



**HAL**  
open science

# Etude à l'interface air-eau de mélanges lipidiques susceptibles de former des RAFTS membranaires

Christine Grauby-Heywang

► **To cite this version:**

Christine Grauby-Heywang. Etude à l'interface air-eau de mélanges lipidiques susceptibles de former des RAFTS membranaires. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2008. tel-00685610

**HAL Id: tel-00685610**

**<https://theses.hal.science/tel-00685610v1>**

Submitted on 5 Apr 2012

**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.

Habilitation à Diriger des Recherches

Présentée à l'Université Bordeaux 1

Ecole Doctorale des Sciences Physiques et de l'Ingénieur

Par

Christine Grauby-Heywang

**ETUDE A L'INTERFACE AIR-EAU DE MELANGES  
LIPIDIQUES SUSCEPTIBLES DE FORMER DES  
RAFTS MEMBRANAIRES**

Soutenue le 17 novembre 2008

Devant le jury composé de :

M. J.-M. TURLET, Professeur, Université Bordeaux 1	Président
Mme S. CRIBIER, Professeur, Université Paris 6	Rapporteur
M. B. DESBAT, Directeur de Recherche, Université Bordeaux 1	Rapporteur
Mme A. RENAULT, Directeur de Recherche, Université Rennes 1	Rapporteur
Mme A. GIRARD-EGROT, Professeur, Université Lyon 1	
Mme M. SAINT-PIERRE CHAZALET, Maître de Conférence, Université Paris 6	







## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier ici les chercheurs et enseignants-chercheurs qui ont accepté de juger le travail présenté dans ce manuscrit et de participer au jury :

- Sophie Cribier (Pr., Université Paris 6, IBPC/FRC CNRS 550, Paris) ;
- Anne Renault (DR, Directrice de l'IPR/UMR CNRS 6251, Rennes) ;
- Agnès Girard-Egrot (Pr, Université Lyon 1, ICBMS/UMR 5246, Lyon) ;
- Michèle Saint-Pierre Chazalet (Mdc HC, Université Paris 6, BioMoCeTi/UMR7033, Paris) ;
- Bernard Desbat (DR, CBMN/UMR CNRS 5248, Pessac) ;
- Jean-Marie Turlet (Pr, CPMOH/UMR CNRS 5798).

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance aux chefs d'équipe qui m'ont accueillie successivement après ma thèse :

- Arlette Garnier-Suillerot (Pr., LPBC, Université de Bobigny, Paris Nord) ;
- Erich Sackmann (Pr., Laboratoire E22 de la Technische Universität München) ;
- Jean-Marie Turlet (Pr., Université Bordeaux 1, CPMOH/UMR CNRS 5798) ;
- Gediminas Jonusauskas (DR, CPMOH/UMR CNRS 5798).

J'en profite pour remercier aussi les membres des équipes dans lesquelles j'ai travaillé, en particulier Daniel Blaudez qui a assuré la relecture de ce manuscrit, et Emmanuel Abraham.

Une bonne partie de ce mémoire n'existerait pas sans les stagiaires de licence, master ou thèse qui se sont succédés dans notre équipe et que je veux remercier ici : Florence Lhert, Florent Sandras, Eloïse Lancelot, Aurélie Fructuoso, Laure Martineau, Edward Johnston, Florian Nehme, Kelly Monjoly...

En ce qui concerne l'enseignement, je souhaiterais remercier plus particulièrement Dominique Bertault, Pol Bégasse, et Alain Bretenoux, pour leur accueil et leur confiance.

D'une manière plus générale, je tiens aussi à exprimer ma gratitude à différents collègues pour les discussions autour d'un café et les dîners du samedi soