité à l'intérieur de l'échantillon qui a une faible épaisseur est supposée uniforme et décrite par l'expression suivante :

$$I(\vec{r}, t) = \frac{I_0}{2\Lambda}(1 + \cos(\vec{q}_0 \cdot \vec{r} + \phi(t))) \quad (\text{IV.7})$$

Après photoblanchiment, la concentration en molécules marquées est $c(\vec{r}, t = 0)$. Cette distribution évolue en suivant la loi de diffusion :

$$\frac{\partial c(\vec{r}, t)}{\partial t} = D\Delta c(\vec{r}, t) \quad (\text{IV.8})$$

Le signal de fluorescence est proportionnel à l'intensité d'excitation des molécules soit $I(\vec{r}, t)$ et à la concentration en molécules fluorescentes. L'intensité de fluorescence I_F est décrite par :

$$I_F(t) = \int d\vec{r} c(\vec{r}, t) I(\vec{r}, t) \quad (\text{IV.9})$$

L'utilisation des transformées de Fourier spatiales permet de résoudre le problème. En effet, la concentration en molécules marquées peut être décomposée de la manière suivante :

$$c(\vec{r}, t) = \int d\vec{q} \tilde{c}(\vec{q}, t) e^{-2i\pi \vec{q} \cdot \vec{r}}$$

où

$$\tilde{c}(\vec{q}, t) = \tilde{c}(\vec{q}, 0) e^{-Dq^2 t}$$

est solution de l'équation de diffusion. La décomposition spatiale de l'intensité incidente est, quant à elle, donnée par :

$$I(\vec{r}, t) = \int d\vec{q} \tilde{I}(\vec{q}, t) e^{-2i\pi \vec{q} \cdot \vec{r}}$$

où

$$\tilde{I}(\vec{q}, t) = \frac{I_0}{2\Lambda} [\delta(\vec{q}) + \frac{1}{2}(\delta(\vec{q} - \vec{q}_0) e^{i\phi(t)} + (\delta(\vec{q} + \vec{q}_0) e^{-i\phi(t)}))]$$

L'intensité de fluorescence s'écrit :

$$I_F(t) = \int d\vec{q} \int d\vec{q}' \int d\vec{r} \tilde{c}(\vec{q}, t) \tilde{I}(\vec{q}', t) e^{-2i\pi(\vec{q} + \vec{q}') \cdot \vec{r}} = \int d\vec{q} \tilde{c}(\vec{q}, t) \tilde{I}(-\vec{q}, t)$$

L'expression de l'intensité I conduit alors à l'expression suivante pour l'intensité de fluorescence :

$$I_F(t) = \frac{I_0}{2\Lambda} \left[\tilde{c}(0, 0) + \frac{1}{2}(\tilde{c}(-\vec{q}_0, 0) e^{i\phi(t)} + \tilde{c}(\vec{q}_0, 0) e^{-i\phi(t)}) \right] e^{-Dq_0^2 t}$$

Or, la figure d'interférence est symétrique donc la fonction \tilde{c} est paire par rapport aux coordonnées spatiales. L'expression de l'intensité de fluorescence se simplifie de la manière suivante :

$$I_F(t) = \frac{I_0}{2\Lambda} \left[\tilde{c}(0, 0) + 2\tilde{c}(-\vec{q}_0, 0) \cos(\phi(t)) \right] e^{-Dq_0^2 t}$$

$\phi(t)$ est une fonction sinusoïdale de fréquence f et d'amplitude u , on pose $\phi(t) = u \sin(2\pi ft)$. Cette fonction $\cos(\phi(t))$ est décomposable en séries de Fourier en faisant intervenir les fonctions de Bessel J_k . Elle est paire, donc seules les harmoniques paires sont non nulles. En conclusion, l'intensité de fluorescence s'écrit sous la forme :

$$I_F = \sum_{n=0}^{\infty} f_{2n}(t) \cos(4n\pi ft) \quad (\text{IV.10})$$

avec

$$f_0(t) = \frac{I_0}{2\Lambda} \left[\tilde{c}(0, 0) + 2J_0(u)\tilde{c}(-\vec{q}_0, 0) \right] e^{-Dq_0^2 t}$$

et

$$f_{2n}(t) = \frac{I_0}{\Lambda} J_{2n}(u)\tilde{c}(-\vec{q}_0, 0) e^{-Dq_0^2 t}$$

Les fonctions de Bessel d'ordre k sont rapidement décroissantes par rapport à k . La composante la plus importante sera donc la composante d'ordre 2. Cette composante présente une variation exponentielle avec le temps et fait apparaître une constante de temps $\tau = \frac{1}{Dq_0^2}$. Cette solution est une décomposition sur une base d'harmoniques paires, la présence d'harmoniques impaires dans un signal étant liée à des phénomènes de convection. Il faut donc contrôler l'absence de ces harmoniques impaires afin de vérifier que le mouvement étudié est purement diffusif.

IV.2.2 Montage

Système source

Pour mesurer le coefficient de diffusion d'un objet marqué, il faut pouvoir exciter sa fluorescence grâce à un laser de forte puissance afin de pouvoir blanchir les marqueurs. Nous utilisons un laser Argon avec une raie à 488 nm (un étalon est présent dans la cavité) et une puissance maximale de 1W. Il est utilisable pour une grande gamme de fluorophores tels que la fluorescéine, la FITC, la GFP (Green Fluorescent Protein), la YFP (Yellow Fluorescent Protein). Ce laser est suivi d'un sélecteur de faisceau (figure IV.4). Ce dispositif est constitué de deux lames à faces parallèles constituées en dièdre. Le coefficient de réflexion en intensité à l'intérieur des lames est $R=0.04$. Il s'agit du coefficient de réflexion pour une interface verre-air. Deux chemins sont possibles pour le faisceau : le premier est le faisceau direct qui traverse les deux lames (son intensité est forte), le second est réfléchi à l'intérieur des deux lames (son intensité est diminuée d'un facteur au maximum R^2 soit $1.6 \cdot 10^{-3}$: il sera le faisceau de lecture). Le faisceau de forte intensité est bloqué par un dispositif de barrière mécanique commandé grâce au système d'acquisition qui va pouvoir basculer pour créer le photoblanchiment pendant des temps de l'ordre de 20 à 50 ms.

Interféromètre

A la sortie de ce sélecteur, le faisceau entre dans l'interféromètre (figure IV.5). Le faisceau est séparé en deux faisceaux au moyen d'une lame semi-réfléchissante. L'un des faisceaux

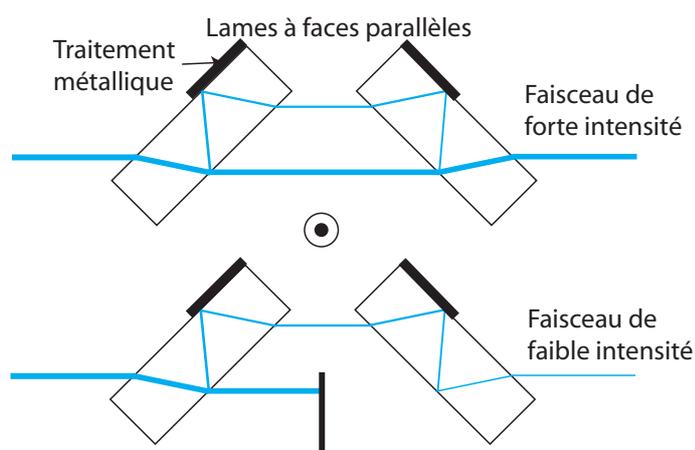


Figure IV.4: Montage de sélecteur de faisceau. Le faisceau de photoblanchiment est obtenu par passage direct à travers les deux lames à faces parallèles. Le faisceau de lecture est obtenu par réflexion à l'intérieur des lames à faces parallèles, son intensité est diminuée d'un facteur R^2 par rapport au faisceau de forte intensité.

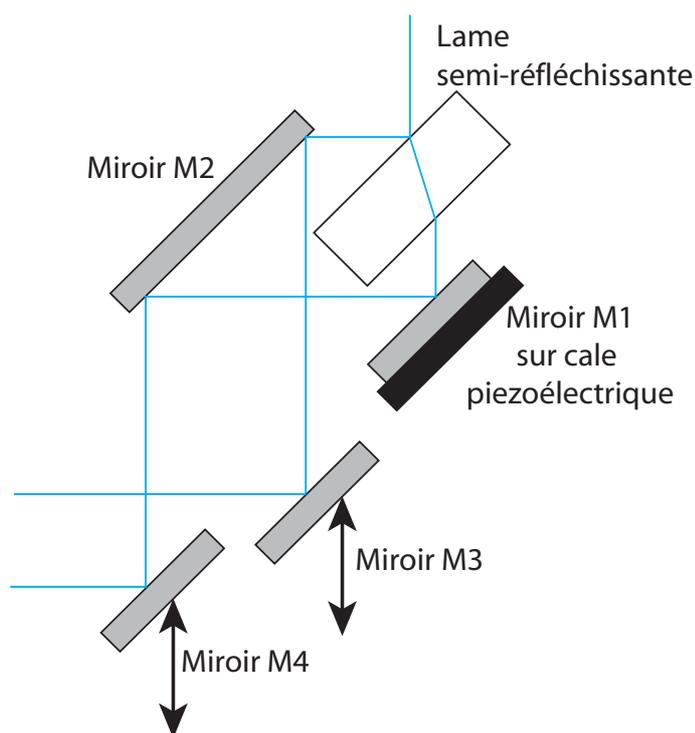


Figure IV.5: Interféromètre permettant de contrôler la différence de chemin optique entre les deux faisceaux.

est conduit sur le miroir M1 monté sur un piézoélectrique qui va assurer la modulation de la figure d'interférence. La position de ce miroir M1 joue aussi sur le déphasage initial des deux faisceaux. Il sera déplacé selon la gamme d'interfranges que l'on désire atteindre. Les deux faisceaux parallèles sont ensuite envoyés chacun sur un miroir M3 et M4. Ces

miroirs sont placés sur des platines mobiles avec des translations de précision et peuvent être déplacés l'un par rapport à l'autre de manière à changer l'interfrange de la figure en modifiant la différence de chemin optique entre les deux faisceaux. Les deux faisceaux parallèles sont focalisés au niveau de l'échantillon par une lentille (la tache obtenue est de $100\ \mu\text{m}$) pour créer des interférences de pas variable. Les interfranges sont calibrées en fonction de la position relative des miroirs M3 et M4. Les interfranges peuvent être variées entre 1 et $100\ \mu\text{m}$.

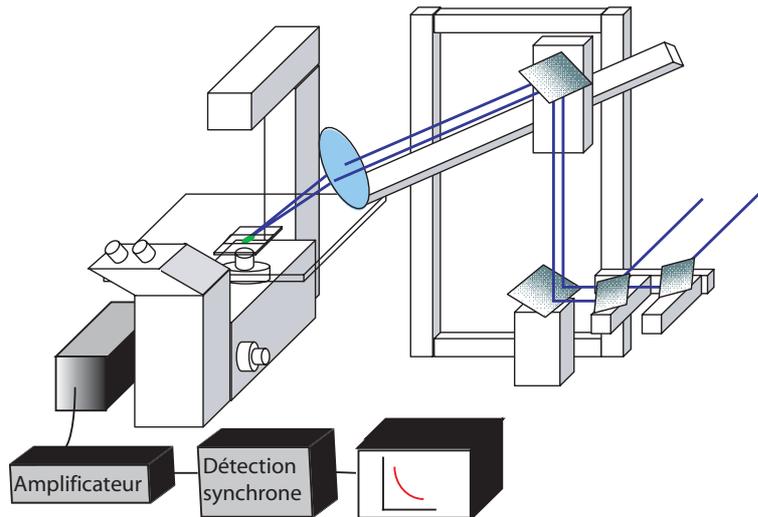


Figure IV.6: Schéma général du dispositif de FRAPP.

Echantillon

Les échantillons sont aspirés dans des capillaires (Vitrocom) et contiennent un volume d'environ 10 à $20\ \mu\text{L}$. Ils sont scellés avec de la cire de manière à éviter toute évaporation lors de la manipulation. Ils peuvent être placés dans une enceinte thermostatée contrôlée en température avec une précision de l'ordre de 0.5°C . Les concentrations en protéines marquées varient entre 0.1 et $1\ \mu\text{M}$. La détermination d'un coefficient de diffusion ne requiert ainsi qu'une quantité minimale de $1\ \text{pmol}$. Ces faibles quantités sont un avantage de la méthode car les techniques développées par la biophysique doivent s'adapter aux difficultés de la production de protéines.

Dispositif de détection

L'intensité de fluorescence est collectée en utilisant l'objectif du microscope auquel on ajoute un filtre dichroïque coupant à $510\ \text{nm}$ afin de ne pas récupérer le faisceau direct sur le photomultiplicateur. Devant le photomultiplicateur, un obturateur évite la saturation lors de la phase de photoblanchiment. Le signal du photomultiplicateur est amélioré par passage dans un amplificateur de gain et un amplificateur sélectif (figure IV.6). Il est ensuite traité par une détection synchrone de manière à ne conserver que la composante correspondant à une fréquence double de la fréquence de balayage. La théorie que nous

avons développée explique cette décomposition suivant les harmoniques paires mais de manière plus intuitive, on peut raisonner en considérant que sur une période d'oscillation du piézoélectrique, les franges ont balayées deux fois la même surface. L'intensité correspondant au signal de fluorescence aura ainsi une fréquence double. Cette détection synchrone à la fréquence attendue permet d'augmenter le rapport signal sur bruit. Un multicanal enregistre le recouvrement de fluorescence en fonction du temps (figure IV.6). Ce recouvrement est une fonction décroissante du temps. La constante de temps τ est liée au vecteur d'onde de la figure d'interférence (et donc à l'interfrange i) ainsi qu'au coefficient de diffusion par la relation :

$$\tau = \frac{i^2}{4\pi^2 D} \quad (\text{IV.11})$$

IV.2.3 Mesure de coefficient de diffusion pour une espèce diffusante

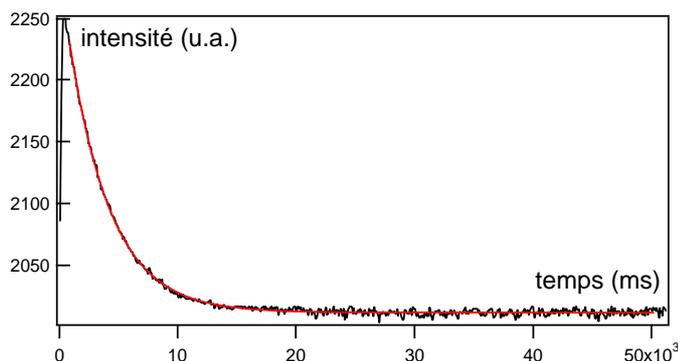


Figure IV.7: Recouvrement de fluorescence enregistré pour la protéine MexA diffusant dans une phase éponge de C12E5 après 10 accumulations. La courbe rouge est l'ajustement obtenu par une simple exponentielle.

Pour une interfrange donnée, on enregistre la figure de recouvrement de fluorescence (figure IV.7). Ce signal est ajusté par une exponentielle simple décroissante qui fait intervenir un temps de recouvrement τ . Le montage de FRAPP permet de faire varier l'interfrange de la figure d'interférence. Cette versatilité permet de vérifier le comportement brownien de la molécule (des régimes sous-diffusifs ou super-diffusifs seront facilement discernables). Chaque courbe est moyennée sur une dizaine de photoblanchiments. Les variations de l'inverse du temps de recouvrement sont tracées en fonction du vecteur d'onde d'interférence (figure IV.8). Si on obtient une droite linéaire, le régime est un régime de diffusion brownienne. Le coefficient directeur de cette droite est D . L'estimation du coefficient de diffusion se fait avec une précision de l'ordre de 3 à 5 %.

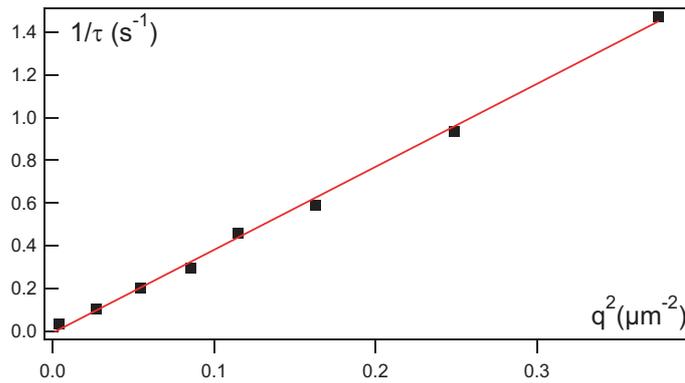


Figure IV.8: Evolution de l'inverse du temps de recouvrement en fonction du vecteur d'onde d'interférence pour la diffusion de la protéine MexA sur les bicouches. On vérifie qu'il existe une relation linéaire entre ces deux entités. Ceci indique que la protéine MexA suit bien une loi de diffusion brownienne. Son coefficient de diffusion est de $4.0 \pm 0.1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

IV.2.4 Mesure de coefficient de diffusion pour deux espèces

Si l'échantillon comporte deux espèces diffusantes (1 et 2), le signal peut être ajusté par une double exponentielle (figure IV.9):

$$I = I_1 e^{-t/\tau_1} + I_2 e^{-t/\tau_2} \quad (\text{IV.12})$$

où τ_1 et τ_2 sont les temps de recouvrement de chacune des deux espèces. Nous avons vérifié ceci tout d'abord pour deux molécules différentes qui n'interagissent pas et diffusent dans la membrane : une protéine marquée OprM et un tensioactif marqué possédant une queue aliphatique de 12 carbones et noté C12. On enregistre la figure de recouvrement de fluorescence et on obtient une courbe qui est mal ajustée par une simple exponentielle (figure IV.9) comme en témoigne l'estimation des résidus, mais qui est bien ajustée par une double exponentielle.

L'évolution des temps de recouvrement obtenus avec le vecteur d'onde d'interférence $\tau_i^{-1} = f(q^2)$, donne accès à des coefficients de diffusion égaux aux valeurs obtenues pour les objets seuls (figure IV.10).

Les intensités I_1 et I_2 sont proportionnelles aux quantités de molécules de chacune des deux espèces (figure IV.11). En faisant varier les quantités relatives de chacune des espèces, on constate que le rapport des intensités est bien proportionnel au rapport des concentrations de ces espèces (figure IV.11). Le coefficient de proportionnalité est lié au degré de marquage respectif de chacune des espèces ainsi qu'à la position des marqueurs. En effet si les marqueurs sont situés dans la membrane, leur efficacité sera plus faible. Dans notre étude, OprM possède environ 1.7 marqueur par protéine alors que le tensioactif en C12 n'en possède qu'un seul. La pente de la droite a donc un coefficient de proportionnalité supérieur à 1. Toutefois la pente n'est pas de 1.7 car une des amines primaires facilement accessible de OprM est située dans la zone hydrophobe. L'efficacité de fluorescence doit être diminuée. Pour le tensioactif en C12 en revanche, le marquage

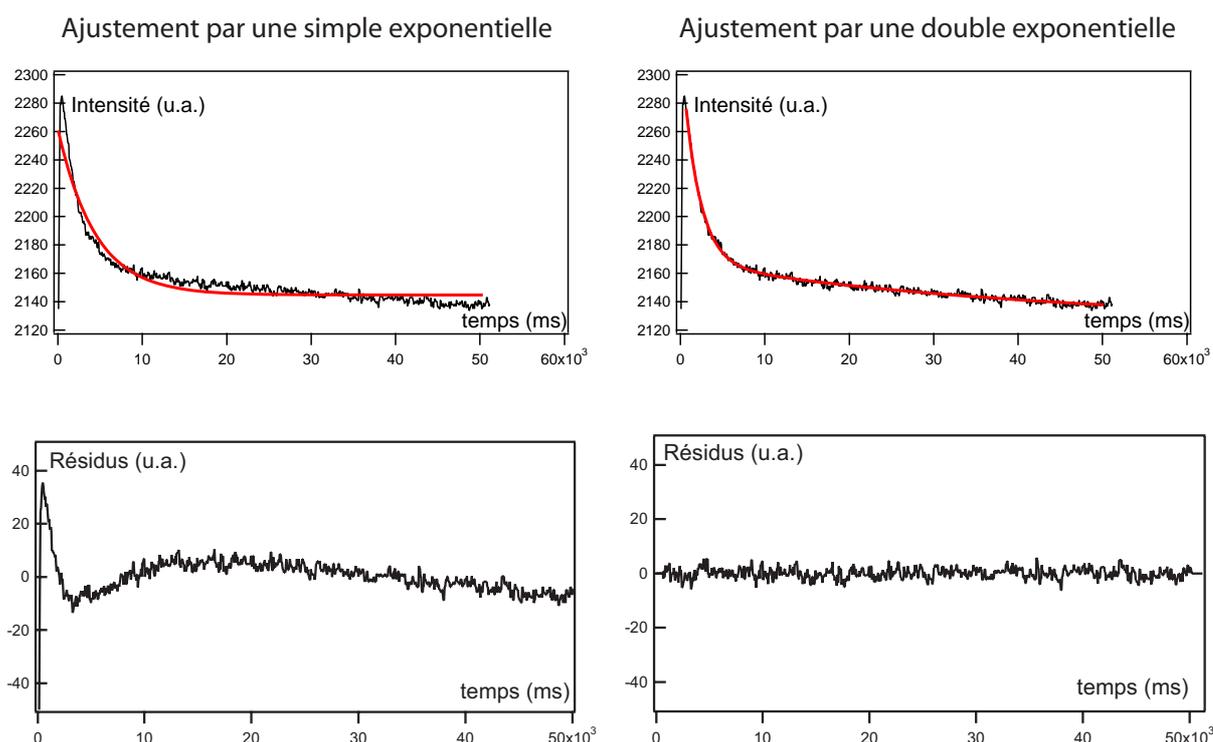


Figure IV.9: Les courbes de recouvrement de fluorescence du mélange OprM et C12 marqués dans une phase éponge sont ajustées par une exponentielle simple ou par une double exponentielle. Le calcul des résidus montre que l'ajustement double exponentiel donne de meilleurs résultats puisque les résidus sont compris entre -6 et $+6$ alors que pour un ajustement monoexponentiel, les résidus atteignent des valeurs entre -20 et $+50$. On a bien deux espèces diffusantes.

est fait au niveau de la tête polaire, il n'y a donc pas de phénomène de masqué.

Ces résultats peuvent être étendus, comme nous le verrons plus tard, au cas d'une molécule diffusant sous deux états. La distinction entre simple exponentielle et double exponentielle n'est cependant possible que si les coefficients de diffusion des deux espèces sont assez différents. Nous n'avons obtenu de bons résultats que pour des espèces ayant un facteur 2 entre leurs coefficients de diffusion. Ces mesures indiquent que si une protéine est présente sous plusieurs états, les figures de recouvrement sont des doubles exponentielles. En outre, l'intensité de chacune des composantes est proportionnelle à la fraction de protéines présentes sur la bicouche.

En conclusion, la précision obtenue sur la mesure d'un coefficient de diffusion pour un objet dans une bicouche est comprise entre 3 et 5 %. Nous pouvons dès lors espérer pouvoir vérifier le modèle de Saffman-Delbrück sur des objets dont le rayon varie entre 5.5 et 30 Å.

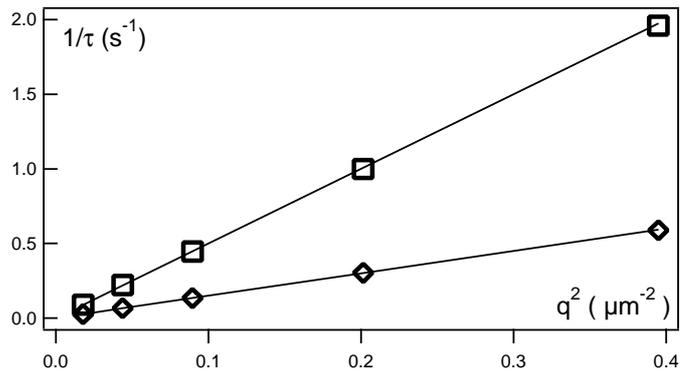


Figure IV.10: Evolution de l'inverse du temps de recouvrement en fonction du vecteur d'onde d'interférence pour la diffusion de deux objets marqués qui sont OprM et un tensioactif avec un queue aliphatique de 12 atomes de carbones. On vérifie qu'il existe une relation affine entre ces deux entités pour chacune des deux espèces identifiées à partir des courbes de double exponentielle. Le coefficient de diffusion du tensioactif est de $(4.5 \pm 0.2) \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et celui de OprM est égal à $(1.50 \pm 0.07) \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Ces valeurs sont proches de celles obtenues avec chacun des deux éléments seuls dans une phase.

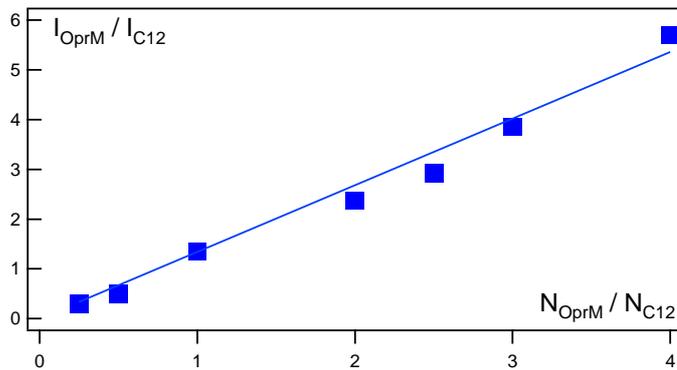


Figure IV.11: Sur les courbes avec des doubles exponentielles, nous avons identifié chacune des espèces : c'est-à-dire OprM (temps le plus long) et le tensioactif C12 (temps le plus court). Le rapport de ces intensités est tracé pour des échantillons contenant des quantités relatives différentes de chacune des espèces. La linéarité entre ces deux grandeurs est évidente. Le coefficient de proportionnalité est lié au degré de marquage.

IV.3 Influence de la taille hydrophobe de l'objet

La taille hydrophobe h de la membrane adaptée à celle d_π de l'objet est un paramètre de l'équation de Saffman (équation IV.4) dont la dépendance n'a jamais été vérifiée. Pour varier ce paramètre, il faut avoir recours à des membranes d'épaisseur variable et à des objets calibrés de tailles variables. Comment faire varier la taille de la membrane ? On peut

utiliser des tensioactifs possédant des chaînes carbonées de longueurs différentes. Cependant cette première solution nécessite d'avoir pour chacun des diagrammes de phases étudiés des domaines proches de manière à pouvoir comparer les résultats obtenus en se plaçant à la même température. Il faut aussi trouver une bonne adéquation entre objet diffusant et membrane, ce qui n'est pas aisé à obtenir. La seconde solution est celle pour laquelle nous avons opté du fait de sa flexibilité. L'épaisseur hydrophobe des bicouches de la phase L_3 est ajustable par addition d'un solvant hydrophobe : le dodécane. Yann Gambin [107] a obtenu des variations de la taille hydrophobe h de ces membranes entre 16 Å, qui est la taille sans dodécane, et 40 Å. Nous avons ainsi à notre disposition une bicouche modulable qui peut s'adapter à des objets ayant une épaisseur différente mais il faudra vérifier que la viscosité de la membrane n'est pas modifiée. Toutefois, pour pouvoir appliquer le modèle de Saffman, il reste à trouver des objets transmembranaires dont la taille soit variable. Nous avons opté pour des peptides. Ce sont des objets dont la synthèse est maîtrisée avec des techniques telles que la synthèse en phase solide et la chromatographie de phase inverse [113] [114]. Ces peptides ont été synthétisés par Yann Gambin au "Department of Biochemistry and Molecular Genetics" dirigé par R. Hodges.

IV.3.1 Description des objets

Obtenir un quasi-cylindre transmembranaire modèle revient à synthétiser un peptide avec un segment hydrophobe de longueur ajustable terminé par des extrémités hydrophiles. Pour une telle construction, il faut s'inspirer des protéines membranaires existantes. Parmi les protéines transmembranaires, on distingue deux types d'accrochage à la membrane :

- l'hélice α est le motif le plus répandu. Le squelette polypeptidique s'enroule ici en spirale et est stabilisé par des liaisons hydrogène (figure IV.12a).
- les feuillets β sont des structures périodiques étendues, les liaisons hydrogène existent mais pas entre résidus consécutifs. Cette organisation en brins nécessite pour être stable la présence de liaisons hydrogène entre différents brins. C'est pourquoi on parle de feuillets. Ces feuillets peuvent être anti-parallèles si les deux brins s'alignent suivant des directions opposées (figure IV.12b).

L'hélice α apparaît évidemment comme le meilleur cylindre modèle. Le choix des acides aminés s'est porté sur une chaîne α de leucines (L) qui sont des acides aminés fortement hydrophobes.

Les principales têtes polaires utilisées lors des expériences d'ancrage à une membrane sont soit des têtes utilisant des lysines (motifs GKK et KKA), soit des têtes faisant intervenir des tryptophanes. L'utilisation de lysines induit des interactions électrostatiques entre les objets ce qui va empêcher une interpénétration entre hélices. Les constructions obtenues sont rappelées figure IV.13. La taille du peptide est notée d_π dans la suite.

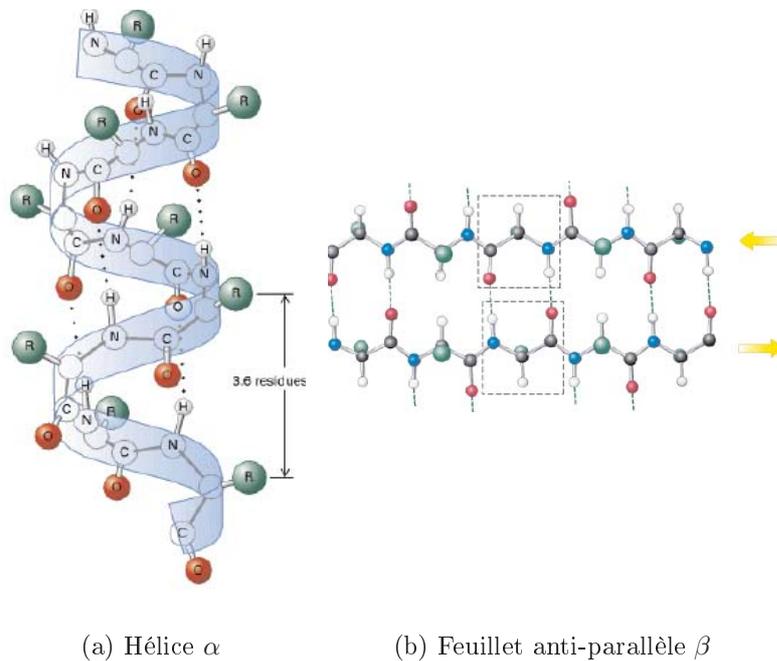


Figure IV.12: Structures secondaires des segments hydrophobes des protéines membranaires

Peptides	Nom	Séquences des peptides	d_π
	\emptyset -L ₁₂	(L) ₁₂ -GKK-FITC	19 Å
	L ₁₂	AKK-(L) ₁₂ -GKK-FITC	19 Å
	L ₁₈	AKK-(L) ₁₈ -GKK-FITC	28 Å
	L ₂₄	AKK-(L) ₂₄ -GKK-FITC	37 Å

Figure IV.13: Caractéristiques des peptides synthétisés. Ces peptides vont être les cylindres modèles pour l'étude de la loi de variation de Saffman-Delbrück.

IV.3.2 Loi de variation

Viscosité de la bicouche gonflée avec du dodécane

La première étape est de quantifier le rôle du dodécane sur la viscosité de la membrane. Nous avons choisi cette huile pour son bon ajustement à la viscosité de la phase mais

cette étape va le vérifier. Pour cela, nous avons utilisé deux sondes distinctes qui sont :

- d'une part, un tensioactif marqué dont la chaîne est composée de douze atomes de carbone comme le C12E5 qui teste la viscosité à l'intérieur d'une monocouche,
- d'autre part, un lipide marqué, le 1-stéaroyl,2-oléoyl,sn-glycéro,3-phosphocholine ou SOPC, long de 13 Å qui va explorer la bicouche et une zone entre bicouches longue de 6 Å.

Les mesures montrent que le coefficient de diffusion de ces deux objets à l'intérieur de bicouches dont l'épaisseur h est modulée entre 16 et 40 Å est indépendant de h . On trouve :

- pour le tensioactif en C12, $D_{C12} = 8.0 \pm 0.2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$
- pour le SOPC, $D_{SOPC} = 5.0 \pm 0.2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$

Ceci confirme le bon ajustement entre les viscosités de l'huile et de la bicouche. L'addition de dodécane ne modifie pas la viscosité de la bicouche.

Variation du coefficient de diffusion d'un peptide avec l'épaisseur h de la membrane

Le peptide est incorporé dans la phase éponge de C12E5 puis on ajoute peu à peu du dodécane. Le coefficient de diffusion du peptide est alors mesuré. Les variations sont reportées sur la figure IV.14. Le comportement est identique pour tous les peptides. Le

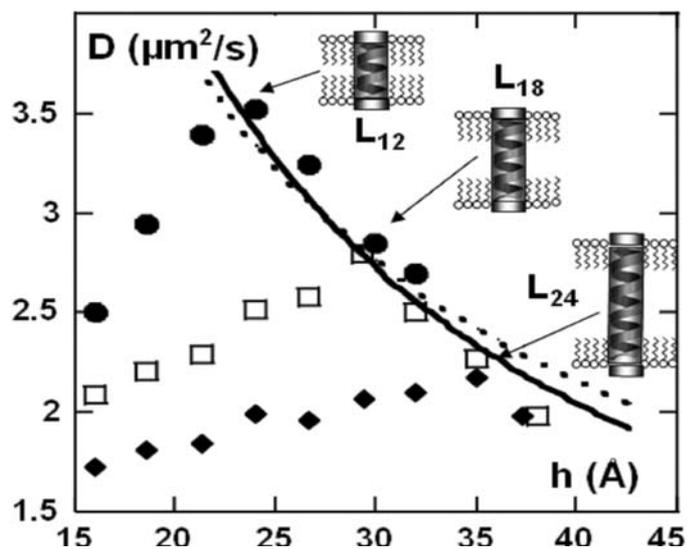


Figure IV.14: Variation du coefficient de diffusion de peptides de taille variable en fonction de l'épaisseur hydrophobe h de la membrane. Les maxima de ces trois courbes sont ajustés par une loi de variation en $1/h$ (ligne continue) ou par l'équation IV.4 (ligne en pointillés).

coefficient de diffusion augmente jusqu'à atteindre un maximum lorsque la taille d_π du peptide est en adéquation avec l'épaisseur h de la membrane c'est-à-dire dans le cas de Saffman-Delbrück. A partir de ce point, le coefficient de diffusion diminue. Les courbes ne sont pas symétriques autour du point $h=d_\pi$. Nous les étudierons plus amplement dans la section IV.5. Nous allons ici nous focaliser sur l'étude des maxima.

Variation du coefficient de diffusion avec h dans le cas du modèle de Saffman

On se place dans le cas développé par Saffman et Delbrück ce qui signifie que l'épaisseur de la membrane et la taille hydrophobe du peptide sont adaptées. Cette situation correspond aux maxima de la courbe précédente. Ces trois points sont bien ajustés par le modèle de Saffman (figure IV.14) en fixant le rayon du cylindre à 5.5 Å et la viscosité de la phase aqueuse à $1.1 \cdot 10^{-3}$ Pa.s. Cet ajustement permet de déduire une valeur de la viscosité de membrane de 0.29 Pa.s.

Cependant, si on utilise un ajustement plus simple en $\frac{A}{h}$, l'accord avec les résultats est également bon. On obtient une valeur de $A = (8.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-21} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$.

IV.4 Influence du rayon de l'objet

Nous avons ensuite examiné l'influence de la section de l'objet sur sa diffusion. Nous avons choisi d'étudier des protéines transmembranaires et des peptides.

IV.4.1 Description des objets

Les objets insérés dans la membrane sont les protéines suivantes :

- la protéine OmpA de 11 Å de rayon qui nous a été fournie par J-L. Popot (Institut de Biologie Physique et Chimique, UMR 7099, Paris) et que nous avons marquée [116].
- la protéine OprM ayant un rayon de 17 Å [34].
- la bactériorhodopsine donnée par P. Bassereau (Laboratoire Physico-Chimie Curie, UMR 168, Paris) qui est assimilable à un cylindre de rayon 20 Å [117].

A cette liste, il faut ajouter le peptide L_{12} . La taille hydrophobe de la membrane est choisie égale à 21 Å. Ce peptide de 5.5 Å de rayon nous permet de calibrer la phase. Il est le cylindre "parfait" auquel nous nous référerons. Son coefficient de diffusion sera noté D_0 . Ce coefficient de diffusion est égal à $3.5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

La streptavidine est une molécule possédant quatre sites d'accrochage avec la biotine. Deux sites sont présents sur chaque face de la molécule. La streptavidine peut être ancrée à un ou deux peptides appartenant à la même bicouche. Dans ce dernier cas, on forme un objet ellipsoïdal de rayon équivalent 10.8 Å qui se déplace dans la membrane.

IV.4.2 Loi de variation

Le coefficient de diffusion de ces cinq objets sur les bicouches de la phase C12E5/ β -OG/Solution S2 (Annexe B) est mesuré séparément et comparé sur la figure IV.15. En comparant le coefficient de diffusion de la streptavidine liée à un peptide à celui du peptide seul, on constate que la partie hydrophile n'a que peu d'influence. La variation du coefficient de diffusion est de l'ordre de 3 %, elle est comprise dans les barres d'erreur.

Les variations du coefficient de diffusion avec l'épaisseur h nous ont permis de déduire

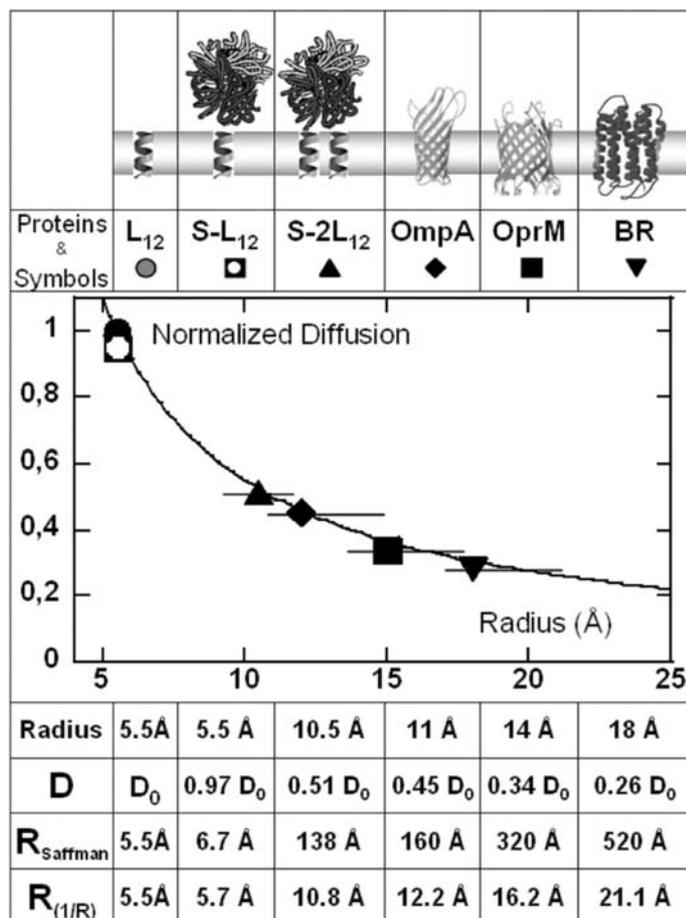


Figure IV.15: Variation du coefficient de diffusion avec le rayon des protéines et des peptides extrait de [115].

une valeur de viscosité de la membrane d'après le modèle de Saffman qui est de 0.29 Pa.s (soit 290 fois la viscosité de l'eau). Grâce à cette donnée, on peut calculer le rayon des objets insérés dans la bicouche à partir de la mesure de leur mobilité. Le coefficient de diffusion de la streptavidine liée à deux peptides est égal à $0.51 D_0$ ce qui correspond à un objet de 138 Å alors que le rayon calculé est de 10.8 Å. L'inadéquation entre le rayon estimé par la théorie de Saffman et le rayon des protéines mesuré par cristallographie est évident pour les trois protéines OmpA, OprM et la bactériorhodopsine (figure IV.15).

En revanche, un ajustement suivant l'inverse du rayon de l'objet inséré dans la bicouche donne des valeurs de rayons à partir des données de mobilité très proches des mesures

cristallographiques (figure IV.15).

Les études publiées sur le modèle de Saffman-Delbrück peuvent être comparées à nos

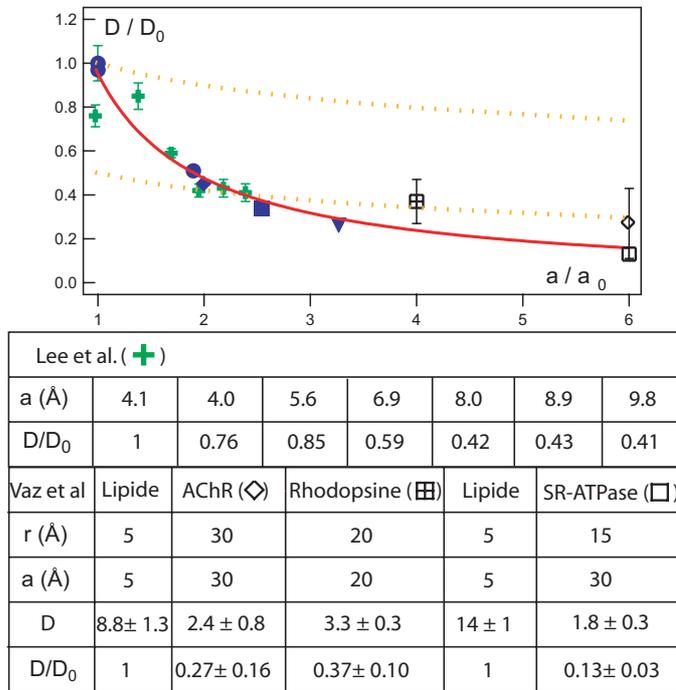


Figure IV.16: Variation du coefficient de diffusion renormalisé par un objet sonde (peptide ou lipide) en fonction du rayon renormalisé des protéines. Les résultats comparés sont ceux obtenus par Gambin et al. [115] (en bleu), par Vaz et al. [102] (en noir), par Lee et al. [105] (en vert). On note r le rayon cristallographique d'un monomère et a le rayon de l'objet qui diffuse. La variation du coefficient de diffusion en fonction de l'inverse du rayon est tracée en rouge. La loi de variation de Saffman est donnée en pointillés, elle a été calculée avec une épaisseur hydrophobe h de 28 Å, une viscosité de 10^{-3} Pa.s pour la solution aqueuse et de 2.9 Pa.s pour la membrane. L'ajustement de Lee et al. utilisant la loi de Saffman est donné en pointillés en bas.

résultats afin de vérifier leur généralisation à des bicouches différentes. Pour cela, il faut choisir une calibration entre les protéines et un objet de référence. Les caractéristiques de cet objet sont son rayon a_0 et son coefficient de diffusion D_0 . La nature de l'objet semble ne pas avoir d'influence au vu de la similitude des résultats de Lee et al. et de Vaz et al. qui utilisaient respectivement un peptide et un lipide pour calibrer leur phases.

Dans notre étude, nous avons comparé la diffusion de protéines à la diffusion d'un cylindre modèle de 5.5 Å de rayon : le peptide L_{12} . Son coefficient de diffusion D_0 est égal à $3.5 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Dans les expériences de Lee et al. [105], un lipide est utilisé comme référence. Son rayon est de 4.0 Å.

Pour Vaz et al. [102], nous avons choisi comme calibration des différentes membranes étudiées la diffusion du lipide sonde de ces expériences. Les valeurs des rayons et des coef-

coefficients de diffusion sont données sur la figure IV.16. Ces mesures fournissent des résultats pour le récepteur de l'acétylcholine, pour l'ATPase du réticulum et pour la rhodopsine. Les rayons proposés pour ces trois objets par Vaz et al. étaient respectivement de 15, 30 et 20 Å. Le résultat pour la rhodopsine est confirmé par les données cristallographiques. En revanche, pour les deux autres protéines, les valeurs données par la cristallographie sont différentes. Tout d'abord, en ce qui concerne le récepteur de l'acétylcholine, nous avons retenu une valeur de 30 Å pour un monomère [118]. Pour l'ATPase du réticulum, la structure cristallographique donne un rayon de 16 Å [119]. Vaz et al. se réfèrent à un article de Fleisher et al. [120] pour justifier que leur protéine est reconstituée sous la forme d'oligomère à 4 ou 6 éléments. Cependant une étude plus récente [121] concernant la reconstitution de ces protéines à l'intérieur de vésicules lipidiques conclut à un état monomérique. Remarquons que les lipides utilisés sont différents. Vaz et al. annoncent un coefficient de diffusion normalisé pour la SR-ATPase de 0.13 ± 0.03 et pour le récepteur de l'acétylcholine de 0.27 ± 0.16 . Si la SR-ATPase était sous forme monomérique dans les phases qu'ils ont utilisées, cela impliquerait qu'un objet plus grand diffuse avec un coefficient de diffusion plus grand, ce qui ne semble pas raisonnable. Dans les résultats qui suivent, nous avons donc conservé la valeur de rayon fourni par Vaz et al..

Les différents coefficients de diffusion sont alignés sur la loi en $1/a$ (figure IV.16). La

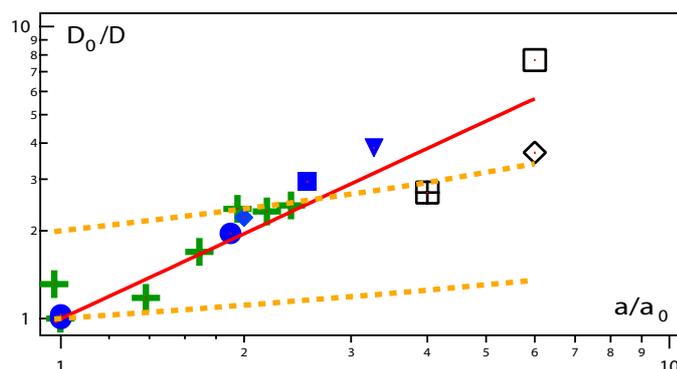


Figure IV.17: Variation de l'inverse du coefficient de diffusion renormalisé par la valeur de la diffusion pour un lipide ou un peptide en fonction de la taille renormalisée de l'objet. L'ajustement de ces valeurs par une loi de puissance donne une variation du coefficient de diffusion en $a^{-0.97}$. Le modèle de Saffman avec les paramètres obtenus pour nos valeurs est tracé ainsi que la courbe de variation de Saffman utilisée par Lee et al. (en pointillés).

comparaison avec le modèle de Saffman-Delbrück est révélatrice : on remarque que les variations prédites ne sont pas dans l'ordre de grandeur de celles mesurées du moins pour les objets dont le rayon est inférieur à 30 Å.

Si on compare plus précisément l'inverse du coefficient de diffusion renormalisé au rapport des rayons de l'objet par rapport à la référence choisie, une échelle logarithmique permet de trouver la loi de puissance entre ces deux grandeurs (figure IV.17). On obtient $D = \alpha a^{-0.97}$. Si on compare les résultats aux courbes obtenues par le modèle de Saffman et Delbrück pour nos données ou celles de Lee et al. [105], on constate que le modèle de

Saffman-Delbrück est éloigné des résultats expérimentaux.

Nous avons proposé une relation heuristique dérivée du modèle de Stokes-Einstein pour décrire l'évolution du coefficient de diffusion de l'objet avec le rayon dans la membrane et l'épaisseur hydrophobe :

$$D = \frac{k_B T \lambda}{4\pi \mu h a} \quad (\text{IV.13})$$

où λ est une longueur qui tient compte de la nature complexe de la bicouche.

IV.4.3 Quelques remarques

Le modèle de Saffman et Delbrück est un modèle hydrodynamique qui ne prend pas en compte les fluctuations locales de la bicouche ou les inhomogénéités de celle-ci. Les résultats que nous avons obtenus pour des objets dont le rayon varie entre 5 et 30 Å, sont en désaccord avec ce modèle mais sont bien ajustés par la relation IV.13.

Cette relation fait apparaître une longueur λ par homogénéité qui doit tenir compte de la nature complexe de la membrane ainsi que des perturbations induites par l'objet dans cette membrane. Si on reprend les résultats obtenus pour la variation en fonction de l'épaisseur h , le facteur A est égal à $\frac{k_B T \lambda}{4\pi \mu a}$ où a est le rayon des peptides soit 5.5 Å.

Le rapport λ/μ qui s'en déduit est de $1.4 \pm 0.6 \cdot 10^{-8} \text{ m}^4 \cdot \text{s}^{-1}$. L'ajustement par la loi IV.13 des variations de la mobilité en fonction du rayon donne une seconde estimation de ce rapport λ/μ . On trouve $1.3 \pm 0.3 \cdot 10^{-8} \text{ m}^4 \cdot \text{s}^{-1}$. Cependant, comme la viscosité de la membrane n'est pas connue mais estimée entre 0.1 et 100 Pa.s, la longueur λ est simplement comprise entre 1 et 1000 nm.

Une estimation indépendante de la viscosité de la membrane pourrait lever cette ambiguïté sur la longueur λ . Une expérience a été proposée par Tom Chu pour mesurer μ . Il reproduit un viscosimètre de Couette plan. Une phase lamellaire est placée entre deux parois. Les bicouches sont orientées parallèlement aux parois. Une force F parallèle constante est appliquée sur la paroi supérieure et on mesure la vitesse U_0 de cette paroi. On mesure ainsi une viscosité effective de la phase qui dépend de la viscosité de la membrane, de son épaisseur, du nombre de lamelles et de la viscosité de la solution aqueuse

L'application d'une force constante pour cisailer les bicouches est obtenue en inclinant le montage (figure IV.18).

Joao Gomes en stage de master 2 a commencé ces expériences. Il est parvenu à orienter les bicouches de la phase lamellaire de C12E5/ β -OG/solution S2 pour des dilutions importantes. Cependant la sensibilité du montage ne permet pas de mesurer la viscosité de la membrane pour ces phases diluées. L'orientation de phases plus concentrées devrait permettre d'atteindre ce résultat.

IV.5 Implications de la relation inspirée de Stokes-Einstein

Dans le modèle de Saffman-Delbrück, l'objet inséré dans la membrane a la même taille hydrophobe que celle de la membrane. Lorsque la protéine insérée est de taille hydrophobe d_π différente, on parle de mésappariement hydrophobe. Ce phénomène est très étudié à la

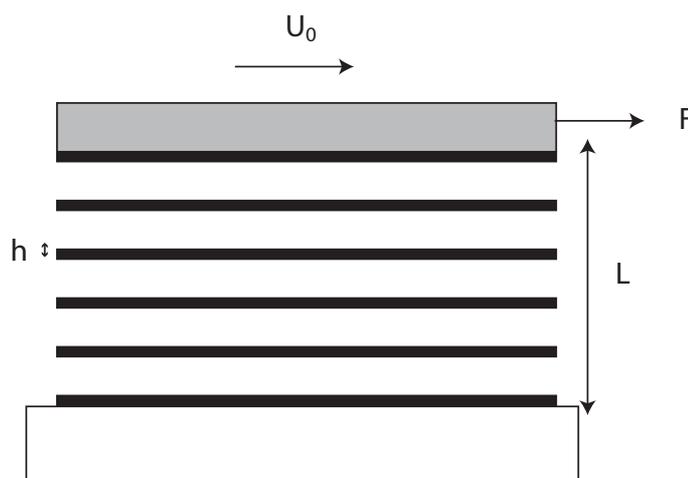


Figure IV.18: Description de l'expérience pour la mesure de la viscosité de la membrane.

fois théoriquement et expérimentalement [122], [123] car certaines protéines ont une activité qui dépend de l'épaisseur de la membrane dans laquelle elles sont insérées. En outre, la mise en évidence, à l'intérieur de la cellule, de micro-domaines correspondant à des épaisseurs différentes de bicouches a permis de proposer des mécanismes de tri à l'intérieur de la cellule. Les principales méthodes pour étudier ce mésappariement sont des techniques de RMN, de dichroïsme circulaire, de résonance électronique de spin, d'absorption infra-rouge ou des simulations moléculaires [124] [125]. Ces techniques ne fournissent pas de renseignements sur la taille de la perturbation induite par un objet dont la taille hydrophobe n'est pas adaptée à celle de la membrane. Mais elles renseignent sur la géométrie adoptée par cet objet.

Lorsque le peptide est plus court que l'épaisseur hydrophobe, les modèles existants suggèrent que le peptide pince la membrane. On a alors des "boutons pressions" sur la bicouche [126] du moins tant que l'énergie nécessaire au pincement est inférieure à l'énergie du rupture du peptide. En revanche, les propositions sur le comportement quand le peptide est plus long que l'épaisseur hydrophobe h de la bicouche diffèrent. La première

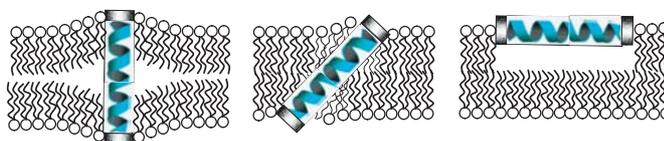


Figure IV.19: Hypothèses proposées pour la position d'un peptide de longueur d_π plus grande que l'épaisseur hydrophobe h de la membrane.

proposition est que la membrane s'adapte à la taille de l'objet (figure IV.19 a). La seconde est que le peptide s'incline en travers de la bicouche (figure IV.19 b). La dernière propose que le peptide se couche sur la membrane (figure IV.19 c). C'est dans le but de discriminer quelle théorie s'applique que nous avons utilisé les différents peptides L_{12} , L_{18} ,

L_{24} .

Ces peptides sont des cylindres hydrophobes modèles qui vont être insérés dans des bicouches de tensioactifs d'épaisseur modulable. D'après la section précédente, le coefficient de diffusion proportionnel à $1/a$ est très sensible aux variations du rayon a de l'objet qui diffuse. Dans le cas d'un objet qui n'est pas adapté à la membrane, ces variations de mobilité seront donc inversement proportionnelles au rayon de la perturbation induite par le peptide à l'intérieur de la membrane.

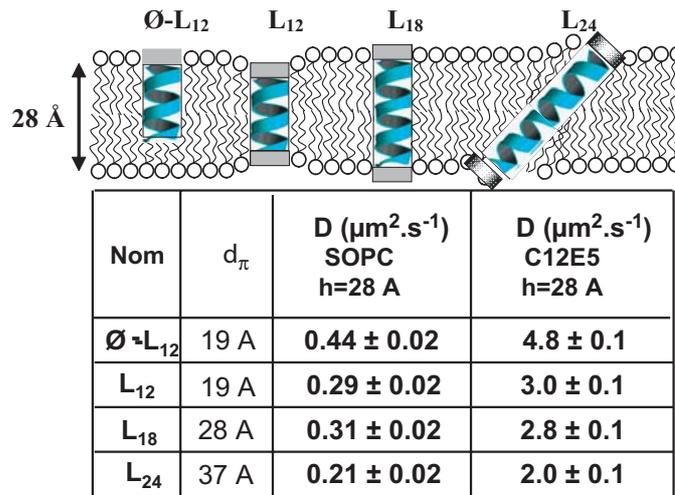


Figure IV.20: Mesures de coefficient de diffusion pour les peptides Ø-L_{12} , L_{12} , L_{18} , L_{24} dans les vésicules géantes et dans des bicouches de C12E5 ayant la même épaisseur.

IV.5.1 Coefficient de diffusion dans des vésicules de SOPC

On mesure le coefficient de diffusion de ces quatre peptides dans des vésicules géantes de SOPC (figure IV.20). Les bicouches de SOPC ont une épaisseur hydrophobe $h = 28$ Å. Le peptide L_{18} est donc le seul qui ait une taille adaptée à la membrane. Les deux autres peptides L_{12} et L_{24} sont mal adaptés à cette épaisseur ; leur mésappariement est de 9 Å. L'un est plus court, l'autre plus long de 9 Å. Le coefficient de diffusion de L_{24} est inférieur de 30 % à celui du L_{18} tandis que la valeur obtenue pour L_{12} est très proche de celle de L_{18} . On constate que le peptide Ø-L_{12} qui possède une seule tête polaire a un coefficient de diffusion plus important que celui de L_{12} . Le peptide L_{12} est bien toujours transmembranaire. Pour la même valeur absolue de mésappariement hydrophobe, les peptides L_{12} et L_{24} n'ont pas le même coefficient de diffusion. Les phénomènes mis en jeu sont différents selon le signe du mésappariement.

Les résultats obtenus pour ces mêmes peptides insérés dans une bicouche de tensioactif C12E5 d'épaisseur hydrophobe $h=28$ Å égale à celle du SOPC présentent les mêmes variations bien que les valeurs des coefficients de diffusion soient plus grandes. Dans cette phase aussi, le comportement selon le signe du mésappariement n'est pas symétrique.

IV.5.2 Mesures de coefficient de diffusion dans une phase éponge

Pour étudier l'effet du mésappariement hydrophobe, il faut avoir accès à une bicouche dont l'épaisseur soit modifiable. Les bicouches de lipides étant difficilement modulables, il faut recourir à un changement de lipides pour atteindre cet effet. Au contraire la phase éponge de C12E5/ β -OG/solution S2 (Annexe B) présente une versatilité intéressante puisque, par addition de dodécane, on parvient à augmenter l'épaisseur de la membrane sans changer sa viscosité (section IV.3.2). Comme les résultats en GUV et en phase éponge présentent les mêmes variations, nous avons basculé vers cette phase afin de mesurer le coefficient de diffusion des peptides selon la valeur de h .

La figure IV.14 résume les résultats obtenus. A mesure que l'épaisseur de la membrane

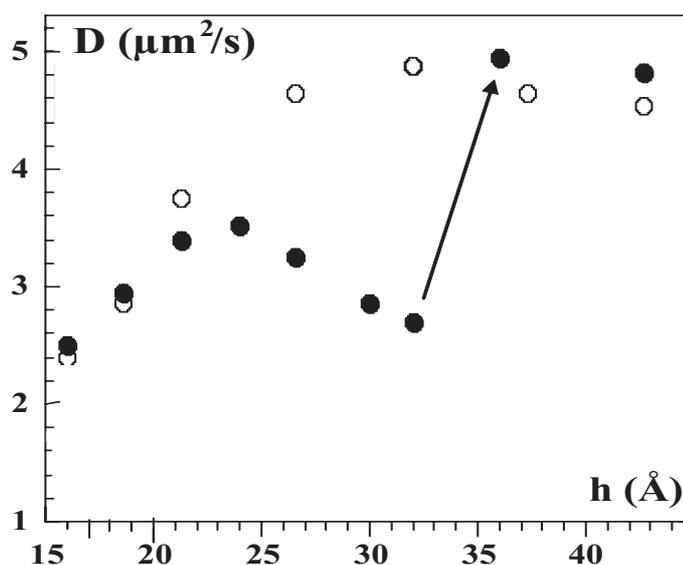


Figure IV.21: Variation des coefficients de diffusion pour L_{12} et $\emptyset-L_{12}$ en fonction de l'épaisseur hydrophobe h de la membrane. L'évolution est la même pour les deux peptides tant que h est inférieure à 22 Å. Au-delà, les coefficients de diffusion du peptide privé d'une tête polaire continuent d'augmenter jusqu'à $h=28$ Å alors que celui de L_{12} diminue. Pour des épaisseurs h supérieures à 30 Å, la mobilité du peptide L_{12} connaît une augmentation importante. Le peptide perd son caractère transmembranaire.

augmente, on observe une augmentation de la mobilité. Puis quand des épaisseurs de 22, 29 et 36 Å sont atteintes, les coefficients de diffusion de L_{12} , L_{18} , L_{24} diminuent. La position de ces maxima doit être reliée à la longueur d_{π} de chacun des peptides qui est de 19, 28 et 37 Å respectivement. La position du maximum de L_{12} est décalée par rapport à sa longueur (22 Å figure IV.20) mais la flexibilité de la position de la tête polaire de lysine mise en évidence par Killian [127] peut expliquer ce phénomène qui sera d'autant plus visible que la longueur de la chaîne sera courte.

Au-delà de ces positions, la diminution du coefficient de diffusion pour les trois peptides s'aligne sur une variation en $1/h$ (figure IV.14). Cette loi de variation indique donc que pour un mésappariement positif, on a un objet diffusant dont le rayon est toujours celui

du peptide droit. Pour expliquer ceci, on a recours à diverses hypothèses. La première est que l'hélice α se détend et s'ajuste à la membrane. Cependant, quand on utilise un peptide marqué par une biotine et qu'on ajoute de la streptavidine, celle-ci ne s'ancre plus. La biotine présente au niveau de la tête polaire n'est pas accessible. Cette conclusion renforce l'image d'une pression exercée sur la membrane par le peptide. Une seconde hypothèse est que la perturbation a une amplitude trop faible ou que les tensioactifs qui appartiennent à l'anneau autour du peptide sont constamment échangés avec le reste de la membrane. Cette diminution est, de plus, la signature d'un comportement transmembranaire. En effet, si les résultats pour L_{12} sont comparés à ceux obtenus pour son analogue non transmembranaire (le peptide $\emptyset-L_{12}$), on observe (figure IV.21) que ce peptide, privé d'une tête polaire, voit son coefficient de diffusion suivre les mêmes variations que L_{12} pour $h < d_\pi$. Il atteint un plateau quand l'épaisseur de la membrane atteint 28 Å. Pour cette épaisseur, la queue hydrophobe n'est plus en contact avec la seconde bicouche de tensioactif. Le peptide explore une bicouche et 8 Å de la couche intermédiaire de dodécane. Pour une épaisseur h de 30 Å (d_π de L_{12} plus 10 Å), on observe un saut de la valeur du coefficient de diffusion de L_{12} . La mobilité du peptide passe de 2.5 à 5 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, valeur identique à celle mesurée pour le peptide $\emptyset-L_{12}$. Cette brusque augmentation indique que le second accrochage à la membrane a été rompu. Les peptides ne sont plus transmembranaires.

Le comportement pour un mésappariement négatif n'est pas symétrique. A partir de

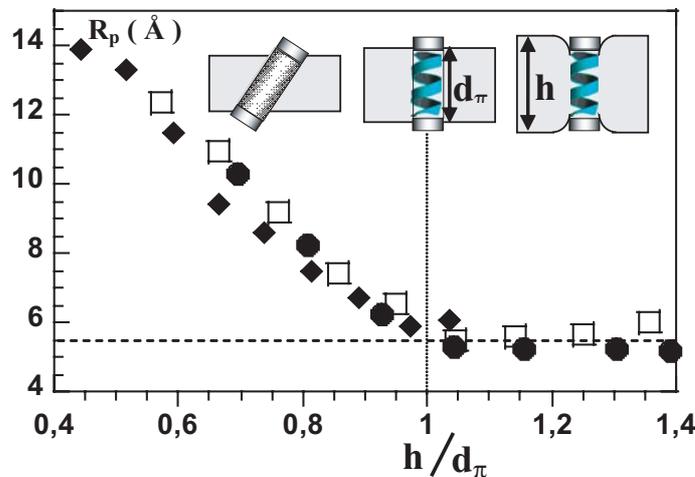


Figure IV.22: Variation du rayon hydrophobe en fonction de més-appariement relatif pour les trois peptides. Les points correspondants à L_{12} (●), à L_{18} (□) et à L_{24} (◆) suivent la même évolution.

la loi IV.4 et de la détermination du rapport $\frac{\lambda}{\mu}$ grâce aux maxima de la courbe, on peut calculer un rayon de perturbation (R_p) correspondant au coefficient de diffusion mesuré. La figure IV.22 montre l'évolution de ce dernier en fonction du mésappariement relatif. Les points expérimentaux correspondants à tous les peptides transmembranaires sont alignés sur une même courbe maîtresse. Ces variations indiquent ainsi un phénomène continu. L'hypothèse selon laquelle le peptide serait couché sur la membrane est à écarter

car on aurait alors une valeur constante puis un saut pour $h = d_\pi$ quand le peptide se redresse pour devenir transmembranaire. Si la membrane s'adaptait à la taille de peptide inséré droit, le comportement serait symétrique de part et d'autre de la position $h = d_\pi$ ce qui n'est pas le cas. L'hypothèse à vérifier est donc celle qui suppose que le peptide est penché.

Son angle d'inclinaison θ peut être déduit de la valeur du rayon de perturbation. En effet, l'aire projetée du peptide faisant un angle θ est (figure IV.23) :

$$S = \pi R_p^2 = \pi a^2 \cos(\theta) + 2ha \tan(\theta) \quad (\text{IV.14})$$

où a le rayon du peptide et h la taille hydrophobe de la membrane.

L'angle d'inclinaison dépend donc du mésappariement relatif. Si on compare nos résul-

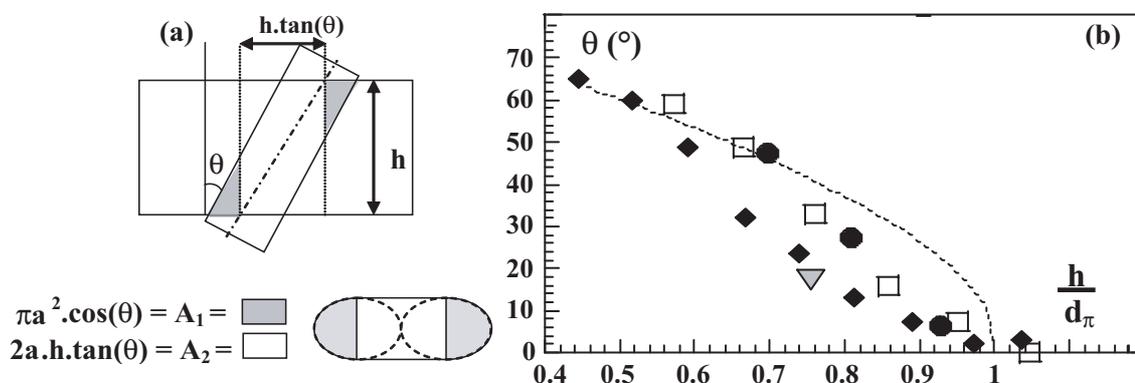


Figure IV.23: a) Schéma de la projection du peptide incliné de θ selon le plan de la membrane. b) Evolution de l'angle d'inclinaison pour les mesures faites avec les trois peptides transmembranaires, le triangle gris indique les résultats donnés par FTIR sur le peptide L_{24} dans une membrane de SOPC. Ces résultats sont comparés avec un simple modèle géométrique qui donne $\cos(\theta) = \frac{h}{d_\pi}$

tats avec ce simple modèle géométrique, on remarque qu'ils s'alignent sur cette courbe pour de grandes valeurs d'inclinaison (figure IV.23). En effet, le modèle géométrique néglige le rayon du peptide par rapport à la taille hydrophobe h de la membrane. Ceci est d'autant plus vrai que le mésappariement est important.

Le peptide L_{24} est inséré dans une bicouche de SOPC et étudié par absorption infra-rouge. Les résultats obtenus par F. Hommlé (Structure et fonction des membranes biologiques-Université Libre de Bruxelles-Belgique) conduisent à un angle de 18° très proche de la valeur obtenue par notre méthode de mesure du rayon de perturbation qui était de 19° .

IV.5.3 Bilan

Nos résultats expérimentaux montrent que la mesure de la mobilité des objets pouvait renseigner de manière très précise sur leur configuration. La mesure de coefficient de diffusion apporte alors des informations sur la structure des objets qui diffusent dans une

membrane.

Ce chapitre sur la confrontation expérimentale du modèle de Saffman-Delbrück a permis de conclure que :

- le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à l'épaisseur hydrophobe h de la membrane.
- le coefficient de diffusion est inversement proportionnel au rayon de l'objet diffusant pour des objets dont le rayon est inférieur à 30 Å.

Nous avons proposé une expression du coefficient de diffusion qui prend en compte ces conclusions :

$$D = \frac{k_B T \lambda}{4\pi \mu h a} \quad (\text{IV.15})$$

Cette relation autorise, à partir des mesures de coefficient de diffusion, la déduction de l'état d'oligomérisation d'une protéine ou la mise en évidence des interactions lipides-protéines ou protéines-protéines. Cette relation nous a permis d'étudier le mésappariement hydrophobe d'un peptide dans une bicouche de C12E5. Les chapitres suivants vont utiliser cette loi de variation du coefficient de diffusion afin de mettre en évidence des interactions protéines-protéines.

Chapitre V

Interactions protéines-protéines

Nous avons à notre disposition une phase éponge stable en température et en dilution dans laquelle les protéines membranaires s'insèrent sans difficulté. Cette phase est modulable sur une gamme de distances entre bicouches (d_W entre 50 et 350 Å) qui encadrent la taille supposée du périplasma. Nous avons démontré que la mesure du coefficient de diffusion est un outil sensible aux variations de rayons des objets donc à leur état d'oligomérisation ou à leurs interactions. Dans ce chapitre, nous allons étudier comment notre système permet de détecter des interactions entre objets ancrés dans une membrane à partir de deux exemples : d'une part, l'interaction modèle streptavidine-biotine qui est une interaction forte et d'autre part, des interactions entre les différents composants de la pompe à efflux MexA-B/OprM. La détection d'interactions entre protéines solubles est maîtrisée (ultracentrifugation analytique ou détection sur colonne gel-filtration). L'originalité de notre étude est qu'elle s'intéresse à des interactions entre protéines membranaires qui sont difficiles à caractériser par d'autres moyens (la présence de détergent complique souvent l'interprétation). Nous verrons dans ce chapitre comment les mesures de recouvrement de fluorescence permettent :

- la détection de la formation d'un complexe avec une grande sensibilité,
- la détermination de la configuration adoptée par le complexe,
- la stœchiométrie des différents éléments mis en jeu lors de l'assemblage,
- la dépendance de ces données avec le pH.

V.1 Principe

Des protéines sont insérées dans une membrane fluide d'une phase éponge. La variation de leur coefficient de diffusion en fonction de la séparation entre les bicouches d_W est mesurée séparément pour chacune des protéines. Que nous apprennent ces mesures de coefficient de diffusion ? Tout d'abord, leurs valeurs permettent de savoir si la protéine étudiée diffuse en volume ou sur la membrane. En effet, dans la phase L₃, les protéines membranaires ont un coefficient de diffusion entre 0.1 et 5 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ alors que des objets solubles ont des coefficients de diffusion un ordre de grandeur supérieur : entre 20 et 80 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Ce facteur entre les deux termes est aussi obtenu dans le cadre de la diffusion sur des vésicules [128] ou des membranes biologiques [129] [130]. Ceci est dû à l'importance de la viscosité de la membrane par rapport à celle du fluide environnant.

De plus, les variations du coefficient de diffusion avec la fraction volumique de membrane ϕ renseignent sur le caractère membranaire ou non des molécules. En effet, si un objet diffuse dans la phase aqueuse entre les bicouches, toute diminution de la distance d_W

entre les bicouches va conduire à une diminution de l'espace libre de diffusion. Cette décroissance est proportionnelle à ϕ : $D = D_0(1 - b\phi)$. Ces résultats ont été démontrés par Andersen et Wennerstrom [131] et vérifiés par A. Maldonado et al. [132]. Si la protéine diffuse sur la bicouche, la diminution de la taille caractéristique va augmenter les interactions hydrodynamiques entre l'objet et la bicouche voisine donc diminuer son coefficient de diffusion par un facteur proportionnel à ϕ^2 [131] : $D = D_0(1 - b\phi^2)$. Nous avons vu au chapitre IV que le coefficient de diffusion d'un objet membranaire est inversement proportionnel à son rayon a [115] :

$$D = \frac{k_B T \lambda}{4\pi \mu h a} \quad (V.1)$$

La mesure de "a" donne le degré d'oligomérisation de la protéine.

Une fois la protéine caractérisée, on la fait réagir avec son partenaire supposé. Une des deux protéines est marquée : la protéine ayant le coefficient de diffusion le plus important (c'est-à-dire la protéine la plus petite ou la protéine soluble) car elle est la plus sensible aux accrochages. En effet, si cette protéine est soluble et s'ancre à une seconde protéine membranaire, son coefficient de diffusion va fortement varier. De même, si la protéine s'accroche à une seconde ayant un rayon plus important, les variations relatives en taille du nouvel objet sont maximales. La variation du coefficient de diffusion sera plus facilement décelable.

Dans le cas où une protéine soluble et une membranaire réagissent. Quelle que soit la distance entre les lamelles, la protéine soluble va pouvoir s'ancre à la protéine membranaire et son coefficient de diffusion va diminuer.

Si on envisage maintenant un accrochage entre deux objets membranaires, cette liaison

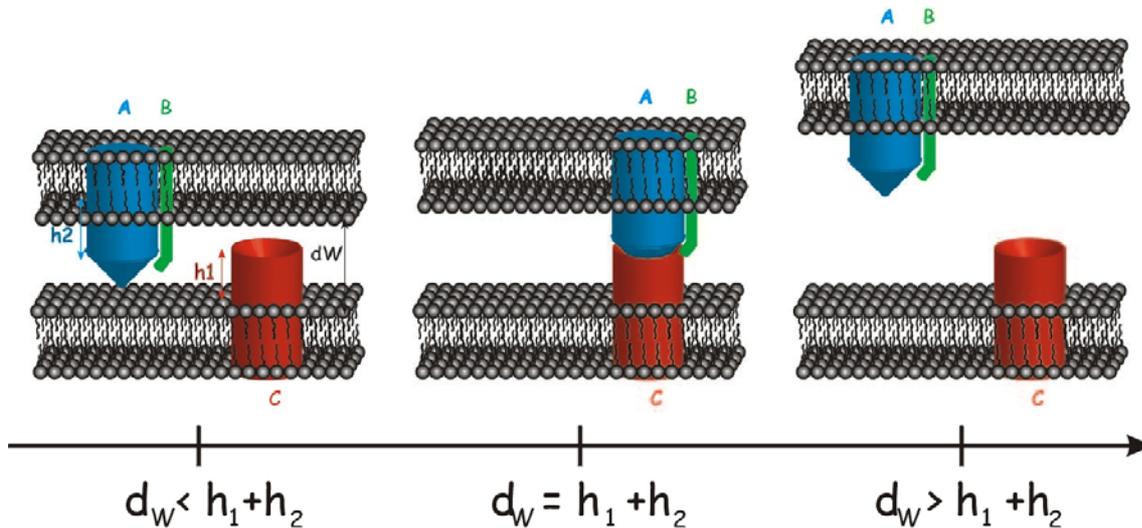


Figure V.1: Schéma de principe de la détection d'interaction par mesure du coefficient de diffusion selon la géométrie de l'interaction

peut intervenir :

- soit entre des protéines appartenant à la même bicouche. On parlera alors d'interaction latérale comme indiquée sur la figure V.1 entre les protéines A et B,

- soit entre des protéines appartenant à des lamelles voisines. On parlera dans cette situation d'interaction frontale (figure V.1 entre les protéines A et C).

Dans le premier cas, l'interaction aura lieu pour toute distance d_W .

Dans la situation où le lien est frontal, la liaison n'interviendra que pour des distances d_W particulières entre bicouches voisines. Cette taille permettra de déduire la distance entre sites d'interaction. Toutefois, selon la valeur de l'énergie de liaison et selon la valeur de la rigidité de la bicouche, on pourra avoir une adaptation de celle-ci pour que l'accrochage ait lieu pour des distances légèrement différentes de la distance d'interaction. Dans cette hypothèse, le coefficient de diffusion de la protéine étudiée ne sera modifié par rapport à la mesure faite pour la protéine seule que pour des valeurs de d_W encadrant la distance d'interaction.

Nous pouvons détecter par la mesure de coefficient de diffusion des interactions entre protéines. De plus, la possibilité de contrôler la distance d'approche entre protéines autorise la détermination de la configuration de l'interaction et de sa distance caractéristique d'accrochage.

V.2 Détection d'une interaction forte par la méthode de recouvrement de fluorescence

Afin de valider notre méthode, nous nous sommes intéressés à un lien fort entre deux protéines : la streptavidine et la biotine. Cette liaison est bien caractérisée et sert d'attache au niveau moléculaire [134].

V.2.1 Description d'un lien modèle : Streptavidine-biotine

La streptavidine est une protéine tétramérique. Sa structure a été résolue [135] [136] [137]. Elle possède un plan de symétrie et s'inscrit dans une ellipsoïde de dimensions $50 \times 54 \times 48$ Å. Deux poches d'interaction avec la biotine sont présentes de chaque côté de la protéine (figure V.2). Elles sont séparées par une distance de 4-5 nm. Deux poches diamétralement opposées (B_1 et B_3 sur la figure V.2 par exemple) sont distantes de 75 Å. Le panorama énergétique de cette liaison a fait l'objet de nombreuses études : des mesures de microscope à force atomique [138] [139], des mesures dynamiques de force par la technique du Biomembrane Force Probe ou BFP [140] [141], des pinces optiques [142] ou de la chambre à flux [143]. Les résultats [141] ont montré que le lien streptavidine-biotine possédait plusieurs paliers énergétiques correspondants aux énergies suivantes : 32, 26 et 37 $k_B T$.

La streptavidine que nous avons utilisée est une protéine fluorescente marquée par un groupement FITC (Uptima Interchim-Montluçon). Son coefficient de diffusion dans la solution S2 (solution aqueuse des phases éponge - voir annexe B) est de $73 \pm 5 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Cette valeur correspond à un rayon hydrodynamique de 26 ± 2 Å en accord avec les dimensions de la streptavidine. Dans la phase éponge (figure V.3), son coefficient de diffusion diminue avec d_W et il est de $50 \pm 2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ pour une fraction volumique de membrane de 0.1 correspondant à une distance entre bicouche de 120 Å. Lorsque ϕ augmente de 0.1

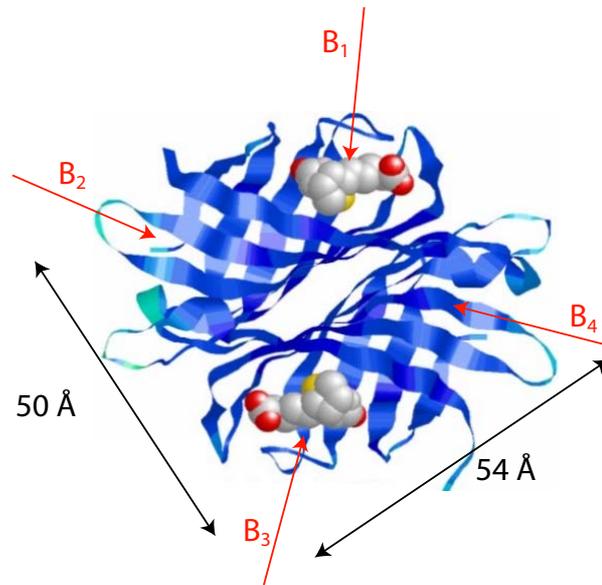


Figure V.2: Structure en ruban de la streptavidine ancrée à deux biotines (en blanc). Les groupements biotines sont liés à des poches d'interaction diamétralement opposées. Les quatre poches sont indiquées par des flèches. Les dimensions sont rappelées.

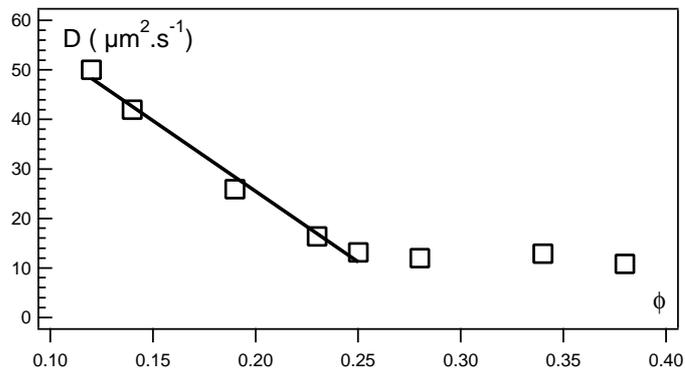


Figure V.3: Evolution du coefficient de diffusion de la streptavidine en fonction de ϕ . Le coefficient de diffusion reste constant quand $\phi > 0.25$, les tailles d_W correspondantes sont de l'ordre des dimensions de la streptavidine. Pour $\phi < 0.25$, $D = D_0(1 - b\phi)$ avec $D_0 = (82 \pm 4) \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $b = (3.4 \pm 0.2)$ (trait continu).

à 0.25, la valeur du coefficient de diffusion varie linéairement avec ϕ . Nous vérifions ainsi que la streptavidine diffuse en volume à l'intérieur de la solution. Pour des phases plus riches en lamelles $\phi > 0.25$, le coefficient de diffusion reste constant. Ces valeurs de fraction volumique de membranes correspondent à des séparations entre bicouches $d_W < 80 \text{ \AA}$ ce qui est la plus grande dimension de la streptavidine. Celle-ci diffuse plus difficilement car elle peut frotter sur les bicouches.

De plus, quand on place la streptavidine dans une phase éponge, on remarque qu'un second coefficient de diffusion intervient. Il est de $2.8 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour $d_W = 120 \text{ \AA}$. Ce second

temps de diffusion est lié à l'accrochage transitoire de la streptavidine à la membrane. Il faudra en tenir compte dans les expériences que nous allons réaliser.

La biotine est un petit groupement qui peut facilement être associé à des molécules. Nous avons travaillé avec des biotines fixées sur des peptides transmembranaires. Dans nos expériences, la biotine diffuse donc en surface et son coefficient de diffusion est égal à $3.2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ c'est le coefficient de diffusion du peptide (Section IV.3.2).

V.2.2 Comportement en fonction de la concentration : mise en évidence d'une liaison latérale

La streptavidine diffuse entre les bicouches. Seule une faible fraction est liée transitoirement à la surface. La biotine est liée à un peptide transmembranaire. La streptavidine fluorescente est la protéine dont nous mesurons le coefficient de diffusion. Tout ancrage avec la biotine se solde par une diminution du coefficient de diffusion.

On introduit la streptavidine dans une phase éponge pour laquelle la taille caractéristique $d_W = 120 \text{ \AA}$ (supérieure à la plus grande dimension de la streptavidine). Nous allons décrire les variations du coefficient de diffusion de la streptavidine en fonction du rapport molaire r entre les quantités initiales de biotine et de streptavidine : $r = n_{B_0}/n_{S_0}$.

Dès que la biotine est introduite, les courbes de recouvrement de fluorescence sont des

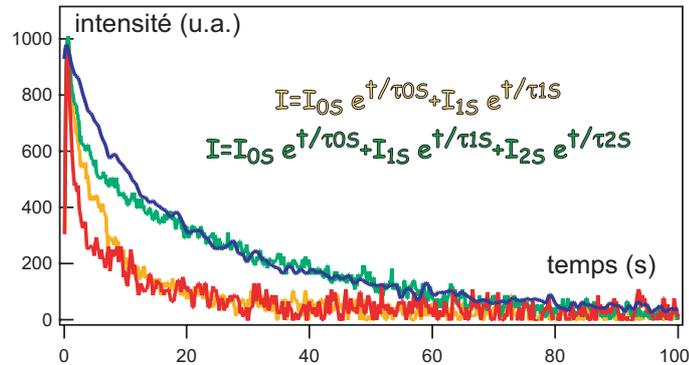


Figure V.4: Courbes de recouvrement de fluorescence obtenues pour différents rapports r . La courbe en rouge est la courbe obtenue pour $r=0.1$, la courbe en orange pour $r=0.25$, la courbe en vert pour $r=1.5$ et la courbe en bleu pour $r=2$. La courbe rouge est bien ajustée par une double exponentielle. Cet ajustement permet de déduire I_{0S} et I_{1S} , les intensités de chaque fraction. Les courbes orange et verte sont ajustées par une triple exponentielle. On en déduit les valeurs des intensités des différentes composantes I_{0S} , I_{1S} et I_{2S} . La courbe bleue est bien ajustée par une simple exponentielle. (Signaux non moyennés obtenus après un seul photoblanchiment).

doubles exponentielles (figure V.4). On met en évidence deux fractions :

- la première a un coefficient de diffusion $D_{0S} = 50 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (elle correspond à la streptavidine libre),
- la seconde $D_{1S} = 3.2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (identique au coefficient de diffusion du peptide). Cette population correspond à la streptavidine ancrée à un peptide.

Quand r est supérieur à 0.1, on voit apparaître une troisième composante dans le signal de recouvrement (figure V.4 courbes orange et verte). Le coefficient de diffusion associé est de $D_{2S} = 1.5 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. La fraction possédant ce coefficient de diffusion augmente avec la fraction molaire r . Ces courbes sont donc ajustées par une triple exponentielle comme le montre la figure V.5. Au-delà d'une valeur de r égale à 2, les figures de recouvrement

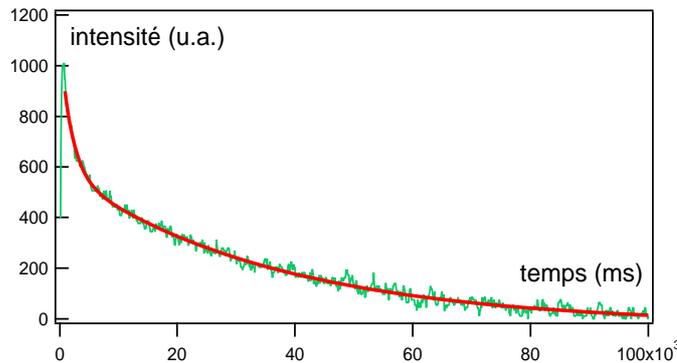


Figure V.5: Courbes de recouvrement de fluorescence obtenues pour $r=1.5$. L'ajustement est réalisé avec une exponentielle triple soit $I(t) = I_{0S} e^{-t/\tau_{0S}} + I_{1S} e^{-t/\tau_{1S}} + I_{2S} e^{-t/\tau_{2S}}$. On en déduit les valeurs des intensités des différentes composantes I_{0S} , I_{1S} et I_{2S} .

de fluorescence sont des exponentielles simples (figure V.4) et la mobilité associée est D_{2S} . Deux poches d'interaction sont présentes sur chaque côté de la streptavidine. D_{2S} correspond à la diffusion d'une streptavidine liée à deux peptides situés dans la même membrane. En effet la séparation d_W entre les bicouches n'autorise pas une liaison avec des biotines ancrées dans des membranes opposées.

En conclusion, la variation de la fraction molaire r entre streptavidine et biotine a permis de mettre en évidence une interaction latérale entre la streptavidine liée à 1 peptide et un peptide biotiné. Nous verrons dans la section V.5.2 que le suivi quantitatif des intensités des différentes composantes du signal renseigne à la fois sur le nombre de sites d'accrochage mais aussi sur les constantes d'association du système.

V.2.3 Comportement en fonction de la distance d'approche : mise en évidence d'une liaison frontale

La streptavidine possède deux poches sur chacune de ses faces. De cette façon une streptavidine ancrée via deux biotines à une membrane (complexe S-(BL₁₂)₂) possède deux poches libres sur la face en regard de la membrane voisine. Elle peut interagir avec un (ou plusieurs) peptide biotiné présent sur une lamelle voisine. En modifiant la distance

d_W , nous allons pouvoir tester ce lien.

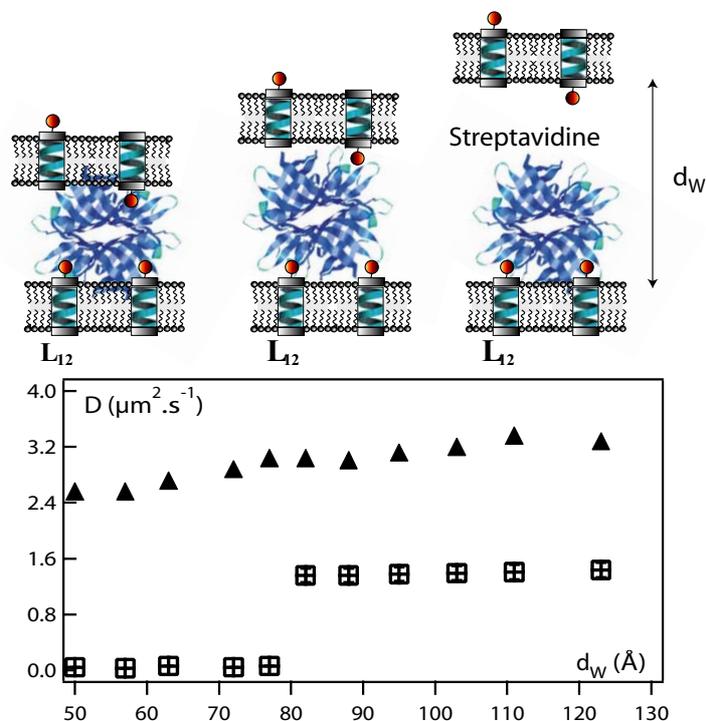


Figure V.6: Variations des coefficients de diffusion d'un peptide L_{12} (▲) et d'une streptavidine (⊞) dans une phase éponge contenant des peptides biotinisés en large excès. On observe deux types d'interactions : pour $d_W > 80$ Å, une interaction latérale entre deux peptides d'une même bicouche médiée par une streptavidine. Cet accrochage se produit pour toute valeur de d_W entre 80 et 120 Å. Pour $d_W < 80$ Å, on observe une liaison entre deux peptides appartenant à deux bicouches voisines.

La streptavidine est insérée dans une phase éponge dont la d_W varie entre 50 et 125 Å. Une quantité de peptides biotinisés en large excès ($r=10$) est présente dans la membrane. Quand la séparation entre bicouches est supérieure à 83 Å, on retrouve le coefficient D_{2S} (figure V.6). Cependant quand d_W est inférieure à 78 Å, le coefficient de diffusion diminue et est égal à $0.05 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Cette valeur correspond à la diffusion de la streptavidine liée à deux peptides au moins qui appartiennent à des bicouches opposées. On peut ainsi détecter une interaction frontale entre $S-(BL_{12})_2$ et un peptide biotiné présent sur une bicouche voisine. La distance à laquelle la transition a lieu (78 ± 5 Å) est proche de la distance maximale entre deux poches d'interaction (75 Å). La méthode renseigne donc sur la distance d'interaction avec précision.

L'étude du lien streptavidine-biotine à l'intérieur de systèmes de bicouches modèle montre que la détection d'un lien fort est possible. Cette méthode permet de tester à la fois des interactions frontales et latérales et renseigne sur la géométrie de l'interaction.

V.3 Mise en évidence d'interactions entre composants d'une pompe à efflux : MexA et OprM

La partie précédente valide notre technique pour des interactions fortes. Nous montrerons que cette méthode permet aussi de détecter la liaison entre la protéine périplasmique MexA et la protéine de la membrane externe OprM appartenant à la pompe à efflux MexA-B/OprM. Jusqu'alors, aucune liaison entre ces deux éléments n'a été clairement identifiée. Des études réalisées à partir des structures cristallographiques de MexA et de l'homologue de OprM chez *Escherichia coli* TolC [43] prédisent toutefois une telle liaison.

V.3.1 Caractérisation des deux protéines MexA et OprM

La première phase de ce travail a été consacrée à la détermination des coefficients de diffusion des deux protéines MexA et OprM à l'intérieur de la phase éponge.

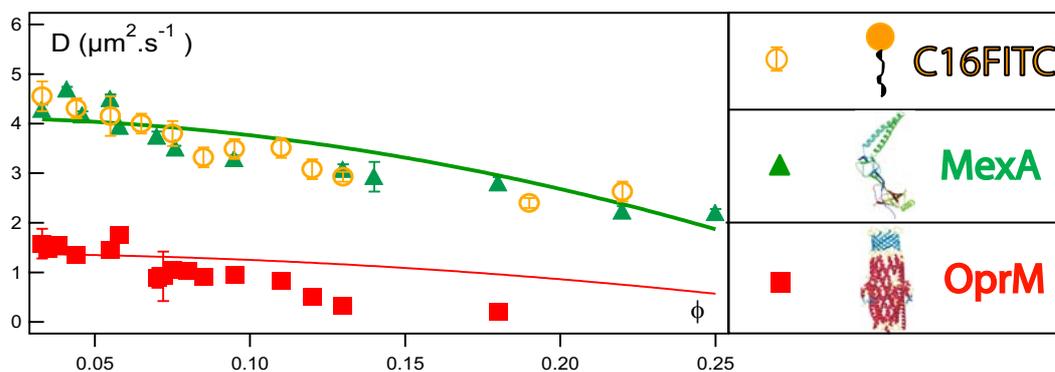


Figure V.7: Variations des coefficients de diffusion des protéines MexA (▲) et OprM (■) en fonction de la fraction volumique de membrane ϕ . Chacune des protéines est introduite seule dans la phase. Les résultats obtenus sont bien ajustés par une loi de variation en $D=D_0(1-b\phi^2)$ [131] (traits pleins). Pour MexA, $D_{0,A} = (4.13 \pm 0.02) \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $b = 8.7 \pm 0.3$. Pour OprM, $D_{0,M} = (1.4 \pm 0.1) \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $b = 10 \pm 1$. Les variations des coefficients de diffusion de MexA sont comparées à celles d'un tensioactif avec 16 atomes de carbone (○). Ces deux objets ont le même type d'accrochage à la membrane.

La protéine OprM

Les variations de coefficient de diffusion de OprM avec ϕ sont compatibles avec une loi de la forme : $D_{OprM}=D_{0,M}(1-b\phi^2)$ avec $D_0 = (1.4 \pm 0.1) \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (figure V.7) car OprM est une protéine membranaire qui diffuse dans la membrane. Toutefois pour des valeurs de ϕ supérieures à 0.12 (c'est-à-dire des tailles d_W inférieures à 110 Å), l'ajustement n'est plus valable, le coefficient mesuré est plus faible. La protéine OprM a une taille hydrophile de

100 Å. Pour de telles valeurs de d_W , elle frotte sur la membrane opposée ce qui provoque un ralentissement important.

OprM a une tendance à former des ponts entre bicouches comme l'ont montré des structures cristallographiques à deux dimensions [47]. Pour $d_W > 320$ Å soit $\phi < 0.04$, ces interactions ne peuvent pas avoir lieu. Le coefficient de diffusion mesuré pour OprM ($1.4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) est celui d'une protéine sans interaction (figure V.7). La diffusion dans la phase a été calibrée par l'utilisation de peptides de rayons connus (dans l'équation V.1, $\lambda/\mu = 1.3 \pm 0.3 \cdot 10^{-8} \text{ m}^4.\text{s}^{-1}$). Nous obtenons un rayon membranaire de 18 ± 2 Å pour OprM [115] ce qui est en bon accord avec les données cristallographiques [34]. On ne relève pas d'interaction frontale entre les protéines OprM. Ceci est dû au fait que les concentrations utilisées sont très faibles : de l'ordre de 10^{-13} à $10^{-12} \text{ mol}.\text{dm}^{-2}$.

La protéine MexA

La protéine MexA sous sa forme native possède un segment hydrophobe supposé créer un ancrage à la membrane. Toutefois cet accrochage n'a pas encore été démontré.

La loi : $D_{MexA} = D_{0,A}(1 - b\phi^2)$ permet d'ajuster nos résultats (figure V.7). $D_{0,A}$ est égal à $(4.13 \pm 0.02) \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et $b = 8.7 \pm 0.3$. Toutefois un ajustement linéaire pourrait être satisfaisant pour nos données. Cependant pour les protéines MexA et OprM, la valeur de b pour l'ajustement quadratique est proche. b est un paramètre qui dépend de la topologie de la phase. Or les deux protéines diffusent sur la même bicouche donc le paramètre b doit être identique. Ceci semble indiquer que cette protéine est ancrée à la membrane. Si on compare son coefficient de diffusion à celui d'un tensioactif avec une chaîne carbonée de 16 atomes de carbone, on constate que les variations pour ces deux objets sont identiques (figure V.7). L'accrochage de MexA à la membrane est supposé mettre en jeu la modification palmityl d'une cystéine libre. Or un acide palmityl est un groupement carboné possédant 16 atomes de carbone. Ces résultats renforcent donc l'hypothèse avancée d'un ancrage de MexA à la membrane par une chaîne palmityl.

De plus, nous avons étudié dans les mêmes phases le coefficient de diffusion d'un mutant de MexA : la protéine nommée MexA_{signal} qui ne comporte pas de cystéine libre et ne peut donc subir cette modification de sa structure en acide gras. Le coefficient de diffusion de cette protéine dans nos phases est de $25 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Il varie linéairement avec ϕ . Par conséquent, une nouvelle preuve s'ajoute en faveur de l'hypothèse d'un accrochage membranaire de MexA via une palmitylation.

V.3.2 Mise en évidence d'interactions entre MexA et OprM

Interactions en volume

Tout d'abord, nous avons testé ces interactions en solution. Les deux protéines MexA et OprM sont solubilisées dans du β -OG. Nous pouvons les faire réagir par simple mélange. On mesure alors les changements éventuels du coefficient de diffusion de MexA.

Dans la solution de solubilisation des protéines (Solution S1-Annexe B), le coefficient de diffusion de MexA est $D_{MexA} = 45.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Il correspond à un objet de 42.4 ± 0.5 Å de rayon hydrodynamique. La protéine MexA s'inscrit dans une ellipse de 85 Å de

Objet	MexA	OprM	MexA/OprM	MexA/OprM	MexA/OprM
Concentration (μM)	0.8	17	0.8/4	0.8/8	0.8/20
D ($\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	46 ± 0.6	32 ± 0.4	39 ± 1	36 ± 1	34 ± 1

Tableau V.1: Mesure des coefficients de diffusion de protéines MexA seule et en présence de OprM (pour les échantillons notés MexA/OprM) en solution.

long et de largeur 30 Å. Selon le facteur de Perrin [133], le rayon hydrodynamique d'une ellipsoïde prolata de demi-axes a et b s'écrit :

$$R_H = \frac{a \tanh(\xi)}{\xi} \left(\frac{3V}{4\pi} \right)^{1/3} \left(\frac{b}{a} \right)^{2/3} \quad (\text{V.2})$$

où

$$\xi = \frac{\sqrt{(a/b)^2 - 1}}{a/b}$$

et V est le volume de l'ellipsoïde. Le rayon hydrodynamique de MexA est de 35 Å. Cette valeur est inférieure à celle que nous avons trouvée. Toutefois, nous n'avons pas tenu compte de la présence du détergent lié au palmityl dans ces calculs. Celui-ci va augmenter la taille de la protéine (une valeur de 10 Å semble raisonnable).

Le coefficient de diffusion de OprM dans cette même solution est de $31.9 \pm 0.4 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Le rayon hydrodynamique qui s'en déduit est alors de 51.1 Å. OprM est une ellipsoïde longue de 130 Å (30 Å de partie hydrophobe et 100 Å de partie hydrophile), et de rayon maximal 34 Å. Le rayon hydrodynamique de cet objet est selon les formules V.2 de 45 Å. La contribution du β -OG peut là encore expliquer cette différence. Nous avons en solution des objets isolés qui ne présentent aucune agrégation.

Dans une seconde série d'expériences, on mélange les deux protéines : MexA fluorescente et OprM non marquée. Dans les échantillons, la concentration de MexA est de 0.8 μM et celle de OprM varie entre 4 et 20 μM . Le coefficient de diffusion de MexA est relevé après une heure de réaction. En deçà de ce temps, les changements de coefficient de diffusion ne sont pas identifiables car ils sont compris dans les barres d'erreur de mesure.

L'addition de OprM dans la solution diminue le coefficient de diffusion de MexA en solution. Le coefficient de diffusion de MexA passe de $46 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ à $34 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ (table V.1), c'est-à-dire une valeur proche de celle de OprM. On ne relève pas ici la présence de deux temps distincts de diffusion car les valeurs des coefficients de diffusion de MexA et de OprM en solution sont trop proches pour être distingués. De plus, la diminution est faible. Or, OprM est introduite en solution à une concentration 25 fois supérieure à celle de la protéine périplasmique. Deux raisons peuvent expliquer que cet accrochage soit si peu important : d'une part, le détergent pourrait empêcher les rencontres entre les deux protéines ; d'autre part, l'accrochage peut être transitoire.

Ainsi, nous avons mis en évidence une interaction en solution entre les deux protéines MexA et OprM même si cet accrochage semble peu important. Cependant ces mesures ne permettent pas de conclure sur l'orientation du lien entre les deux protéines ni sur la

stœchiométrie dans cet assemblage. Nous avons donc opté pour une insertion dans une phase de bicouches qui permet d'étudier l'interaction entre une protéine de la membrane externe (OprM) et cytoplasmique (MexA) reproduisant ainsi dans un système simplifié, la situation biologique.

Interactions dans une phase éponge

MexA est introduite dans une phase éponge contenant un large excès de protéines OprM non fluorescentes. La quantité de protéines MexA introduites dans un échantillon est de 1 pmol, celle en protéines OprM est de 10 pmol. La séparation entre les bicouches est modifiée pour chacun des échantillons. La gamme de variation choisie s'étend de 150 Å à 320 Å. Pour de telles valeurs, OprM ne frotte pas sur la bicouche adjacente. Elle ne va donc pas créer de ponts entre membranes qui pourrait ralentir la diffusion de MexA. Les

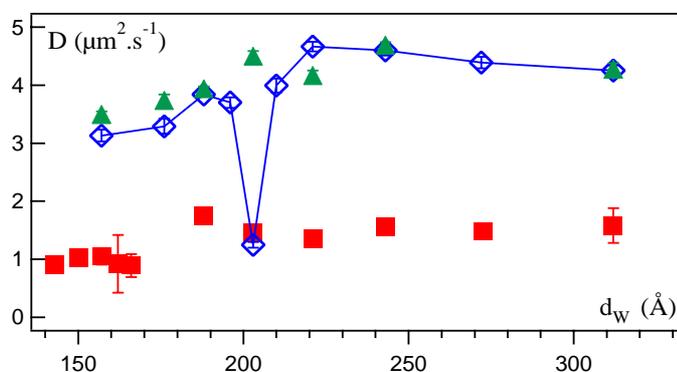


Figure V.8: Mesure des mobilités de la protéine MexA dans une phase contenant la protéine OprM en excès (\diamond). Ces résultats sont comparés à ceux précédemment obtenus pour les protéines MexA (\blacktriangle) et OprM (\blacksquare) chacune diffusant seules dans cette même phase.

résultats (figure V.8) révèlent trois parties distinctes selon la valeur de d_w :

- a- pour des séparations entre bicouches supérieures à 220 Å, la mobilité de la protéine MexA est inchangée par rapport aux résultats de la figure V.7. Or pour de telles valeurs de d_w , les protéines MexA et OprM peuvent seulement interagir de manière latérale car la distance entre bicouches est supérieure à la somme des tailles hydrophiles de nos deux objets. Aucune interaction latérale n'est observée entre ces deux protéines.
- b- pour $d_w \simeq 200$ Å qui est la valeur supposée de l'épaisseur du périplasma, le coefficient de diffusion moyen de MexA chute brutalement de 4.2 à 1.3 $\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Il atteint la valeur du coefficient de diffusion mesurée lorsque la protéine OprM diffuse seule dans une phase L_3 . Cette chute de mobilité ne peut pas être attribuée à la présence d'agrégats car les concentrations utilisées sont très faibles et les résultats obtenus ne dépendent pas de la concentration mais de la taille caractéristique de la phase éponge. Par conséquent cette soudaine décroissance est la signature d'une interaction entre les protéines MexA et OprM ancrées à des bicouches opposées.

c- pour des distances interlamellaires inférieures à 180 \AA , aucune interaction n'est détectée entre MexA et OprM.

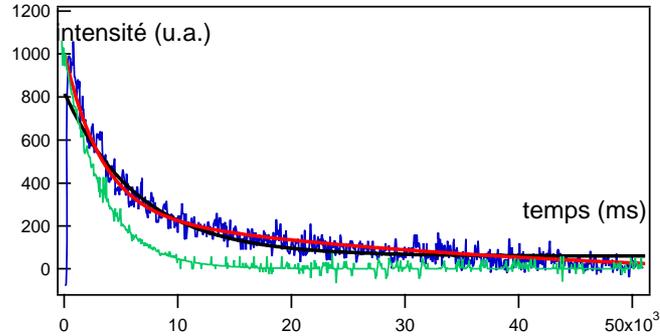


Figure V.9: Courbes de recouvrement de fluorescence pour la protéine MexA seule (courbe verte) ou en présence de OprM (courbe bleue) dans une phase avec un d_W de 202 \AA . On ajuste cette dernière courbe avec une simple exponentielle (en noir) ou une double exponentielle (en rouge). L'ajustement par une simple exponentielle permet de donner un coefficient de diffusion moyen de $1.3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. L'ajustement par une double exponentielle donne toutefois un meilleur accord avec les résultats. Il conduit à deux coefficients de diffusion distincts : $4.1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $0.6 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

La distance entre les membranes qui permet un accrochage est de $202 \pm 10 \text{ \AA}$. La distance obtenue est égale à la somme des tailles hydrophiles des deux protéines puisque MexA sous sa forme repliée est longue de 85 \AA (110 \AA pour sa configuration la plus étendue) et OprM possède un domaine hydrophile de 100 \AA . Les deux protéines semblent donc interagir au niveau de leurs extrémités hydrophiles.

Pour une distance d_W de 200 \AA , les courbes de recouvrement de fluorescence peuvent être ajustées par des doubles exponentielles (voir figure V.9). Une composante notée composante A correspond à la protéine MexA libre avec un coefficient de diffusion de $4.1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et l'autre indiquée AM à la protéine MexA formant un complexe avec OprM avec une mobilité égale à $0.6 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. L'intensité relative de ces deux fractions est relevée selon la taille d_W (figure V.10). On constate que la distribution est très piquée autour de 201 \AA . Malgré la légère asymétrie de la courbe (pour $d_W < 202 \text{ \AA}$, on note un faible accrochage pour des séparations entre bicouches de 190 et 195 \AA alors qu'aucun accrochage n'est visible pour $d_W > 202 \text{ \AA}$). Un ajustement gaussien est fait. Il fournit une largeur de l'ordre de 5 \AA . On peut s'étonner d'une valeur aussi strictement définie. En effet, l'amplitude de fluctuations des bicouches est de l'ordre de d_W . Dès lors, comment peut-on avoir un accrochage qui n'intervienne que sur des tailles moyennes comprises dans un espace de 10 \AA ? Une première hypothèse est que le module de rigidité de la phase est plus important que celui de la phase lamellaire. Par ailleurs, cela signifie que les sites d'interaction de MexA et de OprM sont très localisés.

Cette méthode de détection qui utilise le caractère membranaire des objets permet de déceler des interactions qui, en solution, sont difficilement détectables.

Remarquons pour terminer que la valeur du coefficient de diffusion du complexe est supérieure à celle obtenue pour la diffusion de la streptavidine ancrée via deux peptides transmembranaires appartenant à deux bicouches voisines. Ce phénomène peut avoir trois explications. Premièrement, la protéine possède un segment membranaire court de seize atomes, son accrochage membranaire est moins fort que celui du peptide et le rayon membranaire du complexe est plus faible. Deuxièmement, MexA est une protéine flexible, elle peut s'adapter sur presque 35 Å aux fluctuations de la membrane [40]. Enfin la protéine pourrait s'ancrer transitoirement à OprM.

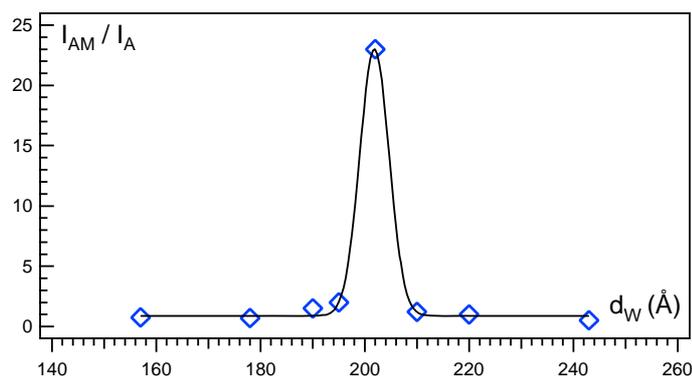


Figure V.10: Poids relatif des intensités correspondants à la protéine MexA liée notée I_{AM} et libre I_A . Cette distribution en fonction des séparations entre bicouches est très piquée autour de la position $d_W=202$ Å. Cette courbe n'est pas symétrique car pour des tailles plus petites, le pourcentage d'éléments liés est plus importants que pour des tailles plus grandes. Dans un cas, la protéine a la possibilité de s'adapter à la séparation entre les membranes dans l'autre cas, elle ne peut pas. Un ajustement gaussien donne une taille $d_W=201$ Å et une largeur de 5 Å.

Importance de l'ancrage membranaire

Les mêmes mesures sont réalisées avec la protéine MexA_{signal} à laquelle manque la partie hydrophobe en C16. La protéine est introduite dans une phase éponge contenant des protéines OprM non fluorescentes en large excès. L'accrochage à la protéine OprM est détecté. Il est lent. On mesure un signal correspondant à la diffusion de OprM c'est-à-dire avec un coefficient de diffusion de $1.4 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, pour des temps d'attente supérieurs à trois heures. Nous étudierons la dynamique de ce lien à la section VI.2. Pour des protéines MexA et OprM sous leur forme native membranaire, le régime permanent d'accrochage est atteint en un temps inférieur à celui de préparation d'un échantillon soit 120 secondes environ. La configuration relative des protéines est donc essentielle pour déceler une interaction. En effet, lorsque les protéines MexA et OprM diffusent en surface avec une distance d'approche qui est la distance d'interaction, le temps d'accrochage va dépendre uniquement des valeurs des coefficients de diffusion de ces deux protéines. Si elles se

retrouvent face à face, elles vont interagir. En revanche, si l'une ou l'autre des protéines est confinée dans le volume, l'accrochage va dépendre du coefficient de diffusion translationnel mais aussi rotationnel ainsi que de l'orientation relative des deux objets. Le phénomène de rencontre efficace sera donc plus lent. Nous reparlerons de cette dynamique au chapitre VI.

V.4 Interactions mettant en jeu MexB

Pour l'étude des interactions mettant en jeu la protéine de la membrane interne MexB, nous avons utilisé une phase L₃ comportant du C12E5 et un mélange β -OG/DDM comme cotensioactif (section III.7).

Caractérisation de MexB

Tout d'abord, une calibration de la phase est nécessaire. On introduit dans celle-ci des objets dont le comportement est connu : un tensioactif marqué, la protéine MexA, la protéine OprM. Les coefficients de diffusion de ces objets sont mesurés. Les résultats présentent les mêmes variations que celles obtenues en l'absence de DDM mais les valeurs de coefficients de diffusion sont plus élevées (table V.2). Si on compare les coefficients de

Objet	C16-FITC	MexA	OprM	MexB
Rayon (Å)	4	4	17	40
D ($\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	10 ± 1	10 ± 0.8	3.5 ± 0.5	1.8 ± 0.4

Tableau V.2: Mesure des coefficients de diffusion de protéines dans une phase contenant du DDM. Les rayons obtenus par cristallographie pour MexA [37], OprM [34] sont notés. Pour la protéine MexB, on a supposé un rayon identique à celui de AcrB.

diffusion de OprM et MexB, on a $\frac{D_{OprM}}{D_{MexB}} = 1.9 \pm 0.5$. D'après la loi V.1, le rayon de MexB est alors de 32 ± 8 Å ce qui est en assez bon accord avec le rayon obtenu à partir des données cristallographiques de AcrB (40 Å) qui est la protéine homologue de MexB chez *Escherichia coli*.

Interactions entre MexA et MexB

La gamme de fraction volumique de membrane utilisée correspond dans le cas de la phase C12E5/ β -OG/solution S2 à des séparations entre bicouches de 120 à 350 Å. En l'absence de résultats de cryofracture et de SAXS pour la phase L₃ avec du DDM, nous considérerons que ces données ne sont pas modifiées par l'addition de DDM dans notre phase. Cette section est donc en attente de confirmation de la structure de la phase.

La protéine MexA est la protéine marquée et on détecte les modifications de son coefficient de diffusion provoquées par l'addition de MexB. Les variations sont reportées sur la figure V.11. On note une diminution du coefficient de diffusion de MexA d'un facteur cinq : il passe de $10 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ à $2.2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Cette dernière valeur est égale à D_{MexB}

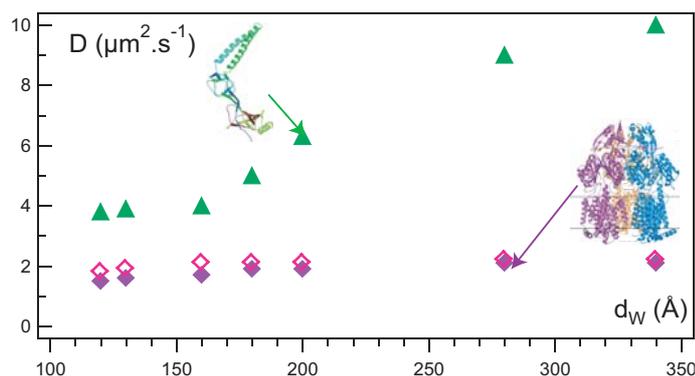


Figure V.11: Variation du coefficient de diffusion de la protéine MexA (\blacktriangle), MexB (\blacklozenge) avec la séparation entre les bicouches. Ces données sont comparées à la mobilité de MexA insérée dans une phase éponge en présence de la protéine MexB (\blacklozenge).

mesuré quand MexB diffuse seule dans la phase. Cette diminution est constante sur toute la gamme de séparations entre bicouches. Ceci indique que les protéines MexA et MexB interagissent latéralement en accord avec les résultats obtenus *in vitro* par des techniques de cross-linking [24].

Interactions entre MexB et OprM

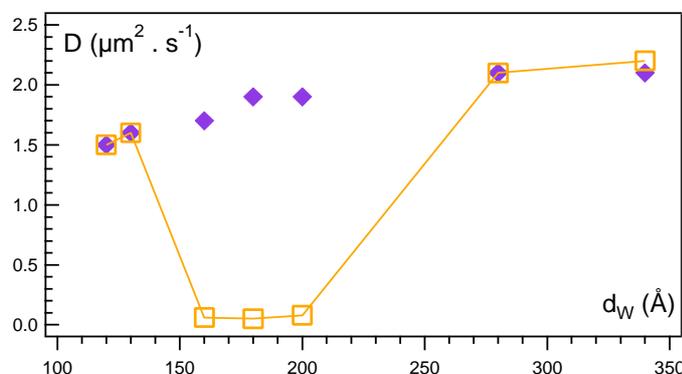


Figure V.12: Variations avec d_W du coefficient de diffusion de la protéine MexB seule (\blacklozenge) ou en présence de OprM (\square).

Les interactions entre ces deux protéines sont étudiées en suivant les variations du coefficient de diffusion de MexB dans une phase contenant OprM non fluorescent en excès (figure V.12). La première conclusion est qu'un accrochage frontal est détecté pour des distances supposées entre bicouches comprises entre 160 et 200 Å. Le coefficient de diffusion de MexB chute de $1.9 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ à $0.05 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. La valeur du coefficient de diffusion du complexe OprM-MexB ($0.05 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) est du même ordre que celle mesurée pour la streptavidine liée à deux peptides appartenant à des bicouches opposées. La formation du complexe est lente. Pour une concentration en OprM identique à celle

de MexB, la courbe de recouvrement devient une exponentielle simple (correspondant à la diffusion du complexe) au bout d'un temps supérieur à 4000 s. Nous étudierons plus amplement cette dynamique au chapitre suivant.

Au terme de cette section, nous avons mis en évidence les interactions qui existent entre les différents constituants de notre pompe à efflux. MexA interagit avec OprM et avec MexB. L'accrochage avec OprM est frontal, celui avec MexB est latéral. Ces deux types d'accrochage sont très rapides. En outre, les protéines MexB et OprM interagissent frontalement mais ce processus est plus lent. Nous étudierons au chapitre suivant l'influence de MexA sur cette cinétique.

V.5 Détermination de la stœchiométrie d'une interaction

Un des enjeux majeurs de la détection d'interaction est la détermination de la stœchiométrie des complexes. Cette donnée est essentielle pour espérer cristalliser le complexe. Cependant les méthodes connues sont applicables plus facilement pour les protéines solubles car le détergent des protéines membranaires est difficile à prendre en compte. La seule technique qui étudie le complexe dans une membrane est la méthode de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) qui déduit une stœchiométrie du complexe de la comparaison des intensités des signaux du receveur et de l'accepteur.

L'originalité de notre travail réside dans le fait que la stœchiométrie est étudiée pour des complexes formés dans une phase L_3 .

V.5.1 Principe

Pour doser les sites de complexation d'un élément, on ajoute à une solution de concentration connue de récepteurs, un ligand par fractions successives. On mesure ensuite en solution les concentrations de ligands libres et liés. Le rapport de ces deux concentrations augmente à mesure que le ligand est ajouté (figure V.13). En effet, le ligand a tendance au départ à se lier au récepteur, la constante de dissociation K_D dicte cet équilibre. Puis, à mesure que les sites de liaison sont occupés, le nombre de ligands libres augmente. Cette augmentation est très importante à l'équivalence. La courbe du rapport des concentrations en fonction du nombre de ligands introduits présente un point d'inflexion à l'équivalence (figure V.13). Loin de l'équivalence, la quantité de ligands ajoutée va contribuer à l'augmentation de la fraction libre en solution.

Nous avons appliqué ce principe de titration dans nos phases. L'élément qui permet le dosage est une protéine marquée avec de la FITC. Elle réagit avec un objet non fluorescent. Cette protéine se partage en deux populations : la protéine liée et la protéine libre. Le signal de recouvrement de fluorescence est donc ajusté par une double exponentielle. Si on prend garde à conserver les mêmes intensités incidentes et le même gain de collection du signal, le rapport des intensités correspondants à chacune des espèces est proportionnel au rapport des concentrations de ces deux différentes espèces (section IV.2.4).

Comment peut-on déduire les concentrations à partir des intensités ? Il faut distinguer

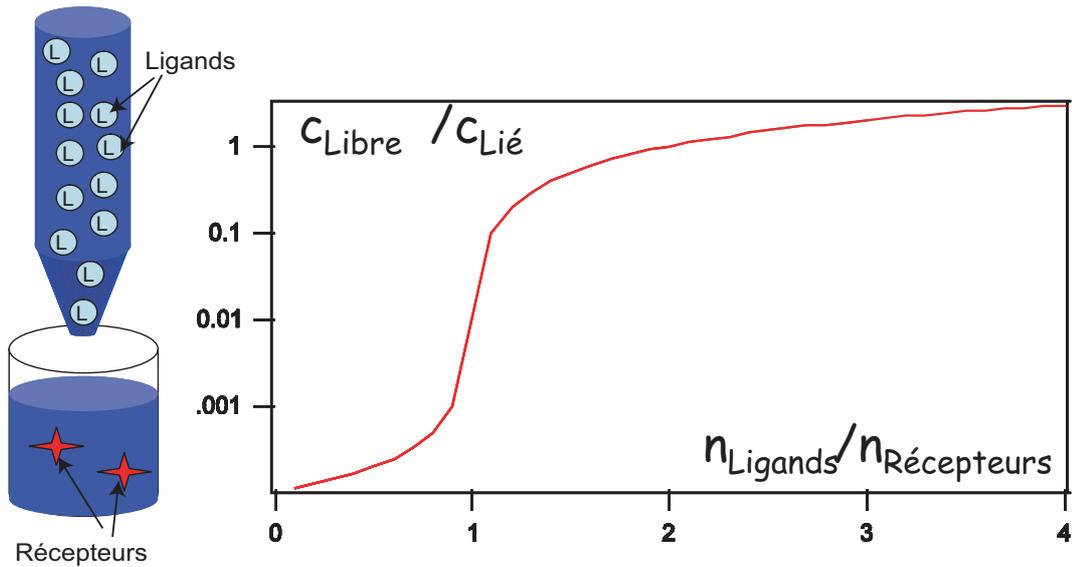


Figure V.13: Principe de l'expérience de dosage chimique d'un récepteur par un ligand à gauche. A droite, la courbe donnant le rapport entre les concentrations de ligands libres et liés en fonction de la quantité de ligands introduits est tracée en supposant une constante de dissociation K_D de $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$.

les différents types d'objets étudiés. En effet, nous utilisons des molécules qui diffusent entre les bicouches ou sur les bicouches. Examinons tout d'abord le cas de protéines membranaires.

Si les protéines sont ancrées à la membrane, la concentration à prendre en compte est la concentration surfacique c_{Surf} exprimée en mol.dm^{-2} . Si on considère que dans le volume V éclairé par le laser, la surface de bicouche est égale à A , alors I est proportionnelle à $A c_{\text{Surf}}$. Le facteur de proportionnalité dépend du degré de marquage de la protéine, de la position des fluorophores sur cette dernière mais aussi de la concentration locale en fluorophores. En effet, si deux fluorophores sont trop proches, on assiste à un déplacement de la raie d'émission du fluorophores qui va diminuer l'intensité de fluorescence : c'est le quenching. Ce phénomène intervient pour des concentrations importantes de marqueurs. Il peut apparaître lorsque des protéines marquées sont proches et forment un complexe. Pour des protéines solubles, la concentration c_V s'exprime en mol.L^{-1} ou mol.dm^{-3} . Cette concentration volumique est obtenue en connaissant le nombre de protéines introduites et le volume de la phase aqueuse de l'échantillon. Les protéines qui sont confinées entre les bicouches ont un volume de diffusion \mathcal{V} qui est différent du volume aqueux V_{aqueux} . En effet, si on note l la dimension de la protéine, celle-ci ne peut pas s'approcher à une distance inférieure à $l/2$ de la bicouche (figure V.14). Le volume corrigé \mathcal{V} accessible à la protéine est donc :

$$\mathcal{V} = (d_W - l)A \quad (\text{V.3})$$

La concentration qui compte est la concentration des centres de protéines. L'intensité de fluorescence pour une protéine soluble est proportionnelle à $c_V \mathcal{V}$. Le facteur de proportionnalité dépend là aussi du degré de marquage et de phénomènes éventuels de quenching

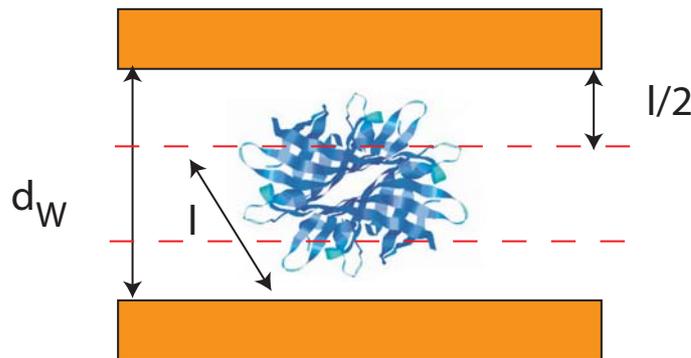


Figure V.14: Protéine diffusant en volume dans une phase éponge. Le volume disponible pour sa diffusion est inférieur au volume de solution aqueuse car la protéine ne peut pas être à une distance inférieure à la moitié de sa taille de la membrane.

due à une interaction qui augmente la concentration locale en fluorophores. Dans ces études de dosage, la protéine marquée est la même pour les deux espèces. Le degré de marquage est identique pour les deux espèces. Seul le déplacement de spectre d'émission peut être responsable d'une modification du coefficient de proportionnalité γ entre intensité et nombre d'émetteurs.

En conclusion, on a donc :

- pour les protéines diffusant entre les bicouches, l'intensité est donnée par $I = \gamma_V c_V \mathcal{V}$
- pour les protéines diffusant sur la bicouche $I = \gamma_S c_{Surf} A$

La mesure du rapport des intensités relatives de ces deux fractions libre et liée autorise la détermination du point d'équivalence.

V.5.2 Dénombrement des sites d'interaction de la streptavidine avec la biotine

Comme précédemment, nous avons testé ces remarques sur une liaison streptavidine-biotine. Nous nous plaçons dans la situation où la taille de la streptavidine ne lui permet pas de ponter deux lamelles : la séparation entre les bicouches d_W est égale à 120 Å. Pour cette distance, nous avons déjà constaté que, selon la quantité de biotine ajoutée à nos échantillons pour une quantité de streptavidine constante, les figures de recouvrement de fluorescence sont des triples exponentielles (figure V.4). Nous avons donc ajusté ces courbes par des triples exponentielles correspondant à des coefficients de diffusion $D_{0S} = 50 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, $D_{1S} = 3.2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et $D_{2S} = 1.5 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Nous obtenons alors trois intensités relatives I_{0S} , I_{1S} et I_{2S} . I_{0S} est l'amplitude du signal provenant de la streptavidine libre. I_{1S} correspond à la streptavidine liée soit à un peptide biotiné soit à la membrane (section V.2). Enfin I_{2S} est l'amplitude du signal correspondant à la streptavidine liée à deux peptides biotins appartenant à la même bicouche.

Le dosage que nous faisons ici est un dosage du nombre de sites d'interactions présents sur une face de la streptavidine. Pour cela, on introduit dans chacun des échantillons

de phase éponge une concentration en streptavidine de $9.7 \cdot 10^{-7}$ M soit un nombre de streptavidines égal à $n_{S_i} = 9.7 \cdot 10^{-13}$ mol pour $10 \mu\text{L}$ de solution aqueuse. Chacun de ces échantillons contient une quantité différente de peptides biotinis notée $n_{B_i} = r n_{S_i}$ avec r variant entre 0.1 et 1.9.

Vérification de la conservation des quantités de matière

Tout d'abord, il nous faut vérifier que l'intensité est bien proportionnelle au nombre de molécules même quand le signal est composé de plusieurs exponentielles. Pour cela, la conservation des différentes quantités de matières en streptavidine et en peptide est à vérifier.

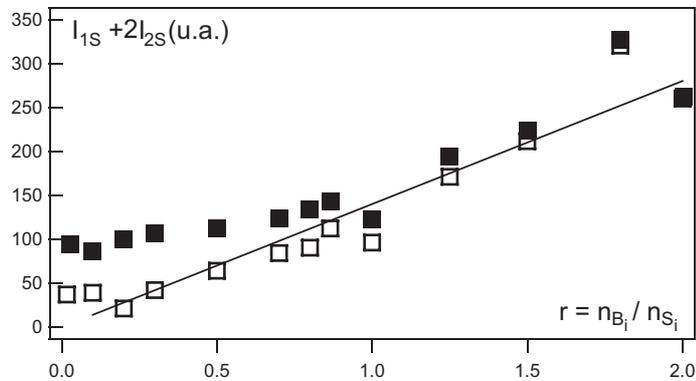


Figure V.15: Variation de la somme $I_{1S} + 2I_{2S}$ (■) en fonction de r , le rapport molaire entre les quantités de streptavidine et de biotine introduites. Or quand la streptavidine est seule, une partie s'accroche à la membrane et son coefficient de diffusion est très proche de celui d'un peptide biotiné. Il faut donc tenir compte de cette contribution dans la détermination de I_S . Une fois la correction effectuée (voir texte), on obtient bien une loi de proportionnalité entre $I_{1S} + 2I_{2S}$ (□) et r ($I_{1S} + 2I_{2S} = (141 \pm 3)r$).

La conservation de la quantité de matière en biotine s'écrit :

$$n_{B_i} = r n_{S_i} = n_{0B} + n_{1S} + 2n_{2S} \quad (\text{V.4})$$

avec n_{B_i} la quantité initiale de peptides introduits dans l'échantillon, n_{0B} la quantité de peptide libre, n_{1S} la quantité de streptavidine liée à un peptide biotiné, n_{2S} la quantité de streptavidine liée à deux peptides. La réaction entre la streptavidine et la biotine est un accrochage fort. La réaction est dite quantitative ce qui signifie qu'elle est totale. On pourra donc considérer que la quantité de biotine libre est nulle si la biotine est introduite en défaut dans le milieu réactionnel. Selon ces hypothèses, la conservation de la quantité de biotine s'écrit :

$$n_{B_i} = \frac{1}{\gamma} (I_{1S} + 2 * I_{2S}) = r n_{S_i}$$

soit

$$(I_{1S} + 2 * I_{2S}) = \gamma r \cdot n_{Si} \tag{V.5}$$

Dans cette expression, nous avons fait l'hypothèse que le coefficient de proportionnalité γ était le même pour la streptavidine liée à un ou à deux peptides. Cette hypothèse est justifiée car l'élément marqué est le même dans les deux cas. Même si on forme des complexes, ceux-ci ne possèdent qu'une seule streptavidine. La concentration locale en éléments marqués n'est donc pas augmentée (le phénomène de quenching est peu probable). La variation de $I_{1S} + 2I_{2S}$ en fonction de r est présentée sur la figure V.15. La courbe obtenue n'est pas linéaire et elle ne passe pas par 0. En effet, même en l'absence de biotine, une partie de la streptavidine diffuse sur la membrane avec un coefficient de diffusion de l'ordre de $2.8 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (section V.2). Cette fraction contribue dès lors à l'intensité I_{1S} mais ne correspond pas à une streptavidine liée à une biotine. Nous avons corrigé l'intensité I_{1S} de cette contribution. En effet, pour une fraction r nulle, une quantité $I_{1S} = I_{1S0}$ non nulle est mesurée. Nous supposons que la quantité de streptavidine accrochée est proportionnelle à la quantité de streptavidine libre donc qu'il existe un facteur de proportionnalité β entre I_{1S0} et I_{0S} . La valeur pour $r=0$ permet de déduire une valeur de $\beta = 3 \pm 0.5$. De cette manière, dans la suite, la valeur de I_{1S} correspondra à la quantité $I_{1S}(\text{mesuré}) - \beta I_{0S}$. Une fois cette correction faite, on vérifie bien que la variation avec r de $(I_{1S} + 2I_{2S})$ est linéaire (figure V.15). En outre, le coefficient de proportionnalité γ permet de déduire à partir de la mesure des intensités, la quantité de peptides mise en jeu puisqu'on connaît la quantité de biotine introduite. La pente obtenue ($\gamma \cdot n_{Si}$) permet de déduire le rapport $\alpha = \gamma \cdot A$ entre l'intensité I_{1S} et la concentration en complexe Streptavidine liée à un peptide que nous noterons $[S-BL_{12}]$ par la suite. On trouve une valeur de $1.2 \cdot 10^{15} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2$ pour α (Pour le calcul de A voir annexe E).

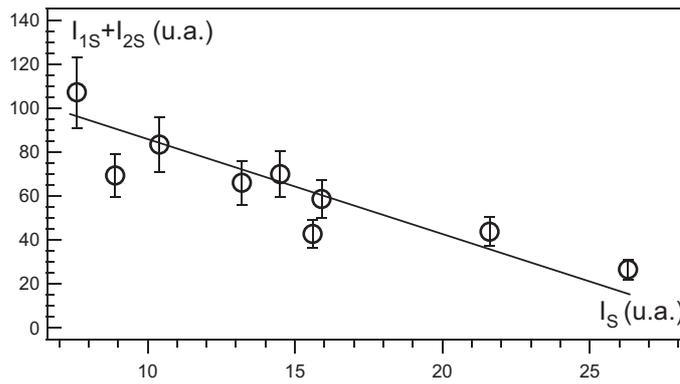


Figure V.16: Variation de la somme $I_{1S} + I_{2S}$ en fonction de I_{0S} . L'ajustement par une droite est acceptable. Cette vérification traduit la conservation de la quantité de streptavidine.

La seconde loi de conservation est celle de la quantité de matière en streptavidine, elle s'écrit :

$$n_{Si} = n_{0S} + n_{1S} + n_{2S} \tag{V.6}$$

avec n_{Si} la quantité initiale de streptavidine introduite dans l'échantillon, n_{0S} la quantité de streptavidine libre. Si on passe aux intensités, comme les fractions indicées 1S et 2S se rapportent à la streptavidine liée à un ou deux peptides qui diffuse en surface et que la fraction indicée 0S correspond à la streptavidine libre qui diffuse en volume, la relation devient :

$$n_{Si} = \frac{1}{\gamma_{S,vol}} I_{0S} + \frac{1}{\gamma} (I_{1S} + I_{2S})$$

Les coefficients $\gamma_{S,vol}$ et γ désignent les constantes de proportionnalité entre concentrations et intensité pour la streptavidine diffusant respectivement entre les lamelles ou sur les bicouches. Ces coefficients de proportionnalité peuvent être différents. Par exemple, un masquage des fluorophores peut intervenir lors de la diffusion en surface qui serait absent lors de la diffusion en volume. Les échantillons sont préparés avec une quantité de streptavidine constante donc il faut vérifier que la somme $I_{1S}+I_{2S}$ est proportionnelle à I_{0S} . L'intensité I_{1S} est corrigée. En revanche, on ne peut pas corriger I_{0S} . Toutefois, on suppose que cette correction sur I_{0S} est négligeable. Les résultats obtenus confirment une loi de proportionnalité (figure V.16).

Nous avons ainsi vérifié que les mesures d'intensité pouvaient renseigner sur les quantités de matière des différentes fractions.

Dosages des sites d'interaction de la streptavidine

A titre d'exemple, nous allons montrer comment doser le nombre de sites d'interactions sur une face de la streptavidine.

Une première méthode pour réaliser ceci est de comparer les intensités relatives à la fraction de streptavidine liée (soit $I_{1S} + I_{2S}$) et à celle libre c'est-à-dire I_{0S} . La figure V.17 donne les résultats obtenus. On observe une augmentation brutale de ce rapport pour $r=2$. Auparavant l'augmentation avec le rapport r est douce. On peut donc conclure de ces variations que l'équivalence intervient quand on ajoute en solution deux fois plus de biotine que de streptavidine. Ceci signifie que la streptavidine possède sur une face deux sites d'interaction avec la biotine, ce qui est en bon accord avec la structure de cette protéine. Cependant on n'observe pas de première augmentation pour $r=1$ qui correspondrait au remplissage de la première poche d'interaction de la streptavidine. Ceci signifie que les réactions entre la streptavidine libre et le peptide biotiné d'une part et la streptavidine liée à un peptide avec un deuxième peptide d'autre part, sont simultanées. Le remplissage des deux sites d'interactions ne se fait pas de manière successive mais en même temps. La seconde réaction a donc un taux de formation supérieur ou égal à la première.

Une seconde représentation possible de cette équivalence est de suivre les variations du rapport $\frac{I_{2S}}{I_{1S}}$ en fonction de la quantité de biotine ajoutée par rapport à la streptavidine (c'est-à-dire le rapport r). En effet, comme la constante d'affinité de cette liaison est très importante, les réactions d'accrochage de la streptavidine avec 1 ou 2 biotines vont être simultanées. Le nombre de streptavidines doublement liées va donc fortement augmenter au moment de l'équivalence qui se situe à $r=2$ selon la figure V.18. Ce rapport peut être quantitativement étudié comme nous le verrons au chapitre suivant car il met en jeu des

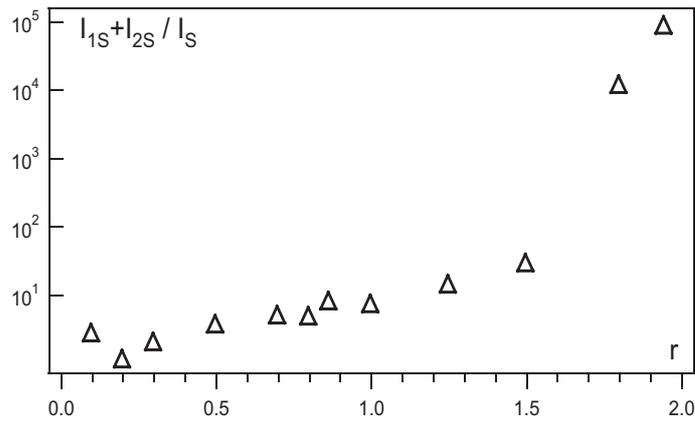


Figure V.17: Variation du rapport $\frac{I_{1S} + I_{2S}}{I_S}$ en fonction de la quantité de biotine introduite. Ce rapport est proportionnel à la fraction lié/libre pour la streptavidine. Une échelle logarithmique est choisie de manière à mettre en évidence les variations. Une échelle linéaire ne laissant apercevoir qu'une montée brutale pour $r=2$.

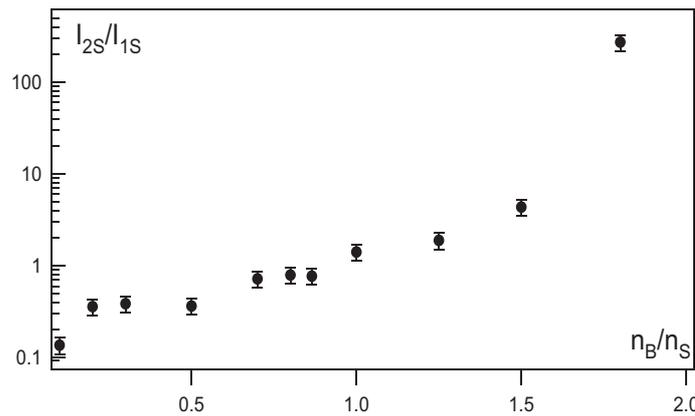


Figure V.18: Variation du rapport $\frac{I_{2S}}{I_{1S}}$ en fonction de la quantité de biotine introduite. Ce rapport est proportionnel aux fractions lié à 1 peptide/lié à 2 peptides pour la streptavidine. On observe une variation très importante pour $r=2$.

espèces liées et diffusant en surface. Il est donc égal aux concentrations. En outre, on remarque là aussi une forte augmentation quand le nombre de biotines dans le milieu est égal au double de celui en streptavidine. Ces deux méthodes de relevé conduisent bien au même point d'équivalence et donc à la même stœchiométrie de la liaison biotine-streptavidine sur une face.

En conclusion, nous sommes parvenus à doser le nombre de sites actifs d'une protéine par une simple méthode de titration appliquée à notre géométrie d'objets. Le test sur des liaisons plus faibles est alors la prochaine étape pour généraliser cette technique.

V.5.3 Stœchiométrie du lien entre MexA et OprM

La question de la stœchiométrie de MexA à l'intérieur de la pompe est controversée. Les hypothèses avancées sont nombreuses et varient entre 3, 6, 7, 9 ou 12 éléments MexA à l'intérieur du complexe qui comporte un trimère de OprM et de MexB (Chapitre I). Nous avons démontré que la protéine MexA interagit avec la protéine OprM. Elle a un rôle dans le recrutement de OprM ou dans l'ouverture de cette porine. Nous avons donc essayé de dénombrer les sites d'interaction d'un trimère de OprM avec la protéine périplasmique MexA.

Conservation de la quantité de MexA

Pour réaliser ce dosage, on prépare des échantillons de phase éponge caractérisés par une distance entre lamelles $d_W = 200 \text{ \AA}$. Le pH de la solution aqueuse est égal à 7.5. Ces échantillons contiennent 8 pmol (soit une concentration surfacique de $2 \cdot 10^{-13} \text{ mol.dm}^2$) de trimères de OprM et des quantités de MexA de 0.25 à 12 fois supérieures. On note r_{AM} le rapport entre ces deux concentrations en protéines $\frac{[MexA]_0}{[OprM]_0}$. La protéine MexA est la protéine fluorescente. Elle est la plus petite donc la plus sensible aux interactions. Pour les fractions étudiées, le signal est une double exponentielle (figure V.19) mettant

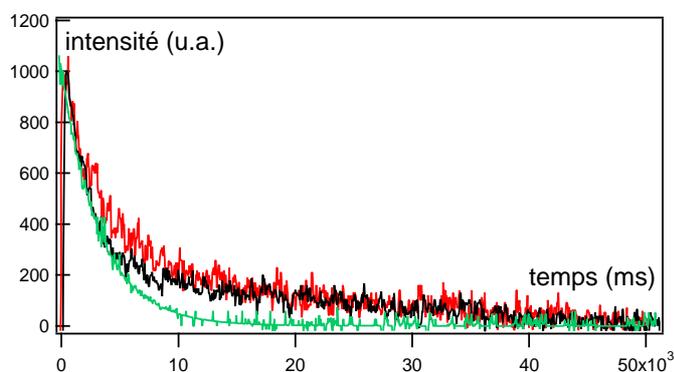


Figure V.19: Figures de recouvrement de fluorescence obtenue pour des rapports molaires r_{AM} différents. La courbe verte est obtenue pour la protéine MexA seule, la courbe noire pour $r=3$ et la courbe rouge pour $r=0.75$.

en évidence deux coefficients de diffusion : $D_A = 4.2 \pm 0.5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour la protéine MexA seule et $D_{AM} = 0.6 \pm 0.1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ pour la protéine MexA liée à une protéine OprM. Les intensités correspondantes I_A et I_{AM} sont relevées pour chaque échantillon.

Les lois de conservation de la quantité de matière fournissent les relations suivantes entre les concentrations surfaciques de la protéine MexA sous ses différentes formes (c'est-à-dire sous sa forme libre MexA et ses formes complexées notées AM) :

$$r_{AM} \cdot [OprM]_0 = [MexA]_0 = c_{MexA} + c_{AM}$$

En terme d'intensité, on doit vérifier la relation suivante :

$$r_{AM}[OprM]_0 = \left(\frac{1}{\gamma_A} I_A + \sum_n \frac{1}{\gamma_{AnM}} I_{AnM} \right) \quad (V.7)$$

Avec γ_A le coefficient de proportionnalité entre l'intensité et la concentration de MexA libre et γ_{AnM} celui entre l'intensité et la concentration en complexe formé OprM-MexA_n. I_{AnM} désigne l'intensité du signal relative à ce complexe. Toutefois, dans notre mesure, nous ne parvenons à identifier qu'une contribution I_{AM} correspondant à la somme de ces populations. Ce coefficient peut varier selon le nombre d'éléments dans le complexe. En effet, si plusieurs protéines MexA sont présentes autour de la protéine OprM, la concentration locale en marqueur est augmentée. Le phénomène de quenching peut apparaître.

On trace la somme des intensités $I_A + I_{AM}$ en fonction du rapport r_{AM} afin de voir si les

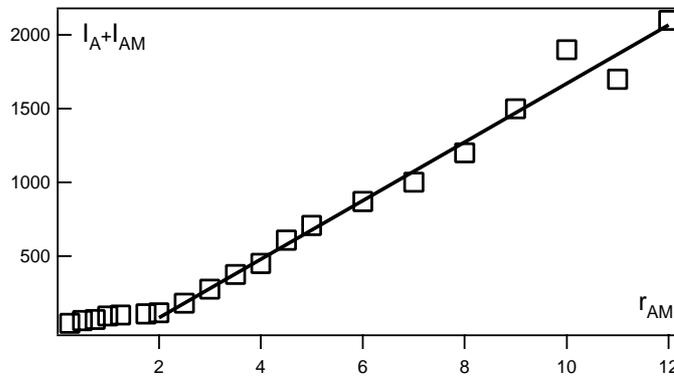


Figure V.20: Variation de la somme des intensités $I_A + I_{AM}$ en fonction du rapport molaire r_{AM} . L'ajustement est réalisé par une droite mais celle-ci n'est pas affine.

coefficients γ_{AnM} sont tous égaux. Les points (figure V.20) ne sont pas alignés suivant une droite. Seules les données pour une valeur de r_{AM} supérieure à 2 peuvent être ajustées par une droite mais cette dernière ne passe pas par 0. Ceci suggère donc que plusieurs protéines MexA sont présentes autour d'un trimère de OprM. Il nous faut étudier la courbe de stœchiométrie pour savoir si des complexes avec plus de deux éléments existent. Nous pourrions ensuite essayer de corriger cet effet.

Détermination du point d'équivalence

Comme dans la section précédente, on étudie le rapport des fractions libres et liées, c'est-à-dire le rapport $\frac{I_A}{I_{AM}}$. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure V.21. Pour des valeurs de r_{AM} faibles, les quantités de protéines liées sont plus importantes que celles de protéines libres. En effet, les sites d'interaction sont nombreux, la protéine MexA est en défaut. On ne note pas de saut pour $r_{AM}=1$. Ceci indique que la réaction d'accrochage d'une protéine est simultanée des autres réactions. Une brusque augmentation de ce rapport intervient quand r_{AM} atteint la valeur de 2 (soit deux protéines MexA introduites par trimère de OprM). Au-delà de cette valeur, l'augmentation du rapport des intensités

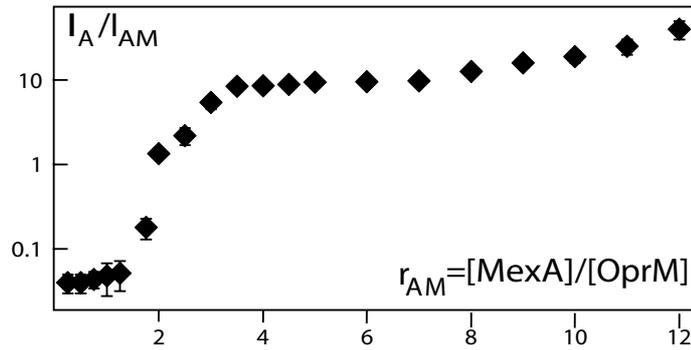


Figure V.21: Variation du rapport $\frac{I_A}{I_{AM}}$ en fonction de la quantité de protéine MexA introduite pour la titration des sites actifs de OprM. Ces expériences sont réalisées à 23°C avec un pH de 7.5. On observe une variation très importante pour $r_{AM}=2$.

est presque linéaire. Cette variation indique que le point d'équivalence correspond à 2 protéines MexA liées à un trimère de OprM.

Correction due au phénomène de déplacement du spectre d'absorption

L'accrochage de MexA avec la protéine OprM met en jeu un complexe à deux éléments MexA pour un trimère de OprM : A_2M . On suppose l'existence d'un élément transitoire entre 1 protéine MexA et 1 trimère de protéine OprM, : A_1M . En effet, MexA diffuse dans la phase sous forme de monomère, on ne peut donc supposer une formation directe de A_2M . L'intensité correspondant au complexe est en fait la somme de deux contributions : celle due à A_1M et celle correspondant à A_2M . Cette dernière contribution possède *a priori* un facteur de proportionnalité entre concentration et intensité plus faible. On a ainsi la relation suivante

$$c_{AM} = c_{A_1M} + 2 * c_{A_2M} = \frac{1}{\gamma_{AM} \cdot A} (I_{A_1M} + 2\eta * I_{A_2M})$$

avec γ_{AM} le rapport de proportionnalité entre quantité de matière et intensité pour des protéines MexA libre ou dans le complexe A_1M et η le facteur correctif induit par le phénomène de déplacement du spectre d'émission. A désigne la surface de membrane. Dans notre mesure, nous ne pouvons pas discriminer les contributions de chacun des complexes. Cependant nous voyons sur la courbe de stœchiométrie que pour des valeurs de r_{AM} très éloignées du point d'équivalence, le rapport des intensités $\frac{I_A}{I_{AM}}$ augmente linéairement. Dans cette situation, tous les sites de OprM sont occupés et les protéines MexA ajoutées restent libres. On peut donc supposer que la concentration en protéines MexA libres est $(r_{AM} - 2)[OprM]_0$ et la concentration en complexe A_2M est $[OprM]_0$, le complexe A_1M ayant une concentration négligeable. Le rapport des concentrations $\frac{c_A}{c_{AM}}$ est donc égal à $\frac{c_A}{2c_{A_2M}}$ c'est-à-dire à $\frac{r_{AM} - 2}{2}$. En ce qui concerne les intensités, on a

ainsi :

$$\frac{I_A}{I_{AM}} = \frac{r_{AM} - 2}{2\eta}$$

L'ajustement de notre courbe par une droite donne un coefficient de proportionnalité η de 0.17 ± 0.02 .

De cette manière, lorsque nous voudrions comparer nos valeurs d'intensité avec des résultats numériques sur les concentrations, il faudra prendre en compte ce facteur correctif.

Notre méthode de titration donne des résultats pour le dosage d'un lien plus faible que celui entre la streptavidine et la biotine. Elle est utilisable pour des protéines membranaires. Elle permet de décrire la stœchiométrie des associations de protéines. Cependant ce résultat ne correspond à aucune des hypothèses formulées lors des études cristallographiques de MexA. De plus cette valeur ne respecte pas une symétrie d'ordre 3 du système qui est attendu puisque la protéine MexA s'organise autour d'un trimère. Toutefois des études faites sur MexA révèlent que son degré d'oligomérisation est sensible au pH, il augmente à pH acide [39]. Notre expérience a lieu à pH 7.5. Nous avons donc modifié cette condition afin d'évaluer l'influence du pH sur les structures obtenues.

V.6 Influence de paramètres tels que le pH sur une interaction

La phase éponge que nous utilisons est constituée de bicouches de tensioactifs non-ioniques. Elle reste stable pour des gammes de pH importantes. Nous avons vérifié que notre phase n'était pas modifiée par l'utilisation d'un tampon phosphate dans les gammes de pH entre 5.5 et 8. Nous n'avons pas testé de pH plus acides car l'efficacité de fluorescence de la FITC est fortement diminuée dans des conditions acides.

Tout d'abord, nous avons vérifié en nous plaçant en fort excès de OprM (1 protéine MexA pour 10 protéines OprM) que l'interaction entre MexA et OprM avait toujours lieu dans la gamme de pH étudiée.

Pour chaque pH choisi, nous avons relevé une courbe de dosage avec le protocole décrit ci-dessus. La position de l'équivalence se déplace à mesure que le pH est diminué comme en témoigne la figure V.22. On atteint ainsi un nombre moyen de protéines liées au trimère de OprM de 3, 4, 5 puis 6. Un plateau à 6 protéines MexA par trimère de OprM est relevé entre les pH de 5.5 et de 6.4.

Ces résultats confirment un nombre d'accrochages moyen qui ne respecte pas la symétrie d'ordre 3 pour des pH supérieurs à 6.5. Afin de vérifier ce résultat inattendu, nous avons utilisé une technique habituelle des laboratoires de Biologie : celle du gel natif ou BN-Page.

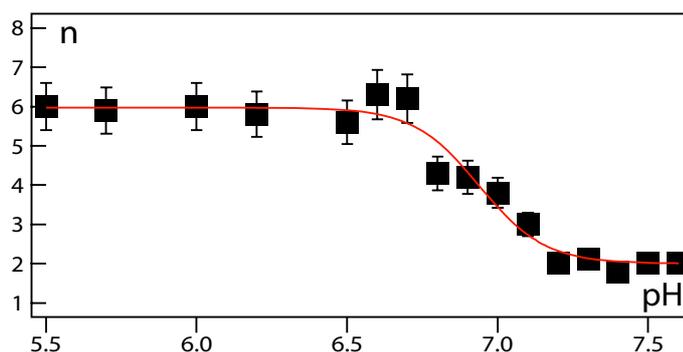


Figure V.22: Grâce aux courbes de titration (figure V.21), on obtient un nombre moyen n de protéines MexA autour d'un trimère de OprM. L'étude de ces courbes de titration en fonction du pH voit la position du point d'équivalence évoluer. Le nombre moyen de protéines MexA dans un complexe dépend du pH. La courbe en traits pleins donne l'ajustement obtenu avec la formule V.8 pour des valeurs de constantes d'acidité de 6.7 et 7.1.

V.7 Le gel natif de protéines

Houssain Benabdelhak (Laboratoire de RMN et Cristallographie Biologiques-Université Paris V) a réalisé avec la collaboration de Pierre Falson (CEA-Département des Sciences du vivant- Gif-sur-Yvette) une étude sur gel des complexes formés entre MexA et OprM.

Les protéines réagissent sur une colonne d'affinité (voir chapitre I). Une première protéine est fixée sur les billes de Nickel puis on introduit la seconde avec un rapport de quantité choisie. Ici les expériences ont été réalisées en faisant réagir 1, 2 ou 3 protéines MexA par OprM. Une fraction de cette protéine ajoutée (ici MexA) va réagir avec les protéines OprM immobilisées. L'imidazole est ajouté ensuite pour éluer chacune des protéines accrochées à la matrice de nickel ainsi que le complexe. Le mélange obtenu est alors mis à migrer sur un gel électrophorétique mais en absence de SDS de manière à ne pas rompre les liaisons existantes, la migration va séparer les protéines par poids moléculaire (figure V.23). Ce gel donne cinq bandes distinctes que l'on compare à celles de protéines connues mises à migrer sur le même gel (les poids moléculaires de ces protéines placées sur la gauche du gel, sont indiquées à côté des bandes qui leur correspondent). Les deux premières bandes correspondent à la migration de chacune des protéines MexA et OprM. Les poids moléculaires associés à ces bandes sont en effet de 118 kDa (dimère ou trimère de MexA) et de 174 kDa or la masse d'un trimère de OprM est de 150 kDa auxquels il faut ajouter la masse du détergent qui entoure la partie hydrophobe et celle du bleu de Comassie : 174 kDa est donc acceptable.

Trois autres bandes apparaissent. Elles correspondent à des masses de 250, 320 et 390 kDa par ordre croissant (figure V.23). L'importance relative de ces bandes est différente selon les quantités relatives de protéines mélangées. Le mélange correspondant à 3 protéines MexA pour un trimère de OprM est celui pour lequel les bandes sont les plus prononcées et où elles sont toutes les trois présentes. Un prélèvement de chacune de ces bandes est

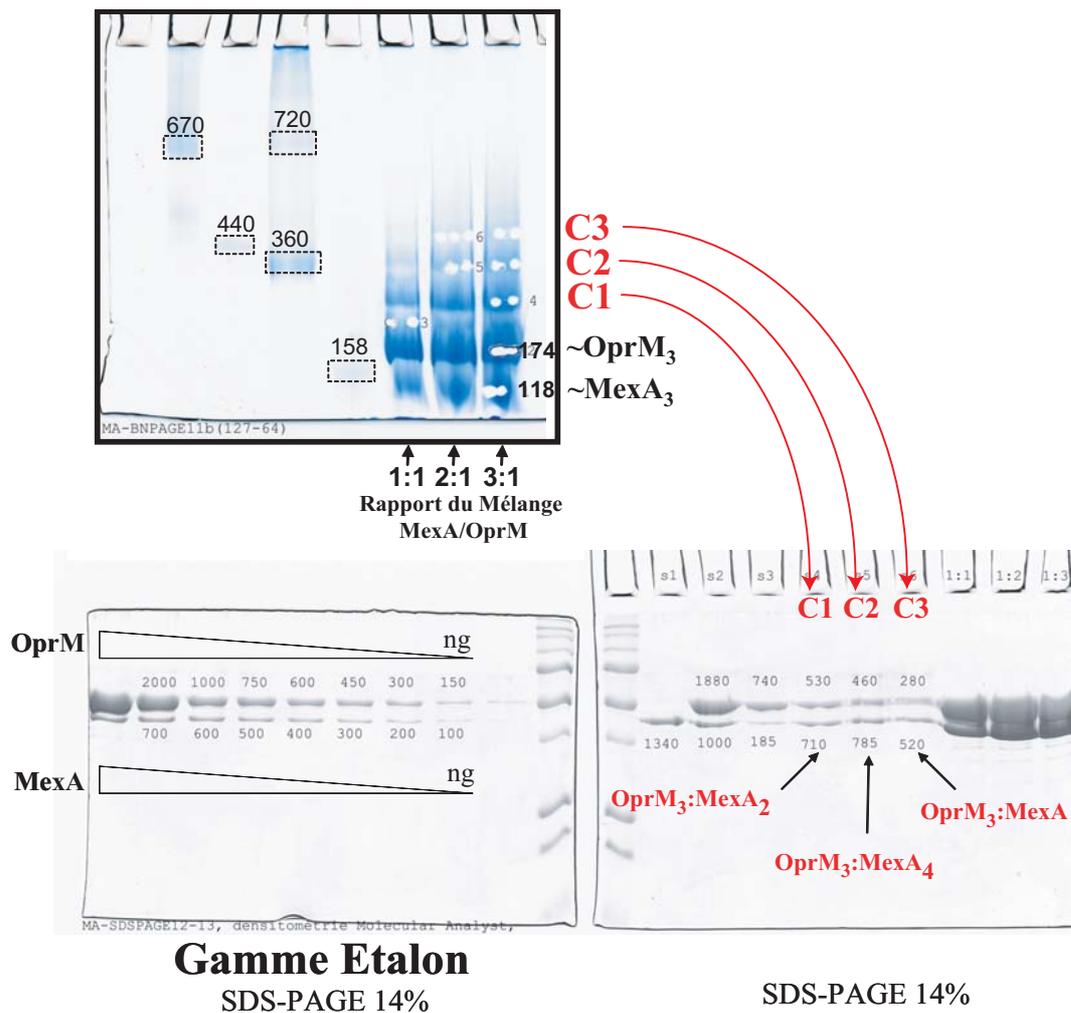


Figure V.23: Résultats obtenus par Houcine Benabdelhak et Pierre Falson sur l'association entre MexA et OprM pour un pH de 7.3. Le complexe formé est mis à migrer sur un gel non dénaturant. Son poids moléculaire est comparé à celui de protéines connues (placées sur la gauche du gel). Les intensités dues à chacune des protéines sont étalonnées en fonction de la concentration en protéines. Les complexes formés précédemment sont rompus par addition de SDS et les intensités des taches correspondant à chacune des protéines sont mesurées. On dose ainsi chaque élément du complexe.

effectué sur le gel afin de pouvoir déterminer la quantité de chaque espèce pour chaque bande.

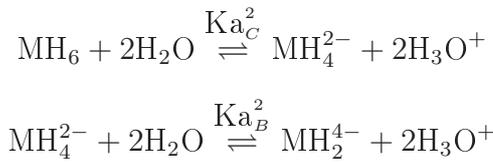
Pour parvenir à cette analyse quantitative, il faut détruire le complexe et mesurer les quantités de chacun des éléments. Ceci est possible sur un gel électrophorétique en présence de SDS. L'intensité de chaque tache est proportionnelle à la concentration en protéines. Un étalonnage est réalisé en déterminant le profil d'intensité donnée par MexA et OprM pour des quantités de matière variable (figure V.23). Chaque complexe migre et les intensités des empreintes relatives à MexA et à OprM sont relevées. On obtient alors les

stœchiométries suivantes : 2, 4 et 6 MexA par trimère de OprM.

Ces données confirment tout d'abord la présence de complexes stables pour lesquels la symétrie d'ordre 3 n'est pas respectée. En outre, elles définissent clairement les différents complexes existants ce qui autorise une analyse plus complète de nos résultats sur la variation du nombre de sites d'accrochage avec le pH.

V.8 Constante d'acidité des sites d'interaction

Les résultats de gel natif concluent à l'existence de trois complexes stables avec une organisation à 2, 4 ou 6 protéines MexA par trimère d'OprM. Nos résultats montrent que ces sites sont actifs en fonction du pH. La construction du trimère de OprM peut être modélisée comme suit. Deux sites d'interaction (dits sites A) sont actifs à pH 7.5, puis, quand on diminue le pH deux nouveaux sites notés sites B se libèrent et deviennent actifs vis-à-vis de l'accrochage de MexA. Si on continue à diminuer le pH, deux nouveaux sites d'interaction avec MexA apparaissent. On les nommera sites C. Chacun de ces sites est alors considéré comme une molécule ayant des propriétés acido-basiques et dont la forme acide interagit avec la protéine MexA. Dans la gamme de variation de pH utilisé, nous avons dosé l'acidité des sites B et C seulement. Leur constantes d'acidité sont notées Ka_B et Ka_C . Les équilibres acido-basiques correspondants sont :



avec MH_6 la désignation de la forme d'OprM possédant six sites d'interactions avec MexA, A, B et C, MH_4^{2-} celle en possédant quatre (les sites notés A et B) et MH_2^{4-} celle en ayant deux. La définition de la constante d'acidité en fonction des différentes formes de OprM s'écrit :

$$\begin{aligned} Ka_C^2 &= \frac{[\text{MH}_4^{2-}][\text{H}_3\text{O}^+]^2}{[\text{MH}_6]} \\ Ka_B^2 &= \frac{[\text{MH}_2^{4-}][\text{H}_3\text{O}^+]^2}{[\text{MH}_4^{2-}]} \end{aligned}$$

La conservation de la quantité de matière pour les trimères de OprM s'écrit :

$$[\text{OprM}]_0 = [\text{MH}_2^{4-}] + [\text{MH}_4^{2-}] + [\text{MH}_6]$$

avec $[\text{OprM}]_0$ la concentration initiale de trimères de OprM. La résolution de ce système d'équations conduit aux solutions suivantes pour la concentration des différentes formes de OprM :

$$\begin{aligned} [\text{MH}_6] &= \frac{[\text{OprM}]_0}{1 + Ka_C^2 \cdot 10^{2pH} + Ka_C^2 Ka_B^2 \cdot 10^{4pH}} \\ [\text{MH}_4^{2-}] &= \frac{[\text{OprM}]_0}{Ka_C^{-2} \cdot 10^{-2pH} + 1 + Ka_B^2 \cdot 10^{2pH}} \end{aligned}$$

$$[\text{MH}_2^{4-}] = \frac{[\text{OprM}]_0}{\text{Ka}_C^{-2}\text{Ka}_B^{-2} \cdot 10^{-4\text{pH}} + \text{Ka}_B^{-2} \cdot 10^{-2\text{pH}} + 1}$$

Le nombre moyen de sites d'accrochage par trimère de cette porine est donné par

$$n = \frac{6[\text{MH}_6] + 4[\text{MH}_4^{2-}] + 2[\text{MH}_2^{4-}]}{[\text{OprM}]_0}$$

Les variations en fonction du pH du nombre n de sites d'accrochage s'en déduisent :

$$n = \frac{2 \cdot (1 + 2 \cdot 10^{-2\text{pH}}\text{Ka}_B^{-2} + 3 \cdot 10^{-4\text{pH}}\text{Ka}_C^{-2}\text{Ka}_B^{-2})}{1 + 10^{-2\text{pH}}\text{Ka}_B^{-2} + 10^{-4\text{pH}}\text{Ka}_C^{-2}\text{Ka}_B^{-2}} \quad (\text{V.8})$$

Cette variation est utilisée afin d'ajuster les résultats obtenus (figure V.22). Les ajustements s'accordent aux résultats. Ils donnent les valeurs suivantes pour les constantes d'acidité des sites B et C : $\text{pKa}_B = 7.1$ et $\text{pKa}_C = 6.7$.

Remarquons pour finir que le laboratoire de R.M.N. et Cristallographie Biologiques a obtenu des résultats cristallographiques intéressants sur OprM. Ils ont montré que le trimère n'était pas purement symétrique. Des différences existent au niveau des extrémités périplasmiques des segments hydrophiles pour chacun des éléments du trimère. Le fait de trouver des associations avec 2 ou 4 éléments qui ne vérifient pas la symétrie d'ordre 3 n'est donc pas aberrant. Ces différences permettent peut-être un accrochage transitoire de certaines espèces en fonction du temps et du pH donc du passage de protons.

V.9 Conclusion

En conclusion, nous avons développé un système adapté aux protéines membranaires. Ces dernières sont insérées dans une phase fluide de bicouches modulables. Dans cet environnement leur distance d'approche est contrôlée. Les éventuels accrochages sont facilement détectables, la sensibilité est plus importante que lorsqu'on mélange les protéines en solution. A l'intérieur de ce système, on peut parvenir à doser le nombre relatif d'éléments. La stœchiométrie de ces ensembles est résolue avec une variabilité possible sur le pH ou les conditions ioniques. Ce dispositif permet d'étudier les protéines membranaires dans un milieu proche de la situation *in vivo*. On a accès à des informations sur le lien à l'intérieur d'une membrane. Ce résultat n'est atteint que par le FRET sur cellule.

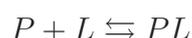
Nous avons déjà noté les interactions entre les différents constituants de la pompe. Une caractérisation de la stœchiométrie au sein de chaque couple d'assemblage serait intéressante de manière à élucider la stœchiométrie de MexA autour d'un complexe MexB-OprM. Une étude complémentaire de cette méthode de détection pour des interactions faibles entre objets serait intéressante. On pourrait ainsi considérer le lien réversible qu'il existe entre les bases A et T de l'ADN.

Chapitre VI

Dynamique du lien entre protéines

Lors des chapitres précédents, nous avons établi que les mesures de coefficients de diffusion renseignent sur l'état d'association d'une protéine. Nous avons aussi démontré que l'évolution des fractions de protéines liées et libres sont mesurables grâce aux intensités correspondant à chaque espèce. Le but de l'étude des interactions entre protéines est de comprendre les conséquences de ces interactions sur le fonctionnement de la cellule. La détection des accrochages est donc le premier pas vers cette compréhension mais la dynamique du lien est essentielle. Pour cela il faut accéder aux taux d'association et de dissociation ainsi qu'à la constante d'équilibre du système.

Une liaison entre une protéine P et son ligand L est décrite par l'équation de réaction :



L'interaction protéine-ligand peut être décrite d'un point de vue cinétique comme la compétition entre deux vitesses :

- la vitesse de formation du complexe PL : $k_a[P][L]$ où k_a désigne le taux d'association.
- la vitesse de rupture : $k_d[PL]$ avec k_d le taux de dissociation.

A l'équilibre, ces deux vitesses sont égales (il y a autant de complexes formés que rompus). L'interaction est gouvernée par une constante de dissociation K_D :

$$K_D = \frac{[P]_{eq}[L]_{eq}}{[PL]_{eq}} = \frac{k_d}{k_a}$$

Dans cette équation les quantités $[P]_{eq}$ et $[L]_{eq}$ se réfèrent aux concentrations en protéine et en ligand libres. Cette constante est une donnée thermodynamique du système qui n'a un sens qu'à l'équilibre. Plus K_D a une valeur faible, plus le lien est fort.

Dans ce chapitre, nous allons présenter une méthode originale pour déterminer des taux d'association et de dissociation entre des objets ainsi que leur constante d'équilibre. Comme dans le chapitre précédent, nous évoquerons deux types d'interaction : la première met en jeu le couple streptavidine-biotine, la seconde des protéines de la pompe à efflux MexA-B/OprM.

VI.1 Taux d'association à deux et à trois dimensions

Les taux d'association entre un récepteur et un ligand sont généralement obtenus pour des objets en solution. Les principales méthodes utilisées sont la résonance plasmonique de surface (SPR) [144] [145] et la micro-balance de quartz à mesure de dissipation (QCM-D). Ces deux techniques utilisent la géométrie suivante : une protéine est greffée sur une

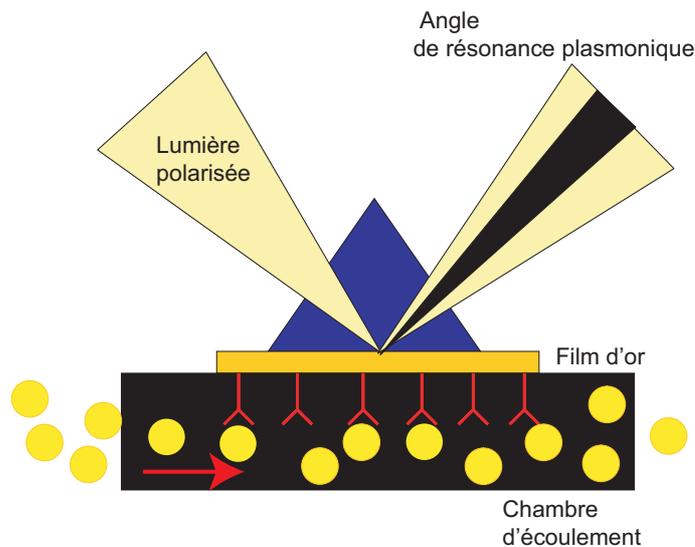


Figure VI.1: Schéma de principe de l'expérience de résonance plasmonique. Un film d'or fonctionnalisé par des protéines (\times) est éclairé sous incidence plasmonique. L'adsorption de ligand (\bullet) va modifier l'angle de résonance plasmonique. La détection du signal de résonance renseigne sur la dynamique d'association.

monocouche supportée placée sur une surface métallique pour la SPR (figure VI.1) ou sur un quartz recouvert d'or pour la QCM-D. Les ligands sont ajoutés en solution sous un flux constant. Les ligands qui interagissent avec le récepteur sont immobilisés sur la surface. L'adsorption de ces ligands va induire des changements de propriété de la surface qui vont être mesurés. Pour la SPR, l'indice va être modifié. L'angle de résonance plasmonique (correspondant à une excitation de plasmon sur la surface métallique) va changer. Pour la QCM-D, c'est la fréquence de résonance du quartz qui va être modifiée par l'adsorption. Comme ces expériences sont résolues en temps, on a accès au taux d'association. Puis en ajoutant un courant sans ligands, on mesure le décrochage de ces derniers. On accède ainsi au taux de dissociation. Les constantes de dissociation se déduisent de ces mesures. Elles sont mesurables pour des valeurs allant du pM au μ M.

Baudry et al. se sont intéressés à l'association d'objets orientés [146] et ont révélé des modifications de la dynamique d'association dues à cette orientation. Dans leur expérience, deux types d'anticorps, A et B, sont greffés sur des billes magnétiques (figure VI.2). On ajoute en solution un antigène ayant cette double reconnaissance, il sera noté Ag. Cet antigène va réagir avec l'un ou l'autre des anticorps. Un champ magnétique est alors appliqué pour orienter préférentiellement les billes les unes par rapport aux autres. Ces billes vont former des lignes. On va ainsi avoir création de ponts entre billes grâce à des liaisons A-Ag-B. Cette deuxième réaction met en jeu une constante d'association $k_a(B)$ qui dépend de l'alignement, donc du champ magnétique. Le nombre de billes liées est évalué par des mesures de turbidité.

L'association en l'absence de champ magnétique a lieu avec un temps caractéristique de 8 heures. L'application d'un champ va réduire ce temps par un facteur 100. Pour des objets en solution, la constante d'association à champ nul $k_a(B = 0)$ dépend du coefficient de

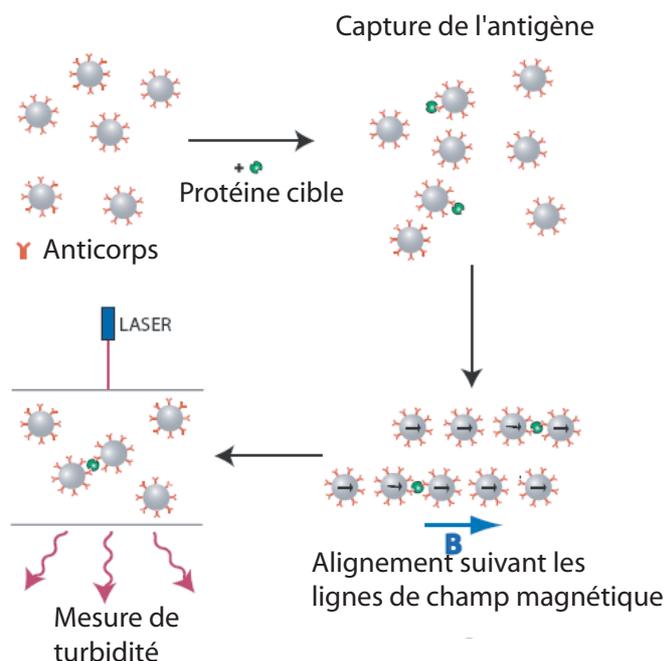


Figure VI.2: Résumé de l'expérience réalisée par Baudry et al sur les cinétiques d'association anticorps-antigènes et leur dépendance en fonction de l'alignement [146]. Les antigènes réagissent avec des anticorps greffés sur des billes. La création de ponts entre billes par une double liaison de l'antigène avec deux anticorps est accélérée par l'application d'un champ magnétique qui aligne les billes.

diffusion de ces objets et de leur rayon selon la théorie de Smoluchowski. Cependant si ces objets présentent une anisotropie, ce qui est le cas s'ils sont orientés, un facteur stérique intervient ce qui conduit à une augmentation de la constante d'association [147]. Ce facteur prend en compte à la fois la géométrie des molécules et leur diffusion rotationnelle. On comprend que, pour des raisons analogues, la dynamique des objets en solution soit différente de celle des objets qui diffusent sur une membrane.

Ces considérations témoignent de l'importance de la réalisation de montages permettant de mesurer des taux d'association entre des protéines membranaires. Or aucune mesure de constante d'association entre protéines membranaires sur une surface n'a été réalisée à notre connaissance.

Nous nous intéressons tout d'abord à la détermination de la constante d'association de la streptavidine liée à la membrane avec la biotine. Après avoir établi quelques relations sur la cinétique de cette réaction, nous pourrions déterminer une constante de réaction en surface. Nous étudierons ensuite des associations entre protéines d'une pompe à efflux. Sur l'exemple de l'interaction entre les protéines MexA et OprM, nous montrerons ensuite comment accéder aux taux de dissociation et aux constantes d'équilibre.

VI.1.1 Quelques considérations cinétiques sur l'accrochage entre streptavidine et biotine

Dans le chapitre V, nous avons mis en évidence deux types d'accrochage entre la streptavidine (notée S dans la suite) et un peptide transmembranaire biotinylé noté BL₁₂ :

- le premier entre la streptavidine et un unique peptide S-BL₁₂
- le second entre la streptavidine et deux peptides appartenant à la même bicouche S-(BL₁₂)₂.

Le passage d'une streptavidine libre à une streptavidine liée à un peptide fait intervenir le taux d'association k_a qui s'exprime en mol⁻¹.L.s⁻¹ ou mol⁻¹.dm³.s⁻¹. Ce taux d'association est déduit du taux de dissociation k_d (qui est l'inverse du temps de vie de liaison égal à 10⁷ s [143]) et de la détermination de la constante de dissociation du système qui varie entre 10⁻¹³ et 10⁻¹⁵ mol.L⁻¹ [135]. Le taux d'association k_a est compris entre 10⁶ et 10⁸ mol⁻¹.dm³.s⁻¹.

En revanche, l'accrochage d'une streptavidine liée à un peptide, à un second peptide (c'est-à-dire le passage de S-BL₁₂ à S-(BL₁₂)₂) fait intervenir une constante d'association k'_a qui s'exprime en mol⁻¹.dm².s⁻¹. Ce taux d'association quantifie un accrochage entre peptides membranaires.

Nous avons récapitulé dans le tableau VI.1 les unités des différentes données que nous

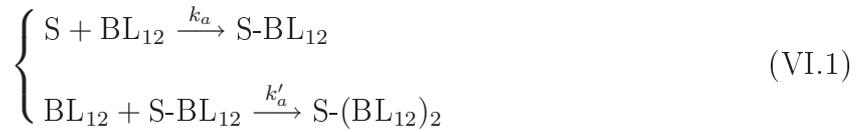
Grandeur	Symbole	Unité
Taux d'association de la réaction S + BL ₁₂ → S-BL ₁₂	k_a	mol ⁻¹ .dm ³ .s ⁻¹
Taux d'association de la réaction S-BL ₁₂ + BL ₁₂ → S-(BL ₁₂) ₂	k'_a	mol ⁻¹ .dm ² .s ⁻¹
Concentration molaire volumique de streptavidine	{S}	mol.dm ⁻³
Concentration molaire surfacique en BL ₁₂	[BL ₁₂]	mol.dm ⁻²
Concentration molaire surfacique en S-BL ₁₂	[S - BL ₁₂]	mol.dm ⁻²
Concentration molaire surfacique en S-(BL ₁₂) ₂	[S - (BL ₁₂) ₂]	mol.dm ⁻²

Tableau VI.1: Tableau-Récapitulatif des symboles utilisés dans cette section et de leurs unités.

utiliserons dans cette partie¹. Les réactions sont examinées sur des échelles de temps de l'ordre de quelques heures. Sur ces échelles, la dissociation du lien n'intervient pas car la durée de vie du lien est de 10⁷ s soit 116 jours.

¹Les concentrations volumiques sont notées entre accolades et les concentrations surfaciques entre crochets

Les réactions qui décrivent ces interactions sont les suivantes :



Dans la section V.5.2 nous avons observé les courbes de stoechiométrie du système. Nous avons constaté qu'aucun saut n'était présent pour un élément biotine ajouté par streptavidine. Ceci signifie que les deux réactions sont simultanées (Equations VI.1). Les équations d'évolution de chacune des espèces s'écrivent alors :

$$\begin{cases} \frac{d[BL_{12}]}{dt} = -k_a[BL_{12}]\{S\} - k'_a[BL_{12}]\{S-BL_{12}\} \\ \frac{d\{S\}}{dt} = -k_a[BL_{12}]\{S\} \frac{A}{V} \\ \frac{d[S-BL_{12}]}{dt} = k_a[BL_{12}]\{S\} - k'_a[BL_{12}]\{S-BL_{12}\} \\ \frac{d[S-(BL_{12})_2]}{dt} = k'_a[BL_{12}]\{S-BL_{12}\} \end{cases} \quad (\text{VI.2})$$

Ces équations d'évolution dérivent toutes de la définition des taux de réaction. Toutefois, pour la seconde équation, on doit introduire un facteur $\frac{A}{V}$ afin de passer d'une concentration surfacique en biotine à une concentration volumique (voir V.5.2). Cependant le volume à prendre en compte doit être le volume accessible à la streptavidine, c'est-à-dire le volume corrigé de diffusion de la streptavidine libre dont l'expression est donnée par l'équation V.3.

On pose

$$r = \frac{n_{B_i}}{n_{S_i}}$$

où n_{B_i} et n_{S_i} désignent respectivement le nombre de moles de biotine et de streptavidine introduit dans l'échantillon. Si on a un large excès de streptavidine par rapport à la biotine ($r \ll 1$), on peut considérer que la quantité de streptavidine est constante, alors :

- la fraction de streptavidine liée à la biotine est très faible donc $\{S\} = \{S_0\}$
- le complexe majoritairement formé est S-BL₁₂ car la probabilité pour une biotine de rencontrer une streptavidine libre est beaucoup plus grande que celle de rencontrer une streptavidine déjà liée.

En première approximation, nous allons négliger la formation du complexe S-(BL₁₂)₂ devant celle de S-BL₁₂. Nous supposons donc $k_a[BL_{12}]\{S\} \gg k'_a[BL_{12}]\{S-BL_{12}\}$. Nous discuterons ces hypothèses par la suite. Les équations du système s'écrivent alors :

$$\begin{cases} \frac{d[BL_{12}]}{dt} = -k_a[BL_{12}]\{S_0\} \\ \frac{d[S-BL_{12}]}{dt} = k_a[BL_{12}]\{S_0\} \\ \frac{d[S-(BL_{12})_2]}{dt} = k'_a[BL_{12}]\{S-BL_{12}\} \end{cases} \quad (\text{VI.3})$$

Ce système se résout (voir le détail des calculs en annexe D) pour donner les lois d'évolution suivantes :

$$\begin{cases} [BL_{12}] = [B_0] \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \\ [S-BL_{12}] = [B_0] \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right\} \\ [S-(BL_{12})_2] = k'_a [B_0]^2 \tau \left\{ \frac{1}{2} - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + \frac{1}{2} \exp\left(-\frac{2t}{\tau}\right) \right\} \end{cases} \quad (\text{VI.4})$$

où $\tau = \frac{1}{k_a \{S_0\}}$ est le temps caractéristique d'évolution et $[B_0]$ désigne la concentration surfacique initiale en biotine.

k_a est connue, sa valeur est comprise entre 10^6 et $10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$. $\{S_0\}$ est de l'ordre de $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. On peut ainsi estimer τ entre 10^{-2} et 1 seconde. Or nous nous intéressons à des échantillons sur l'échelle de l'heure ou de la journée donc pour des temps très supérieurs à τ . Les valeurs de concentrations auxquelles nous allons pouvoir avoir accès sont donc des valeurs en régime permanent. Les concentrations obtenues sont :

$$\begin{cases} [BL_{12}]_{t \gg \tau} = 0 \\ [S-BL_{12}]_{t \gg \tau} = [B_0] \\ [S-(BL_{12})_2]_{t \gg \tau} = \frac{k'_a [B_0]^2 \tau}{2} = \frac{k'_a [B_0]^2}{2k_a \{S_0\}} \end{cases} \quad (\text{VI.5})$$

Nous allons montrer que notre système suit bien ces conclusions pour des valeurs de r faibles. Pour cela, nous allons vérifier que :

P1. L'intensité du signal de recouvrement relative au complexe S-BL₁₂ notée I_{1S} est proportionnelle à $[B_0]$ selon l'équation VI.5

P2. L'intensité du signal de recouvrement correspondant à la diffusion de la streptavidine liée à deux peptides I_{2S} est proportionnelle au rapport $\frac{[B_0]^2}{\{S_0\}}$ d'après l'expression VI.5 trouvée pour la valeur de la concentration en S-(BL₁₂)₂.

Puis nous étudierons le rapport I_{2S}/I_{1S} . En effet, nous avons montré à la section V.5.2 que :

$$\begin{cases} I_{1S} = \alpha [S-BL_{12}] \\ I_{2S} = \alpha [S-(BL_{12})_2] \end{cases} \quad (\text{VI.6})$$

où α est égal à $1.2 \cdot 10^{15} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2$. Ainsi selon les relations VI.5 :

$$\frac{I_{2S}}{I_{1S}} = \frac{[S-(BL_{12})_2]_{t \gg \tau}}{[S-BL_{12}]_{t \gg \tau}} = \frac{k'_a [B_0]}{2k_a \{S_0\}} = \frac{k'_a \mathcal{V}}{2k_a A} \quad (\text{VI.7})$$

La mesure de ce rapport conduit ainsi à déterminer k'_a car toutes les autres données sont connues. La valeur du taux d'association à deux dimensions pourra être estimée et comparée à la valeur à trois dimensions.

VI.1.2 Détermination du taux d'association surfacique

Les expériences présentées étudient des échantillons de phase L_3 avec une séparation entre les bicouches $d_W = 120 \text{ \AA}$ (déterminée par SAXS au Chapitre III). Dans ces échantillons, la concentration en streptavidine est constante (Les échantillons font $10 \mu\text{L}$ et on introduit une quantité de streptavidine constante de 9.6 pmol). Les quantités de biotine ajoutées varient d'un échantillon à l'autre de manière à faire varier le rapport molaire r entre les quantités initiales de biotine et de streptavidine entre 0.1 et 2.

Loi de proportionnalité entre intensité et concentration surfacique : vérification de la prédiction P1

Le graphique VI.3 montre que la somme $I_{1S} + 2I_{2S}$ est proportionnel à $[B_0]$. Le coefficient de proportionnalité est égal à $\alpha = (1.2 \pm 0.1) 10^{15} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2$. Nous avons une relation de proportionnalité entre l'intensité des signaux correspondant aux complexes $S\text{-BL}_{12}$ et $S\text{-(BL}_{12})_2$ et les concentrations surfaciques de ces espèces : c'est la relation VI.6. Si on

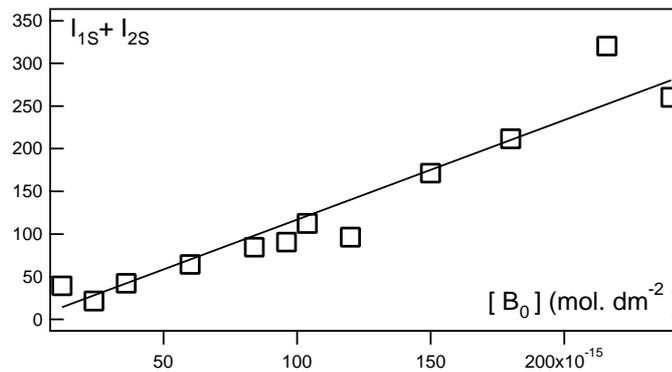


Figure VI.3: Variation de la somme $I_{1S} + 2I_{2S}$ en fonction de la concentration de biotine introduite. On obtient une loi de proportionnalité où le coefficient de proportionnalité est $\alpha = (1.2 \pm 0.1) 10^{15} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2$

représente maintenant l'intensité I_{1S} en fonction de la concentration initiale surfacique en peptides biotinylés $[B_0]$ (figure VI.4), nous pouvons observer que l'intensité I_{1S} augmente pour de faibles valeurs de $[B_0]$. Elle atteint ensuite un maximum pour une concentration proche de $10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-2}$ qui correspond à un rapport r de 0.8. Enfin elle diminue jusqu'à s'annuler pour des concentrations supérieures à $2.1 \cdot 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-2}$. Si on raisonne en terme de concentration, ce comportement est facilement explicable. Pour de faibles valeurs de r , la streptavidine s'ancre à un peptide et la concentration $[S\text{-BL}_{12}]$ augmente. Quand r devient proche de 1, le complexe $S\text{-(BL}_{12})_2$ prend de plus en plus d'importance. Pour des valeurs de r supérieures à 1, les complexes $S\text{-BL}_{12}$ vont réagir avec de nouvelles biotines présentes pour donner un complexe $S\text{-(BL}_{12})_2$ et la concentration $[S\text{-BL}_{12}]$ diminue.

Nous voyons que l'approximation linéaire pour les faibles concentrations en biotine est vérifiée (c'est-à-dire pour des rapports r inférieurs à 1). La pente obtenue sur les quatre premiers points (en imposant une fonction linéaire) est égale à $(9 \pm 7) 10^{14} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2$. Cette pente doit être égale à α (d'après les équations VI.6 et VI.5). La valeur obtenue

a une barre d'erreur très importante. Toutefois elle est compatible avec la valeur de α obtenue grâce au graphique VI.3.

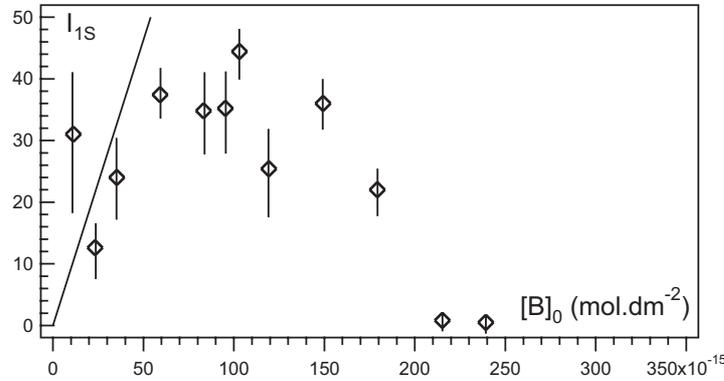


Figure VI.4: Intensité I_{1S} après correction de la contribution de la streptavidine libre en fonction de la concentration surfacique en biotine. Pour des concentrations faibles inférieures à $7 \cdot 10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-2}$, on vérifie que I_{1S} est proportionnelle à la concentration initiale en biotine. L'ajustement sur les quatre premiers points est représenté par la ligne continue. La pente est de $6.1 \cdot 10^{14} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2$ ce qui conduit à $\alpha = 1.2 \cdot 10^{15} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2$

L'intensité relative à la streptavidine liée à un peptide est bien proportionnelle à la concentration initiale en biotine $[B_0]$ comme annoncé par la prédiction P1. En outre, on vérifie que la concentration de l'espèce associée à I_{1S} est égale à $[B_0]$, ce qui est l'expression théorique que nous avons obtenue (équation VI.5).

Evolution de la concentration en streptavidine ancrée à deux peptides : Vérifications de la proposition P2

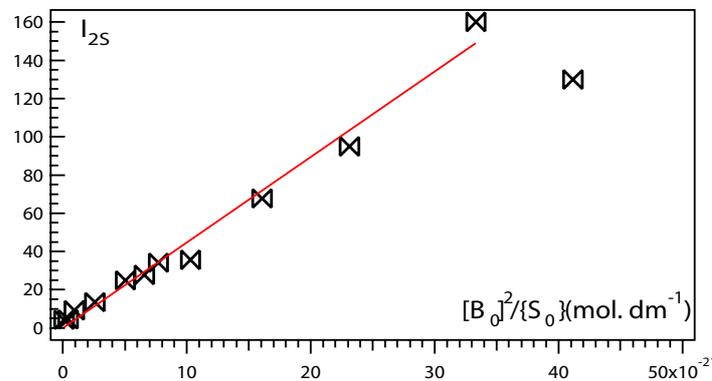


Figure VI.5: Intensité I_{2S} en fonction de $\frac{[B_0]^2}{\{S_0\}}$. La linéarité entre ces deux grandeurs est vérifiée sur une gamme importante de concentrations.

Nous allons vérifier la relation linéaire entre I_{2S} et $\frac{[B_0]^2}{\{S_0\}}$. Les résultats sont présentés sur la figure VI.5. La loi de proportionnalité entre ces deux quantités est vérifiée sur une gamme importante de concentration qui correspond à des rapports r entre 0 et 1.4. Dans cet exemple, les conclusions de notre calcul semblent pouvoir s'étendre à une gamme de rapport r plus importante que dans le cas du complexe S-BL₁₂.

Ainsi la vérification des propositions P1 et P2 permet de valider les hypothèses que nous avons faites et les équations VI.5.

Nous allons utiliser ces résultats afin de déterminer le taux d'association à deux dimensions.

Détermination de la constante d'association streptavidine/biotine en surface

Pour des valeurs de r inférieures à 1, nous examinons le rapport entre les quantités I_{2S} et I_{1S} qui est proportionnel à la fraction $\frac{[S-(BL_{12})_2]}{[S-BL_{12}]}$. L'évolution de ce rapport est bien linéaire avec r pour des valeurs de r inférieures à 1 comme en témoigne la figure VI.6. La

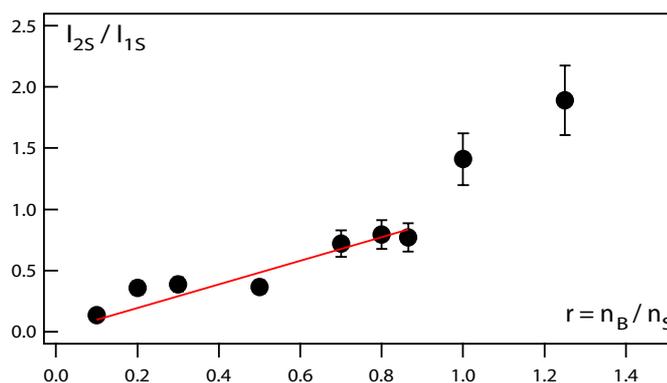


Figure VI.6: Représentation linéaire du rapport entre I_{2S} et I_{1S} en fonction de r . Ces deux grandeurs sont liées par une loi affine pour des valeurs de r comprises entre 0.1 et 0.9. La pente de la droite d'ajustement est de 0.97.

pente obtenue entre ces deux fractions est de 0.97 ± 0.07 . Or, selon les lois d'évolution établies, la relation existant entre ces deux quantités est donnée par la relation VI.7. La pente de cette droite est égale à $\frac{k'_a \mathcal{V}}{2k_a A}$. Pour connaître la valeur du rapport k'_a/k_a , il faut estimer le rapport A/\mathcal{V} . L'expression V.3 du volume dans lequel un objet de taille ℓ peut diffuser librement entre des bicouches distantes de d_W permet de déduire que :

$$\frac{A}{\mathcal{V}} = \frac{1}{d_W - \ell}$$

Dans les échantillons de phase L₃ utilisés ici, $d_W = 120 \text{ \AA}$. La dimension de la streptavidine est de l'ordre de 50 \AA . Ainsi le rapport $\frac{\mathcal{V}}{A}$ est de 70 \AA soit $7 \cdot 10^{-8} \text{ dm}$. Finalement, le

rapport entre les constantes k'_a et k_a est donc de $(2.7 \pm 0.3) 10^7 \text{ dm}^{-1}$.

L'inverse de ce rapport a la dimension d'une longueur Δ égale à $37 \pm 5 \text{ \AA}$. Cette valeur

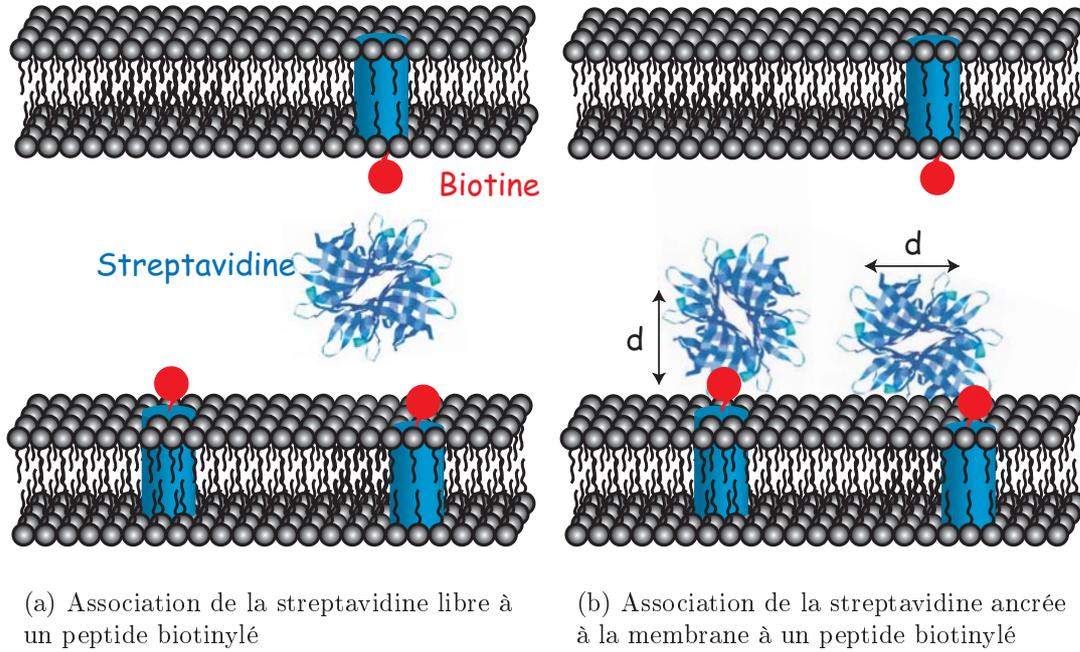


Figure VI.7: Comparaison entre les deux types d'accrochage streptavidine-biotine. Dans la situation où la streptavidine diffuse en surface, elle n'explore autour du peptide qu'une zone de rayon d la distance entre deux poches d'interaction avec la biotine.

correspond à une longueur caractéristique du système. On remarque que la valeur de Δ est proche de la distance d qui sépare deux poches de fixation de la streptavidine avec la biotine ($d=35-45 \text{ \AA}$ [135]). Par conséquent, on pourrait interpréter Δ comme la distance sur laquelle la streptavidine ancrée à un peptide peut explorer le volume. En effet, la constante k_a décrit l'association d'une streptavidine en volume à un peptide biotinylé ancré à une surface ($BL_{12}+S \rightarrow S-BL_{12}$). La cinétique de cette réaction est donnée par

$$\frac{d[S-BL_{12}]}{dt} = -k_a \{S_0\} [BL_{12}]$$

La constante k'_a quantifie la liaison entre une streptavidine liée à la surface avec une biotine diffusant sur la même surface ($BL_{12}+S-BL_{12} \leftarrow S-(BL_{12})_2$). La cinétique de cette réaction est donnée par

$$\frac{d[S-(BL_{12})_2]}{dt} = -k'_a [S-BL_{12}] [BL_{12}] = -\frac{k_a}{\Delta} [S-BL_{12}] [BL_{12}]$$

Ainsi $[S-BL_{12}]/\Delta$ représente la concentration volumique équivalente en streptavidine dans ce système. Quand la streptavidine est ancrée sur la surface, elle n'explore autour d'elle qu'une région centrée autour du peptide qui est de l'ordre de la taille d entre deux poches

d'interaction avec la biotine (figure VI.7). La distance moyenne de la streptavidine à la bicouche est alors de l'ordre de d . La valeur de Δ est donc dans la gamme des dimensions caractéristiques du système.

Les mesures que nous avons réalisées nous donnent accès à des informations essentielles sur la dynamique du lien. Nous connaissons le taux d'association k_a (entre 10^6 et 10^8 mol⁻¹.dm³.s⁻¹). Le taux d'association surfacique se déduit de la valeur de Δ . On trouve k'_a compris entre $2.7 \cdot 10^{13}$ et $2.7 \cdot 10^{15}$ mol⁻¹.dm².s⁻¹. Ainsi, l'étude des intensités de recouvrement de fluorescence nous a permis de mesurer un taux d'association à deux dimensions entre deux objets appartenant à une même bicouche. Le caractère membranaire des peptides est pris en compte. A notre connaissance, ce type de mesures n'a jamais été réalisé et les valeurs de k'_a ne sont pas connues pour d'autres systèmes.

VI.1.3 Comparaison avec les concentrations effectives

Les conclusions que nous avons obtenues sur l'interaction entre la streptavidine et la biotine ont été déduites de résultats analytiques obtenus pour des rapports r faibles et dans le cadre de l'hypothèse d'un complexe S-BL₁₂ majoritaire. Nous avons voulu vérifier que la valeur du taux de dissociation k'_a trouvée était compatible avec les résultats obtenus pour des valeurs de r plus grandes. Les équations d'évolution VI.2 ne sont pas solubles analytiquement. Nous avons donc utilisé un logiciel de calcul (*Mathematica*) afin d'obtenir les valeurs des différentes concentrations : $[S-BL_{12}]$ et $[S-(BL_{12})_2]$. La constante k_a a une valeur comprise entre 10^6 et 10^8 mol.L⁻¹.s⁻¹. La constante k'_a peut donc varier dans la gamme $2.7 \cdot 10^{13}$ à $2.7 \cdot 10^{15}$ mol⁻¹. dm². s⁻¹. Dans ces évaluations numériques, le rapport r est varié entre 0.1 et 1.9.

Sur la figure VI.8, les résultats obtenus pour l'évolution de $\frac{I_{2S}}{I_{1S}} = \frac{[S-(BL_{12})_2]}{[S-BL_{12}]}$ sont comparés avec les points expérimentaux. L'accord est très bon. La valeur du taux d'association n'est pas un facteur important. L'accord est bon tant que k_a est supérieur à 10^2 mol⁻¹.dm³.s⁻¹. Ceci s'explique par le fait que les constantes de réaction sont très élevées et correspondent dans la gamme de concentration étudiée à des réactions quantitatives. Cependant la dépendance de ces estimations numériques devant le rapport $\frac{k'_a}{k_a}$ est plus sensible. Nous voyons ainsi que les courbes relatives à une valeur de Δ de 40 Å sont plus proches de nos résultats.

On peut déduire de ces valeurs de concentrations trouvées numériquement une valeur d'intensité grâce à la relation VI.6. La figure VI.9 reproduit ces variations. Nous avons déjà constaté que les points expérimentaux correspondants à I_{1S} sont très dispersés. Ceci est dû à l'estimation de I_{1S} . Cette valeur dépend de la mesure de trois paramètres qui sont les intensités mesurées directement et relatives aux coefficients de diffusion D_{0S} et D_{1S} mais aussi à la loi de correction établie par la figure VI.3. Malgré cette large distribution de points, nous constatons que l'accord avec les courbes numériquement établies est satisfaisant.

En faisant la même étude pour I_{2S} , on peut souligner le très bon accord entre les résultats expérimentaux et les valeurs numériques (figure VI.10). Les meilleurs résultats sont obtenus pour longueur caractéristique Δ de 40 Å et un taux d'association de 10^6

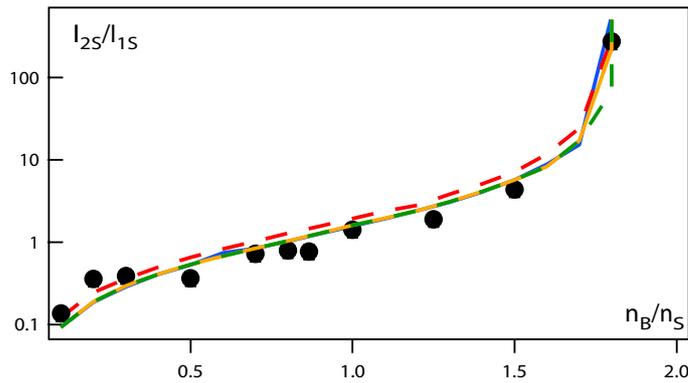


Figure VI.8: Représentation en échelle semi-logarithmique du rapport entre I_{2S} et I_{1S} en fonction de r repris de la figure VI.6. Les points expérimentaux sont représentés par les disques noirs. Les courbes obtenues numériquement correspondent à des paramètres différents. La courbe rouge en pointillés donne les valeurs obtenues pour $k_a = 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et une valeur de Δ de 35 \AA . La courbe bleue est obtenue avec la même valeur de k_a mais $\Delta = 40 \text{ \AA}$. La courbe orange utilise un rayon de $\Delta = 40 \text{ \AA}$. La courbe verte en pointillés est obtenue pour un taux d'association de $10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et $\Delta = 40 \text{ \AA}$.

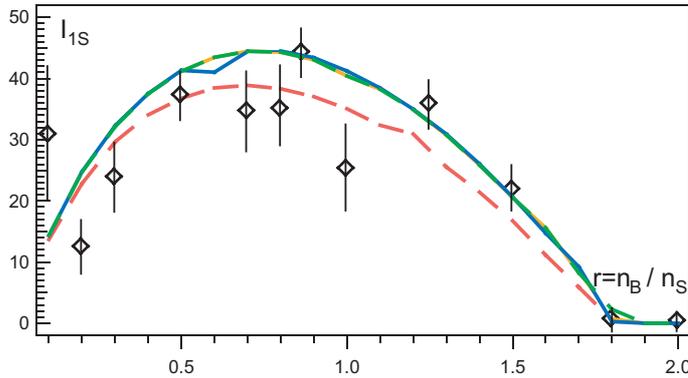


Figure VI.9: Comparaison entre les points expérimentaux de I_{1S} donnés à la figure VI.4 avec les résultats numériques et pour différentes valeurs de k_a et de Δ . Les différentes courbes obtenues sont représentées avec les codes couleurs utilisés dans la figure VI.8.

$\text{M}.\text{s}^{-1}$. La constante d'association surfacique k'_a qui paraît la plus acceptable est donc de $2.5 \cdot 10^{13} \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^2.\text{s}^{-1}$. Ces résultats sont résumés dans le tableau VI.2.

En conclusion, nous avons pu mesurer une constante d'association à deux dimensions k'_a entre deux objets diffusant sur une membrane. La constante trouvée pour l'association entre un peptide transmembranaire biotinyllé et une streptavidine liée à un peptide transmembranaire est de $2.5 \cdot 10^{13} \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^2.\text{s}^{-1}$. La comparaison avec la constante d'association volumique permet d'accéder à une longueur caractéristique Δ qui

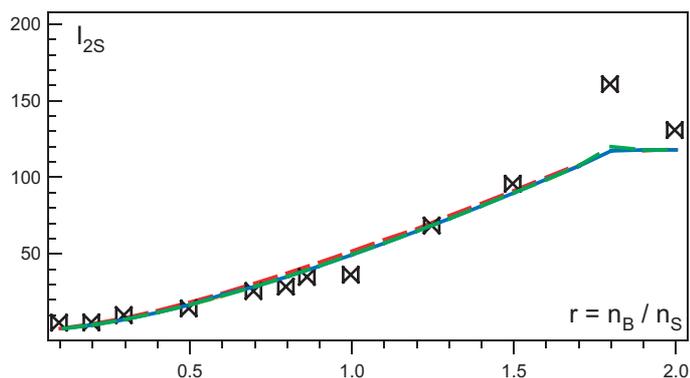


Figure VI.10: Comparaison entre les points expérimentaux de I_{2S} donnés sur la courbe VI.5 avec les résultats numériques et pour différentes valeurs de k_a et Δ . Les différentes courbes obtenues sont représentées en traits pleins et les codes couleurs utilisés sont ceux de la figure VI.8.

Grandeur	Symbole	Unité	Valeur
Taux d'association de la réaction $S + BL_{12} \longrightarrow S-BL_{12}$	k_a	$\text{mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{s}^{-1}$	10^6
Taux d'association de la réaction $S-BL_{12} + BL_{12} \longrightarrow S-(BL_{12})_2$	k'_a	$\text{mol}^{-1}.\text{dm}^2.\text{s}^{-1}$	$2.5 \cdot 10^{13}$
Distance caractéristique $\left(\frac{k_a}{k'_a}\right)$	Δ	Å	40

Tableau VI.2: Tableau-Récapitulatif des résultats obtenus dans cette section

peut être interprétée dans notre système comme une taille d'exploration de la surface. La valeur obtenue n'est pas aberrante par rapport aux dimensions caractéristiques des molécules étudiées.

Nous sommes parvenus à mettre au point un outil indispensable pour l'étude des accrochages avec des objets membranaires.

Nous nous sommes intéressés ici à une mesure de constante d'association qui n'est pas une mesure dynamique mais qui profite du fait que le temps de vie de la liaison streptavidine-biotine est très long. Nous allons voir par la suite que nous pouvons aussi mesurer des constantes d'associations par des mesures dynamiques de recouvrement de fluorescence résolues en temps.

VI.2 Dynamique d'association entre protéines d'une pompe à efflux

Le chapitre V a montré que les interactions entre MexA et OprM et entre MexA et MexB sont des interactions pour lesquelles on ne note pas de modifications des figures de recouvrement avec le temps au-delà de 2 minutes. Les temps caractéristiques de mise à l'équilibre sont donc faibles. On ne peut pas atteindre d'informations dynamiques directes. Nous allons dans cette section étudier le cas des associations entre les protéines MexA_{signal}-OprM et MexB-OprM.

VI.2.1 Association de MexA_{signal} et de OprM

La protéine MexA_{signal} est une protéine mutante de la protéine MexA. Le segment manquant est la modification lipidique. En effet, cette protéine ne subit pas de palmitoylation du fait de l'absence de l'unique cystéine libre en position N-terminale (Chapitre I). Nous avons étudié la diffusion de la protéine MexA_{signal} fluorescente dans une phase L₃ dont la séparation entre les bicouches est fixée à 200 Å. Sa mobilité est étudiée en présence de la protéine intégrale de membrane OprM en large excès (10 trimères de OprM pour une protéine MexA_{signal}).

Description des figures de recouvrement

Comme nous l'avons montré à la section V.3.2, lorsqu'on mesure le coefficient de diffusion de la protéine MexA_{signal} en présence de la protéine OprM immédiatement après préparation de l'échantillon, le coefficient de diffusion obtenu est celui de la protéine MexA_{signal} seule (comme en témoigne la courbe rouge de VI.11). Pour des temps supérieurs à une heure (3600 s) en revanche, on obtient un coefficient de diffusion égal à celui de OprM indiquant que MexA_{signal} interagit avec OprM.

Nous nous sommes intéressés aux figures de recouvrement enregistrées à différents instants t après la préparation de l'échantillon. L'instant de préparation est notée $t = 0$. Les courbes sont enregistrées avec un seul flash de photo-blanchiment ce qui explique la qualité moindre des signaux par rapport à ceux présentés dans les sections précédentes. Les figures de recouvrement de fluorescence sont des doubles exponentielles (figure VI.11) :

$$I(t) = I_{AS}e^{-t/\tau_{AS}} + I_{ASM}e^{-t/\tau_{ASM}}$$

Les deux composantes qui apparaissent sont :

- une composante rapide d'intensité I_{AS} correspondant à un coefficient de diffusion de $25 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ identique au coefficient de diffusion de la protéine seule. Cette fraction désigne donc la fraction de protéine soluble qui diffuse entre les bicouches sans accrochage.
- une composante lente (I_{ASM}) avec $D = 1.3 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ qui est le coefficient de diffusion de OprM sur la bicouche. Cette fraction représente donc l'ensemble des protéines de MexA_{signal} qui sont accrochées à OprM.

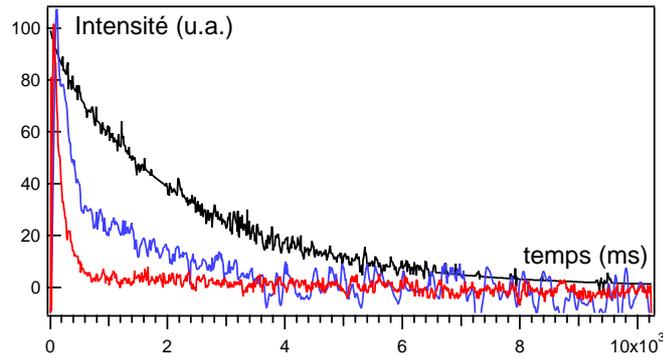
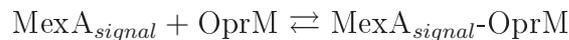


Figure VI.11: Courbes de recouvrement de fluorescence obtenues pour $MexA_{signal}$ intégrée dans une phase contenant la protéine $OprM$ en excès (les rapports de quantité de matière sont supérieurs à 10 trimères de $OprM$ pour chaque protéine $MexA_{signal}$). La courbe rouge est la courbe initiale, la courbe bleue est la courbe obtenue après 400 s, la courbe noire est obtenue après 2200 s.

Sur la figure VI.11, on voit que la courbe rouge décroît rapidement. La courbe obtenue après 400 s présente une rupture. On voit clairement deux temps caractéristiques : le temps le plus court correspond à celui de la courbe rouge et le second est beaucoup plus important (les ajustements donnent un facteur 20 entre les deux temps). La courbe noire voit le poids de la composante lente augmenter, la diffusion globale est plus lente. Si on prend garde à conserver une intensité du laser de lecture constante et un gain de collection du photomultiplicateur constant, les intensités des signaux de recouvrement renseignent sur les concentrations de chacune des espèces (sections IV.2.4 et V.5.3).

Evolution temporelle

Comment peut-on passer de l'évolution temporelle de ces courbes à des valeurs de taux d'association et de dissociation ? Les notations sont résumées dans le tableau VI.3. La réaction étudiée est la suivante :



L'équation qui décrit l'évolution temporelle de $[A_{signal}M]$ est :

$$\frac{d[A_{signal}M]}{dt} = k_{a,AM}\{A_{signal}\}[M] - k_{d,AM}[AM] \quad (VI.8)$$

La protéine $OprM$ est introduite en excès. On considère donc que sa concentration est constante. La conservation de la quantité de protéines $MexA$ s'écrit :

$$A[A_{signal}M] + \mathcal{V}_A\{A_{signal}\} = n_{A_0}$$

où A représente la surface de bicouche et \mathcal{V}_A représente le volume corrigé de diffusion de $MexA_{signal}$. L'équation de variation de $[A_{signal}M]$ devient :

$$\frac{d[A_{signal}M]}{dt} = -(k_{a,AM}\frac{A}{\mathcal{V}_A}[M] + k_{d,AM})[AM] + \frac{k_{a,AM}n_{A_0}[M]}{\mathcal{V}_A}$$

Grandeur	Notations	Unité
Taux d'association de la réaction $MexA_{signal} + OprM \longrightarrow MexA_{signal}-OprM$	$k_{a,AM}$	$\text{mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{s}^{-1}$
Taux de dissociation de la réaction $MexA_{signal}-OprM \longrightarrow MexA_{signal} + OprM$	$k_{d,AM}$	$\text{mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{s}^{-1}$
Concentration molaire volumique de $MexA_{signal}$	$\{A_{signal}\}$	$\text{mol}.\text{dm}^{-3}$
Concentration molaire surfacique en trimère de OprM	$[M]$	$\text{mol}.\text{dm}^{-2}$
Concentration molaire surfacique en $MexA_{signal}-OprM$	$[A_{signal}M]$	$\text{mol}.\text{dm}^{-2}$
Quantité de protéines $MexA_{signal}$ introduite	n_{A_0}	mol
Temps caractéristique de la liaison $MexA_{signal}-OprM$	τ_{AM}	s

Tableau VI.3: Tableau-Récapitulatif des notations utilisées dans cette section et de leurs unités.

Un temps caractéristique apparaît :

$$\tau_{AM} = \frac{1}{\left(\frac{k_{a,AM}A[M]}{\mathcal{V}_A} + k_{d,AM}\right)} \quad (\text{VI.9})$$

La solution de ce système est :

$$[A_{signal}M] = \frac{k_{a,AM}n_{A_0}[M]\tau_{AM}}{\mathcal{V}_A} \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_{AM}}\right)\right) \quad (\text{VI.10})$$

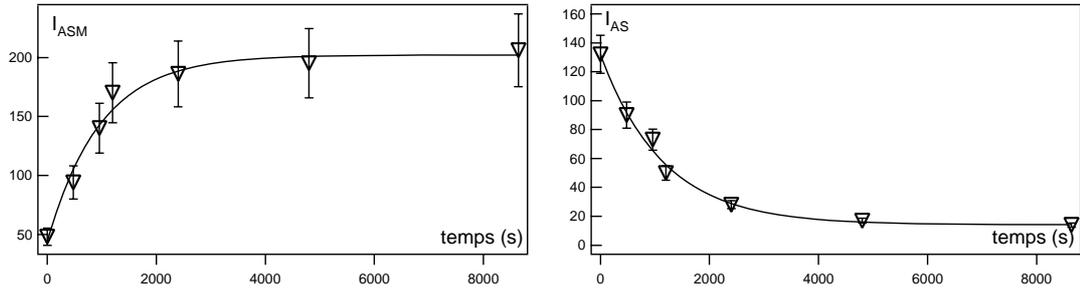
Il faut prendre garde au fait que l'origine des temps n'est pas la même que dans notre expérience. Il faudra tenir compte de ce décalage t_1 de l'origine par la suite. On en déduit pour l'évolution temporelle de la concentration $\{A_{signal}\}$:

$$\{A_{signal}\} = \frac{n_{A_0}}{\mathcal{V}_A} \cdot \left[1 - \frac{k_{a,AM}A[M]\tau_{AM}}{\mathcal{V}_A} \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_{AM}}\right)\right)\right] \quad (\text{VI.11})$$

Nous allons vérifier que les évolutions temporelles des intensités I_{ASM} et I_{AS} suivent les variations données par les équations VI.10 et VI.11.

Détermination du temps caractéristique τ_{AM}

L'évolution de l'intensité I_{ASM} suit bien un ajustement selon la loi VI.10. Ce dernier conduit à une première mesure du temps caractéristique $\tau_{AM} = 980 \pm 150$ s. Par ailleurs, on peut estimer le temps t_1 correspondant à l'origine des temps : $t_1 = -240 \pm 80$ s (figure VI.12 a). Les variations de I_{AS} suivent un ajustement selon l'équation VI.11 (figure VI.12 b). On obtient une seconde estimation du temps caractéristique $\tau_{AM} = 1150 \pm 120$ s. Ces deux estimations du temps caractéristique sont compatibles. Finalement, le temps caractéristique est $\tau_{AM} = 1065 \pm 100$ s.


 (a) Evolution temporelle de l'intensité I_{ASM}

 (b) Evolution temporelle de l'intensité I_{AS}

Figure VI.12: Les évolutions temporelles des intensités I_{ASM} et I_{AS} sont ajustées par les lois d'évolution VI.10 et VI.11. On trouve $I_{ASM} = I_0(1 - \exp(-(t - t_1)/\tau_{AM}))$ avec $I_0 = (202 \pm 7)$, $t_1 = -240 \pm 80$ s et $\tau_{AM} = 980 \pm 150$ s. On trouve $I_{AS} = I_1 + I_2 \exp(-t/\tau_{AM})$ avec $I_1 = (14 \pm 4)$, $I_2 = (118 \pm 6)$ et $\tau_{AM} = 1150 \pm 120$ s.

Détermination du taux d'association $k_{a,AM}$

Comment parvenir à une estimation de $k_{a,AM}$? D'après les formules VI.10 et VI.11, le rapport entre les concentrations en éléments liés et libres est :

$$\frac{\{A_{signal}\}}{[A_{signal}M]} = \frac{1}{k_{a,AM}\tau_{AM}[M](1 - \exp(-t/\tau_{AM}))} - \frac{A}{\mathcal{V}_A} \quad (VI.12)$$

Le rapport des intensités I_{AS} et I_{ASM} est proportionnel à $\{A_{signal}\}/[AM]$, le facteur de proportionnalité est noté β . On ajuste le rapport I_{AS}/I_{ASM} par une loi de la forme $A+B/(1-\exp(-(t-t_1)/\tau_{AM}))$ (figure VI.13). A est égal à $\beta A/\mathcal{V}$ et B à $\beta/(k_{a,AM}\tau_{AM}[M])$.

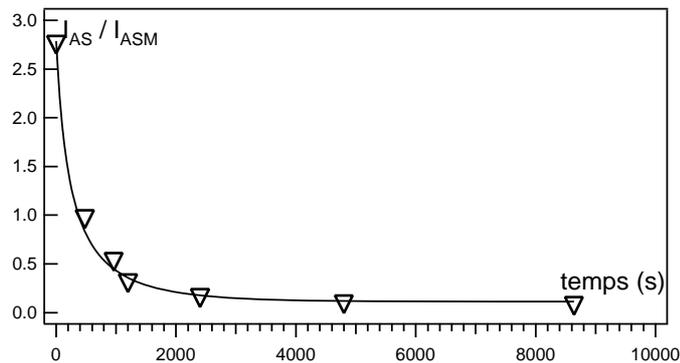


Figure VI.13: Résultats pour la détermination du rapport des intensités relatives aux protéines libres par rapport aux protéines liées $\frac{I_{AS}}{I_{ASM}}$ en fonction du temps. Cette courbe est décroissante, on l'ajuste par une loi de la forme $A+B/(1-\exp(-(t-t_1)/\tau_{AM}))$ avec $A = -0.6 \pm 0.05$ et $B = 0.71 \pm 0.02$.

La phase L_3 correspond à une distance entre membranes de 200 Å. La protéine MexA peut être modélisée par un cylindre long de 85 Å avec une base de 30 Å. Nous avons estimé son rayon hydrodynamique avec les formules de Perrin à 35 Å. La taille caractéristique ℓ de la protéine MexA_{signal} est donc de 35 Å. Ainsi :

$$\frac{V_A}{A} = d_W - \ell = 1.65 \cdot 10^{-7} \text{ dm}$$

On obtient alors un coefficient de proportionnalité β de $(9.9 \pm 0.9) \cdot 10^{-8} \text{ dm}^{-1}$. Ainsi, grâce aux mesures précédentes, nous avons estimé τ_{AM} et β . On connaît la concentration initiale en trimère de protéines OprM $[M] = 2 \cdot 10^{-12} \text{ mol.dm}^{-2}$. Le coefficient B permet de déduire le taux de formation $k_{a,AM} = 65 \pm 13 \text{ mol.dm}^{-3} \text{ s}^{-1}$.

L'analyse résolue en temps des courbes de recouvrement permet d'accéder à des taux d'association pour des objets en solution comme le permet la résonance plasmonique de surface. Il serait intéressant de pouvoir réaliser des comparaisons avec ce type de montage afin de valider nos mesures. Les seules mesures existantes sur la dynamique d'une liaison entre les protéines MexA solubles et OprM sont des mesures de QCM-D [148]. Les protéines OprM sont greffées sur le support et les concentrations massiques obtenues sont les concentrations de saturation de 1292 ng/cm². La masse de détergent est estimée à 54 % par les auteurs (cette estimation est basée sur des clichés de cryo-microscopie électronique qui mettaient en évidence une structure hexagonale compacte pour la protéine OprM mais aucune mesure directe ne permet de mesurer la quantité de détergent réellement adsorbée). On obtient une concentration surfacique locale en trimère de OprM (150 kDa) de $4 \cdot 10^{-10} \text{ mol.dm}^{-2}$. Cette concentration est 200 fois supérieure à celle que nous avons à l'intérieur de nos bicouches. Les temps caractéristiques de mise à l'équilibre sont inférieurs à 2 minutes. Dans cette expériences, les volumes et les surfaces utilisées ne sont pas connues. Nous ne pouvons donc pas comparer nos résultats avec ces données.

Détermination du taux de dissociation $k_{d,AM}$

Le temps caractéristique dépend du taux de dissociation $k_{d,AM}$ selon la formule VI.9. Ainsi, le taux de dissociation obtenu est de $k_{d,AM} = (1.5 \pm 0.7) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. En étudiant la dynamique des objets diffusant en volume, nous parvenons à atteindre, comme avec la technique de résonance plasmon de surface, des données sur les taux d'associations et de dissociations de l'assemblage entre les protéines MexA solubles et la protéine OprM. La constante de dissociation à l'équilibre qui s'en déduit est de $2.3 \cdot 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$.

Comparaison avec le cas à deux dimensions

Ce paragraphe a pour but d'accéder à des ordres de grandeur pour la comparaison entre taux de dissociation à deux et trois dimensions pour la liaison MexA-OprM. Les calculs qui vont suivre sont donc de simples comparaisons car nous n'avons pas pu estimer précisément le temps d'association entre MexA native et OprM. Dans le cas d'une interaction entre les protéines MexA natives (donc membranaires) et OprM, nous avons vérifié qu'après deux minutes de préparation d'échantillon, les figures de recouvrement de

Grandeur	Notations	Unité
Taux d'association de la réaction $MexA_{signal} + OprM \longrightarrow MexA_{signal}-OprM$	$k_{a,AM}$	$\text{mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{s}^{-1}$
Taux d'association de la réaction $MexA + OprM \longrightarrow MexA-OprM$	$k'_{a,AM}$	$\text{mol}^{-1}.\text{dm}^2.\text{s}^{-1}$
Concentration molaire volumique de MexA _{signal}	$\{A_{signal}\}$	$\text{mol}.\text{dm}^{-3}$
Concentration molaire surfacique en trimère de OprM	$[OprM]$	$\text{mol}.\text{dm}^{-2}$
Concentration molaire surfacique en MexA	$[A]$	$\text{mol}.\text{dm}^{-2}$
Concentration molaire surfacique en MexA _{signal} -OprM	$[A_{signal}M]$	$\text{mol}.\text{dm}^{-2}$
Concentration molaire surfacique en MexA-OprM	$[AM]$	$\text{mol}.\text{dm}^{-2}$
Temps d'association de la liaison MexA _{signal} -OprM	τ_{AM}	s
Temps d'association de la liaison MexA-OprM	τ'_{AM}	s

Tableau VI.4: Tableau-Récapitulatif des notations utilisées dans cette section et de leurs unités.

fluorescence ne varient pas. Ces 120 s doivent représenter au minimum cinq fois le temps caractéristique τ'_{AM} . On peut donner une limite supérieure de ce temps caractéristique : $\tau'_{AM} < 25$ s. Ainsi $\frac{\tau_{AM}}{\tau'_{AM}} > 44$.

Comment peut-on passer du temps caractéristique au taux d'association ?

Dans le cas d'une association avec une protéine en solution, nous avons obtenu un temps caractéristique $\tau_{AM} \simeq \mathcal{V}_A / (k_{a,AM}A[M])$. Le raisonnement fait pour l'évolution de la concentration $[AM]$ est toujours valable pour une liaison entre la protéine MexA native et la protéine OprM. Toutefois, les concentrations sont surfaciques. L'expression du temps caractéristique d'accrochage s'écrit :

$$\tau'_{AM} = \frac{1}{k'_{a,AM}[OprM]} \quad (\text{VI.13})$$

De manière analogue à la section précédente sur la streptavidine, l'estimation du rapport entre les constantes d'association surfacique et volumique s'écrit :

$$\frac{k'_{a,AM}}{k_{a,AM}} = \frac{\tau_{AM}}{\tau'_{AM}} \cdot \frac{A}{\mathcal{V}_A}$$

Puisque $\frac{\tau_{AM}}{\tau'_{AM}} > 44$, la fraction $\frac{k'_{a,AM}}{k_{a,AM}}$ est supérieure à $2.6 \cdot 10^8 \text{ dm}^{-1}$ avec $k_{a,AM}$ égale à $6.5 \cdot 10^1 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^{-3}.\text{s}^{-1}$. Ainsi la constante $k'_{a,AM}$ est supérieure à $1.7 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^2.\text{s}^{-1}$. L'inverse de ce rapport conduit à une distance caractéristique Δ_{AM} inférieure à 8 Å. Δ_{AM} pourrait désigner la taille du site d'interaction ou la largeur du puits de potentiel qui décrit l'interaction (figure VI.14). Lorsque nous avons examiné les distances entre bi-couches d_W pour lesquelles un accrochage était possible (courbe V.10), nous avons trouvé

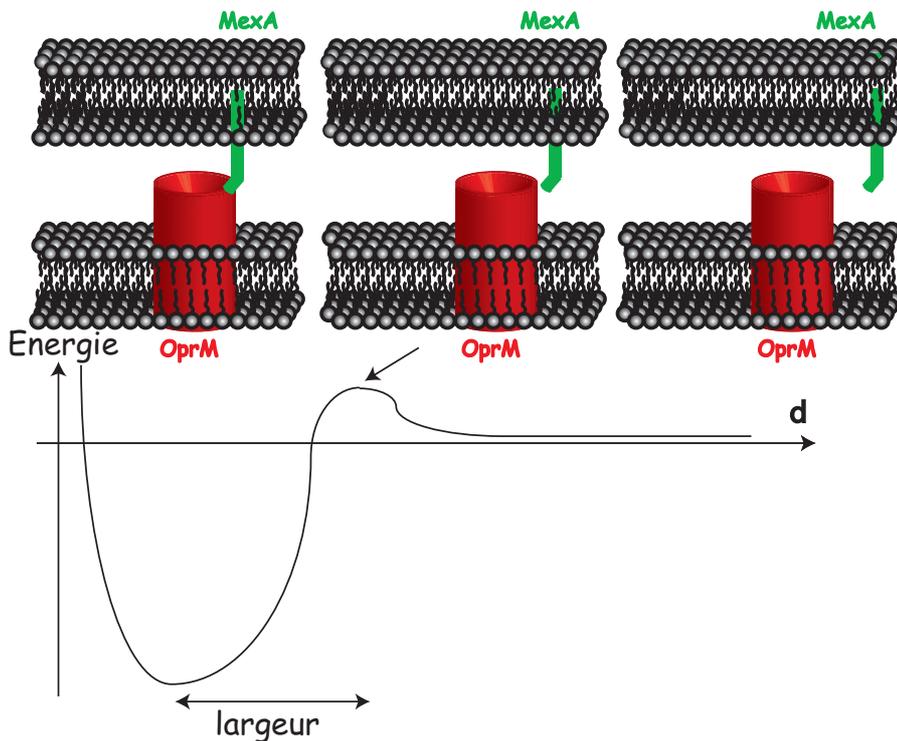


Figure VI.14: Représentation du profil énergétique pour la liaison entre MexA et OprM

que l'association MexA-OprM était possible sur une largeur de 10 \AA . Cette valeur est très faible au vu des fluctuations de membrane. Toutefois la valeur faible de Δ_{AM} conduit à penser que l'accrochage a lieu sur une largeur faible.

Ainsi, les mesures de recouvrement de fluorescence résolues en temps permettent d'accéder aux constantes dynamiques à trois dimensions entre les protéines MexA et OprM. Nous avons obtenu $k_{a,AM} = (6.5 \pm 1.3) 10^1 \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^3.\text{s}^{-1}$, $k_{d,AM} = (1.5 \pm 0.7) 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et une constante de dissociation à l'équilibre $K_{D,AM} = (2.3 \pm 0.9) 10^{-6} \text{ mol}.\text{dm}^{-3}$. Une vérification intéressante serait de comparer ces valeurs à celles obtenues par Résonance Plasmonique de Surface ou par QCM-D. Une estimation du taux d'association à deux dimensions $k'_{a,AM} > 2 10^{10} \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^2.\text{s}^{-1}$ est possible par comparaison avec le cas à trois dimensions.

VI.2.2 Association entre MexB et OprM

Nous allons nous intéresser ici à la comparaison de temps caractéristiques d'évolution pour des liaisons à deux dimensions entre deux protéines transmembranaires : les protéines MexB (membrane interne) et OprM (membrane externe). Cette comparaison dynamique ne peut pas être obtenue par d'autres méthodes expérimentales.

Les protéines sont insérées dans une phase éponge dont la séparation entre les bicouches

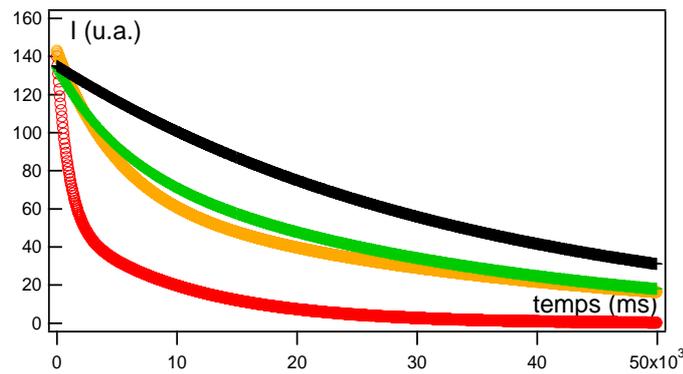


Figure VI.15: Courbes de recouvrement de fluorescence de MexB en présence de OprM relevées à différents instants. La première figure est représentée par la courbe rouge (Elle correspond au temps $t=0$ arbitraire). Les courbes orange, verte et noire sont obtenues après un temps de 2000, 5600 et 10000 s. La contribution correspondant à une diffusion rapide diminue avec le temps. Ceci indique la disparition progressive des protéines MexB libres

est de 200 Å. En effet, pour cette valeur, nous avons obtenu une liaison entre les protéines MexB et OprM (voir la section V.4). Le pH de la solution est de 7.5 pour être en bonne adéquation avec le tampon des protéines (la protéine MexB a un comportement qui varie avec le pH). Les protéines MexB et OprM sont mélangées en proportion équimolaire (qui sont les rapports de concentration *in vivo* [42]). Les concentrations surfaciques en trimères de protéines sont de 0.2 pmol.dm^{-2} (Annexe E). Lorsqu'on ajoute une fraction de OprM à une solution contenant des protéines MexB fluorescentes, les figures de recouvrement de fluorescence sont des doubles exponentielles (on pose $I(t) = I_B e^{-t/\tau_B} + I_{BM} e^{-t/\tau_{BM}}$). Elles mettent en évidence (figure VI.15) :

- un coefficient de diffusion de l'ordre de $2 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Cette valeur est celle du coefficient de diffusion de la protéine MexB seule. L'intensité relative à cette composante du signal est notée I_B .
- un coefficient de diffusion 40 fois plus faible. La population correspondante est celle de la protéine MexB liée à une protéine OprM. L'intensité qui s'y rapporte est I_{BM} .

On remarque sur la figure VI.15 que la fraction peu mobile augmente avec le temps. Dans le cas de l'association MexB-OprM, les deux espèces fluorescentes sont transmembranaires puisqu'il s'agit soit de la protéine MexB diffusant librement, soit de la protéine MexB liée à la protéine OprM située sur une bicouche voisine. Le rapport des intensités des fractions libres et liées est proportionnel au rapport des concentrations entre ces deux espèces. Son évolution temporelle est représentée sur la figure VI.16. Nous avons ajusté ces courbes par des exponentielles de manière à déduire un temps caractéristique d'évolution mais la loi de variation n'a pas été résolue et n'est donc pas exponentielle. Il s'agit simplement de donner un outil de comparaison. L'ajustement par une exponentielle donne pour l'interaction MexB-OprM, un temps caractéristique de décroissance de l'ordre de 5000 s. Nous avons étudié à la section V.4 les interactions entre les protéines MexA et OprM et

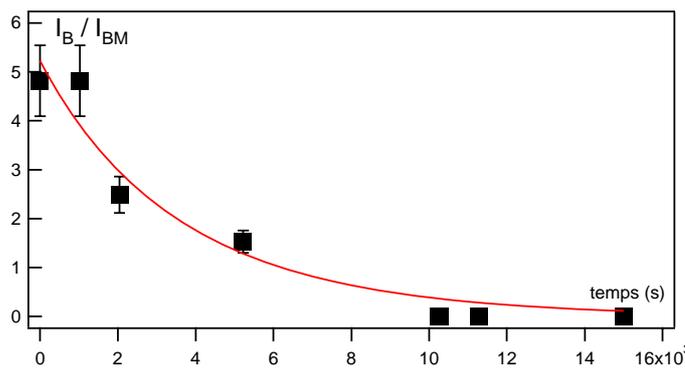


Figure VI.16: Evolution temporelle du rapport des intensités correspondant à la fraction libre de la protéine MexB par rapport à la fraction liée. Cette quantité décroît. Un ajustement exponentiel conduit à un temps caractéristique d'évolution de 5000 s.

les protéines MexA et MexB. Nous avons noté que, pour des concentrations de protéines MexA de 0.2 pmol.dm^{-2} et de protéines MexB ou OprM de 2 pmol.dm^{-2} , le temps de préparation des échantillons est très supérieur au temps d'évolution du système. Le temps de préparation est de l'ordre de 120 s. On peut alors estimer qu'il correspond au moins à cinq fois le temps d'association $\tau_{liaison}$. Ainsi la borne supérieure pour ces temps de liaison est de 25 s. Toutefois, dans ces deux derniers cas, les protéines MexB et OprM étaient dix fois plus concentrées.

Nous avons alors repris cette étude pour des concentrations en protéines MexB et MexA de 0.2 pmol.dm^{-2} . La protéine MexA est suivie. Les courbes sont des doubles exponentielles pour lesquelles on note les intensités I_{AB} et I_A correspondant aux fractions liées et libres. L'évolution de ces intensités (figure VI.17) donne un temps caractéristique d'accrochage de $60 \pm 20 \text{ s}$.

Le phénomène d'accroche d'une des protéines des membranes interne ou externe (MexB

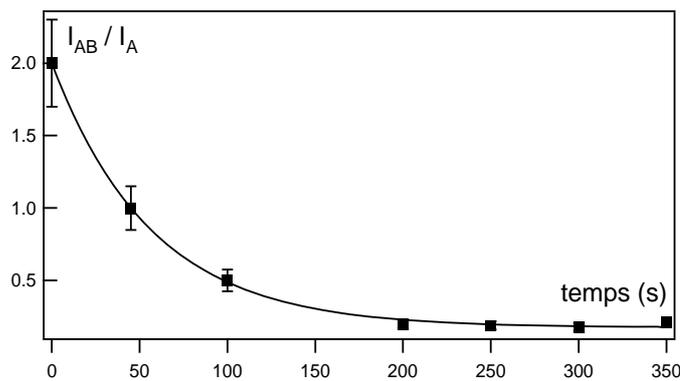


Figure VI.17: Evolution temporelle du rapport des intensités correspondant à la fraction libre de la protéine MexA par rapport à la fraction liée. L'ajustement permet d'obtenir un temps caractéristique d'accrochage de $60 \pm 20 \text{ s}$.

ou OprM) avec la protéine pérисplasmique (MexA) est donc un phénomène environ 100 fois plus rapide que la liaison entre les protéines MexB et OprM.

D'après ces résultats, on peut supposer qu'au sein de la bicouche, les accrochages de MexA précèdent la constitution d'un canal entre les deux membranes par formation d'un complexe entre MexB et OprM puisque les accrochages entre MexA et les deux autres protéines sont formés sur des temps plus courts.

VI.2.3 Rôle de MexA dans l'association entre MexB et OprM

Nous avons tenté de détecter un effet de MexA sur la dynamique de l'accrochage entre la porine de la membrane externe OprM et la protéine proto-motrice de la membrane interne MexB. Les protéines MexB et OprM interagissent dans des phases L_3 correspondant à une séparation de membranes $d_W = 200 \text{ \AA}$ et $\text{pH} = 7,5$. On réalise des échantillons avec des protéines MexB marquées et des protéines OprM non fluorescentes, chacune a une concentration de 0.2 pmol.dm^{-2} . A cette solution, on ajoute des protéines MexA de sorte que les rapports entre MexA/MexB/OprM soient respectivement de 2/3/3 ou 1/3/3. Là encore, les figures de recouvrement de fluorescence sont des doubles exponentielles qui nous permettent d'avoir accès aux poids relatifs de chacune des composantes.

Les courbes relevant le rapport entre intensité de MexB libres I_B et celle de MexB

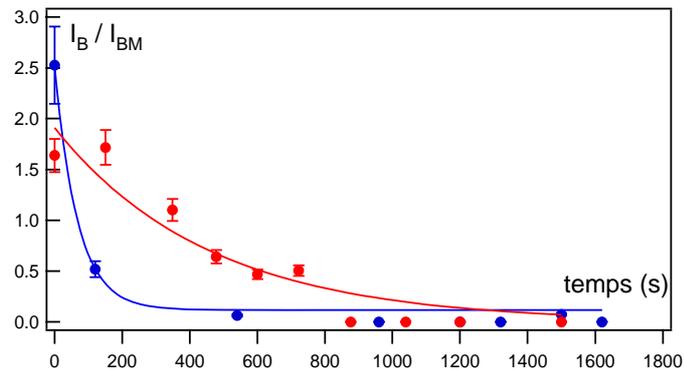


Figure VI.18: Evolution temporelle du rapport des intensités correspondant à la fraction libre de la protéine MexB par rapport à la fraction liée. Les trois protéines MexA/MexB/OprM sont présentes dans la solution. Les proportions utilisées sont 1/3/3 pour la courbe rouge et 2/3/3 pour la courbe bleue. Un ajustement exponentiel conduit à un temps caractéristique d'évolution de $710 \pm 200 \text{ s}$ pour la courbe rouge et un temps caractéristique de $70 \pm 30 \text{ s}$ pour la courbe bleue.

liées I_{BM} sont tracées en fonction du temps (figure VI.18). Ces résultats montrent que si on ajoute des protéines MexA, le complexe MexB-OprM se forme plus vite. Le temps caractéristique d'évolution est de 710 s quand les composés sont ajoutés avec une fraction relative 1/3/3 et il chute jusqu'à 70 s dans le cas d'une proportion 2/3/3 entre MexA/MexB/OprM. Dans ce dernier cas, l'estimation n'est pas précise car elle est au seuil de résolution de notre méthode. En effet, l'enregistrement d'une courbe de recouvre-

ment demande un temps qui dépend du coefficient de diffusion de l'objet. Ce temps est diminué si on choisit de petites interfranges. Nous avons travaillé ici avec des interfranges de l'ordre de $10 \mu\text{m}$. Cependant, le second coefficient de diffusion est faible. On ne peut donc pas descendre au dessous d'une cadence d'un enregistrement toutes les 120 s.

Le temps de formation du lien qui était de 5000 s est diminué de deux ordres de grandeur par addition de deux protéines MexA par trimère de OprM et de MexB. La protéine MexA accélère le processus d'amarage entre MexB et OprM. Même si nos mesures ne permettent pas de donner un schéma de montage de la pompe, on peut supposer que la protéine MexA s'accroche tout d'abord aux deux éléments MexB et OprM. Puis du fait de ces deux accrochages, les processus de rencontre entre objets ont de plus grandes chances d'avoir lieu. En effet, lorsque la protéine MexA se lie avec OprM, des ponts entre bicouches voisines sont créés. Le complexe MexA-OprM forme un obstacle que la protéine MexB peut plus facilement rencontrer.

Liaison	Concentrations	Géométrie	τ (s)	k_a
MexA _{signal} OprM	$0.2 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ 2 pmol.dm^{-2}	frontale ($d_W = 200 \text{ \AA}$)	1065 ± 100	$6.5 \cdot 10^1 \text{ mol.dm}^{-3}.\text{s}^{-1}$
MexA OprM	0.2 pmol.dm^{-2} 2 pmol.dm^{-2}	frontale ($d_W = 200 \text{ \AA}$)	< 25	$> 2 \cdot 10^{10} \text{ mol.dm}^{-2}.\text{s}^{-1}$
MexA MexB	0.2 pmol.dm^{-2} 2 pmol.dm^{-2}	latérale	< 25	$> 2 \cdot 10^{10} \text{ mol.dm}^{-2}.\text{s}^{-1}$
MexA MexB	0.2 pmol.dm^{-2} 0.2 pmol.dm^{-2}	latérale	60 ± 20	
MexB OprM	0.2 pmol.dm^{-2} 0.2 pmol.dm^{-2}	frontale ($d_W = 200 \text{ \AA}$)	5000 ± 1000	
MexB OprM MexA	0.2 pmol.dm^{-2} 0.2 pmol.dm^{-2} 0.2 pmol.dm^{-2}		710 ± 200	
MexB OprM MexA	0.2 pmol.dm^{-2} 0.2 pmol.dm^{-2} 0.4 pmol.dm^{-2}		70 ± 30	

Tableau VI.5: Tableau-Récapitulatif des résultats obtenus sur la dynamique d'association des protéines des pompes à efflux. τ désigne le temps d'évolution. Les géométries ont été obtenues au chapitre V

Nous avons résumé dans le tableau VI.5 les mesures effectuées dans cette section. La détermination des temps caractéristiques τ pour des assemblages entre protéines membranaires donne ainsi accès aux mécanismes d'associations à l'intérieur de la cellule. Le développement d'un tel outil pour les protéines membranaires est essentiel à la compréhension des processus cellulaires. Nous avons ainsi établi que les mesures de recouvrement de fluorescence donnent accès à la dynamique d'association des protéines. Nous pouvons proposer des hypothèses sur le rôle de chacune des protéines comme nous l'avons vu dans

l'amarage entre MexB et OprM qui est accéléré par la protéine MexA. D'autre part, nous pouvons estimer les distances sur lesquelles les interactions peuvent avoir lieu comme le montre la comparaison entre l'accrochage de MexA et de MexA_{signal}.

VI.3 Détermination de la constante d'équilibre du lien entre MexA et OprM

La dynamique d'une réaction d'association met en jeu deux constantes : le taux d'association k_a et le taux de dissociation k_d . Ces taux sont liés entre eux par la constante de dissociation à l'équilibre K_D par la relation :

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

Nous avons estimé le taux d'association de la liaison MexA-OprM mais nous n'avons pas de détermination précise car la formation du lien est trop rapide. Il nous faut donc accéder à la constante de dissociation à l'équilibre et au taux de dissociation pour avoir une description de cette liaison. Dans cette section, nous allons proposer des solutions pour la détermination de la constante de réaction K_{DAM} .

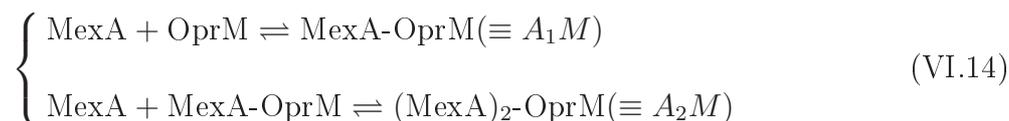
Revenons au cas d'une réaction entre une protéine et un ligand : $P + L \rightleftharpoons PL$. La constante de dissociation est obtenue en mesurant les quantités de P, de L libres et de PL :

$$K_D = \frac{[P]_{eq}[L]_{eq}}{[PL]_{eq}}$$

Les intensités sont proportionnelles aux concentrations pour les éléments fluorescents (voir section IV.2.4). En outre, nous connaissons les quantités initiales introduites dans notre solution. Comme on n'observe pas d'éléments agrégés à l'intérieur de nos solutions, nous sommes sûrs que les protéines sont bien incorporées. On peut estimer la concentration surfacique à l'équilibre de chaque composé. Nous avons eu cette démarche pour étudier les courbes de stœchiométrie au chapitre précédent.

Nous avons décidé d'étudier la constante de dissociation pour le couple OprM/MexA. Une première étude des courbes de stœchiométrie donne les informations préliminaires suivantes :

- Si l'association de 2 protéines MexA autour d'un trimère se fait sous la forme de deux réactions :



alors elles sont simultanées puisqu'on ne voit pas de palier dans la courbe pour un rapport $r_{AM} = 1$ (figure V.21 ou VI.19 qui reproduit ces résultats),

- la constante de dissociation à l'équilibre K_D est faible comparée aux concentrations des protéines à l'équivalence c'est-à-dire 10^{-13} mol.dm⁻². En effet, à l'équivalence

quand la constante de dissociation est dix fois supérieure aux concentrations des différents réactifs seulement 9 % des réactifs sont sous forme associée. Si la constante de dissociation est égale aux concentrations à l'équivalence, on en compte 38 % Pour une constante de dissociation 10 fois inférieure, 73 % de réactifs participent au complexe. Dans notre cas à l'équivalence, l'intensité de la fraction libre par rapport à celle de la fraction liée est de 0.01. Or, comme nous l'avons dit à la section V.5.3 :

$$\begin{cases} I_{A_1M} = \gamma_{A,surf}[A_1M] \\ I_{A_2M} = 2\gamma_{A,surf}\eta[A_2M] \end{cases} \quad (\text{VI.15})$$

avec $\gamma_{A,surf}$ le coefficient de proportionnalité entre intensité et concentration pour le complexe A_1M et $\eta = 0.165$ le facteur correctif tenant compte du quenching pour le complexe A_2M . Le rapport entre les concentrations de protéines MexA libres et de protéines liées est inférieur à 0.01 soit une fraction d'éléments liés supérieure à 90 %. La constante de dissociation de la liaison MexA-OprM est inférieure au dixième de la concentration à l'équivalence (soit 10^{-14} mol.dm⁻²).

D'après ces constatations, nous pouvons avancer les hypothèses suivantes. Tout d'abord, nous envisageons deux réactions simultanées traduisant l'accrochage entre MexA et OprM. Les constantes de dissociation à l'équilibre de ces deux réactions VI.14 sont donc : soit égales, soit la constante de la seconde réaction est inférieure. Nous supposons que ces deux accrochages ont la même constante d'équilibre $K_{D,AM}$. On ne considère pas l'éventualité d'un phénomène de coopération. Cette hypothèse tient au fait que nous ne pouvons pas prouver un tel phénomène. En effet, si nous faisons l'hypothèse d'une coopération, nous trouvons effectivement deux constantes de réaction K_{D,A_1M} et K_{D,A_2M} (plus le nombre de paramètres est important, plus il est facile d'obtenir un ajustement). Pourtant les valeurs obtenues ne prouveraient pas le phénomène de coopération. Nous avons préféré simplifier le problème pour ne conserver qu'une unique inconnue : la constante de dissociation à l'équilibre $K_{D,AM}$.

En second lieu, nous pourrions considérer lorsque l'un des réactifs est en défaut, que sa concentration est nulle car la constante de dissociation est faible (inférieure à 10^{-14} mol.dm⁻²).

Toutes les espèces considérées sont membranaires, toutes les concentrations sont donc des concentrations molaires surfaciques. On note x la concentration de protéines OprM consommée par la première réaction et y la concentration de protéines A_2M produite par la seconde réaction (on se référera aux équations VI.14). De cette manière, nous pouvons écrire le bilan de matière suivant pour les différentes espèces :

	MexA	OprM	A_1M	A_2M
initialement	$r_{AM}c_0$	c_0	0	0
équilibre	$r_{AM}c_0-x-y$	c_0-x	$x-y$	y

La définition de la constante d'équilibre donne les deux relations suivantes :

$$\begin{cases} K_{D,A_1M} = \frac{(r_{AM}c_0 - x - y)(c_0 - x)}{(x - y)} \\ K_{D,A_2M} = \frac{(r_{AM}c_0 - x - y)(x - y)}{y} \\ K_{D,A_1M} = K_{D,A_2M} = K_{D,AM} \end{cases} \quad (\text{VI.16})$$

Avant l'équivalence (pour r inférieure à 2), MexA est en défaut. On peut considérer que la concentration en protéine MexA libre est proche de 0, ce qui signifie que $x = r_{AM}c_0 - y$. L'équation à résoudre pour y s'écrit alors :

$$3y^2 - (1 + 3r_{AM})c_0y + r_{AM}^2c_0^2 = 0$$

On a ainsi les solutions suivantes pour x et y :

$$\begin{cases} x = \frac{c_0}{6}(3r_{AM} - 1 + \sqrt{1 + 6r_{AM} - 3r_{AM}^2}) \\ y = \frac{c_0}{6}(1 + 3r_{AM} - \sqrt{1 + 6r_{AM} - 3r_{AM}^2}) \end{cases}$$

Finalement, les concentrations des différents produits s'écrivent :

$$\begin{cases} [A] = \frac{K_{D,AM}}{2} \cdot \frac{1 + 3r_{AM} - \sqrt{1 + 6r_{AM} - 3r_{AM}^2}}{-1 + \sqrt{1 + 6r_{AM} - 3r_{AM}^2}} \\ [A_1M] = \frac{c_0}{3}(-1 + \sqrt{1 + 6r_{AM} - 3r_{AM}^2}) \\ [A_2M] = \frac{c_0}{6}(1 + 3r_{AM} - \sqrt{1 + 6r_{AM} - 3r_{AM}^2}) \end{cases}$$

Comme nous pouvons mesurer l'intensité de la fraction liée et celle de la fraction libre, nous avons accès au rapport $\frac{[A]}{[A_1M] + 2\eta[A_2M]}$ qui s'écrit avant l'équivalence :

$$\frac{[A]}{[A_1M] + 2\eta[A_2M]} = \frac{3K_{D,AM}}{2c_0} \cdot \frac{1 + 3r - \Xi}{(-1 + \Xi)((\eta - 1)(1 - \Xi) + 3r_{AM}\eta)} \quad (\text{VI.17})$$

où $\Xi = \sqrt{1 + 6r_{AM} - 3r_{AM}^2}$. Après l'équivalence (pour r supérieur à 2), la protéine OprM est introduite en défaut. On peut considérer que $x = c_0$. De cette façon, en remplaçant x par son expression, on obtient la loi de variation suivante pour y :

$$y^2 - (K_{D,AM} + r_{AM}c_0)y + (r_{AM} - 1)c_0^2 = 0$$

Ceci conduit aux concentrations suivantes pour chacune des espèces :

$$\begin{cases} [A] = \frac{1}{2}((r_{AM} - 2)c_0 - K_{D,AM} + \sqrt{(K_{D,AM} + r_{AM}c_0)^2 - 4(r_{AM} - 1)c_0^2}) \\ [A_1M] = \frac{1}{2}(-(r_{AM} - 2)c_0 - K_{D,AM} + \sqrt{(K_{D,AM} + r_{AM}c_0)^2 - 4(r_{AM} - 1)c_0^2}) \\ [A_2M] = \frac{1}{2}(r_{AM}c_0 + K_{D,AM} - \sqrt{(K_{D,AM} + r_{AM}c_0)^2 - 4(r_{AM} - 1)c_0^2}) \end{cases}$$

Finalement, la proportion de MexA libres par rapport aux protéines liées s'écrit après l'équivalence :

$$\frac{[A]}{[A_1M] + 2\eta[A_2M]} = \frac{(r_{AM} - 2)c_0 - K_{D,AM} + \Upsilon}{(r_{AM} + 2r_{AM}\eta + 2)c_0 + (2\eta - 1)(K_{D,AM} - \Upsilon)} \quad (\text{VI.18})$$

où $\Upsilon = \sqrt{(K_{D,AM} + r_{AM}c_0)^2 - 4(r_{AM} - 1)c_0^2}$. Ces deux expressions avant (équation VI.17) et après l'équivalence (équation VI.18), vont nous permettre d'ajuster nos données. Une seule inconnue intervient : la constante de dissociation $K_{D,AM}$. L'ajustement est réalisé avant l'équivalence car l'équation est plus simple.

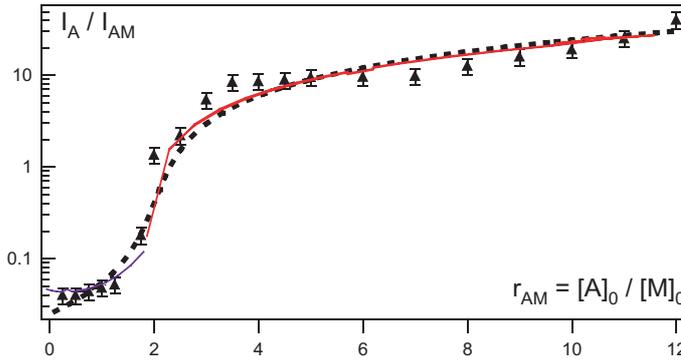


Figure VI.19: Rapport des intensités des fractions libre et liée en fonction du rapport molaire des quantités initiales en MexA et OprM : r_{AM} . Les courbes violette et rouge indiquent l'ajustement réalisé avec les formules des équations VI.17 et VI.18. La courbe en pointillés donne les résultats obtenus par la résolution numérique des équations VI.16 avec une constante de dissociation $K_{D,AM}$ de $(5 \pm 2) \cdot 10^{-15} \text{ mol.dm}^{-2}$

Il donne une valeur de la constante de dissociation de $(5 \pm 2) \cdot 10^{-15} \text{ mol.dm}^{-2}$. Si on remplace ensuite $K_{D,AM}$ par cette estimation dans la seconde partie de la courbe, on atteint des valeurs proches de nos données expérimentales comme en témoigne la figure VI.19.

Nous faisons une dernière vérification de nos hypothèses en effectuant la résolution numérique de notre système d'équations VI.16 pour des valeurs de rapport r_{AM} variant entre 0.1 et 12 et avec la valeur de $K_{D,AM}$ trouvée plus haut $(5 \pm 2) \cdot 10^{-15} \text{ mol. dm}^{-2}$. La courbe est tracée sur la figure VI.19. Nous vérifions ainsi que nos approximations pour le calcul analytique sont fondées et que la courbe tracée est proche de nos points expérimentaux.

De plus, la résolution du système VI.16 nous a permis d'estimer les concentrations de chacune des espèces MexA, A_1M et A_2M en fonction de la quantité de protéine MexA introduite. Tout d'abord, la concentration en protéines libres est très faible pour des rapports initiaux r_{AM} entre la protéine MexA et OprM inférieurs à 2 (figure VI.20). La réaction peut donc bien être considérée comme quantitative. Au-delà de cette valeur, la quantité de MexA libre augmente linéairement puisqu'aucune protéine ajoutée ne peut plus trouver de sites d'interaction avec OprM. En ce qui concerne les concentrations en

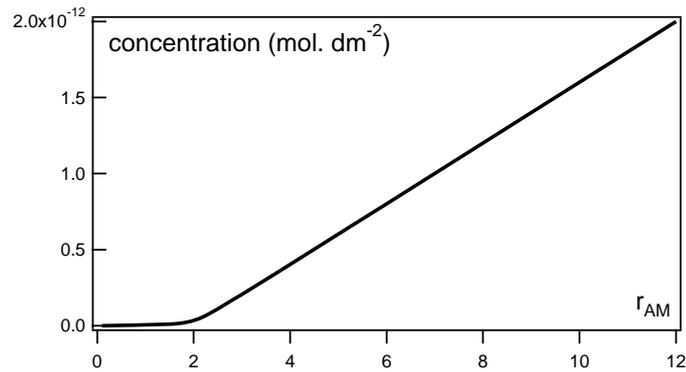


Figure VI.20: Evolution de la concentration en protéine MexA libre en fonction du rapport r_{AM} . Ces concentrations sont estimées par résolution du système d'équations VI.16 avec $K_{D,AM}=5.10^{-15}$ mol. dm⁻²

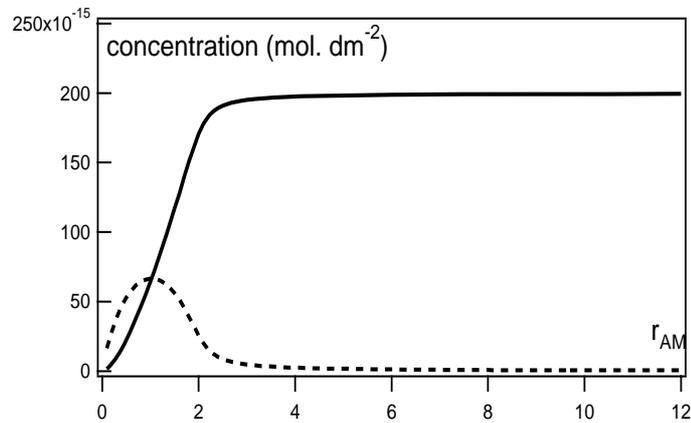


Figure VI.21: Evolution de la concentration en protéine MexA liée sous les formes A_1M (courbe en pointillés) et A_2M (courbe trait plein) en fonction du rapport r_{AM} . Ces concentrations sont estimées par résolution du système d'équations VI.16 avec $K_{D,AM}=5.10^{-15}$ mol. dm⁻².

protéines MexA associées, la figure VI.21 montre que pour des valeurs de r_{AM} inférieure à 0.5, le complexe A_1M est prépondérant puis le complexe A_2M apparaît et représente la majorité de la fraction associée de protéine MexA. Pour $r_{AM} > 2$, il s'agit de la seule espèce présente. Notre hypothèse sur la détermination de η supposait que pour de grandes valeurs de r_{AM} les protéines associées étaient sous la forme de A_2M et le reste sous la forme de protéines MexA libres. Ce calcul la vérifie.

La valeur de la constante de dissociation (5.10^{-15} mol.dm⁻²) est très faible puisqu'elle signifie que dès qu'une concentration surfacique en protéine dépasse 5.10^{-15} mol.dm⁻², la fraction de complexe est supérieure à 33%. Toutefois, nous ne pouvons pas comparer cette valeur avec d'autres car les constantes de dissociation à l'équilibre pour des espèces en surface ne sont pas mesurées par d'autres techniques.

Intéressons-nous aux implications au niveau *in vivo*. Dans une cellule bactérienne de

P. aeruginosa, Narita et al. comptabilisent environ 2500 molécules de MexA [42]. Une cellule bactérienne peut être assimilée à une ellipse de rayon $1 \mu\text{m}$. La surface de la bactérie est de l'ordre de $1.2 \cdot 10^{-21} \text{ dm}^2$. La concentration de protéines MexA est de l'ordre de 3 mol.dm^{-2} . La protéine MexA est donc uniquement sous forme associée. Cette constante d'équilibre traduit un accrochage fort entre les deux objets. Le taux de dissociation peut être déduit de l'estimation du taux d'association. Comme la réaction est rapide, nous savons que ce taux d'accrochage est supérieur à $2 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^2.\text{s}^{-1}$. Alors on atteint des taux de dissociation de cette liaison supérieurs à 10^{-4} s^{-1} c'est-à-dire des temps de dissociation inférieurs à 160 min. Les résultats présentés sur les stœchiométries sont obtenus pour des échantillons étudiés après une nuit de mise à l'équilibre. Ce temps d'attente est supérieur au temps de dissociation donc on se place bien à l'équilibre.

Finalement, l'étude des courbes de stœchiométrie renseigne sur la constante d'équilibre de l'association. L'équilibre de la liaison entre MexA et OprM possède ainsi une constante de dissociation à l'équilibre de $(5 \pm 2) \cdot 10^{-15} \text{ mol.dm}^{-2}$. Nous parvenons à mesurer les constantes pour un équilibre entre objets diffusant en surface.

VI.4 Détermination du taux de dissociation du lien entre MexA et OprM

Le temps de dissociation semble être de l'ordre de la dizaine à la centaine de minutes. Il paraît possible d'avoir accès à cette dynamique par des études de recouvrement de fluorescence résolues en temps. En effet, nous sommes parvenus à mesurer des temps d'associations à des échelles de l'ordre de la minute. Nous avons donc essayé de mesurer ce temps de dissociation pour l'assemblage entre MexA et OprM. Le principe de cette mesure sera décrit puis nous donnerons les résultats obtenus.

VI.4.1 Principe de la mesure

Tout d'abord, on prépare deux solutions de phase L_3 correspondant à une séparation entre bicouches de 200 \AA à pH 7,5. Cette phase correspond aux conditions pour lesquelles les protéines MexA et OprM interagissent. Le complexe obtenu compte deux protéines MexA par trimère de OprM. Une des solutions contient des protéines MexA et OprM dans les proportions stœchiométriques : la concentration en OprM de $1.2 \text{ pmol. dm}^{-2}$ (soit une concentration en trimère de $0.4 \text{ pmol. dm}^{-2}$) et celle de MexA fluorescentes de $0.8 \text{ pmol. dm}^{-2}$. A l'intérieur de cette phase éponge, les protéines MexA et OprM peuvent interagir de manière frontale (Chapitre V). L'autre solution contient la protéine MexA non marquée avec une concentration de 80 pmol.dm^{-2} soit une concentration 100 fois supérieure à celle du premier échantillon. Les deux solutions sont ensuite mélangées ($10 \mu\text{L}$ de l'une avec $10 \mu\text{L}$ de l'autre). On a donc au départ, des protéines MexA fluorescentes qui sont en grande partie liées à la protéine OprM. Sous l'action des fluctuations thermiques, les protéines MexA fluorescentes vont se détacher avec un temps caractéristique $\tau_{d,AM}$. Elles ont 99% de chances d'être remplacées par des protéines non fluorescentes (la concentration en éléments non fluorescents est 100 fois supérieure à celle en éléments fluorescents). La

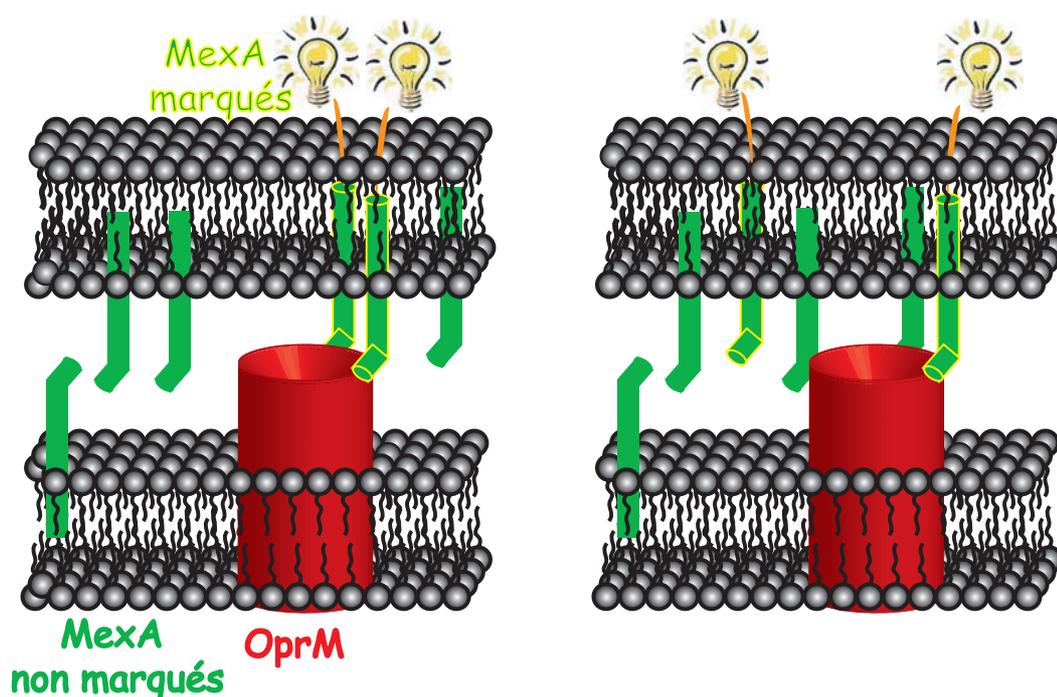


Figure VI.22: Schéma de principe de l'expérience de mesure du temps de dissociation. Dans une phase contenant le complexe entre 2 protéines MexA fluorescentes et 1 protéine OprM, on introduit des protéines MexA qui ne sont pas marquées en grande quantité. Ces protéines vont donc remplacer les protéines fluorescentes.

mesure des intensités relatives aux fractions libres et liées de MexA fluorescentes fournit une information sur la dynamique de décrochage du lien entre MexA et OprM.

VI.4.2 Résultats obtenus

Les courbes de fluorescence sont des doubles exponentielles de la forme :

$$I(t) = I_A \exp(-t/\tau_A) + I_{AM} \exp(-t/\tau_{AM})$$

avec les constantes indicées A relatives à MexA libre et celles indicées AM correspondent à MexA liée à OprM (figure VI.23). Le coefficient de diffusion de MexA libre est de $4.5 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et celui de MexA liée est de $0.6 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Peu à peu, le poids correspondant à la fraction liée diminue (figure VI.23). Au-delà de 300 minutes, les courbes sont des exponentielles simples et donnent un coefficient de diffusion de $4.5 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. La courbe donnant l'évolution des intensités relatives entre protéines liées et libres est représentée figure VI.24. Cette proportion diminue au cours du temps pour s'annuler au delà de 300 minutes. On remarque toutefois que, pour des temps courts, le rapport des intensités reste presque constant ; la diminution n'advient sensiblement que pour des temps supérieurs à 2000 s. La courbe de décroissance donne un temps caractéristique de 81 ± 4 minutes. Nous obtenons un taux de dissociation de $2 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ en accord avec l'estimation faite à la section VI.3.

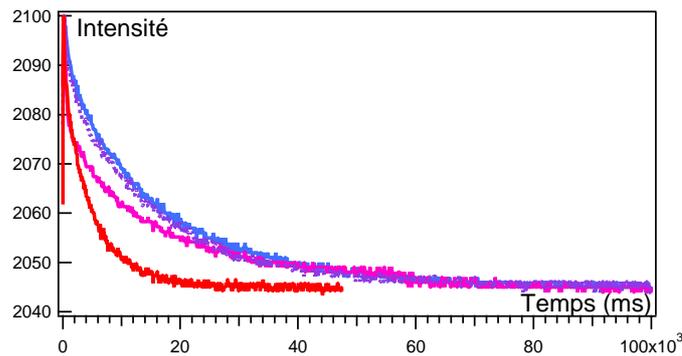


Figure VI.23: Courbes de recouvrement obtenues en fonction du temps. La courbe bleue représente la courbe obtenue pour un temps de 120 s, celle en violet pour un temps de 1000 s. La figure rose est enregistrée après 5800 s et celle en rouge après 28000 s.

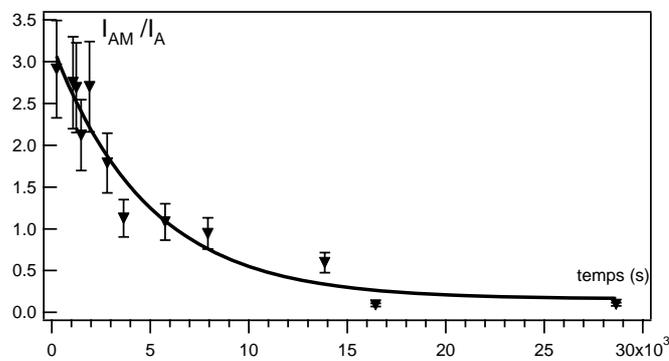


Figure VI.24: Variation du rapport des intensités entre fractions liée et libre $\frac{I_{AM}}{I_A}$ en fonction du temps. Cette courbe est ajustée par une exponentielle dont le temps caractéristique est de 4860 s

VI.4.3 Vérification numérique

Notre méthode de mesure du temps de dissociation met en jeu deux phénomènes et donc deux temps associés. Tout d'abord, comme on ajoute une grande quantité de MexA, il y a modification de l'équilibre de départ puis on a ensuite dissociation. Notre mesure suppose que le temps de mise à l'équilibre est négligeable devant le temps de dissociation. Nous avons donc essayé de vérifier cette hypothèse. Nous estimons le rapport entre des intensités. Or, dans la contribution pour la protéine MexA associée, le complexe A_2M a un rendement de fluorescence moins important (cf section V.5.3). Notre mesure n'est donc pas une mesure directe des concentrations en éléments libres et liés.

Nous avons voulu déterminer quelles étaient les concentrations des différentes espèces au cours du temps à partir des paramètres que nous avons déterminés. Nous avons utilisé la valeur de la constante de dissociation à l'équilibre $K_{D,AM} = 5 \cdot 10^{-15} \text{ mol.dm}^{-2}$, ainsi que celle du taux de dissociation noté k_{dAM} égale à $2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour en déduire la valeur du taux d'accrochage $k_{a,AM}$ qui est alors de $4 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1}.\text{dm}^2.\text{s}^{-1}$ (cette valeur est en

accord avec notre hypothèse selon laquelle le taux d'association est supérieur à $2 \cdot 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Cette réaction met en jeu les éléments suivants :

- La protéine MexA sous deux formes fluorescentes et non fluorescentes que nous noterons respectivement A^* et A .
- Le complexe entre 1 protéine MexA et 1 trimère de OprM. Il en existe deux sortes selon le marquage que nous noterons A^*M et AM .
- Le complexe entre 2 protéines MexA et 1 trimère de OprM. Trois espèces différentes existent selon leur degré de marquage, il s'agit de A_2^*M , A^*AM , A_2M .

On suppose comme au chapitre V que le phénomène de coopération est absent pour plus de simplification. L'accrochage des protéines MexA aux deux sites de OprM est indépendant et possède la même dynamique d'association. Le fait que les protéines soient marquées ne modifie pas cette dynamique.

Les équations donnant la loi d'évolution de ces différentes quantités sont donc les suivantes :

$$\left\{ \begin{array}{l}
 \frac{d[A]}{dt} = -k_{a,AM}[A]([OprM] + [AM] + [A^*M]) \\
 \quad + k_{d,AM}([AM] + [A_2M] + [A^*AM]) \\
 \frac{d[A^*]}{dt} = -k_{a,AM}[A^*]([OprM] + [A^*M] + [AM]) \\
 \quad + k_{d,AM}([A^*M] + [A_2^*M] + [A^*AM]) \\
 \frac{d[AM]}{dt} = k_{a,AM}([A][OprM] - [A][AM] - [A^*][AM]) \\
 \quad - k_{d,AM}([AM] - [A_2M] - [A^*AM]) \\
 \frac{d[A^*M]}{dt} = k_{a,AM}([A^*][OprM] - [A^*][AM] - [A][A^*M]) \\
 \quad - k_{d,AM}([A^*M] - [A_2^*M] - [A^*AM]) \\
 \frac{d[A_2M]}{dt} = k_{a,AM}[A][AM] - k_{d,AM}[A_2M] \\
 \frac{d[A_2^*M]}{dt} = k_{a,AM}[A^*][A^*M] - k_{d,AM}[A_2^*M] \\
 \frac{d[A^*AM]}{dt} = k_{a,AM}([A^*][AM] + [A][A^*M]) - 2k_{d,AM}[A^*AM]
 \end{array} \right. \quad (\text{VI.19})$$

Initialement, les quantités de protéines MexA fluorescentes libres et liées sont connues grâce à la détermination de $K_{D,AM}$. Au moment du mélange, on a ainsi $[A^*] = 3.3 \cdot 10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-2}$, $[A^*M] = 2.6 \cdot 10^{-14} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-2}$, $[A_2^*M] = 1.7 \cdot 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-2}$ et on déduit

$[M] = 3 \cdot 10^{-15} \text{ mol.dm}^{-2}$. En outre, la concentration en protéines libres non fluorescentes est de 40 pmol.dm^{-2} alors que les concentrations des autres espèces sont nulles.

On utilise un logiciel de résolution d'équations (*Mathematica*) pour obtenir l'évolution

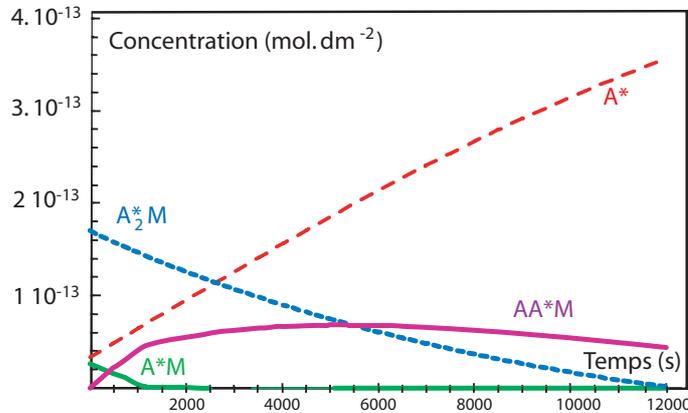


Figure VI.25: Variations temporelles des concentrations en composés fluorescents pour une valeur de constante de dissociation de $5 \cdot 10^{-15} \text{ mol.dm}^{-2}$ et un taux de dissociation de $2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

temporelle de la concentration de ces objets. L'évolution des concentrations en composés fluorescents montre (figure VI.25) que la concentration en A^* libre et en éléments AA^*M augmentent alors que celles en A^*M et en A_2^*M diminuent. En effet, on va avoir détachement d'un élément fluorescent. Il va être remplacé par un élément non fluorescent. A^*M est d'ailleurs le composé qui disparaît le plus rapidement. Puis la concentration en AA^*M atteint un plateau. Il correspond au fait que les pertes, qui équivalent à la production de A^* , sont compensées par les gains, qui correspondent à la dissociation d'un élément A^* de A_2^*M . On assiste ensuite à la saturation en protéines fluorescentes libres alors que toutes les autres contributions s'annulent. Dans ce cas, le phénomène d'association est assez rapide pour qu'on assiste à la diminution directe de la quantité de complexe A_1M . Tout élément qui quitte le complexe A_2^*M est immédiatement remplacé par une protéine non fluorescente.

Si on s'intéresse ensuite à la courbe de dissociation engendrée par un tel système, on trace le rapport :

$$\frac{[A^*M] + [AA^*M] + 2\eta[A_2^*M]}{[A^*]}$$

Ce dernier représente le rapport des intensités mesurées. On remarque sur la figure VI.26 que le temps de dissociation qui peut être déduit d'une telle courbe est de 47 minutes environ ce qui est inférieur au temps de dissociation mesuré. La mesure d'intensité que nous effectuons, ne nous permet pas de déduire un temps de dissociation de manière aussi simple que l'ajustement par une exponentielle.

Nous avons toutefois essayé de comprendre ces résultats en changeant la seule donnée qui puissent l'être c'est-à-dire le taux de dissociation $k_{d,AM}$. Nous avons essayé de corriger simplement le temps de dissociation en supposant une loi de proportionnalité entre temps caractéristique mesuré et temps de dissociation. Comme un temps de dissociation de 81 minutes conduit à une courbe ajustée par une exponentielle de 47 minutes, nous avons

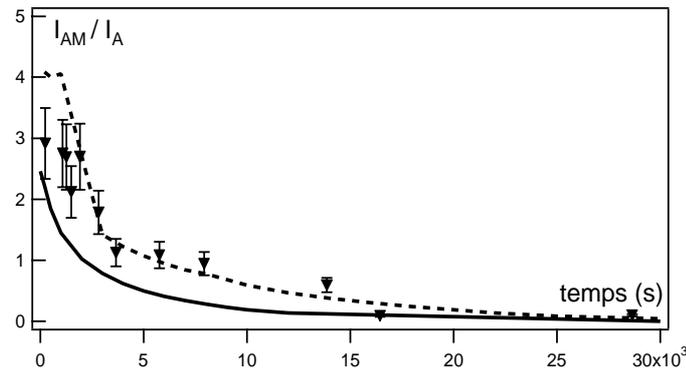


Figure VI.26: Comparaison des valeurs expérimentales de $\frac{I_{AM}}{I_A}$ en fonction du temps avec les valeurs numériques obtenues en supposant un taux de dissociation de $2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (courbe en trait plein) ou un taux de dissociation de $1.1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (courbe en traits pointillés).

supposé un temps de dissociation de 150 minutes (9000 s) c'est-à-dire un taux de dissociation de $1.1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Les estimations numériques ont donc été recommencées avec ces valeurs.

Pour les concentrations (figure VI.27), on remarque que la quantité de A^*M et A^* sont les

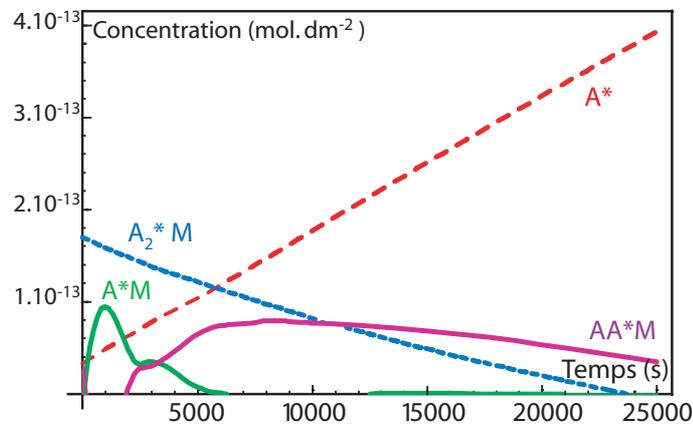


Figure VI.27: Variations temporelles des concentrations en composés fluorescents pour une valeur de constante de dissociation de $5 \cdot 10^{-15} \text{ mol.dm}^{-2}$ et un taux de dissociation de $1.1 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

seules à augmenter au départ. Puis A^*M est remplacé par AA^*M et la situation devient équivalente à celle obtenue précédemment. Il y a donc un effet de retard qui pourrait expliquer notre palier. En effet, si on considère maintenant la courbe représentative du rapport des intensités qui est déduite (figure VI.26), on remarque un palier au départ. Cette courbe théorique est proche de nos points expérimentaux.

Ainsi nous pouvons déduire de nos mesures une estimation des différentes constantes dynamiques qui interviennent dans l'accrochage entre MexA et OprM. Ces résultats sont

présentés dans le tableau VI.6.

Constante	Unités	Méthode	Valeur
$K_{D,AM}$	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-2}$	Ajustement des courbes de stœchiométrie	$(5 \pm 2) 10^{-15}$
$k_{d,AM}$	s^{-1}	Estimation du temps de dissociation	$\sim 1.1 10^{-4}$
$k_{d,AM}$	s^{-1}	Mesure à partir de la liaison MexA _{signal} -OprM	$(1.5 \pm 0.7) 10^{-4}$
$k'_{a,AM}$	$\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	Estimation du temps caractéristique d'évolution	$> 2 10^{10}$
$k'_{a,AM}$	$\text{mol}^{-1} \cdot \text{dm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	Définition $k_a = \frac{k_d}{K_d}$	$2.2 10^{10}$

Tableau VI.6: Valeurs obtenues dans ce chapitre pour les mesures des différentes constantes dynamiques de la liaison MexA-OprM

La détermination du taux de dissociation n'est pas évidente. Le modèle que nous avons proposé n'est pas valable. Cependant, la valeur de cette constante est accessible à partir des mesures d'intensité. Il faudrait développer un programme d'ajustement pour y parvenir.

Toutefois, nous nous sommes focalisés sur l'étude d'un cas complexe qui est la dissociation d'un élément d'un complexe qui met en jeu deux protéines MexA pour un trimère de protéines OprM. La dynamique sera certainement simplifiée si on étudie une interaction entre une protéine et une autre, c'est-à-dire un assemblage avec une stœchiométrie 1/1. En outre, si un seul élément est accroché, les mesures sont rendues plus faciles puisque rapports des concentrations et des intensités relatives sont égaux. Temps de dissociation et temps d'ajustement sont alors égaux du moins tant que les cinétiques d'association sont plus rapides que celles de dissociation.

Cependant, nous avons essayé d'accéder à des temps de dissociations en modifiant notre système de telle sorte que l'association ne soit plus possible.

VI.5 Mesure de temps de rupture d'une liaison soumise à une force constante

Nous avons essayé de mesurer la dynamique de dissociation d'un lien sous l'effet de l'application d'une force constante. Nous verrons au chapitre suivant comment le Biomembrane Force Probe permet d'accéder à des informations sur un lien soumis à une rampe de force. Pour cela, nous avons utilisé l'enregistrement de courbes de recouvrement de fluorescence résolues en temps. En effet, nous avons établi ci-dessus que des informations dynamiques pouvaient être obtenues grâce à l'étude des courbes de recouvrement de fluorescence en fonction du temps. Nous avons pu préciser l'évolution temporelle.

Dans cette section, nous avons mesuré au cours du temps l'évolution des populations de

protéines MexA libres et liées à des protéines OprM sous l'action d'une force exercée sur le lien. Il s'agit d'une force élastique exercée par la membrane. Nous présenterons tout d'abord le principe de cette expérience.

VI.5.1 Principe

Les protéines MexA fluorescentes sont mélangées avec des protéines OprM non fluorescentes dans une phase éponge correspondant à une séparation entre bicouches d_W de 200 Å. Pour cette valeur de d_W , les protéines interagissent en configuration frontale. Le pH utilisé est égal à 7.5. Les protéines MexA sont introduites à raison de 2 protéines MexA pour chaque trimère de OprM (qui représente la stœchiométrie déterminée à ce pH au chapitre précédent). Les concentrations protéiques sont donc de $4 \cdot 10^{-13} \text{ mol.dm}^{-2}$ et de $2 \cdot 10^{-13} \text{ mol.dm}^{-2}$ pour MexA et pour les trimères de OprM respectivement. Toutes les protéines dont nous parlerons ici sont membranaires, les concentrations sont donc des concentrations molaires surfaciques. Dans cette phase, une grande majorité de protéines MexA sera associée à OprM selon les conclusions des chapitres précédents. L'état initial de notre système correspond donc à des protéines MexA liées à des protéines OprM à raison de 2 protéines MexA autour d'un trimère de OprM.

Une solution S2 (voir Annexe B) est ajoutée à différentes fractions dans les différents échantillons. L'addition de cette solution ne modifie pas la constitution des membranes mais joue sur leur fraction volumique ϕ : la distance de séparation entre les bicouches d_W augmente et le lien entre les protéines MexA et OprM est sous tension (figure VI.28). Nous avons supposé que l'ensemble membrane-protéine pouvait être considéré comme un ressort de raideur k .

Dans cette expérience, l'écart par rapport à la distance $d_{W0} = 200 \text{ Å}$ (cf V.3), noté z ($= d_W - d_{W0}$), varie entre 10 et 105 Å.

Sous l'effet de cette force, les protéines MexA vont se décrocher de la protéine OprM (figure VI.28). Une fois libres, ces protéines ne pourront pas se réassocier car pour des distances entre bicouches supérieures à 210 Å, nous avons montré qu'aucun accrochage n'est possible (cf V.3).

Les réactions mises en jeu sont donc les suivantes :



On considère que même si une protéine reste accrochée, les déformations de la membrane ne sont pas suffisantes pour permettre un accrochage. C'est pourquoi la première équation n'est pas un équilibre. Les notations des chapitres précédents sont reprises ce qui signifie que A_1M désigne la protéine MexA liée à un trimère de OprM et A_2M représente le complexe entre 2 protéines MexA et un trimère de OprM. On pose A la protéine MexA et M le trimère de OprM. Comme dans les sections précédentes VI.3 et VI.4, nous supposons que chacune de ces dissociations est gouvernée par un même taux de dissociation $k_{dAM}(f)$. Ce taux de dissociation est une fonction de la force f exercée sur le lien qui dépend de l'écartement z des bicouches par rapport à la position $d_{W0} = 200 \text{ Å}$. Nous faisons ici l'hypothèse que les deux protéines MexA déforment de manière identique la membrane et

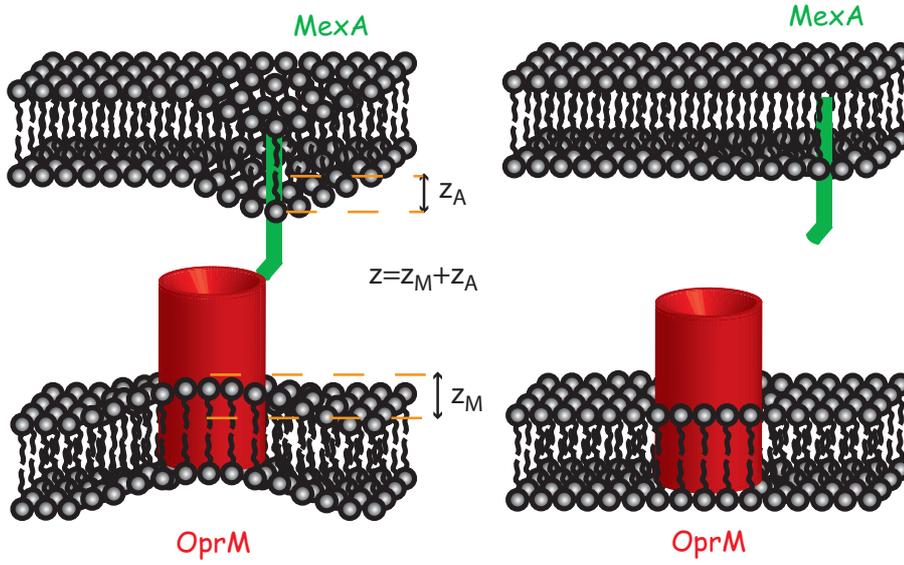


Figure VI.28: Le lien entre les protéines MexA et OprM est formé puis mis sous tension en séparant les bicouches. Sous l'action de la force de rappel exercée par la membrane. Les protéines vont se détacher. On mesure le recouvrement de fluorescence des protéines MexA qui vont passer d'un état lié à un état libre.

qu'elles participent toutes deux à l'élasticité de l'ensemble (cette hypothèse sera justifiée par la suite). Nous avons aussi envisagé le cas où la force exercée sur le complexe A_2M est égale à la moitié de celle exercée sur A_1M du fait de deux points d'ancrage et les résultats obtenus sur les constantes de dissociations sont très proches mais moins précis (voir annexe F). Les équations d'évolution pour chacune des espèces MexA, A_1M et A_2M du système s'écrivent donc :

$$\begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = k_{dAM}(f) \cdot ([A_1M] + [A_2M]) \\ \frac{d[A_1M]}{dt} = k_{dAM}(f) \cdot ([A_2M] - [A_1M]) \\ \frac{d[A_2M]}{dt} = -k_{dAM}(f) \cdot [A_2M] \end{cases} \quad (\text{VI.21})$$

On note avec un indice 0 les quantités de protéines au début de notre expérience c'est-à-dire au moment où on écarte les bicouches. Selon les résultats obtenus pour la détermination de K_{DAM} (section VI.3) sur les constantes à l'équilibre, nous avons donc au temps $t=0$, la répartition suivante :

- $[A]_0 = 3.3 \cdot 10^{-14} \text{ mol.dm}^{-2}$,
- $[A_1M]_0 = 2.6 \cdot 10^{-14} \text{ mol.dm}^{-2}$,
- $[A_2M]_0 = 1.7 \cdot 10^{-13} \text{ mol.dm}^{-2}$.

L'équation d'évolution VI.21 de la concentration en A_2M conduit à la loi d'évolution suivante :

$$[A_2M](t) = [A_2M]_0 \exp(-k_{dAM}(f) \cdot t) \quad (\text{VI.22})$$

Ce résultat est injecté dans l'équation d'évolution de la quantité $[A_1M]$ pour obtenir l'équation suivante :

$$\frac{d[A_1M]}{dt} + k_{dAM}(f) \cdot [A_1M] = k_{dAM}(f)[A_2M]_0 \exp(-k_{dAM}(f) \cdot t)$$

Son intégration, en tenant compte des conditions initiales, donne :

$$[A_1M](t) = ([A_1M]_0 + [A_2M]_0 \cdot k_{dAM}(f) \cdot t) \exp(-k_{dAM}(f) \cdot t) \quad (\text{VI.23})$$

La concentration en MexA est obtenue par integration de la quantité $k_{dAM} \cdot ([A_1M](t) + [A_2M](t))$. Finalement d'après les résultats VI.23 et VI.22, la loi d'évolution de la concentration en protéines MexA s'écrit :

$$[A](t) = \left\{ -([A_1M]_0 + 2[A_2M]_0) - [A_2M]_0 \cdot k_{dAM}(f) \cdot t \right\} \exp(-k_{dAM}(f) \cdot t) + [A]_0 + [A_1M]_0 + 2[A_2M]_0 \quad (\text{VI.24})$$

Les intensités de recouvrement de fluorescence sont ajustées par une double exponentielle et donnent accès à deux intensités distinctes : celle relative aux éléments libres I_A et celle correspondant aux protéines MexA liées I_{AM} . On ne peut distinguer les contributions des complexes protéiques avec 1 ou 2 MexA par trimère de OprM. En outre, nous avons établi que la contribution du complexe A_2M était sous-estimée et qu'il fallait en tenir compte en utilisant un facteur correctif $\eta = 0.165$ pour cette fraction (voir la section V.5.3). Le rapport entre ces deux intensités $\frac{I_{AM}}{I_A}$ est proportionnel à $\frac{[A_1M] + 2\eta[A_2M]}{[A]}$.

Selon les équations VI.22, VI.23 et VI.24, la dépendance temporelle de ce rapport est :

$$\frac{[A_1M] + 2\eta[A_2M]}{[A]} = \frac{([A_1M]_0 + 2\eta[A_2M]_0 + [A_2M]_0 \cdot k_{dAM}(f) \cdot t) \exp(-k_{dAM}(f) \cdot t)}{\left\{ -\gamma_0 - [A_2M]_0 \cdot k_{dAM}(f) \cdot t \right\} \exp(-k_{dAM}(f) \cdot t) + \sigma_0} \quad (\text{VI.25})$$

où

$$\sigma_0 = [A]_0 + [A_1M]_0 + 2[A_2M]_0 \quad \text{et} \quad \gamma_0 = [A_1M]_0 + 2[A_2M]_0$$

Dans cette équation, un seul paramètre est inconnu : le taux de dissociation $k_{dAM}(f)$. L'inverse de ce taux donne le temps de dissociation de la liaison $\tau_{d,z}$ qui dépend lui aussi de la force et donc de l'écartement z .

L'enregistrement des courbes de recouvrement de fluorescence permet donc la détermination de la dynamique de décrochage sous l'effet d'une force élastique constante.

VI.5.2 Mesure dynamique de détachement du lien MexA-OprM

Temps de dissociation obtenu pour une distance de 210 Å entre les bicouches

Les courbes de recouvrement de fluorescence de la protéine MexA en fonction du temps font apparaître deux exponentielles (figure VI.29). Au temps $t=0$ après préparation de

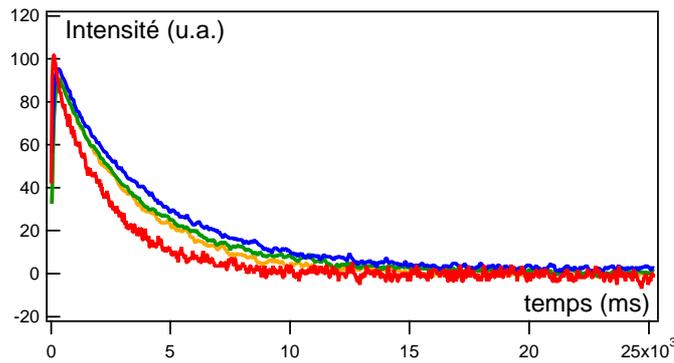


Figure VI.29: Intensités de recouvrement de fluorescence obtenues à différents instants. Ces intensités sont renormalisées de manière à pouvoir les comparer. De droite à gauche, la courbe bleue est obtenue après un temps de 120s, la courbe verte après 7800 s, la courbe orange après 10^4 s et la courbe rouge après $1.7 \cdot 10^4$ s.

l'échantillon, I_{AM} est très supérieure à I_A . A mesure que le temps augmente, la composante I_A devient plus importante. Ceci correspond à une augmentation de la concentration en protéines MexA libres. Au bout de 200 minutes, les courbes sont de simples exponentielles dont la constante de diffusion correspondante est de $4.5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (courbe rouge de la figure VI.29).

Le rapport des intensités $\frac{I_{AM}}{I_A}$ est relevé en fonction du temps (figure VI.30). La

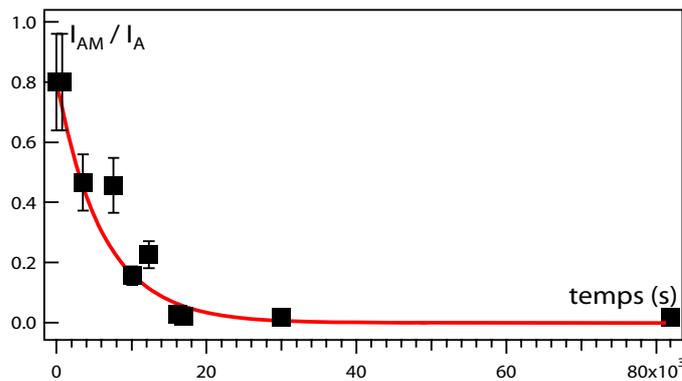


Figure VI.30: Variation du rapport des intensités I_{AM} et I_A en fonction du temps d'enregistrement des courbes de recouvrement pour un échantillon correspondant à un écartement z de 10 \AA . La courbe en trait plein donne l'ajustement par la formule VI.25. Cet ajustement conduit à un temps de dissociation de 6000 ± 800 s.

décroissance a lieu sur des échelles de temps importantes. L'ajustement avec l'équation VI.25 fournit une valeur du temps de dissociation $\tau_{d,10} = 6200 \pm 800$ s (figure VI.30).

Variation de $\tau_{d,z}$ en fonction de l'écart z

En faisant varier l'écartement d_W entre les bicouches, on varie la force exercée sur la liaison MexA-OprM. On constate que ce temps de décrochage diminue quand l'écartement entre les bicouches augmente. Ainsi pour une valeur de z égale à 29 \AA , le temps de dissociation $\tau_{d,29}$ est de $1740 \pm 150 \text{ s}$ (figure VI.31). D'après la théorie développée par Kramers [149]

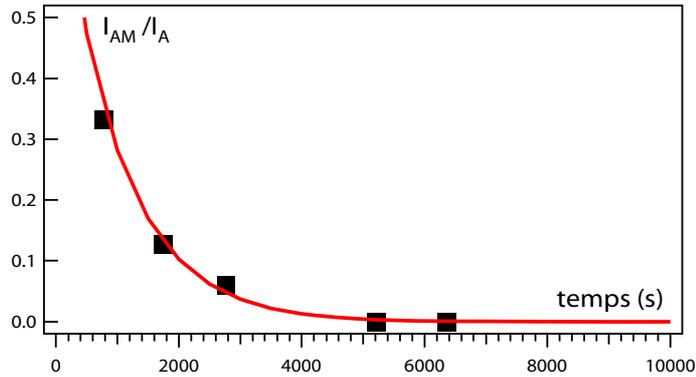


Figure VI.31: Variations du rapport des intensités I_{AM} et I_A en fonction du temps d'enregistrement des courbes de recouvrement pour un échantillon correspondant à un écartement z de 29 \AA . La courbe en trait plein rouge donne l'ajustement par la formule VI.25. Cet ajustement donne un temps de dissociation de $1740 \pm 150 \text{ s}$.

puis par Evans [158], le temps de décrochage entre deux objets soumis à une force f s'écrit :

$$\tau_{d,z} = \tau_0 \exp\left(\frac{E - fx_a}{k_B T}\right) = \tau_0 \exp\left(\frac{E - k \cdot z \cdot x_a}{k_B T}\right) \quad (\text{VI.26})$$

où x_a est la position du puits de potentiel, E désigne l'énergie de liaison du lien et f représente la force exercée par la membrane sur le lien. Dans le cas qui nous intéresse, cette force peut être modélisée comme une force de rappel élastique. On désigne par k la constante de raideur de l'ensemble constitué par les protéines et la membrane (figure VI.33).

Nous avons tracé les temps de dissociation obtenus pour différentes valeurs d'écartements $z = d_W - d_{W0}$ (figure VI.32). Les valeurs de $\tau_{d,z}$ sont ajustées par une courbe exponentielle. Le modèle de Evans proposé VI.26 peut donc expliquer nos données.

La valeur extrapolée en $z=0$ est égale à $8800 \pm 500 \text{ s}$. La valeur établie lors des mesures faites sur les temps de dissociation à la section VI.4 est donc retrouvée puisque un temps de dissociation de 9100 s avait été déterminé (ce point est d'ailleurs ajouté sur la figure VI.32 pour comparaison). Cependant, la mesure que nous venons d'effectuer est plus facile. Le traitement des courbes de variation des rapports d'intensité en fonction du temps est plus direct.

Nous avons alors un moyen pour déduire un temps de dissociation en l'absence de force à partir de l'examen des courbes de recouvrement de fluorescence résolue en temps.

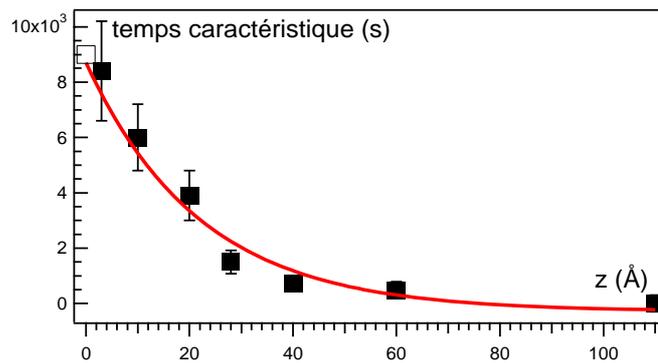


Figure VI.32: Variations du temps de dissociation $\tau_{d,x}$ en fonction de l'écartement z par rapport à $d_{W0} = 200 \text{ \AA}$. Ces mesures sont ajustées par une exponentielle décroissante (trait continu rouge). Le carré vide donne le temps de dissociation obtenu à la section VI.4.

VI.5.3 Constante de raideur

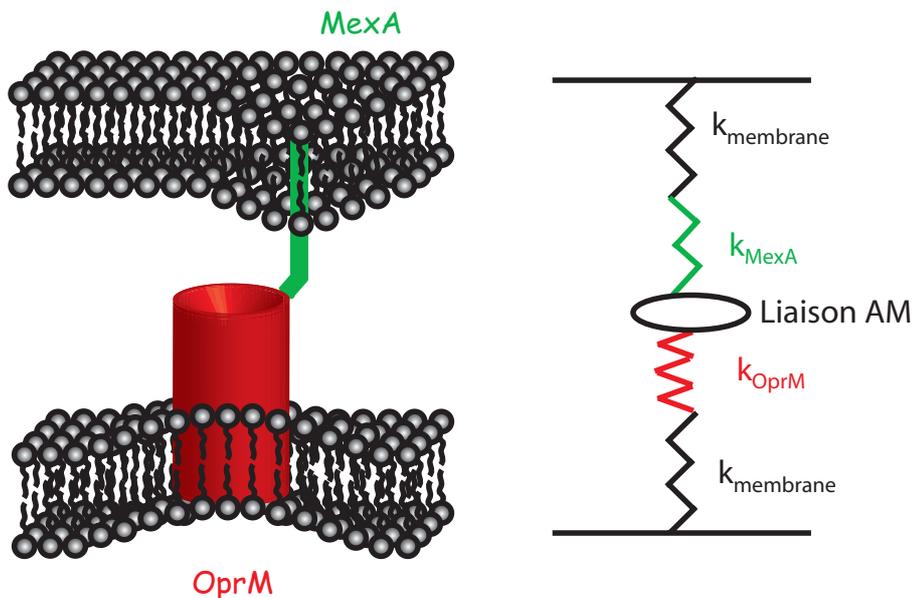


Figure VI.33: Modélisation sous forme de ressorts de la situation de la mesure. Chaque élément(membrane et protéines) peut être considéré comme un ressort de raideur k qui applique une force sur la liaison

Nous avons établi que la loi de variation du temps de rupture en fonction de l'écartement imposé était de la forme :

$$\tau_{d,z} = \tau_{d,0} e^{-\xi z}$$

avec

$$\xi = \frac{kx_a}{k_B T}$$

On obtient une valeur de ξ de $(4.5 \pm 0.1) 10^{-2} \text{ \AA}^{-1}$. On a ainsi une estimation du rapport $\frac{k_B T}{k x_a}$ qui est de 22.1 \AA (figure VI.32).

Nous allons essayer d'estimer la constante de raideur k du ressort équivalent à l'ensemble membrane-protéine. x_a représente la largeur du puits énergétique (figure VI.14). Nous avons vu dans la section V.3 que pour des écarts supérieurs à 5 \AA par rapport à d_{W0} , l'accrochage n'a plus lieu. x_a a donc une valeur inférieure à 5 \AA . Nous avons donc supposé que x_a était égal à 5 \AA . En effet, cette discussion n'a pas pour but de donner une valeur exacte de la constante de raideur mais bien de comparer des ordres de grandeur. Cette hypothèse conduit à une valeur de constante de raideur pour le couple membrane-protéine de l'ordre de 3.6 mN/m .

Essayons d'avoir une estimation de la raideur totale par un autre moyen. Tous les éléments, membrane comme protéines, peuvent être envisagés comme des ressorts de raideur k_i différentes. Ces ressorts sont associés en série (figure VI.33). La raideur équivalente se déduit de :

$$\frac{1}{k} = \sum_i \frac{1}{k_i} = \frac{1}{k_{MexA}} + \frac{1}{k_{OprM}} + \frac{2}{k_{membrane}} \quad (\text{VI.27})$$

Calculons tout d'abord la raideur équivalente de la protéine MexA. Cette protéine est flexible [40]. Vaccaro et al. ont fait des simulations de dynamiques moléculaires et on trouvé que l'angle entre les deux segments de la protéine peut varier de 15° sous l'effet de l'agitation thermique. Cette variation angulaire conduit à une variation en longueur $\Delta\ell$ de 15 \AA autour de sa position d'équilibre. On peut estimer que l'énergie thermique est donc égale à l'énergie du ressort soit :

$$\frac{1}{2} k_{MexA} (\Delta\ell)^2 \approx k_B T$$

La constante de raideur équivalente est alors de l'ordre de $k_{MexA} = 4 \text{ mN/m}$.

En ce qui concerne la protéine OprM, aucune donnée sur sa flexibilité n'a été publiée. Toutefois, une étude sur les modes normaux de cette protéine est en cours au Laboratoire de RMN et Cristallographie Biologiques. Elle est menée par Gilles Phan. Dans l'attente de ces résultats, nous supposons en première approximation cette raideur infinie.

Nous devons maintenant considérer la membrane. Des mesures de microscope à force atomique (AFM) ont été réalisées sur des lipides posés sur une surface percée de trous [4]. La pointe d'AFM est utilisée pour appuyer sur la membrane perpendiculairement à sa surface. Ces mesures permettent d'accéder à un module d'Young à deux dimensions de 0.2 N/m . Cette valeur donne une première estimation de la constante de raideur de la membrane. Des expériences ont été faites sur des vésicules lipidiques [151] [152] [153]. Une bille maintenue au moyen de pinces optiques est attachée sur un vésicule. La bille est ensuite tirée de manière à créer un tube. Pour des tubes qui sont inférieurs à $0.5 \mu\text{m}$ de longueur, la courbe force-longueur est linéaire. On obtient une pente de 0.24 N/m . Ces deux expériences donnent des valeurs proches pour la valeur de la constante de raideur d'une membrane lipidique. Cependant une bicouche lipidique a un module de rigidité supérieure à celui d'une bicouche de tensioactif. Les valeurs obtenues pour les lipides sont $\kappa_{lipides} \sim 10 - 50 k_B T$ alors que pour la bicouche de C12E5/ β -OG nous avons mesuré $\kappa = 0.6 k_B T$ au chapitre III. D'après Landau [58], le module de rigidité est directement

proportionnel au module d'Young à deux dimensions. Ainsi, une estimation de la constante de raideur de la bicouche est comprise entre 2.4 et 12 mN/m. Finalement, en reprenant l'équation VI.27, la constante de raideur de l'ensemble membrane-protéine est estimée à $k = 1-3$ mN/m. Cette gamme de valeurs est donc proche de celle que nous avons évalué grâce à l'étude des variations des temps de dissociations en fonction de l'écart z . Ces deux estimations sont du même ordre de grandeur, ceci valide notre raisonnement. Pour améliorer ce dernier, il faudrait tout d'abord pouvoir accéder à une mesure de x_a . Une des déterminations possibles de cette valeur utilise la spectroscopie dynamique de force et l'analyse de Evans. Toutefois cette méthode est contestée [156] et les résultats obtenus ont une incertitude importante. En outre, il faudrait parvenir à mesurer la constante de raideur de la membrane pour une bicouche de tensioactifs. L'utilisation de la technique d'AFM serait envisageable pour cela. Enfin la détermination de la rigidité de la protéine OprM devrait donner des résultats intéressants.

En conclusion, nous avons réalisé un système qui applique une force constante sur une liaison de manière à obtenir des temps de rupture d'un lien dans un milieu modèle de bicouches. Nos mesures montrent que l'on peut accéder ainsi aux temps de dissociation des objets. Cette mesure du temps de dissociation sous contrainte est plus précise que l'estimation que l'on pouvait faire en utilisant un remplacement de molécules fluorescentes par des molécules non fluorescentes (section VI.4). Elle est surtout plus simple puisque les déplacements d'équilibre et les réassociations ne sont pas à prendre en compte. Le résultat extrapolé à un écartement z nul donne une bonne estimation des temps de dissociation. De plus, cette mesure permet de déduire une raideur équivalente à l'association membrane-protéine qui concorde avec les estimations de la valeur de la rigidité de la bicouche.

Conclusion

L'importance de la compréhension des mécanismes à l'intérieur de la membrane des cellules n'est pas à démontrer. Or, les dispositifs permettant d'y avoir accès sont peu nombreux. En ajoutant une composante temporelle à l'enregistrement de courbes de recouvrement de fluorescence, on peut avoir accès à la dynamique de l'association entre objets et ainsi aux taux d'association et de dissociation de protéines à deux dimensions. En outre, les études stœchiométriques renseignent sur les constantes d'équilibre.

Essayons de donner les limites de l'analyse que nous avons développée. Avec notre méthode, nous parvenons à mesurer des temps d'associations ou de dissociations s'ils sont supérieurs à 60 s. Les concentrations minimales utilisables sont de l'ordre de $0.1-1$ pmol.dm² pour avoir un bon signal de recouvrement. Les taux d'associations sont donc mesurables tant qu'ils sont inférieurs à $10^{10}-10^{11}$ mol⁻¹.dm².s⁻¹. Les taux de dissociations sont mesurables tant qu'ils sont inférieurs à 10^{-2} s⁻¹ puisque la limite de résolution temporelle est de l'ordre de la minute soit 60 s.

Nous avons pu dresser un bilan sur la dynamique du lien entre MexA et OprM. Les constantes obtenues sont rappelées dans le tableau VI.6. Pour compléter la description de la pompe à efflux, il aurait fallu faire la même étude sur les liaisons MexA-MexB ou MexB-OprM. Toutefois, nous n'avons pas eu le temps de réaliser ces mesures.

Chapitre VII

Energie de liaison

Dans les chapitres précédents, nous avons caractérisé l'interaction entre les protéines MexA et OprM. D'un point de vue statique, nous avons déterminé la stœchiométrie et la géométrie de leur assemblage. D'un point de vue dynamique, nous avons mesuré les temps de formation et de dissociation du complexe. Cependant, ces résultats ne fournissent pas d'informations sur les forces entre ces deux protéines. Dans ce chapitre, nous donnerons les résultats que nous avons obtenus sur les mesures d'énergies de la liaison MexA-OprM.

VII.1 Principe

Dans cette partie, nous allons tout d'abord décrire le principe de notre mesure puis nous discuterons les résultats obtenus. A la section V.5.3, nous avons vu que nous pouvions atteindre une constante de dissociation à l'équilibre pour la liaison entre les protéines MexA et OprM.

Dans le cas général d'une interaction entre une protéine P et son ligand L qui réagissent en solution :



La constante de dissociation à l'équilibre K_D a pour expression quand le ligand est en excès [155] :

$$K_D = \frac{1}{V_m} \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) \quad (\text{VII.1})$$

avec V_m le volume molaire du ligand et E l'énergie de liaison de P-L.

Pour des protéines P1 et P2 qui diffusent en surface et interagissent, on peut raisonner par analogie. L'expression de la constante de dissociation du système s'écrit :

$$K_D = \frac{1}{S_m} \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) \quad (\text{VII.2})$$

où S_m désigne une aire caractéristique du problème. Il est en effet raisonnable de penser que la dépendance de la constante de dissociation en fonction de la température est la même. La phase éponge que nous utilisons est stable entre 6 et 30 °C. Ainsi on peut accéder aux variations avec la température des constantes de dissociation à l'équilibre. On vérifiera que ces variations présentent bien une dépendance exponentielle en fonction de $\frac{1}{k_B T}$. La pente permettra alors d'atteindre la valeur de l'énergie de liaison.

VII.1.1 Variation avec la température

Des protéines MexA fluorescentes sont mélangées avec des protéines OprM. On définit r_{AM} le rapport molaire entre les quantités initiales respectives de chacune de ces protéines : $r_{AM} = \frac{n_{A0}}{n_{M0}}$. Ce rapport est varié entre 0.1 et 12. Les échantillons sont placés une nuit dans une enceinte thermostatée.

Les figures de recouvrement sont des doubles exponentielles comme nous l'avons vu à la section V.5.3 :

$$I_A e^{-t/\tau_A} + I_{AM} e^{-t/\tau_{AM}}$$

L'intensité I_A se rapporte à une composante dont le coefficient de diffusion est rapide à $4.2 \pm 1 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Cette intensité correspond à la population de protéines MexA libres. L'intensité I_{AM} se rapporte à une composante dont le coefficient de diffusion est égal à $0.5 \pm 0.3 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$. Cette intensité correspond à la population de protéines MexA liées avec la protéine OprM.

Le rapport des intensités I_A/I_{AM} est relevé en fonction du rapport molaire r_{AM} . Ce rapport est proportionnel au rapport des quantités de protéines MexA libre et liée. Cette démarche est réalisée pour différentes températures (figure VII.1).

Tout d'abord, on remarque pour ces courbes la présence d'un saut important correspondant à $r_{AM}=2$. Nous avons interprété ce saut à la section V.5.3 comme le saut à l'équivalence. On observe que la position du point d'équivalence n'est pas modifiée dans la gamme de température étudiée.

Pour des valeurs de r_{AM} supérieures à 2, nous pouvons voir que les résultats de I_A/I_{AM} sont très proches quelle que soit la température. Cette zone du graphique correspond à un nombre de protéines MexA introduites en excès. Nous avons vu à la section V.5.3 que toutes les protéines OprM réagissaient et que la concentration en protéines MexA libres augmentait linéairement pour de telles valeurs de r_{AM} . Ceci est dû à la faible valeur de K_D . Ainsi quelle que soit la température, la constante K_D reste faible.

A mesure que la température de l'échantillon est augmentée, le saut qui marque l'équivalence est moins important. En effet, les valeurs obtenues avant l'équivalence sont plus importantes quand la température est augmentée (figure VII.1). La constante de dissociation qui en découle est donc plus grande.

Pour déterminer la constante de dissociation $K_D(T)$ à chaque température, on utilise la méthode décrite à la section V.5.3. Les variations de la constante de dissociation en fonction de la température sont résumées dans la figure VII.2. L'ajustement des données expérimentales par l'expression VII.2 est satisfaisant. Il permet de déduire :

- une énergie E de $11 \pm 3 k_B T$ à partir de la valeur de la pente.
- une surface molaire S_m de $(3.6 \pm 2.3) 10^8 \text{ dm}^2.\text{mol}^{-1}$ à partir de l'ordonnée à l'origine

Tout d'abord, l'énergie de liaison E trouvée par cette méthode est de $11 \pm 3 k_B T$. D'autre part, la surface molaire S_m permet de déduire une surface par molécule S de $(5 \pm 3) 10^{-15} \text{ dm}^2$ ($S = S_m/\mathcal{N}_a$ avec \mathcal{N}_a le nombre d'Avogadro). Le rayon équivalent si on suppose que cette surface est un disque est de $(40 \pm 30) \text{ \AA}$. Ce rayon est de l'ordre de grandeur du rayon du segment périplasmique de OprM (30 \AA) ou de celui de la protéine MexA (30 \AA). Nous ne connaissons pas la signification physique de ce rayon. Il est cependant raisonnable

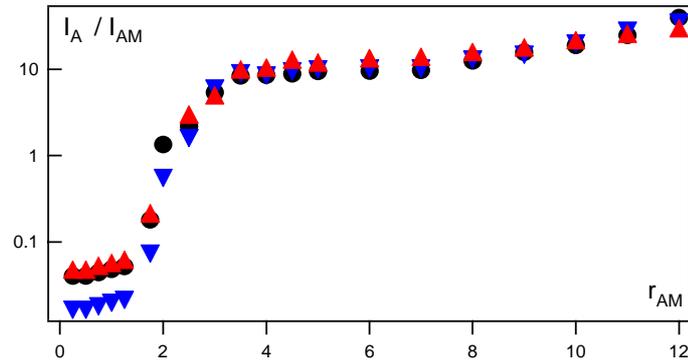


Figure VII.1: Evolution du rapport des intensités correspondant aux fractions libres et liées en fonction du nombre de protéines MexA introduites dans l'échantillon par trimère de OprM. Ce rapport est étudiée pour différentes températures. Les disques noirs rappellent les résultats obtenus pour une température de 293 K. Les résultats obtenus pour une température de 300 K sont représentés par les triangles rouges et ceux pour une température de 283 K par les triangles inversés bleus.

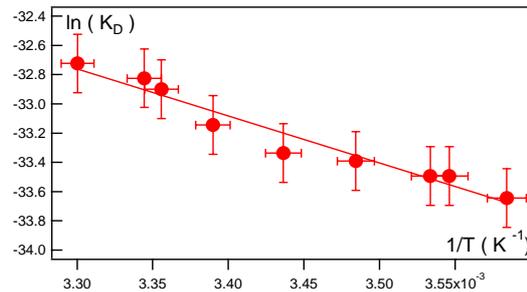


Figure VII.2: Variation de la constante de dissociation avec la température. Les données sont ajustées par la formule VII.2. On a $\ln(K_D) = a + b/T$ avec $a = -22 \pm 1$ et $b = -3200 \pm 500$ K

de supposer qu'il est à mettre en rapport avec la taille des objets. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait recommencer cette approche pour des ligands de rayons différents. Les constantes de dissociation à l'équilibre ne sont mesurées par aucune autre méthode. Les ordres de grandeur de ces constantes sont donc difficiles à interpréter.

Ainsi, nous sommes parvenus à mesurer la variation de la constante de dissociation du lien en fonction de la température. Ces variations permettent de déduire une valeur de l'énergie de liaison d'un lien. En outre, l'expression de cette constante de réaction fait apparaître une surface. L'ordre de grandeur de celle-ci est en bon accord avec les caractéristiques du problème. La mesure d'énergie de liaison de deux protéines transmembranaires effectué par FRAPP est rapide et simple à mettre en œuvre.

Lors de l'expérience d'association de MexA_{signal} avec OprM en excès. Nous avons mesuré des taux d'association et de dissociation. Ces résultats conduisent à une estimation de la

constante d'association de $(2.3 \pm 0.9) 10^{-6} \text{ mol.dm}^{-3}$. En appliquant la formule VII.1, comme OprM est la protéine en excès, on trouve une énergie de liaison de $7.5 \pm 3 k_B T$. Cette estimation est proche de celle que nous avons obtenu en mesurant $K_{D,AM}$ en fonction de la température.

VII.2 Confirmations ?

Grâce à des mesures de recouvrement de fluorescence, nous avons obtenu une énergie de $11 \pm 3 k_B T$ pour le lien entre MexA et OprM à l'intérieur de bicouches. Ce résultat est original car il permet de donner une valeur de l'énergie de liaison entre deux protéines membranaires dans un environnement proche de leur environnement *in vivo*.

Cette mesure demande une confirmation. Plusieurs démarches sont possibles.

La première repose sur l'étude dans la phase L_3 d'une liaison d'énergie connue. Le lien entre streptavidine et biotine nous a paru un bon candidat. Toutefois, le temps de vie du lien est de 10^7 s. Pour que l'équilibre soit atteint, il faut laisser l'échantillon au repos pendant une durée supérieure. Une attente de plus de 116 jours est donc nécessaire. Sur ces échelles et à température ambiante, les peptides ne sont pas stables. Nous avons donc dû renoncer.

La seconde confirmation serait d'utiliser une méthode de mesure d'énergie pour le lien MexA-OprM. La méthode de la calorimétrie isotherme paraît être la meilleure possibilité. Cependant ces mesures sont faites en solution. Elles ne sont pas applicable à un système de bicouches dans lequel les protéines sont insérées. En outre, pour les protéines membranaires, l'interprétation des résultats est rendue difficile du fait de la présence de détergent.

Si le complexe parvient à être co-cristallisé, on pourrait obtenir des valeurs d'énergie grâce à des méthodes de simulations moléculaires.

Il serait intéressant de pouvoir comparer cette énergie de liaison avec l'énergie d'activation du système. L'énergie de liaison représente la différence d'énergie entre état libre et état lié alors que l'énergie d'activation est l'énergie de la barrière énergétique. Nous avons commencé, parallèlement, des mesures de molécules uniques avec la technique du BFP (Biomembrane Force Probe) pour parvenir à cette mesure. Nous avons réussi à insérer la protéine OprM dans des vésicules géantes (voir Annexe G). Un mutant de la protéine MexA : MexA_{CNP}, analogue de MexA mais sans chaîne palmityl et avec une cystéine libre a été produite et greffée sur des billes de silice. Cependant, nous avons rencontré des problèmes pour la mise en place de cette mesure liés très certainement à la présence de filaments. Les résultats obtenus sont présentés en annexe G. En outre, l'obtention du spectre de force de la liaison ne renseigne pas de manière univoque sur les valeurs de l'énergie et de la largeur du puits de potentiel [156].

Conclusion générale

Les protéines membranaires interviennent dans de nombreux processus d'échange de la cellule. Pourtant les techniques pour les étudier dans un milieu proche des membranes sont très peu nombreuses. Nous avons donc créé des outils adéquats pour ces objets. Pour cela, nous avons réalisé un environnement biomimétique d'une membrane : une phase L_3 (Chapitre III) constituée d'un tensioactif non ionique le C12E5, d'un cotensioactif le β -OG et d'une solution aqueuse. Cette phase est très modulable. Elle est stable dans une large gamme de température (6-30°C) et de pH (entre 5.5 et 8). L'épaisseur de sa bicouche peut être variée entre 32 et 48 Å. La séparation entre bicouches est contrôlable entre 50 et 350 Å.

Dans cet environnement de membranes simplifié, nous avons étudié par la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment, la diffusion de protéines membranaires de rayons variés. Nous avons ainsi pu contester expérimentalement le modèle de Saffman-Delbrück qui relie le coefficient de diffusion d'une protéine au logarithme de son rayon et à l'épaisseur de la membrane. Nos résultats ne s'accordent pas avec les propositions de Saffman et Delbrück pour des molécules dont le rayon est inférieur à 30 Å. Nous avons montré que le coefficient de diffusion était donné par (Chapitre IV) :

$$D = \frac{k_B T \lambda}{4\pi \mu h a} \quad (\text{VII.3})$$

où a est le rayon de la protéine, h est sa taille hydrophobe, μ est la viscosité de la membrane et λ est une longueur caractéristique propre à la bicouche. Ces conclusions offrent de nouvelles possibilités. Puisque le coefficient de diffusion est proportionnel au rayon des objets, il devient un outil sensible aux modifications de l'état d'oligomérisation ainsi qu'aux interactions entre protéines.

L'analyse des courbes de recouvrement de fluorescence permet de mettre en évidence plusieurs populations de protéines fluorescentes à l'intérieur d'un même échantillon et que l'intensité obtenue pour une espèce est proportionnelle à la concentration de cette protéine (Chapitre IV). Ce résultat a été établi pour des espèces en solution ou membranaires. Dans le cas de protéines qui se partagent entre deux fractions liée ou libre, nous avons établi que la mesure des intensités permettait de déduire les concentrations de ces populations (Chapitre V). Enfin, nous avons ajouté une composante temporelle à l'étude de ces courbes de manière à pouvoir étudier des phénomènes dynamiques (Chapitre VI). L'ensemble de ces résultats ont permis de développer une nouvelle méthode pour la détection et la caractérisation des interactions entre des protéines membranaires.

Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons étudié une interaction connue entre une streptavidine et un peptide biotiné de manière à pouvoir comparer nos résultats avec des ceux de la littérature. Nous avons également étudié les interactions entre des protéines appartenant à une pompe à efflux d'une bactérie à double membrane *Pseudomonas aeruginosa* (Chapitre I). Nous sommes parvenus à obtenir une description complète de ces interactions à l'intérieur de nos bicouches. En effet, toutes les caractérisations de ces interactions ont été réalisées à l'intérieur d'un même système. Il y a donc plus de concordance que lorsque des techniques différentes sont utilisées pour la description d'une interaction. Les informations obtenues sont d'ordre statique et dynamique.

A L'approche statique, nous a permis de détecter les interactions d'une part et d'autre part de déterminer (Chapitre V) :

- la configuration de l'assemblage (A savoir, si l'accrochage a lieu entre protéines d'une même bicouche ou entre protéines appartenant à des bicouches voisines et dans ce dernier cas, la distance d'interaction peut être précisée),
- le rapport de stœchiométrie entre les différentes protéines de l'assemblage,
- l'action du pH sur ces caractéristiques.

B Du point de vue dynamique, nous avons réussi à mesurer des taux d'association et de dissociation entre protéines membranaires insérées dans une bicouche (Chapitre VI). Cette mesure est un résultat original qui à notre connaissance, ne peut être obtenu par aucune autre méthode. En effet, la technique des bio-senseurs comme le Biacore ne permettent d'accéder qu'à des taux de formation pour des objets en solution. Notre méthode donne accès à des taux d'associations à trois et à deux dimensions. Nous avons comparés ces taux d'association. Selon nos résultats, le rapport entre ces deux taux fait intervenir une longueur qui pourrait être liée aux caractéristiques de l'exploration de l'environnement par la protéine. Nous avons ainsi souligné l'importance des mesures à deux dimensions pour les protéines membranaires afin de comprendre les cinétiques dans leur environnement. La méthode que nous avons développée permet de mesurer directement des taux d'association inférieurs à 10^{11} mol⁻¹.dm².s⁻¹ et des taux de dissociations inférieurs à 10^{-2} mol.dm⁻².

C Du point de vue de l'énergie, nous sommes parvenus à mesurer des constantes de dissociation à l'équilibre (Chapitre VI) ainsi que leurs variations en fonction de la température pour atteindre l'énergie de liaison entre deux protéines membranaires (Chapitre VII).

Toutefois, certains résultats restent encore à comprendre.

La phase L₃ que nous avons utilisée, est caractérisée par des mesures de SAXS, de conductivité et de cryofracture. Sa loi de dilution n'est cependant pas comprise et sa topologie n'est pas connue. Il faudrait pouvoir faire une reconstruction à trois dimensions de cette phase. La cryo-microscopie électronique serait un candidat possible pour parvenir à ce résultat.

Au terme de l'étude réalisée sur les variations des coefficients de diffusion d'objets

transmembranaires, nous avons introduit une longueur caractéristique λ propre à la bicouche qui n'a pas pu être mesurée. Seul le rapport entre cette longueur et la viscosité de la membrane est déterminé. Nous avons proposé une méthode pour mesurer la viscosité de la membrane de façon indépendante (Chapitre IV) qui reste à réaliser. Cette détermination est toutefois essentielle pour comprendre les phénomènes mis en jeu lors de la diffusion dans les bicouches.

Notre méthode de détection et de caractérisation géométrique (configuration, distance d'interaction, stœchiométrie) des interactions est prouvée par les résultats concordants obtenus avec une technique très utilisée : le gel natif protéique (Chapitre V). Les résultats obtenus en étudiant l'interaction connue entre la streptavidine et la biotine ont appuyé ces conclusions. L'étude de cette interaction nous a permis de mesurer une constante d'association à deux dimensions (Chapitre VI). La comparaison de cette constante avec la valeur tabulée pour des protéines en solution fait intervenir une distance qui est proche des distances caractéristiques du problème. Puisque notre approche peut s'étendre à la mesure de taux d'association entre une protéine en solution et une protéine membranaire, il serait intéressant de comparer nos résultats avec les cinétiques obtenues par des techniques plus traditionnelles de bio-senseur.

Pour l'approche énergétique, nous avons étudié les variations de constante d'équilibre en fonction de la température pour déduire l'énergie de liaison. Il faudrait vérifier la valeur de l'énergie obtenue par la méthode de calorimétrie isotherme en titration. Cependant ces expériences ne sont pas aisées à mettre en œuvre pour des protéines membranaires. Une seconde possibilité est d'avoir recours à la simulation moléculaire qui par étude de co-cristaux de complexes parvient à déduire une affinité.

En ce qui concerne la compréhension des mécanismes d'assemblages des pompes à efflux, nous avons mis en évidence : une interaction frontale entre MexA et OprM, une interaction latérale entre MexA et MexB et une interaction frontale entre MexB et OprM. Nous avons montré que les dynamiques de ces associations se font sur des échelles différentes. Ainsi l'association la plus lente est celle entre les protéines MexB et OprM. L'addition de la protéine MexA accélère la dynamique de cet assemblage.

L'étape suivante est de faire fonctionner la pompe à efflux. Nous avons reconstitué les différentes protéines MexA, MexB et OprM en vésicules géantes. On pourrait ainsi créer une pompe par la mise en contact de deux vésicules et mesurer un efflux. Toutefois, cette reconstitution *in vitro* nécessite de résoudre des difficultés majeures. Tout d'abord, le canal constitué par OprM doit être ouvert. Or toutes les protéines cristallisées sont à l'état de pore fermé. Il faudrait parvenir à déterminer le mécanisme d'ouverture. Enfin, il faudra trouver un moyen simple et efficace de fournir de l'énergie à cette pompe soit en créant une différence de pH entre milieu interne et externe de la vésicule soit en ajoutant un transducteur d'énergie à l'intérieur des vésicules.

Annexe A

Tensioactifs et lipides utilisés

Caractéristiques du β -OG

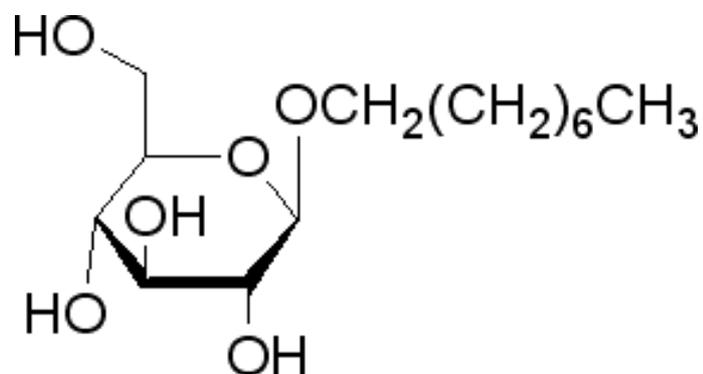


Figure A.1: Formule développée du β -OG

Formule Chimique Brute : $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_6$
Nom : Octyl- β -D-glucopyranoside ou β -octylglucoside
Masse molaire : $292.37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.
Concentration Micellaire Critique : $2.5 \cdot 10^{-2}\text{M}$
Fournisseur : Sigma-Aldrich

Caractéristiques du DDM

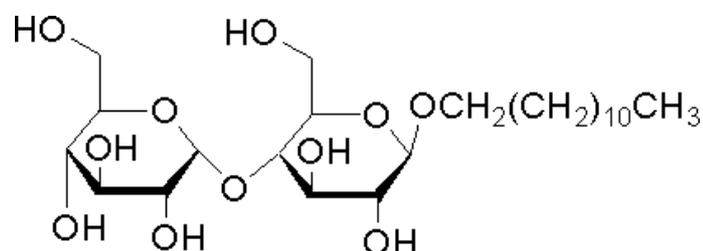


Figure A.2: Formule développée du DDM

Formule Chimique Brute : $\text{C}_{44}\text{H}_{88}\text{O}_{16}$
Nom : Dodécyl maltoside

Masse molaire : 510.62 g.mol⁻¹.

Concentration Micellaire Critique : 2.5 10⁻⁴M

Fournisseur : Sigma-Aldrich

Caractéristiques du SDS

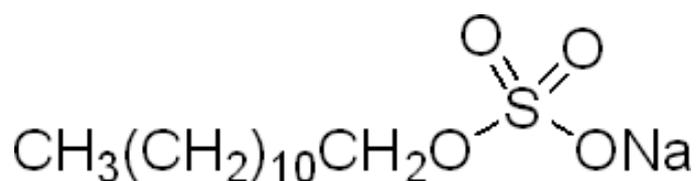


Figure A.3: Formule développée du SDS

Formule Chimique Brute : C₁₂H₂₅NaO₄S

Nom : Sodium dodécyl sulfate

Masse molaire : 288.4 g.mol⁻¹.

Concentration Micellaire Critique : 6-8 mM

Caractéristiques du C14DMAO

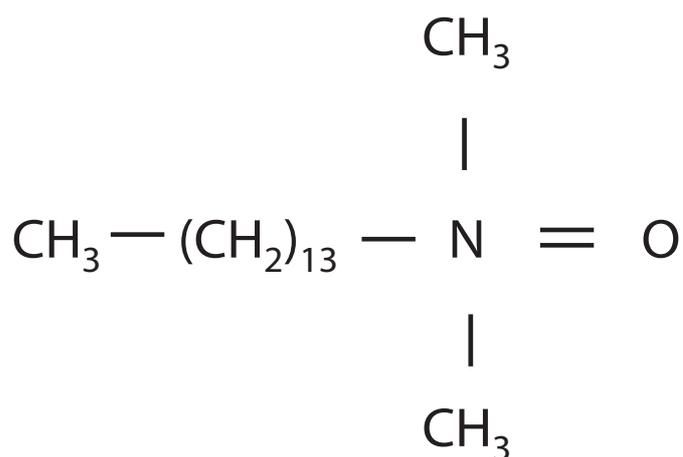


Figure A.4: Formule développée du C14DMAO

Formule Chimique Brute : C₁₆H₃₅NO

Nom : Tetradécyl diméthyl aminoxide

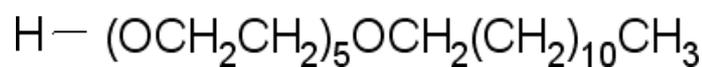


Figure A.5: Formule développée du C12E5

Caractéristiques du C12E5

Formule Chimique Brute : $\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{O}_6$

Nom : Pentaéthylène glycol monododécyl éther

Masse molaire : $406.60 \text{ g.mol}^{-1}$.

Concentration Micellaire Critique : $6.5 \cdot 10^{-5}\text{M}$

Fournisseur : Nikkol Chemicals

Caractéristiques de l'EYPC

Composition :

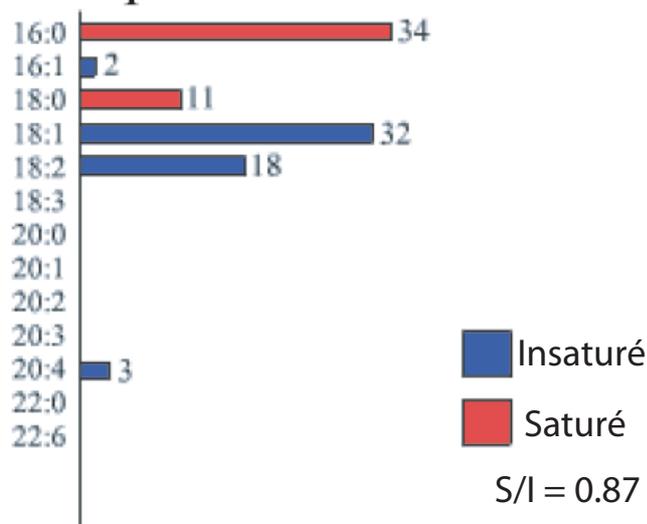


Figure A.6: Composition de l'EYPC

Nom : Egg Yolk L- α -phosphatidylcholine

Masse molaire : $760.09 \text{ g.mol}^{-1}$

Fournisseur : Avanti Polar Lipids

Annexe B

Préparation des échantillons

Préparation des phases L₃ du système C12E5/ β -OG/H₂O

Solution 1 (notée S1) :

- β -OG 0.9 % (pourcentage massique)
- NaCl 100mM
- Tampon phosphate pH 7.5 50mM
- Glycérol 5% (pourcentage volumique)

Solution 2 (notée S2) :

- NaCl 100mM
- Tampon phosphate pH7.5 50mM
- Glycérol 5% (pourcentage volumique)

Solution 3 (notée S3) :

- β -OG 9 % (pourcentage massique)
- NaCl 100mM
- Tampon phosphate pH 7.5 50mM
- Glycérol 5% (pourcentage volumique)

Mode de préparation

Les phases utilisées lors de cette thèse sont obtenues par simple mélange des solutions S1, S2, S3 et de la solution de tensioactif C12E5. Les volumes sont prélevés au moyen de pipettes Gilson de précision.

Quand les solutions contiennent des protéines, le volume S1 est en fait composé de deux fractions : la première est la fraction de solution de protéines, la seconde est celle de solution S1 pour compléter.

Volumes de solutions à mélanger pour préparer 100 μ L de phases L3:

VC12E5 (µL)	VS1 (µL)	VS2 (µL)	VS3 (µL)	Fraction C12E5 (%)	ϕ (%)
3	30,3	66,7	0	3	3,3
3,5	35,4	61,1	0	3,5	3,9
4	40,4	55,6	0	4	4,4
4,5	45,5	50,0	0	4,5	5,0
5	50,6	44,4	0	5	5,5
5,5	55,6	38,9	0	5,5	6,1
6	60,7	33,3	0	6	6,6
6,5	65,7	27,8	0	6,5	7,2
7	70,8	22,2	0	7	7,7
7,5	75,8	16,7	0	7,5	8,3
8	80,9	11,1	0	8	8,8
8,5	85,9	5,6	0	8,5	9,4
9	91,0	0	0	9	9,9
9,5	89,9	0	0,6	9,5	10,5
10	88,8	0	1,2	10	11,0
10,5	87,6	0	1,9	10,5	11,6
11	86,5	0	2,5	11	12,1
12	84,3	0	3,7	12	13,2
13	82,1	0	4,9	13	14,3
14	79,8	0	6,2	14	15,4
15	77,6	0	7,4	15	16,5
16	75,4	0	8,6	16	17,6
17	73,1	0	9,9	17	18,7
18	70,9	0	11,1	18	19,8
19	68,7	0	12,3	19	20,9
20	66,4	0	13,6	20	22,0
21	64,2	0	14,8	21	23,1
22	62,0	0	16,0	22	24,2
23	59,7	0	17,3	23	25,3
24	57,5	0	18,5	24	26,4
25	55,2	0	19,8	25	27,5
26	53,0	0	21,0	26	28,6
27	50,8	0	22,2	27	29,7
28	48,5	0	23,5	28	30,8
29	46,3	0	24,7	29	31,9
30	44,1	0	25,9	30	33,0
31	41,8	0	27,2	31	34,1
32	39,6	0	28,4	32	35,2
33	37,4	0	29,6	33	36,3
34	35,1	0	30,9	34	37,4
35	32,9	0	32,1	35	38,5

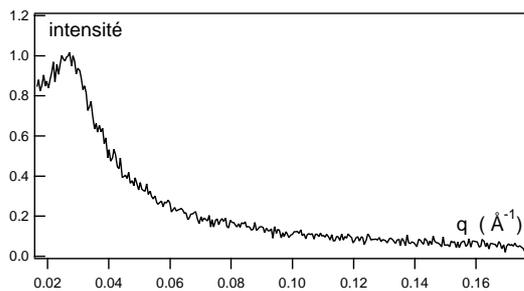
Figure B.1: Mode de préparation des échantillons de phases L3

Annexe C

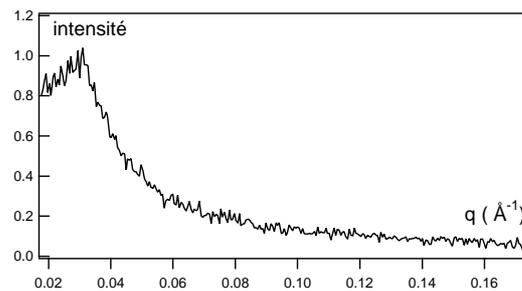
Spectres de rayons X

Spectres de rayons X obtenus pour la phase lamellaire du système C12E5/ β -OG/Solution S2

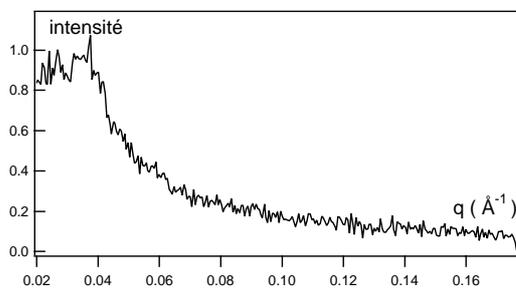
Nous présentons ici quelques spectres obtenus lors de l'étude de la phase lamellaire présentée au chapitre III. Les spectres choisis permettent de voir l'évolution de la période de la phase lamellaire avec la fraction volumique de membrane.



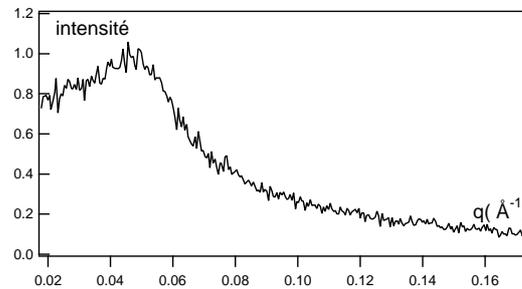
(a) Spectre pour une phase lamellaire de fraction $\phi = 0.13$



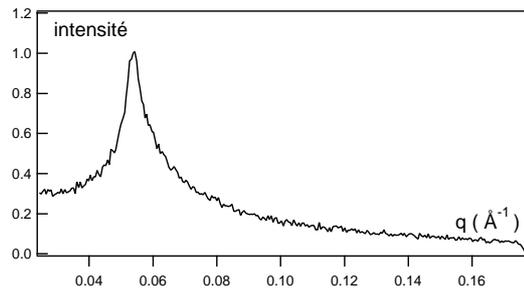
(b) Spectre pour une phase lamellaire de fraction volumique $\phi = 0.13$



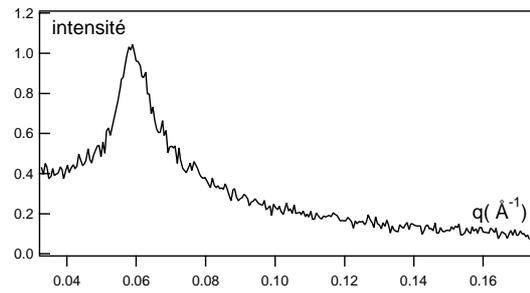
(c) Spectre pour une phase lamellaire de fraction $\phi = 0.16$



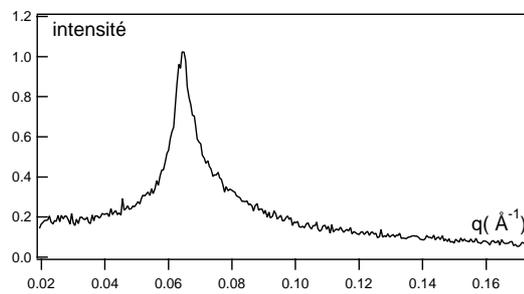
(d) Spectre pour une phase lamellaire de fraction volumique $\phi = 0.19$



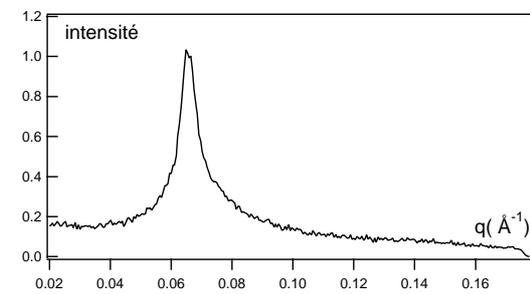
(e) Spectre pour une phase lamellaire de fraction $\phi = 0.22$



(f) Spectre pour une phase lamellaire de fraction volumique $\phi = 0.25$



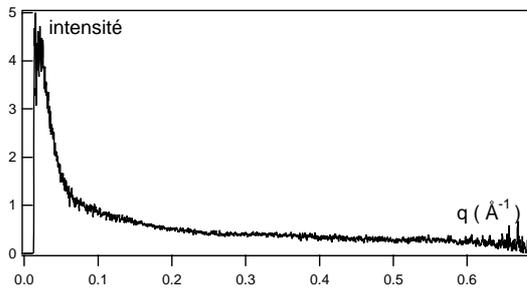
(g) Spectre pour une phase lamellaire de fraction $\phi = 0.29$



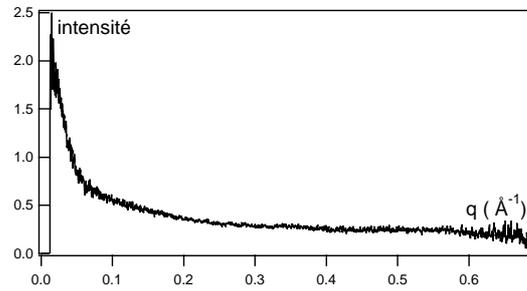
(h) Spectre pour une phase lamellaire de fraction volumique $\phi = 0.33$

Spectres de rayons X obtenus pour la phase éponge du système C12E5/ β -OG/Solution S2

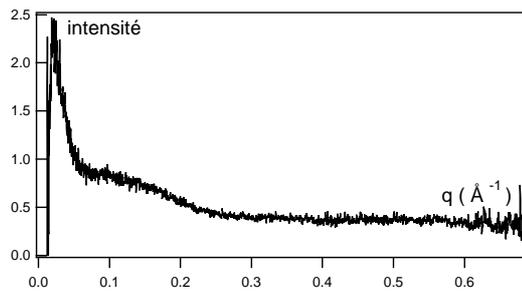
Nous présentons ici les spectres obtenus pour la phase éponge du système C12E5/ β -OG/Solution S2. D'autres spectres sont présentés dans le chapitre III. Les spectres obtenus pour des fractions volumiques de membrane inférieures à 0.1 ont été enregistrés par Frédéric Marchal (CEA-Gif-sur-Yvette) dans le groupe de Patrick Guénoun. Les autres spectres ont été enregistrés au Collège de France sur l'expérience de Raymond Ober (Laboratoire de Physique de la Matière Condensée-Paris)



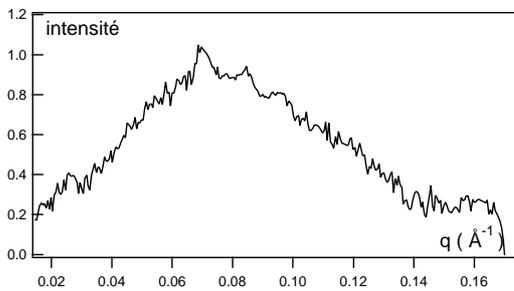
(i) Spectre pour une phase de fraction $\phi = 0.033$



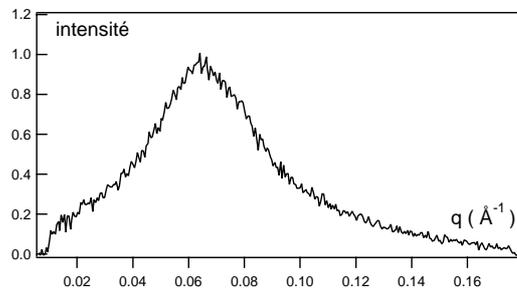
(j) Spectre pour une phase de fraction volumique $\phi = 0.055$



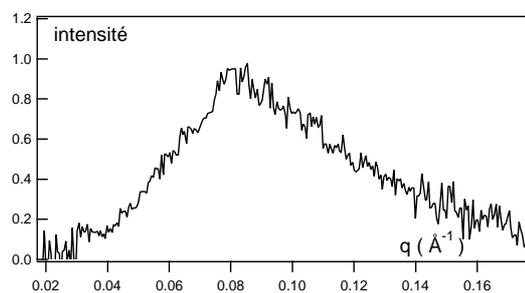
(k) Spectre obtenu pour une phase de fraction volumique de membrane $\phi = 0.08$



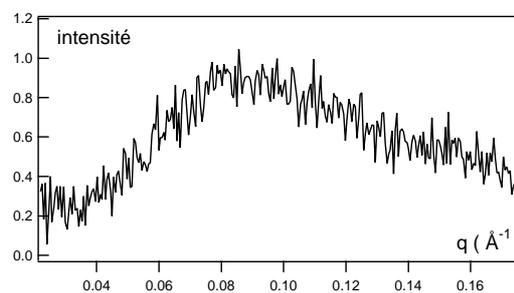
(l) Spectre pour une phase de fraction $\phi = 0.1$



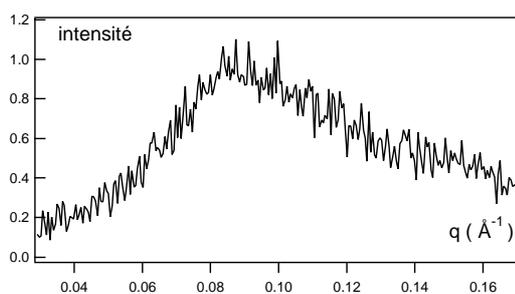
(m) Spectre pour une phase de fraction volumique $\phi = 0.15$



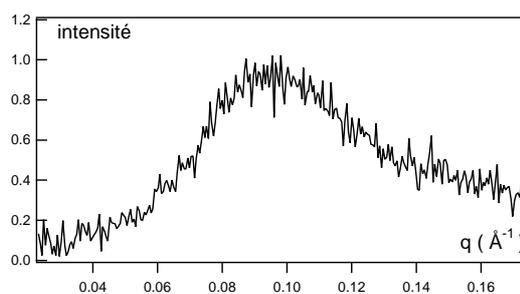
(n) Spectre pour une phase de fraction $\phi = 0.19$



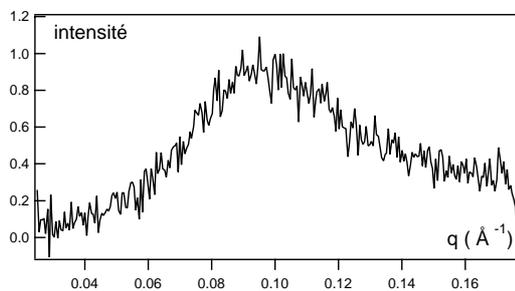
(o) Spectre pour une phase de fraction volumique $\phi = 0.21$



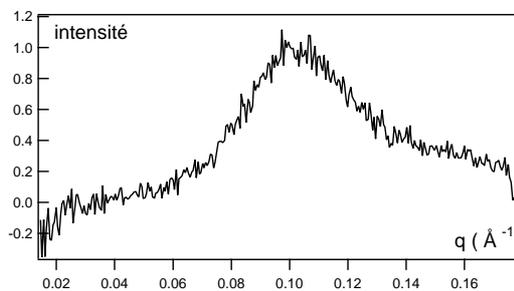
(p) Spectre pour une phase de fraction $\phi = 0.23$



(q) Spectre pour une phase de fraction volumique $\phi = 0.26$



(r) Spectre pour une phase de fraction $\phi = 0.3$



(s) Spectre pour une phase de fraction volumique $\phi = 0.32$

Annexe D

Résolution des équations cinétiques sur la streptavidine

Dans le Chapitre VI, nous avons obtenu le système d'équations suivant :

$$\begin{cases} \frac{d[BL_{12}]}{dt} = -k_a[BL_{12}]\{S_0\} \\ \frac{d[S-BL_{12}]}{dt} = k_a[BL_{12}]\{S_0\} \\ \frac{d[S-(BL_{12})_2]}{dt} = k'_a[BL_{12}]\cdot[S-BL_{12}] \end{cases} \quad (D.1)$$

On déduit de la première équation de ce système, l'évolution de la quantité de BL_{12} :

$$[BL_{12}] = [B_0] \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (D.2)$$

où $\tau = \frac{1}{k_a\{S_0\}}$ et $[B_0]$ désigne la concentration surfacique initiale en biotine.

La loi d'évolution de la quantité S- BL_{12} se déduit de la troisième équation du système quand on remplace la concentration de BL_{12} par son expression temporelle (équation D.2) :

$$\frac{d[S-BL_{12}]}{dt} = \frac{[B_0]}{\tau} \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

La solution de cette équation avec comme condition initiale une concentration nulle en S- BL_{12} s'écrit :

$$[S-BL_{12}] = [B_0] \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right\} \quad (D.3)$$

On injecte ces deux dernières expressions D.2 et D.3, dans la dernière équation du système. L'évolution de la concentration en streptavidine liée à deux peptides appartenant à une même membrane est décrite par :

$$\frac{d[S-(BL_{12})_2]}{dt} = k'_a[B_0]^2 \exp\left(\frac{t}{\tau}\right) \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right\}$$

La concentration en S- $(BL_{12})_2$ est nulle au temps $t = 0$, le résultat précédent s'intègre donc sous la forme :

$$[S-(BL_{12})_2] = k'_a[B_0]^2 \tau \left\{ \frac{1}{2} - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) + \frac{1}{2} \exp\left(-\frac{2t}{\tau}\right) \right\} \quad (D.4)$$

Annexe E

Calcul de concentrations protéiques surfaciques

Détermination de l'aire de la bicouche

Pour calculer des concentrations surfaciques, il faut avoir accès à la surface A de la bicouche.

Pour cela, nous avons besoin des informations suivantes :

- la masse molaire du tensioactif (M_{C12E5}) = 406.6 g.mol⁻¹
- la masse volumique du tensioactif $\rho = 0.967$ g/mL
- l'aire par tête polaire du C12E5 qui est de 42 Å selon [71] σ
- la fraction volumique de membrane de la solution utilisée ϕ
- le volume de la solution V

L'aire de la bicouche est alors donnée par :

$$A = \frac{V\phi\rho\mathcal{N}_a\sigma}{M_{C12E5}} \quad (\text{E.1})$$

où \mathcal{N}_a désigne le nombre d'Avogadro.

Les volumes des échantillons sont de 10 μL . Les deux phases éponges utilisées lors de cette thèse sont :

- une phase avec $\phi = 0.1$ pour l'étude de la réaction entre streptavidine et peptides biotinés,
- une phase pour laquelle $\phi = 0.05$ pour l'étude de la réaction entre MexA et OprM

On obtient ainsi pour la première phase une aire de bicouche de 80 dm² et pour la seconde 40 dm².

Détermination de la concentration surfacique

La concentration de protéine c ajoutée en solution est connue ainsi que le volume de protéines V_{prot} . Donc la concentration surfacique en protéine s'écrit

$$c_{surf} = \frac{cV_{prot}}{A}$$

Annexe F

Retour sur le temps de dissociation avec une force constante

On soumet un lien entre les protéines MexA et OprM à une force f constante.



Si on suppose que la déformation de la membrane est identique que l'on ait 1 ou 2 protéines MexA autour de OprM alors la force ressentie par chaque protéine MexA du complexe A_2M est égal à la moitié de celle ressentie pour un complexe A_1M . Les équations d'évolution s'écrivent alors :

$$\begin{cases} \frac{d[A]}{dt} = k_{dAM}(f)[A_1M] + k_{dAM}(f/2)[A_2M] \\ \frac{d[A_1M]}{dt} = k_{dAM}(f/2)[A_2M] - k_{dAM}(f)[A_1M] \\ \frac{d[A_2M]}{dt} = -k_{dAM}(f/2) \cdot [A_2M] \end{cases} \quad (\text{F.2})$$

L'équation d'évolution F.2 de la concentration en A_2M conduit à la loi d'évolution :

$$[A_2M](t) = [A_2M]_0 \exp(-k_{dAM}(f/2) \cdot t) \quad (\text{F.3})$$

Ce résultat est injecté dans l'équation d'évolution de la quantité $[A_1M]$ pour obtenir l'équation suivante :

$$\frac{d[A_1M]}{dt} + k_{dAM}(f) \cdot [A_1M] = k_{dAM}(f/2)[A_2M]_0 \exp(-k_{dAM}(f/2) \cdot t)$$

Son intégration, en tenant compte des conditions initiales, donne :

$$\begin{aligned} [A_1M](t) &= [A_1M]_0 \exp(-k_{dAM}(f) \cdot t) \\ &+ [A_2M]_0 \frac{k_{dAM}(f/2)}{k_{dAM}(f) - k_{dAM}(f/2)} \cdot \left[\exp(-k_{dAM}(f/2) \cdot t) - \exp(-k_{dAM}(f) \cdot t) \right] \end{aligned} \quad (\text{F.4})$$

Ainsi par conservation de la quantité de protéines MexA, on obtient pour la concentration en protéines MexA libres :

$$\begin{aligned} [A](t) &= ([A]_0 + [A_1M]_0 + 2 * [A_2M]_0) - [A_2M]_0 \exp(-k_{dAM}(f/2)t) \frac{2k_{dAM}(f) - k_{dAM}(f/2)}{k_{dAM}(f) - k_{dAM}(f/2)} \\ &+ \frac{\exp(-k_{dAM}(f)t)}{k_{dAM}(f) - k_{dAM}(f/2)} (k_{dAM}(f/2)[A_2M]_0 - (k_{dAM}(f) - k_{dAM}(f/2))[A_1M]_0) \end{aligned} \quad (\text{F.5})$$

Le rapport des intensités correspondant aux fractions liées et libre de MexA est égal au rapport :

$$\frac{[A_1M] + 2\eta[A_2M]}{[A]}$$

Dans cette expression, les valeurs de $k_{dAM}(f)$ et $k_{dAM}(f/2)$ sont les seules inconnues. Examinons sur un exemple l'ajustement obtenu. Nous considérons la courbe pour laquelle la distance z est de 10 \AA . Cette expression ne permet pas d'ajuster nos données, il faut la multiplier par un facteur de proportionnalité supplémentaire pour obtenir un ajustement correct (figure F.1). Les valeurs obtenues pour les deux constantes de dissociation sont alors : $k_{dAM}(f/2) = (1.2 \pm 1.6) 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et $k_{dAM}(f) = (1.4 \pm 4.5) 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Les temps de dissociations qui s'en déduisent sont $\tau_{dAM}(f/2) = 8000 \pm 11000 \text{ s}$ et $\tau_{dAM}(f) = 7000 \pm 22000 \text{ s}$. Ces résultats sont peu précis. Ils sont toutefois proches des valeurs que nous avons obtenu par la méthode présentée au chapitre VI pour des taux de dissociation correspondant à z de 5 et 10 \AA . Nous avons obtenu : $\tau_{d,z=5}(f) = 7000 \text{ s}$ et $\tau_{d,z=10}(f) = 5600 \text{ s}$.

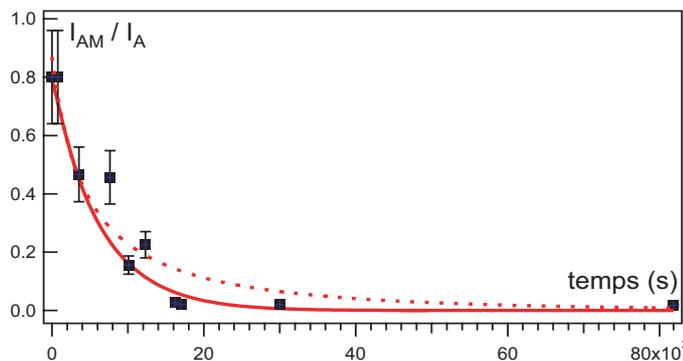


Figure F.1: Variation de I_{AM}/I_A en fonction du temps. Ces données sont comparées à l'ajustement obtenu au chapitre VI. On les ajuste ici avec les expressions obtenues en supposant une force qui dépend du nombre de liaisons. Les deux constantes de dissociations obtenues sont $k_{dAM}(f/2) = (1.2 \pm 1.6) 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ et $k_{dAM}(f) = (1.4 \pm 4.5) 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Les résultats obtenus par cette modélisation ne sont pas très probants. Ils introduisent un facteur de proportionnalité absent des autres mesures faites avec les intensités. En outre, les valeurs obtenues finalement pour les temps de dissociation sont proches de celles que nous avons pour le modèle simplifié du chapitre VI. Nous avons donc préféré un modèle plus simple qui suppose que les deux protéines MexA de l'assemblage A_2M ont la même contribution. Ce modèle prend ainsi en compte l'élasticité des protéines.

Expériences réalisées sur le BFP sur le lien OprM-MexA

Spectroscopie dynamique de force

L'expérience de BFP [157] [158] permet d'accéder à des forces de rupture pour des liens uniques.

Pourquoi choisir le BFP?

Les techniques permettant les mesures de force de rupture d'un lien unique sont nombreuses [159]. Parmi les plus utilisées, on peut citer le microscope à force atomique, les pinces optiques et le BFP. La différence principale entre ces techniques repose sur la nature du capteur de force utilisé pour déterminer les forces entre protéines et ligands.

Dans le cas du microscope à force atomique, ce capteur est une pointe fonctionnalisée par un ligand qui va réagir avec un récepteur sur un substrat et provoquer une déflexion du support de la pointe [160] [161]. Les forces qui peuvent être mesurées sont donc comprises entre quelques dizaines de piconewton jusqu'au nanonewton [162]. Toutefois, lors d'une même expérience, la raideur du ressort ne peut pas être variée, il faut changer la pointe utilisée.

La technologie des pinces optiques [163] fait interagir une bille fonctionnalisée par un ligand avec un récepteur greffé sur une surface. La bille subit une force exercée par un piège optique. La position de la bille renseigne sur la force de liaison. Les forces appliquées sont variées en modifiant l'intensité de l'éclairement. La gamme de force atteinte s'étend entre 0.01 et 100 pN.

Pour le BFP, le capteur de force utilisé est un globule rouge. Sa raideur est facilement variable. La gamme de force de rupture atteinte s'étend sur cinq ordres de grandeur : entre 0.01 pN et 1 nN.

Les méthodes de reconstitution de protéines sur des bicouches supportées qui sont utilisées en AFM et par les pinces optiques sont plus difficiles à mettre en oeuvre. L'incorporation de OprM semblait plus difficile dans ces bicouches. Nous avons préféré une incorporation en vésicules et nous avons donc choisi la technique du BFP.

Spectroscopie dynamique de force

Nous allons dans cette partie, parler des théories qui ont essayé de relier les forces aux énergies et nous soulignerons leurs limites. On se place dans le cas d'une barrière unique et étroite. Pour un lien entre deux protéines, l'allure du profil énergétique (c'est-à-dire

l'énergie le long de la coordonnée réactionnelle) de cette interaction est dessiné sur la figure G.1. Il est caractérisé par un puits de potentiel de profondeur E où E est l'énergie de liaison et une barrière énergétique assurant le passage entre les états libre et lié dont la hauteur est l'énergie d'activation E_a (figure G.1). En l'absence de force extérieure, seules les fluctuations thermiques permettent de passer de l'état lié à l'état libre. L'application d'une force extérieure sur ce lien va diminuer la hauteur de la barrière et déplacer la position des maximum et minimum de la courbe énergétique (figure G.1). La probabilité de dissociation va donc augmenter. Bell [164] a étudié cette augmentation du taux de

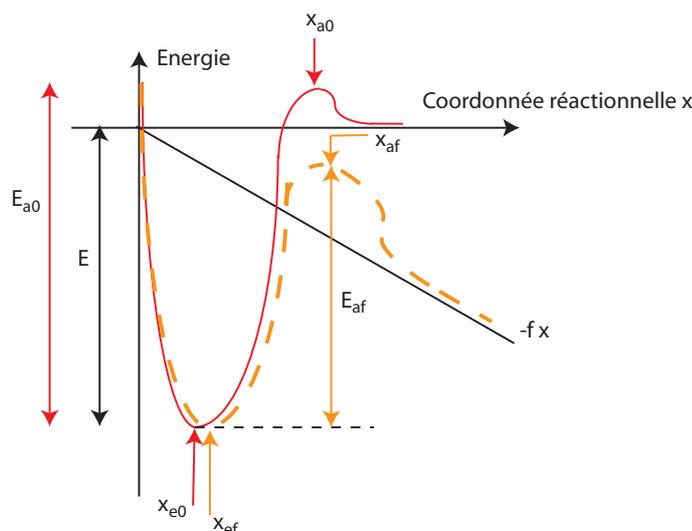


Figure G.1: Profil énergétique d'une interaction entre deux objets, confinée par une unique barrière énergétique. L'action d'une force extérieure f sur le système modifie le panorama énergétique. Pour une barrière très fine, la hauteur de la barrière représente le changement principal.

dissociation avec l'application d'une force extérieure en extrapolant un modèle de transition dans les gaz. Il obtient pour le taux de dissociation ν_d (c'est-à-dire le nombre de dissociations par seconde) l'expression suivante :

$$\nu_d = \nu_0 \exp\left(-\frac{E_a - fx_{a,f}}{k_B T}\right) \quad (\text{G.1})$$

Ainsi le temps de vie de la liaison décroît exponentiellement avec la traction :

$$\tau_d = \tau_0 e^{-\frac{fx_{a,f}}{k_B T}}$$

Evans a développé une théorie moléculaire dans les liquides [158] qui s'appuie sur les résultats de Kramers [149]. Il applique les équations de Smoluchovski pour prédire ce taux de dissociation et obtenir une formule analogue à celle de Bell [158] [165] :

$$\nu_d = \frac{D}{\ell_c \ell_a} \exp\left(\frac{E_a(f)}{k_B T}\right) \quad (\text{G.2})$$

D désigne la mobilité locale des états. La longueur ℓ_c qualifie le confinement c'est-à-dire la largeur du puits. Dans l'approximation d'un puits de potentiel harmonique, ℓ_c est déduite de la courbure autour du minimum $\kappa_c = \frac{\partial^2 E}{\partial x^2}(x_e)$ par la relation :

$$\ell_c = \sqrt{\frac{2\pi k_B T}{\kappa_c}}$$

La longueur ℓ_a représente l'épaisseur effective de la barrière. Elle est définie autour de la position de la barrière x_a par la relation suivante :

$$\ell_a = \sqrt{\frac{2\pi k_B T}{\kappa_a}}$$

avec $\kappa_c = \frac{\partial^2 E}{\partial x^2}(x_a)$ la courbure du potentiel au niveau de la barrière énergétique. De cette manière, l'application d'une force peut affecter la valeur de cette longueur d'activation puisque la position de la barrière et sa hauteur sont modifiées. Cependant, dans le cas d'une barrière d'énergie étroite, l'influence majeure de la force sera portée par le terme $\exp\left(\frac{E_a(f)}{k_B T}\right)$ avec $E_a(f) = E_a(0) - fx$.

Un temps caractéristique moléculaire de diffusion apparaît dans cette formule $\tau_D = \frac{\ell_c \ell_a}{D}$. Il représente le temps nécessaire aux molécules de solvant pour percuter les objets en interaction. Ce temps selon Evans peut varier entre 10^{-11} et 10^{-9} s [159]. Pincet et al. l'ont déterminé pour les différents puits de potentiel du lien streptavidine-biotine et ont obtenu des temps entre 10^{-12} et 10^{-10} s.

Dans le cas d'expériences de BFP, la force augmente avec le temps. Les échelles de temps des augmentations sont de l'ordre de la milliseconde. Elles sont très supérieures à τ_D . Ainsi, on se place dans un régime stationnaire pour les molécules. Les taux de dissociation sont donc une fonction de la force instantanée. Une statistique markovienne peut être appliquée sur la probabilité des forces de rupture. Evans montre que les forces de rupture les plus probables varient linéairement avec les taux de charge. L'expression de la force de rupture la plus probable s'écrit :

$$f^* = \frac{k_B T}{x_a} \ln\left(\frac{r}{\frac{k_B T}{x_a} \nu_{d0}}\right) \quad (\text{G.3})$$

où x_a désigne la position de la barrière énergétique et ν_{d0} est donnée par la relation G.2 pour une force appliquée nulle soit :

$$\nu_{d0} = \frac{1}{\tau_D} \exp\left(\frac{E_a(f)}{k_B T}\right)$$

La variation de f^* en fonction de $\ln(r)$ est représentée par une droite dans le cas d'une barrière unique ou des segments de droite relatifs à chacune des barrières dans le cas de plusieurs barrières [165]. Les ajustements de chacune de ces droites permettent de connaître les couples (x_a et E_a) des positions et des énergies pour chaque barrière.

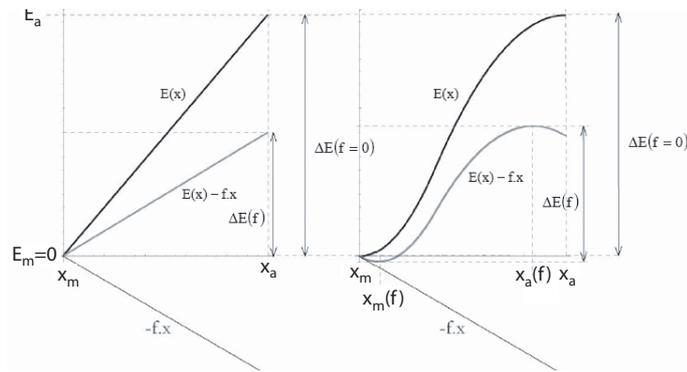


Figure G.2: Déformation du profil énergétique dans les hypothèses d'un profil linéaire (à gauche) ou harmonique (à droite) extraite de la thèse de Julien Husson [156]. Pour ce dernier cas, les positions des extremums sont déplacées.

Signalons que E. Evans néglige le déplacement des maxima de E_a provoquée par l'application d'une force f (ce qui revient à négliger les modifications de la longueur ℓ_a). Toutefois Julien Husson [156] montre que selon le modèle utilisé pour décrire le potentiel énergétique, les valeurs de x_a et E varient (figure G.2). Pour pallier ce problème, il faudrait connaître la position des extremums de E ainsi que le profil énergétique à leur voisinage.

Retenons donc qu'en l'état actuel de la théorie, les variations de f^* avec r ne fournit pas les valeurs de x_a et E_a de manière univoque. Toutefois le BFP permet de connaître les forces de rupture les plus probables ainsi que le nombre de barrières énergétiques.

G.1 Biomembrane Force Probe

La mise en place d'une expérience de BFP nécessite l'utilisation des techniques de micro-manipulations. Les expériences sont réalisées au moyen de micro-pipettes placées à l'intérieur d'une chambre. Une vésicule contient des protéines OprM. Elle est placée en face d'une sonde sur laquelle sont greffées des protéines MexA. Cette sonde est constituée d'une bille fonctionnalisée et d'un capteur de force qui est un globule rouge. La visualisation se fait grâce à un microscope optique. Nous décrirons ici le montage ainsi que la réalisation des vésicules et des billes.

G.1.1 Le capteur de force

Les méthodes de mesure de forces requièrent l'utilisation d'un capteur de cette force : dans le cas du BFP ce capteur est un globule rouge sur lequel on ajoute une bille. Ce globule rouge est utilisé comme un ressort de raideur contrôlée et modulable en changeant l'aspiration exercée sur ce globule rouge par une micropipette. La caractérisation du globule sous contrainte est bien connue [166] [167]. La constante de raideur k_g associée au globule rouge dépend uniquement des paramètres géométriques du montage qui sont mesurés avant chaque expérience et de l'aspiration qui est elle aussi contrôlée. On peut

l'estimer par l'expression suivante [166] :

$$k_g = \frac{\pi \Delta P R_p}{\left(\ln\left(\frac{2R_g}{R_p}\right) + \ln\left(\frac{2R_g}{R_c}\right)\right)\left(1 - \frac{R_p}{R_g}\right)} \quad (\text{G.4})$$

où R_p désigne le rayon de la pipette, R_g celui du globule et R_c celui du contact avec la bille-globule (figure G.3). ΔP est l'aspiration exercée sur le globule rouge.

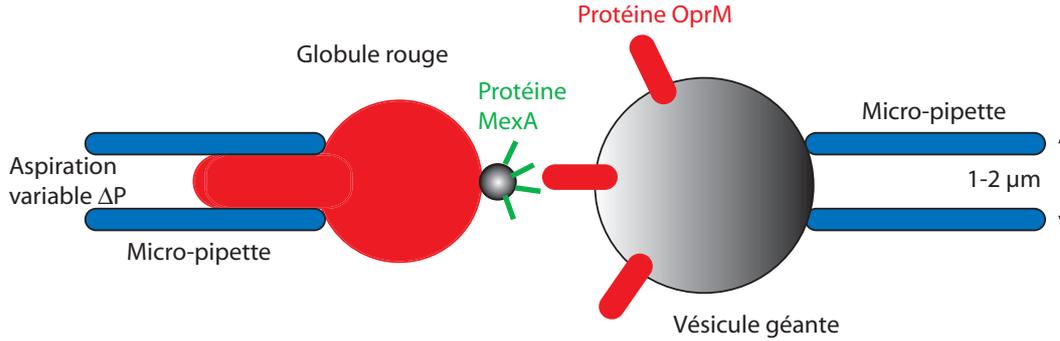


Figure G.3: Description de l'expérience de BFP. Le globule rouge sur lequel est fixé une bille greffée avec la protéine MexA_{CNP} est mis en face de la vésicule contenant la protéine OprM.

G.1.2 Préparation des billes fonctionnalisées avec MexA

Nous avons créé, comme nous l'avons mentionné au chapitre II, une protéine mutante de MexA nommée MexA_{CNP} pour laquelle la cystéine N-terminale reste libre sans palmytation. Sur cette cystéine, un maléimide-biotine est mis à réagir, de manière à avoir une protéine qui soit soluble et qui possède un groupement biotine. Notre expérience nécessite que les protéines MexA_{CNP} soient greffées sur des billes. Les protéines MexA_{CNP} sont marquées avec un maléimide-biotine (voir chapitre II) alors que les billes de silice sont fonctionnalisées avec des streptavidines ([140]). Protéines et billes sont mélangées mais il faut jouer sur les concentrations relatives et sur le temps d'incubation pour parvenir à un optimum de fonctionnalisation de la bille par MexA_{CNP}. En effet, il faut que les protéines MexA_{CNP} soient suffisamment nombreuses pour autoriser des accrochages (or le nombre de streptavidines à la surface des billes est tel qu'on se place déjà en molécule unique) ; d'autre part, tous les sites ne doivent pas être occupés sinon la bille ne pourra plus être accrochée sur le globule rouge.

Cette étape d'optimisation est à tester pour chaque nouvel échantillon de protéines et pour chaque nouvelle préparation de billes, c'est pourquoi nous allons surtout insister sur le protocole.

Il faut tout d'abord tester les concentrations en protéines en utilisant un temps d'incubation de 30 minutes et en mélangeant 20 μL de solution protéique avec 1 μL de billes. Dans notre cas, la concentration maximale en protéines MexA_{CNP} (12 μM) permet toujours l'accrochage de la bille avec le globule rouge. Nous avons alors utilisé cette concentration et nous avons augmenté le temps d'incubation. Au-delà de 40 minutes, l'accrochage entre

globule et billes est rendu difficile.

Finalement, les billes sont donc préparées comme suit : on mélange 20 μL de solution de MexA_{CNP} à 12 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ avec 1 μL d'une solution de billes. On procède ensuite à une série de trois rinçages avant de disperser les billes dans 25 μL de la solution de la chambre SB2 (Annexe H).

G.1.3 Reconstitution de la protéine OprM en vésicules géantes unilamellaires (ou GUV)

La technique du BFP requiert l'insertion de la protéine OprM dans une vésicule lipidique. La seconde étape est alors la reconstitution en GUV de OprM.

Les vésicules géantes sont très utilisées afin d'étudier la dynamique des protéines [168], [169], [170]. Différentes méthodes de production de vésicules géantes contenant des protéines membranaires ont été développées. La première étape est la formation de protéoliposomes, elle est commune à toutes ces techniques. Elle est suivie par un processus de déshydratation et réhydratation dans le tampon voulu. Cette étape peut-être réalisée en l'absence de champ électrique, il s'agit de l'"hydratation douce" [171], [172], [173]. Les tampons utilisés et notamment les forces ioniques de ces tampons peuvent être variés mais cette méthode donne des vésicules avec une grande distribution en taille [174]. C'est pourquoi la méthode d'électroformation lui est souvent préférée [175], [176], [177], [178]. Il s'agit de réhydrater un film lipidique au-dessus de sa température de transition de phase en présence d'un champ électrique alternatif. Les vésicules formées sont plus homogènes en taille et unilamellaires [174].

Nous avons reproduit la méthode développée par Girard et al. [179] [180] en ajoutant une étape supplémentaire afin d'enlever le glycérol. La formation des vésicules s'articule autour de quatre étapes :

- la reconstitution de la protéine OprM dans des liposomes grâce à l'utilisation de détergent [181],
- l'obtention de protéoliposomes sans détergent et sans glycérol,
- la déshydratation des protéoliposomes pré-formés sur des plaques conductrices d'ITO (oxyde d'indium),
- l'électroformation.

Ces étapes sont décrites sur la figure G.4.

Formation des protéoliposomes

Nous avons utilisé un mélange de lipides neutres EYPC pour Egg-Yolk L- α -phosphatidylcholine (Annexe A). Ce mélange possède différents types de chaînes. L'adaptation entre le segment hydrophobe de la protéine OprM et les lipides est ainsi facilitée. Ces lipides sont obtenus chez Avanti Polar Lipids à la concentration de 20 mg/mL dans le chloroforme. On prélève 11 μL de cette solution qui sont placés dans un tube à fond plat. Les lipides sont alors séchés sous courant d'azote puis placés dans une enceinte à vide pendant une

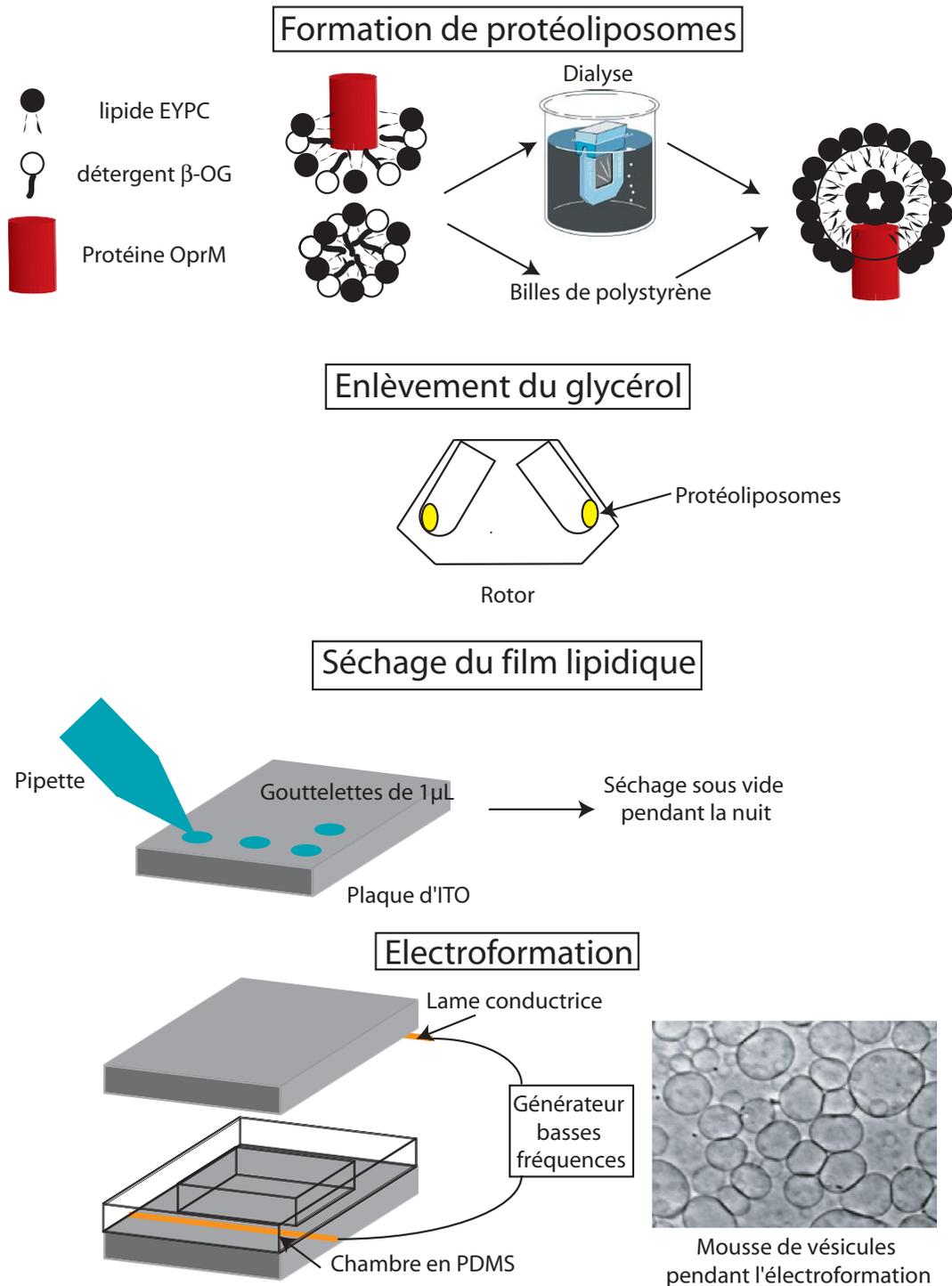


Figure G.4: Résumé des étapes de formation des vésicules géantes d'OprM

heure. Au terme de cette phase de séchage, on repère sur le fond du tube un film blanc. Le film lipidique est réhydraté par un mélange protéine/détergent. Les protéines sont ajoutées de telle sorte que le rapport molaire lipide:protéine soit de 500:1. La protéine est

ajoutée dans son tampon (solution S1 en annexe B) de façon à ne pas la dénaturer (Pour la protéine OprM, on ajoute donc 15 μ L de solution à 40 mM de OprM et on complète avec 85 μ L de solution tampon). La concentration en détergent (le β -OG) est supérieure à sa concentration micellaire critique (Annexe 1) de manière à bien solubiliser les liposomes et les protéines (elle est choisie égale à 0.03 mol.L⁻¹).

L'utilisation de détergent pour la création de protéoliposomes est largement répandue [169]. Du fait de leur caractère amphiphile, ils vont stabiliser la structure native des protéines membranaires car ils vont les solubiliser tout en empêchant leur dénaturation [182]. Ce mélange est placé sous faible agitation pendant 45 minutes.

Au terme de cette étape, on dispose d'un mélange de micelles composées de :

- lipides, protéines et molécules de détergents
- ou de détergents et de lipides.

Il faut ensuite enlever le détergent de cette solution de manière à créer des bicouches lipidiques dans lesquelles les protéines s'incorporent.

Enlèvement du détergent

La concentration en détergent est diminuée pour passer en dessous de la concentration micellaire critique en ajoutant à notre mélange 200 μ L de solution S2 (Annexe B). Pour ôter le détergent, nous avons essayé deux méthodes qui ont donné des résultats identiques. La première est la dialyse. On dialyse le mélange protéine-détergent-lipide contre une solution sans détergent. La dialyse est réalisée sur la nuit en faisant réagir 300 μ L de la solution de protéine-détergent-lipide avec deux bains successifs de 2 L de solution S2.

La seconde méthode est plus rapide c'est pourquoi elle a été préférée par la suite. Elle utilise des billes de polystyrène (Bio-Beads SM-2-BioRad-Hercule-SA). Le détergent s'adsorbe de manière préférentielle sur ces billes et quitte les mélanges faits avec les lipides. Des vésicules phospholipidiques contenant la protéine se forment alors spontanément. L'efficacité de ces billes a été calibrée par des études qui ont utilisé des détergents marqués de manière à contrôler les concentrations restantes de détergents non adsorbés en fonction du temps [170]. On choisit ainsi d'ajouter deux prises de 30 mg /mg de β -OG à l'intérieur de notre solution, les billes sont préalablement lavées à l'éthanol, au méthanol et rincées avec la solution sans détergent. La première addition est laissée à incuber 1 heure. Le surnageant est placé avec de nouvelles billes en incubation pendant 3 heures.

Finalement, notre solution contient des liposomes avec des protéines reconstituées. La prochaine étape est celle de séchage du film. Cependant, la solution dans laquelle les liposomes sont dispersés contient du glycérol qui modifie les propriétés de séchage puisqu'il est hygroscopique. Il faut parvenir à éliminer ce composé.

Elimination du glycérol

Le glycérol a cette fonction protectrice c'est pourquoi il faut le remplacer. Le sucrose a été employé par Doeven et al. [106] afin d'empêcher la dénaturation des protéines lors de la phase de séchage, il est un bon candidat de substitution du glycérol. Les liposomes

sont mélangés avec une solution de NaCl 100mM, Tampon phosphate pH 7.5 50mM et sucrose 8 g.L⁻¹. On mélange 950 μ L de cette solution avec 50 μ L de nos liposomes. La concentration en glycérol est donc diminuée d'un facteur 20 et passe à 0.25 %. Cependant, il ne faut pas trop diluer les liposomes. On a alors recours à une ultracentrifugation à 70 000 rpm sur TLA 100.4 (Beckman) pendant une heure à 4°C de manière à concentrer les liposomes. Ils sont repérables car ils forment une petite tache blanche au fond du tube. Ces liposomes sont ensuite resuspendus dans 50 μ L de la solution de NaCl 100mM, Tampon phosphate 50mM et sucrose 8g.L⁻¹. La concentration lipidique finale de nos échantillons est de 3.7 10⁻⁵ g/L.

Séchage

Les liposomes vont être séchés sur des plaques d'ITO (Delta-Technologies) de résistance (sheet résistance) 20-25 Ω par carré. La préparation de ces lames est essentielle. Elles sont lavées avec de l'eau, de l'éthanol puis du chloroforme. On les rince ensuite avec de l'éthanol puis de l'eau [183]. Elles sont mises à sécher une heure dans une enceinte à vide. Des gouttelettes de 1 μ L de solutions de protéoliposomes sont déposées régulièrement sur les plaques. Des gouttelettes de 0.5 μ L conduisent à un film trop mince qui ne génère pas de vésicules géantes. Des gouttelettes trop épaisses forment un film qui s'hydrate mal. Le film est déshydraté sur la nuit dans une enceinte à vide.

Electroformation

Les vésicules sont formées par la technique d'électroformation. La chambre d'électroformation est réalisée en mettant face à face deux plaques d'ITO séparées par une cellule réalisée en PDMS (ou poly-diméthylsulfate) dont l'épaisseur est de 5 mm. Les contacts électriques sont assurés pour chacune des plaques par une fine lame conductrice autocollante liée à un générateur basse fréquence.

Le tampon de réhydratation est essentiel, une faible force ionique est nécessaire. En effet, Girard et al. [180] ont remarqué que des solutions contenant plus de 5 mM d'ions monovalents ou 1 mM d'ions bivalents empêchaient la formation de vésicules géantes. Toutefois, la présence d'ions est nécessaire pour protéger la protéine et limiter les éventuelles agrégations. La chambre remplie avec le tampon de réhydratation SB1 (Annexe H) contient donc 0.22 M de sucrose, 5mM NaCl, 0.5 mM de tampon phosphate pH 7.5, 0.1 mM MgCl₂. Elle est ensuite placée sous champ électrique alternatif sinusoïdal avec une fréquence de 12 Hz. La tension est augmentée entre 100 mV et 1.1 V à raison d'un pas de 100 mV toutes les cinq minutes. Au terme de cette rampe de tension, une tension constante de 1.1 V est appliquée pendant 3 heures. Pendant cette étape, des vésicules unilamellaires apparaissent et grossissent. Le détachement des vésicules de la plaque d'ITO est obtenu en appliquant une tension carrée de plus faible fréquence 4 Hz et d'amplitude 1.5 V pendant une demie-heure.

Les vésicules peuvent être observées dans une cellule dont les parois ont été recouvertes d'albumine de sérum bovin (ou BSA). Cette protéine empêche toute interaction non spécifique entre le verre et les vésicules de manière à éviter leur éclatement. La chambre est ensuite remplie avec une solution d'hydratation où le sucrose a été remplacé par le

glucose (solution SB2 0.22 M de glucose, 5 mM NaCl, 0.5 mM de tampon phosphate pH 7.5, 0.1 mM MgCl₂). La différence de densité entre glucose et sucrose va faire sédimenter les vésicules. Leur différence d'indice optique va rendre les vésicules visibles avec un microscope à contraste de phase. Le rayon des GUV ainsi préparées varie entre 5 et 20 μm .

Homogénéité de la reconstitution dans les vésicules géantes

Afin de vérifier la bonne incorporation des protéines OprM dans les vésicules géantes, nous avons utilisé des protéines OprM marquées avec la FITC. Les vésicules produites sont observées avec un microscope confocal. Ce mode d'observation permet de faire une coupe à une hauteur fixée de la vésicule. La figure G.5 nous montre un pourtour de

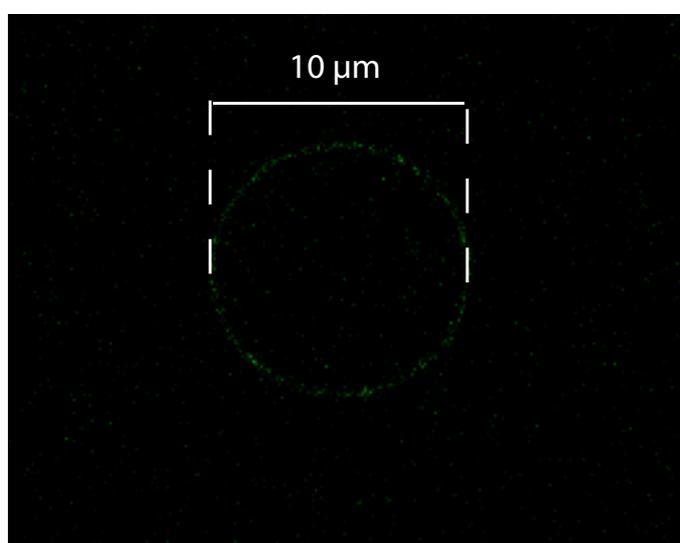


Figure G.5: Cliché d'une vésicule contenant la protéine OprM marquée par la FITC obtenue en microscope confocal

vésicule fluorescent. On observe donc une distribution homogène de OprM localisée au niveau de la bicouche.

Ce protocole utilisé avec les protéines MexA (forme native) et MexB a conduit également à une incorporation de chacune de ces protéines en vésicules. La protéine OprM est ainsi reconstituée en vésicule. La protéine MexA_{CNP} est greffée sur une bille. Les expériences de Biomembrane Force Probe peuvent être réalisées afin de mesurer la force du lien entre MexA et OprM détecté par la technique de recouvrement de fluorescence.

G.1.4 Préparation de la chambre et des pipettes

La chambre est réalisée avec deux lamelles fixées avec de la graisse à vide sur un support métallique de 5 mm d'épaisseur (figure G.6). Elle est reliée à un réservoir d'eau de manière à compenser l'effet de l'évaporation. Ce réglage doit se faire de telle sorte qu'aucun flux

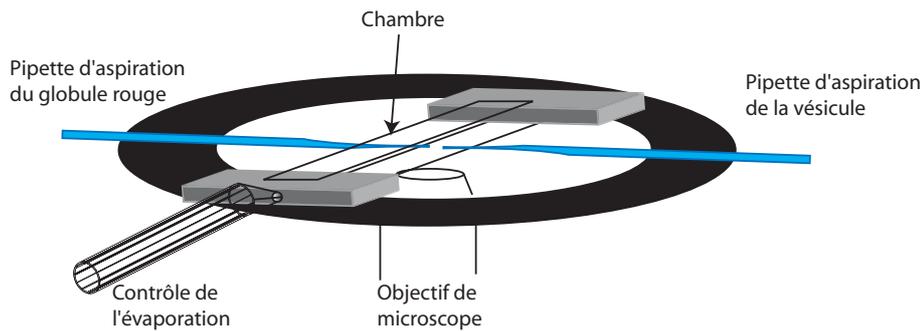


Figure G.6: Schéma de la chambre de mesure du BFP.

ne viennent perturber la mesure.

La chambre est traitée préalablement avec de la BSA pendant 45 à 60 minutes de manière à éviter tout contact non spécifique entre le verre et les vésicules.

Les micropipettes de 1.5 à 2 μm de diamètre sont préparées à partir de tubes capillaires en verre de diamètre 1 mm. Une étireuse permet par chauffage avec un laser et une traction d'obtenir deux pipettes en quelques secondes. Cependant, les pipettes sont fermées à leur extrémité du fait du chauffage. L'ouverture se fait au moyen d'une microforge de façon à obtenir une coupure nette et à la taille désirée.

Les pipettes sont alors remplies avec la solution SB2 (Annexe H) à laquelle on ajoute de la BSA (7 % massique). Elles sont laissées en incubation dans la chambre pendant 30 minutes.

L'aspiration des pipettes doit ensuite être calibrée. L'aspiration de la pipette de gauche qui porte le globule rouge est, en effet, primordiale puisque la raideur du globule est directement proportionnelle à ce paramètre selon la formule G.4. Le niveau du réservoir d'eau lié à la pipette est modifié de telle sorte qu'une impureté piégée à l'intérieur de la pipette reste immobile (il n'y a pas d'écoulement). Une fois le zéro d'aspiration fixé, on peut régler la valeur de l'aspiration désirée en abaissant le réservoir de la hauteur nécessaire.

G.1.5 Préparation d'une sonde

Billes fonctionnalisées, globules rouges et vésicules sont ensuite injectés dans la chambre de mesure. La sonde est réalisée en accolant sous microscope un globule rouge avec une bille. Pour cela, un globule rouge est aspiré dans la pipette de gauche pendant que la pipette de droite aspire une bille. Les deux pipettes sont alignées puis approchées jusqu'à ce qu'il y ait contact entre la bille et le globule. L'aspiration de la bille est alors relâchée pour permettre à cette dernière de rester collée au globule rouge. La sonde est prête.

G.1.6 Expérience de BFP

Une expérience de BFP consiste en la création puis à la rupture d'un lien entre protéines à étudier placées face à face. Dans notre cas, la protéine OprM est insérée dans les vésicules géantes et la protéine MexA est greffée sur une bille de silice de 3 μm de diamètre, qui

servira de sonde pour tester l'interaction. On a ainsi deux pipettes : l'une liée à la sonde globule rouge/bille et l'autre qui supporte la vésicule choisie (figure G.3).

La micropipette du globule rouge est montée sur un micro-manipulateur dont les mouvements sont contrôlés par une cale piézoélectrique. On peut calculer à tout instant la position x_0 de la bille si le globule rouge est au repos. La position réelle de la bille x_b est suivie (avec une résolution de 10 nm) par une caméra ultra-rapide couplée à un logiciel de suivi vidéo fourni par Vincent Croquette (Laboratoire de Physique Statistique-ENS). Quand le globule rouge est au repos : $x_b = x_0$. Quand le globule rouge est sous tension : $x_b \neq x_0$. Ainsi, à tout instant, la force exercée f sur le globule est mesurée grâce à la relation :

$$f = k_g(x_b - x_0)$$

Une expérience se déroule de la manière suivante comme décrit par la figure G.7 :

- 1 La bille se trouve au point A. Le piézoélectrique avance la micropipette de gauche et la bille se déplace vers la vésicule. La force mesurée est nulle.
- 2 Au contact de la vésicule (point B), le globule se comprime ($x_b - x_0 > 0$). La force exercée augmente jusqu'à atteindre la force maximale imposée (point C). La pente finie de cette augmentation tient au fait que vésicule comme globule rouge se déforment.
- 3 Après un temps d'attente τ choisi (100 ms dans nos expériences), le piézoélectrique repart dans l'autre sens. Deux cas se présentent alors :
 - si aucune liaison n'a été formée alors le chemin sera le même qu'à l'aller. Sur le diagramme de force, on ne note aucune différence entre l'aller et le retour.
 - si une liaison a été créée alors la bille est retenue sur la surface de la vésicule. Le globule s'allonge ($x_b - x_0 < 0$) et une force négative est mesurée dont le module augmente jusqu'au point D où le lien est rompu.

Une expérience de BFP va ainsi permettre l'enregistrement de courbes de force en fonction de la distance.

Plusieurs paramètres interviennent dans cette mesure :

- La force maximale atteinte lors du contact bille-cellule. Cette force doit être choisie de telle sorte que le contact soit bien établi mais elle ne doit pas être trop forte pour éviter à la bille d'être déportée d'un côté ou de l'autre de la vésicule. Pour nos expériences, nous avons choisi cette force maximale égale à 20 pN.
- Le temps d'attente au contact τ qui est de 100 ms dans nos expériences.
- Le taux de charge r .

Ce dernier définit le taux de croissance de la force appliquée. Pour un globule donné, et donc pour un ressort de raideur donnée k_g , le taux de charge dépend de la vitesse de

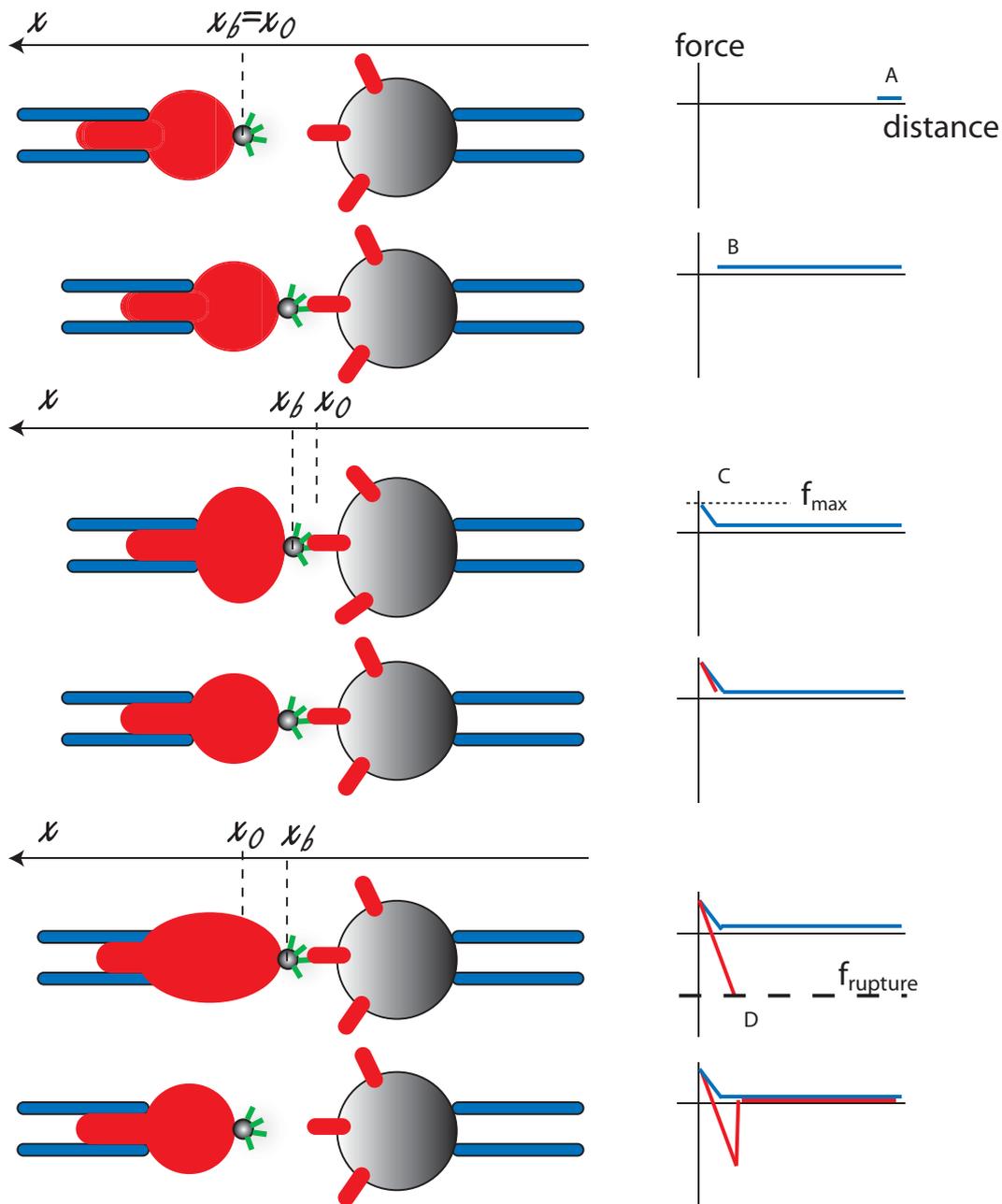


Figure G.7: Déroulement d'une expérience de BFP quand un lien est formé entre deux protéines. Les figures de gauche représentent une expérience vue par la caméra. Les figures de droite résument l'enregistrement de la courbe force en fonction de la distance.

translation, v , du piézoélectrique. Ce paramètre est essentiel dans nos expériences. En effet, un lien va subir une force f qui croît au cours du temps t :

$$f = k_g vt = rt \tag{G.5}$$

La résolution du BFP est limitée par la cadence de la caméra qui est d'une image toutes les 8.3 ms (cadence de 120 Hz) pour des taux de charge consigne inférieurs à 1000 pN/s

et de 2.8 ms (cadence de 360 Hz) au-delà. La force minimale qui puisse être enregistrée est donc donnée par le produit du taux de charge effectif par la période entre les prises de vue.

G.2 Résultats obtenus

Nous avons étudié le lien entre les protéines MexA et OprM. Les expériences de BFP créent un contact entre une bille fonctionnalisée par des streptavidines et par des protéines MexA_{CNP} et une vésicule dans laquelle des protéines OprM sont reconstituées. A priori quatre types d'interactions peuvent apparaître :

- l'interaction spécifique entre la protéine OprM et la protéine MexA,
- l'interaction entre la protéine OprM et la streptavidine présente sur la bille,
- l'interaction entre les lipides de la vésicule et la protéine MexA ,
- l'interaction entre les lipides de la vésicule et la streptavidine.

Nous avons réalisé trois types de mesures pour discriminer les interactions spécifiques et non-spécifiques au lien MexA-OprM. Les accrochages suivants ont été testés :

expérience 1 entre une bille fonctionnalisée par MexA_{CNP} et une vésicule contenant OprM

expérience témoin 2 entre une bille sans protéine MexA et une vésicule avec OprM

expérience témoin 3 entre une bille avec MexA et une vésicule sans OprM

Les taux de charge utilisés se situent entre 10 et 3000 pN.s⁻¹.

Toutefois, nous avons rencontrés des problèmes pour la mise en place de ces expériences. En effet, les courbes d'enregistrement de la force en fonction de la distance sont décalées par rapport au zéro. Cet effet est présent dans les trois types de mesures, il peut être dû à la présence de filaments entre la bille et la vésicule. Nous n'avons donc pas pu obtenir de résultats sur la liaison entre les protéines MexA et OprM.

Annexe H

Solutions pour les expériences de Biomembrane Force Probe

Solution d'hydratation SB1

- 0.22 M de sucrose
- 5mM NaCl
- 0.5 mM de tampon phosphate pH 7.5
- 0.1mM MgCl₂

Solution d'observation SB2

- 0.22 M de glucose
- 5mM NaCl
- 0.5 mM de tampon phosphate pH 7.5
- 0.1mM MgCl₂
- 7 % BSA (pourcentage massique)

Solution d'incubation des chambres SB3

- 0.22 M de glucose
- 5mM NaCl
- 0.5 mM de tampon phosphate pH 7.5
- 0.1mM MgCl₂

Bibliographie

Introduction

- [1] PHISICKY EM., FIELDS S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis *Microbiological Reviews* **59(1)** (1995), 94-123.
- [2] MONOD J., WYMAN J., CHANGEUX JP. On the nature of allosteric transitions: a plausible model *J. Mol. Biol* **12** (1965), 88-118.
- [3] FORMOSA T., BARRY J., ALBERTS BM., GREENBLATT J. Using protein-affinity chromatography to probe structure of protein machines *Methods. Enzymol.* **208** (1991), 24-45.
- [4] SCHAGGER H., VON JAGOW G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form *Anal. Biochem.* **199(2)** (1991), 19958-64.
- [5] CAMACHO-CARJAVAL MM., WOLLSCHIED B., AEBERSOLD R., STEIMLE V., SCHWAMEL WW. Two-dimensional Blue native/SDS gel electrophoresis of multi-protein complexes from whole cellular lysates: a proteomics approach *Molecular and cellular proteomics* **3(2)** (2004), 176-82.
- [6] PLANCON L., JANMOT C., LE MAIRE M., DESMADRIL M., BONHIVERS M., LETELIER L. and BOULANGER P. Characterization of a High-affinity Complex Between the Bacterial Outer Membrane Protein FhuA and the Phage T5 Protein pb5 *J. Mol. Biol.* **318** (2002), 557-69.
- [7] RAVAUD S., DO CAO MA., JIDENKO M., EBEL C., LE MAIRE M., JAULT JM, DI PIETRO A., HASER R and AGHAJARI N. The ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis* is a functional dimer when in a detergent-solubilized state *Biochem. J.* **395** (2006), 345-53.
- [8] COHEN E., GOLDSHLEGER R, SHAINSKAYA A., TAL DM., EBEL C., LE MAIRE M., KARLISH SJD. Purification of Na,K-ATPase Expressed in *Pichia pastoris* Reveals an Essential Role of Phospholipid-Protein Interactions *J. Biol. Chem* **280(17)** (2005), 16610-18.
- [9] TRAUT RR., CASIANO C., ZECHELE N. Cross-linking of proteins subunits and ligands by the introduction of disulfide bonds *Protein function: a practical approach* ed T.E. Creighton , IRL Press, Oxford p103-133.
- [10] PERIASAMY A., DAY RN. Visualizing protein interactions in living cells using digitized GFP imaging and FRET microscopy *Methods Cell Biol.* **58** (1999), 293-314.

BIBLIOGRAPHIE

- [11] HOPPE A., CHRISTENSEN K., SWANSON JA. Fluorescence Resonance Energy Transfer-based stoichiometry in living cells *Biophys. J.* **83(6)** (2002), 3652-64.
- [12] MACBEATH G., SCHREIBER SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination *Science* **289** (2000), 1760-63.
- [13] COURTY S., BOUZIGUEZ C., LUCCARDINI C., EHRENSPERGER MV., BONNEAU S., DAHAN M. Tracking individual proteins in living cells using single quantum dot imaging *Methods Enzym.* **414** (2006), 211-228.
- [14] MURAKOSHI H., IINO R., KOBAYASHI T., FUJIWARA T., OHSHIMA C., YOSHIMARA A., KUSUMI A. Single-molecule imaging analysis of RAS activation in living cells *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101** (2004), 7317-22.
- [15] KARLSSON R. SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas *J. Mol. Recognit.* **17** (2004), 151-61.
- [16] STENLUND P., BABCOCK GJ., SODROSKI J., MYSZKA DG. Capture and reconstitution of G-protein coupled receptors on a biosensor surface. *Anal. Biochem.* **316** (2003), 243-50.
- [17] YANG Y., WANG H., ERIE DA. Quantitative characterization of biomolecular assemblies and interactions using atomic force microscopy *Methods* **29** (2003), 175-87.
- [18] PIERCE MM., RAMAN CS., NALL BT. Isothermal Titration Calorimetry of protein-protein interactions *Methods* **19** (1999), 213-21.

Les pompes à efflux

- [19] CATTOIR V. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries *Pathologie Biologie* **52** (2004), 607-616 .
- [20] BORGES-WALMSLEY MI., WALMSLEY AR. The structure and function of drug pumps *Trends in Microbiology* **9(2)** (2001), 71-9.
- [21] POOLE K. Efflux-mediated antimicrobial resistance *J. Antimicrob. Chemother.* **56** (2005), 20-51.
- [22] ZGURSKAYA HI., NIKAIDO H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes *Molecular Microbiology* **37(2)** (2000), 219-225.
- [23] MOKTONOV V., MOKHONOVA E., YOSHIHARA E., MASUI R., SAKAI M., AKAMA H., NAKAE T., Multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*: overexpression, purification, and initial structural characterization *Protein Expr. Purif.* **40** (2005), 91-100.
- [24] ZGURSKAYA HI., NIKAIDO H., Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli* *J. Bacteriol.* **182** (2000), 4264-67.

- [25] NEHME D., POOLE K., Interaction of the MexA and MexB components of the MexAB-OprM Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of MexA Extragenic Suppressors of a T587I Mutation in MexB *Antimicrob. Agents Chemother.* **49(10)**(2005), 4375-4378.
- [26] JOCELYN K., MIDDLEMISS K., POOLE K. Differential Impact of MexB mutations on substrate selectivity of the MexAB-OprM multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* **186(5)** (2004), 1258-69.
- [27] MURAKAMI S., NAKASHIMA R., YAMASHITA E., YAMAGUCHI A., Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB *Nature* **419** (2002), 587-93.
- [28] YU EW., MC-DERMOTT G., ZGURSKAYA HL., NIKAIDO H., KOSHLAND DE., Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump *Science* **300** (2003) 976-80.
- [29] MURAKAMI S., TAMURA N., SAITO A., HIRATA T, YAMAGUCHI A., Extra-membrane central pore of multidrug exporter AcrB in *Escherichia coli* plays an important role in drug transport *J. Biol. Chem.* (2003)
- [30] MURAKAMI S., NAKASHIMA R., YAMASHITA E., MATSUMOTO T., YAMAGUCHI A., Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism *Nature* **443(14)** (2006), 173-79.
- [31] SEEGER MA., SCHIEFNER A., EICHER T., VERREY F., DIEDERICHS K., POS KM., Structural asymmetry of AcrB trimer suggest a peristaltic pump mechanism *Science* **313** (2006), 1295-98.
- [32] SENNHAUSER G., AMSTUTZ P., BRIAND C., STORCHENEGGER O., GRÜTTER MG., Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPin inhibitors *PLoS Biology* **5(1)** (2007), 0001-0008.
- [33] KORONAKIS V., TolC-The bacterial exit duct for proteins and drugs *FEBS Lett.* **555** (2003), 66-71.
- [34] AKAMA H., KANEMAKI M., YOSHIMURA M., TSUKIHARA T., KASHIWAGI T., YONEYAMA H., NARITA S, NAKAGAWA A., NAKAE T. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* *J. Biol. Chem.* **279(51)** (2004), 52816-19.
- [35] KORONAKIS V., SHARFF A., KORONAKIS E., LUISI B., HUGHES C., Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export *Nature* **405** (2000), 914-19.
- [36] ANDERSEN C. KORONAKIS E., BOKMA E., ESWARAN J., HUMPHREYS D., HUGHES C., KORONAKIS V., Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99(17)** (2000), 11103-8.
- [37] AKAMA H., MATSUURA T., KASHIWAGI S., YONEYAMA H., TSUKIHARA T., NAKAGAWA A., NAKAE T., Crystal structure of the membrane fusion protein MexA of the multidrug transporter *J. Biol. Chem.* **279** (2004), 25939-42.

BIBLIOGRAPHIE

- [38] HIGGINS MK., BOKMA E., KORONAKIS E., HUGHES C., KORONAKIS V., Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101(27)** (2004), 9994-9999.
- [39] YONEYAMA H., MASEDA H., KAMIGUCHI H. NAKAE T., Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA, B-OprM efflux pump in textit*Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane *J. Biol. Chem.* **275** (2000), 4628-34.
- [40] VACCARO L., KORONAKIS V., SANSOM MSP., Flexibility in a drug transport accessory protein: molecular dynamics simulations of MexA *Biophys. J.* **91** (2006), 558-564.
- [41] ELKINS CA., NIKAIDO H., Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its C-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump *J. Bact.* **185(18)** (2003), 5349-56.
- [42] NARITA SI., EDA S, YOSHIRA E., NAKAE T., Linkage of the efflux-pump expression level with substrate extrusion rate in the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308** (2003), 922-26.
- [43] FERNANDEZ-RECIO J., WALAS F., FEDERICI L., VENTAKATESH PRATAP J., BAVRO VN., NUNEZ MIGUEL R., MIZUGUCHI K., LUISI B., A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria *FEBS Lett.* **578** (2004), 5-9.

Protéines : Expression et purification

- [44] SAMBROOK JG., FRITSCH EF. Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual 2^e ed. *Cold Spring Harbour* (1989).
- [45] GUZMAN LM., BELIN D., CARSON MJ., BECKWITH J. Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter *J. Bacteriol.* **177** (1995), 4121-30.
- [46] MIROUX B., WALKER JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli* : mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels *J. Molec. Biol.* **260(3)** (1996), 289-98.
- [47] BROUTIN I., BENABDELHAK H., MORREEL X., LASCOMBE MB., LEROUGE D., DUCRUIX A. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of the outer membrane efflux proteins OprM and OprN from *Pseudomonas aeruginosa* *Act. Cryst.* **F61** (2005), 315-8.
- [48] LAMBERT O., BENABDELHAK H., CHAMI M., JOUAN L., NOUAILLE E., DUCRUIX A., BRISSON A. Trimeric structure of OprN and OprM efflux proteins from *Pseudomonas aeruginosa* from 2D electron crystallography *J. Struct. Biol.* **150** (2005), 50-7.
- [49] BURNETTE WN. "Western blotting" : electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A *Anal. Biochem.* **112(2)** (1981), 195-203.
- [50] NOIREAUX V., BAR-ZIV R., LIBCHABER A. Principle of cell-free genetic circuit assembly *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* **100(22)** (2003), 12672-77.

- [51] NOIREAUX V., LIBCHABER A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101(51)** (2004), 17669-74.

Membranes Fluides

- [52] SINGER SG., NICOLSON GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes *Science* **175** (1972), 720-1.
- [53] SALOME L., LENNE PF., DESTAINVILLE N. Membranes biologiques : vers un modèle physique. *Images de la physique-CNRS* (2000).
- [54] ISRAELACHVILI J. *Intermolecular and surface forces* Academic Press (1985).
- [55] CANDAU SJ., ODA R., LEQUEUX F., MACKINTOSH FC. Structure et dynamique d'autoassemblages fibrillaires de tensioactifs *Images de la physique-CNRS* (2000).
- [56] BICKEL T. *Interactions polymères-membranes : une approche locale* Thèse de l'Université de Strasbourg 1 (2001).
- [57] GIRARD P., PROST J. BASSEREAU P. Passive or active fluctuations in membranes containing proteins *Phys. Rev. Lett.* **94(8)** (2005).
- [58] KOSEVITCH AM., LIFSCHITZ EM., LANDAU ED., PITAEVSKII LP *Theoretical physics : Theory of elasticity* Pergamon Press.
- [59] HELFRICH W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments *Z Naturforsch* **28(11)** (1973), 693-703.
- [60] CATES ME, ROUX D Random bilayer phases of dilute surfactant solutions *J. Phys. Condensed matter* **2 Complément A** (1993), SA339-SA346.
- [61] PORTE G. Lamellar phases and disordered phases of fluid bilayer membranes *J. Phys. Condens. Matter* **4** (1992), 8649-70.
- [62] SAFRAN S. *Statistical thermodynamics of surfaces, interfaces and membranes* Addison-Wesley Reading, MA (1994).
- [63] DE GENNES PG., TAUPIN C. Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces *J. Phys. Chem.* **86(13)** (1982), 2294-2304.
- [64] FREYSSINGEAS E. *Diffusion du rayonnement par des phases de membranes : phases lamellaires, phases éponges*. Thèse de l'Université de Bordeaux 1 (1994).
- [65] LU JR., LI ZX., THOMAS RK., BINKS BP., CRICHTON D., FLETCHER PDI, MCNAB JR., PENFOLD J. The structure of monododecyl pentaethylene glycol monolayers with and without dodecane at the air/solution interface : a neutron reflexion study *J. Phys. Chem. B* **102** (1998) 5785-93.
- [66] MOREAU P. *Diffusion moléculaire d'un dopant hydrosoluble dans une phase lamellaire lyotrope : transition smectique-cholestérique dans un mélange de molécules amphiphiles* Université Bordeaux 1 (2004)

BIBLIOGRAPHIE

- [67] PORTE G., MARIGNAN J., BASSEREAU P., MAY R. Shape transformations of the aggregates in dilute surfactant solutions - A small-angle neutron scattering study *J. Phys. (France)* **49** (1988), 511-519.
- [68] ROUX D., COULON C., CATES ME. Sponge phases in surfactant solutions *J. Phys. Chem* **96** (1992), 4174-4187
- [69] SKOURI M., MARIGNAN J., APPELL J., PORTE G. Fluid membranes in the semi-rigid regime : scale invariance *J. Phys. II (France)* **1** (1991), 1121-1132.
- [70] GOLUBOVITCH L., LUBENSKY TC. Thermal fluctuations and phase-equilibrium in microemulsions *Phys. Rev. A* **41(8)** (1990) 4346-66.
- [71] KURTISOVSKI E., TAULIER N., OBER R., WAKS M., URBACH W. Molecular origin of model membrane bending rigidity *Phys. Rev. Lett.* (2007).
- [72] STREY R., SCHOMACKER R., ROUX D., NALLET F., OLSSON U. Dilute lamellar and L3 phases in the binary water-C12E5 system *J. Chem. Soc.* **86(12)** (1990), 2253-2261.
- [73] GAZEAU D., BELLOCQ AM., ROUX D., ZEMB T. Experimental evidence for random surface-structures in dilute surfactant solutions *Euro. Physics Lett.* **9(5)** (1989), 447-52.
- [74] STREY R., JAHN W., PORTE G., BASSEREAU P. Freeze fracture electron microscopy of dilute lamellar and anomalous isotropic (L3) phases *Langmuir* **6** (1990), 1635-39.
- [75] VINCHES C. *Etudes dynamiques de phases éponges diluées : écoulement en milieu poreux et mesures diélectriques* Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux I, 1994.
- [76] BARD AJ., FAULKNER LR. *Electrochimie : Principes, méthodes et applications*, Ed Masson (1983).
- [77] VINCHES C., COULON C., ROUX D. The symmetric-asymmetric transition of the sponge phase I Effects of salinity *J. Phys. II. France* **4** (1994), 1165-1193.
- [78] ENGBLOM J., HYDE ST. On the Swelling of bicontinuous lyotropic mesophases *J. Phys. II (France)* **5** (1995), 171-190.
- [79] MALDONADO A., URBACH W., LANGEVIN D. Swelling behavior and local topology of an L3 (sponge) phase *Phys. Rev. E* **54(2)** (1996), 1774-1778.
- [80] LEVITZ P. Chap2 : Generic methods for the characterization of porous Media in *Handbook of porous media* Wiley-VCH (2002)
- [81] LEVITZ P. Toolbox for 3D imaging and modeling of porous media: relationship with transport properties. *Cement and Concrete Res.* **37(3)** (2007), 351-9.

Diffusion de protéines membranaires

- [82] BROWN R. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827 on the particles contained in the pollen of plants and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies *Philosophical Mag.* **4** (1828) 161-173.
- [83] EINSTEIN A. *Investigations on the theory of the Brownian motion*, Dover Pub., Inc. (1985).
- [84] PERRIN J. Mouvement brownien et réalité moléculaire *Ann. Chim. Phys.* **19(8)** (1909), 5-114.
- [85] LAMB H. *Hydrodynamics*, ed. Cambridge University Press (1932) section 343.
- [86] LEAL LG. *Laminar flow and convective transport processes*, ed. Butterworth-Heinemann (1992).
- [87] SAFFMAN PG., DELBRÜCK M. Brownian motion in biological membranes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72(8)** (1975), 3111-3.
- [88] BATES IR., WISEMAN PW., HANRAHAN JW. Investigating membrane proteins dynamics in living cells *Biochem. Cell. Biol.* **84(6)** (2006), 825-31.
- [89] EHRENSPERGER MV., HANNUS C., VANNIER C., TRILLER A., DAHAN M. Multiple association states between glycine receptors and gephyrin identified by SPT analysis *Biophys. J.* **109** (2007),
- [90] BACIA K. SCHERFELD D., KAHIA N., SCHWILLE P. Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes *Biophys. J.* **87(2)** (2004), 1034-43.
- [91] SAFFMAN PG. Brownian motion in thin sheets of viscous fluid *J. Fluid. Mech.* **73** (1976), 593-602.
- [92] STONE HA. Philip Saffman and viscous flow theory *J. Fluid Mech.* **409** (2000), 165-83.
- [93] HUGHES BD., PAILTHORPE BA., WHITE LR. The translational and rotational drag on a cylinder moving in a membrane *J. Fluid. Mech.* **110** (1981), 349-72.
- [94] EVANS E., SACKMANN E. Translational and rotational drag coefficients for a disk moving in a liquid membrane associated with a rigid substrate *J. Fluid. Mech.* **194** (1988), 553-61
- [95] STONE HA., AJDARI A. Hydrodynamics of particles embedded in a flat surfactant layer overlying a subphase of finite depth *J. Fluid. Mech.* **369** (1998), 151-173.
- [96] KANG YS., MAJDA M. Headgroup immersion depth and its effect on the lateral diffusion of amphiphiles at the air-water interface *J. Phys. Chem B* **104** (2000), 2082-89.
- [97] TSAPIS N., REISS-HUSSON F., OBER R., GENEST M., HODGES RS., URBACH W. Self diffusion and spectral modifications of a membrane protein, the Rubrivivax gelatinosus LH2 complex, incorporated into a monoolein cubic phase *Biophys. J.* **81** (2001), 1613-23.

BIBLIOGRAPHIE

- [98] PETERS R., CHERRY RJ. Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: experimental test of the Saffman-Delbrück equations *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** (1982), 4317-21.
- [99] DOEBLER R., BASARAN N., GOLDSTON H. HOLLOWAY PW. Effect of protein aggregation in the aqueous phase on the binding of membrane proteins to membranes *Biophys. J.* **76** (1999), 928-36.
- [100] GRABE M., NEU J., OSTER G., NOLLERT P. Protein interactions and membrane geometry *Biophys. J.* **84** (2003), 854-68.
- [101] VAZ WLC., CRIADO M., MADEIRA VMC., SCHOELLMANN G., JOVIN TM. Size dependence of the translational diffusion of large integral membrane proteins in liquid-crystalline phase lipid bilayers. A study using fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* **21** (1982), 5608-12.
- [102] CRIADO M., VAZ WLC., BARRANTES F., JOVIN TM. Translational diffusion of acetylcholine receptor (monomeric and dimeric forms) of *Torpedo marmorata* reconstituted into phospholipid bilayers studied by fluorescence recovery after photobleaching *Biochemistry* **21** (1982), 5750-55.
- [103] LIU C., PAPRICA A., PETERSEN NO. Effects of size of macrocyclic polyamides on their rate of diffusion in model membranes *Biophys. J.* **73** (1997), 2580-87.
- [104] KUCIK DF., ELSON EL., SHEETZ MP. Weak dependence of mobility of membrane protein aggregates on aggregate size supports a viscous model of retardation of diffusion *Biophys. J.* **76** (1999), 314-22.
- [105] LEE CC., PETERSEN NO. The lateral diffusion of selectively aggregated peptides in giant unilamellar vesicles *Biophys. J.* **84** (2003), 1756-64.
- [106] DOEVEN MK., FOLGERING JHA., KRASNIKOV V., GEERTSMA ER., VAN DER BOGAART G., POOLMAN B. Distribution, lateral mobility, and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles *Biophys. J.* **88** (2005), 1134-42.
- [107] GAMBIN Y. *Dynamique en milieu confinés : Peptides et protéines en interaction avec des membranes modèles* Thèse de doctorat de l'Université Paris VI. (2006).
- [108] VAZ WLC., HALLMAN D. Experimental evidence against the applicability of the Saffman-Delbrück model to the translational diffusion of lipids in phosphatidylcholine bilayer membranes *FEBS Letters* **152(2)** (1983), 287-90.
- [109] VAZ WLC., GOODSID-ZALDUONDO F., JACOBSON K. Lateral diffusion of lipids and proteins in bilayer membranes *FEBS Letters* **174(2)** (1984), 199-207.
- [110] COHEN MH., TURNBULL DJ. Molecular transport in liquids and glasses *J. Chem. Phys.* **31(3)** (1959), 1164-69.
- [111] DAVOUST J., LEGER L., DEVAUX P. Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurements of transport coefficients of biological macromolecules *Embo J.* **1 (10)** (1982), 1233-38.

- [112] GAMBIN Y., MASSIERA G., RAMOS L., LIGOURE C., URBACH W. Bounded step superdiffusion in an oriented hexagonal phase *Phys. Rev. Lett.* **94** (2005).
- [113] SEREDA T.J., MANT C.T., QUINN A.M., HODGES R.S. Effect of the alpha-amino group on peptide retention behavior in reversed-phase chromatography. Determination of the pKa values of the alpha-amino group of nineteen different N-terminal amino acid residues *J. Chromatogr.* **646** (1993), 17-30.
- [114] LIU F., LEWIS R.N.A.H., HODGES R.S., MCELHANEY R.N. Effect of Variations in the Structure of a Polyleucine-Based α -Helical Transmembrane Peptide on Its Interaction with Phosphatidylethanolamine Bilayers *Biophys. J.* **87** (2004), 2470-82.
- [115] GAMBIN Y., LOPEZ-ESPARZA R., REFFAY M., SIERECKI E., GOVINSKY N., GENEST M., HODGES R., URBACH W. Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103** (2006), 2098-102.
- [116] PAUTSCH A., SCHULTZ G.E. High resolution structure of the outer membrane protein A (OmpA) transmembrane domain *J. Mol. Biol.* **298** (2000), 273-82.
- [117] PEBAY-PEROULA E., RUMMEL G., ROSENBUCH J.P., LANDAU E.M. X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.50 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases *Science* **277** (1997) 1676-81.
- [118] UNWIN N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution *J. Mol. Biol.* **346**(4) (2005), 967-89.
- [119] TOYOSHIMA C., NAKASAKO M., NOMURA H., OGAWA H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution *Nature* **405** (2000), 647-55.
- [120] FLEISCHER S., WANG C.T., HYMEL L., SEELIG J., BROWN M.F., HERBETTE L., SCARPA A., MCLAUGHIN A.C., BLASIE J.K. in *Function and molecular aspects of biomembrane transport* Quagliariello E. Ed (1979), 465-85.
- [121] HEEGAARD C.W., LE MAIRE M., GULIK-KRZYWICKI T., MOLLER J.V. Monomeric state and Ca^{2+} transport by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, reconstituted with an excess of phospholipid *J. Biol. Chem.* **265**(20) (1990), 12020-8.
- [122] FATTAL D.R., BEN-SHAUL A. A molecular model for lipid-protein interaction in membranes: the role of hydrophobic mismatch *Biophys. J.* **65** (1993), 1795-1809.
- [123] DE PLANQUE M.R.R., KILLIAN J.A. Protein-lipid interactions studied with designed transmembrane peptides: role of hydrophobic mismatch and interfacial anchoring *Molec. Membrane Biol.* **20** (2003), 271-84.
- [124] DAVIS J.H., CLARE D.M., HODGES R.S., BLOOM M. Interaction of a synthetic amphiphilic polypeptide and lipids in a bilayers structure *Biochemistry* **22** (1983), 5298-305.
- [125] PETRACHE H.I., ZUCKERMAN D.M., KILLIAN J.A., KOEPELLE R.E., WOOLF T.B. Hydrophobic matching mechanism investigated by molecular dynamics simulation *Langmuir* **18** (2002), 1340-51.

- [126] TAULIER N., NICOT C., WAKS M., HODGES RS., OBER R., URBACH W. Unbinding-binding transition induced by molecular snaps in model membranes *Biophys. J.* **78(2)** (2000) 857-65.
- [127] STANDBERG E., KILLIAN JA. Snorkeling of lysine chains in transmembrane helices: how easy it can get *FEBS Lett.* **544** (2003), 69-73.

Interactions protéine-protéine

- [128] DOEVEN MK., FOLGERING JHA., KRASNIKOV V., GEERTSMA ER., VAN DER BOGAART G., POOLMAN B. Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles *Biophys. J.* **88** (2005), 1134-42.
- [129] BERK DA., YUAN F., LEUNIG M., JAIN RK. Direct in vivo measurement of targeted binding in a tumor xenograft *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94** (1997) 1785-90.
- [130] REITS EA., NEEFJES JJ. From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells *Nat. Cell Biol.* **3** (2001) E145-47.
- [131] ANDERSEN DM., WENNERSTROM H. Self-diffusion in bicontinuous cubic phases, L3 phases and microemulsions *J. Phys II* **94** (1990) 8683.
- [132] MALDONADO A., NICOT C., WAKS M., OBER R., URBACH W., LANGEVIN D. Confined diffusion in a sponge phase *J. Phys. Chem.* **108** (2004) 2893-7.
- [133] CANTOR CR., SCHIMMEL PR. *Biophysical chemistry. Part II Techniques for the study of biological structure and function* (1980) p.561-562.
- [134] ZHANG W., BARBAGALLO R., MADDEN C., ROBERTS CJ., WOOLFORD A. ALLEN S. Progressing single biomolecule force spectroscopy measurements for the screening of DNA binding agents *Nanotechnology* **16(10)** (2005), 2325-33.
- [135] WEBER PC., OHLENDORF DH., WENDOLOSKI JJ., SALEMME FR. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin *Science* **243** (1989), 85-8.
- [136] HENDRICKSON WA., PAHLER A., SMITH JL., SATOW Y., MERRITT EA., PHIZACKERLEY RP. Crystal-structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **86** (1989), 2190-4.
- [137] FREITAG S., LETRONG I., KLUMB L., STAYTON P., STENKAMP RE. Structural studies of the streptavidin binding loop *Protein Sci.* **6** (1997), 1157-66.
- [138] FLORIN EL., MOY VT., GAUB HE. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs *Science* **264** (1994), 415-7.
- [139] CHILKOTI A. BOLAND T., RATNER BD. STAYTON PS. The relationship between ligand-binding thermodynamics and protein-ligand interaction forces measured by atomic force microscopy *Biophys. J.* **69** (1995), 2125-30.
- [140] MERKEL R., NASSOY P., LEUNG A., RITCHIE K., EVANS E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy *Nature* **397** (1999), 50-53.

- [141] PINCET F., HUSSON J. The solution to the streptavidin-biotin paradox: the influence of history on the strength of single molecular bonds *Biophys. J.* **89** (2005), 4374-81.
- [142] OTA T., SUGIURA T., KAWATA S. Rupture force measurement of biotin-streptavidin bonds using optical trapping *Applied Phys. Lett.* **87** (4) (2005) Art. No. 043901.
- [143] PIERRES A., TOUCHARD D., BENOLIEL AM., BONGRAND P. Dissecting streptavidin-biotin interaction with a Laminar flow chamber *Biophys. J.* **82**(6) (2002), 3214-3223.

Dynamique d'association

- [144] JONSSON U., FAGERSTAM L., IVARSSON B., JOHNSON B., KARLSSON R., LUNDH K., LOFAS S., PERSSON B., ROOS H., RONNBERG I., SJOLANDER S., STENBERG E., STAHLBERG R., URBANICZKY C., OSTLIN H., MALMQVIST M. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology *BioTechniques* **11** (1991), 620-27.
- [145] MALMQVIST M. Biospecific interaction analysis using biosensor technology *Nature* **361** (1993), 186-87.
- [146] BAUDRY J., ROUZEAU C., GOUBAULT C., ROBIC C., COHEN-TANNOUDJI L., KOENIG A., BERTRAND E., BIBETTE J. Acceleration of the recognition rate between grafted ligands and receptors with magnetic forces *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103** (2006) 16076-78.
- [147] BERG OG. Orientation constraints in diffusion-limited macromolecular association - the role of surface-diffusion as a rate-enhancing mechanism *Biophys. J.* **47** (1985), 1-14.
- [148] TREPOUT S., MORNET S., BENABDELHAK H., DUCRUIX A., BRISSON AR., LAMBERT O. Membrane protein selectively oriented on solid support and reconstituted into a lipid membrane *Langmuir* **23**(5) (2007), 2647-54.
- [149] KRAMERS HA. Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions. *Physica* **7** (1940), 284-304.
- [150] GONCALVES RP., AGNUS G., SENS P., HOUSSIN C., BARTENLIAN B., SCHEURING S. Two chamber AFM: probing membrane proteins separating two aqueous compartments *Nat. Methods* **3**(12) (2007), 1007-1012.
- [151] ALLAIN JM. Thèse de doctorat, Université Paris VI, 2005.
- [152] ROUX A. *Tubes de membrane dans le trafic intracellulaire : aspects physiques et biologiques* Thèse de doctorat, Université Paris VII, 2004.
- [153] FYGENSON DK., MARKO JF., LIBCHABER A. Mechanics of micro-tubule-based membrane extension *Phys. Rev. Lett.* **79** (1997), 4497-4500.
- [154] EVANS E., RAWICS W. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes *Phys. Rev. Lett.* **64** (1990), 2094-97.

Forces de Liaison

- [155] PINCET F., GOURIER C., TARESTÉ D., PEREZ E. Energies of weak biochemical bonds from physical and colloidal methods *Recent Res. Devel. Surface and colloids* **1** (2004), 1-24.
- [156] HUSSON J. *Spectroscopie dynamique de forces* Thèse de doctorat, Université Paris VI, 2005.
- [157] EVANS E., RITCHIE K., MERKEL R. Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkage at biological interfaces *Biophys. J.* **68** (1995), 2580-87.
- [158] EVANS E., RITCHIE K. Dynamic strength of molecular adhesion bonds *Biophys. J.* **72** (1997), 1541-55.
- [159] MERKEL R. Force spectroscopy on single passive biomolecules and single biomolecular bonds *Physics Reports* **346** (2001), 343-385.
- [160] BINNIG G., QUATE CF., GERBER C. Atomic force microscope *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986), 930-33.
- [161] BINNIG G., GERBER C., SOLL E., ALBRECHT TR. QUATE CF. Atomic resolution with atomic force microscope *Eur. Phys. Lett.* (1987), 1281-86.
- [162] DUCKER WA., SENDEN TJ., PASHLEY RM. Measurement of forces in liquids using a force microscope *Langmuir* **8** (1992), 1831-36.
- [163] CROCKER JC., GRIER DG. Microscopic measurement of the pair interaction potential of charge-stabilized colloid *Phys. Rev. Lett.* **73** (1994), 352-55.
- [164] BELL GI. Models for the specific adhesion of cells to cells *Science* **200** (1978), 618-27.
- [165] EVANS E. Energy landscapes of biomolecular adhesion and receptor anchoring at interfaces explored with dynamic force spectroscopy *Faraday Discuss.* **111** (1998), 1-16.
- [166] EVANS E. Detachment of agglutinin-bonded red-blood-cells *Biophys. J.* **59** (1991), 838-72.
- [167] SIMSON DA., ZIEMANN F., STRIGL M., MERKEL R. Micropipet-based pico force transducer: In depth analysis and experimental verification *Biophys. J.* **74** (1998), 2080-88.
- [168] RIGAUD JL., PATERNOSTRE M., BLUZAT A. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents *Biochemistry* **27**, 2677-88.
- [169] RIGAUD JL., PITARD B., LEVY D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes : application to energy-transducing membrane proteins. *Biochem. Biophys. Acta* **1231**, 223-46.
- [170] RIGAUD JL., LEVY D., MOSSER G., LAMBERT O. Detergent removal by non-polar polystyrene beads: Application to membrane reconstitution and two-dimensional crystallization *Eur. Biophys. J.* **27** (1998), 305-19.
- [171] REEVES JP., DOWBEN RM. *J. Cell. Physiol.* **73** (1969) 49-60.

- [172] DARSZON A., VANDENBERG CA., SCHONFELD M., ELLISMAN MH., SPITZER NC, MONTAL M. Reassembly of protein-lipid complexes into large bilayer vesicles: perspectives for membrane reconstitution *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **77** (1980) 239-43.
- [173] NEEDHAM D., EVANS E. Structure and mechanical-properties of giant lipid (DMPC) vesicle bilayers from 20-degrees-C below to 10-degrees-C above the liquid-crystal crystalline phase-transition at 24-degrees-C *Biochemistry* **27** (1988), 8261-69.
- [174] RODRIGUEZ N., PINCET F., CRIBIER S. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: A comparison by fluorescence microscopy *Coll. and Surf. B, Biointerfaces* **42** (2005), 125-30.
- [175] ANGELOVA MI., DIMITROV D. Liposome electroformation *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **81** (1986), 303-11.
- [176] ANGELOVA MI., SOLEAU S., MELEARD P., FAUCON JF., BOTHOREL P. *Colloid Polym. Sci.* **89** (1992), 127-31.
- [177] MATHIVET L., CRIBIER S., DEVAUX PF. Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field *Biophys. J.* **70** (1996), 1112-21.
- [178] ESTES DJ., MAYER M. Electroformation of giant liposomes from spin-coated films of lipids *Colloid Surf. B: Biointerfaces* **42** (2005), 115-23.
- [179] MANNEVILLE JB., BASSEREAU P., RAMASWAMY S., PROST J. Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration *Phys. Rev. E* **64** (1994), 021908.
- [180] GIRARD P., PECREAUX J., LENOIR G., FALSON P., RIGAUD JL., BASSEREAU P. A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles *Biophys. J.* **87**(1) (2004), 419-29.
- [181] RIGAUD JL., LEVY D. Reconstitution of membrane proteins into liposomes *Meth. Enzym.* **372** (2003), 65-86.
- [182] LE MAIRE M., CHAMPEIL P., MOLLER JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents *Biochim. Biophys. Acta* **1508** (2000), 86-111.
- [183] GIRARD P. *Membranes hors d'équilibre : échanges et transport actif* Thèse de doctorat Université Paris VI. (2004).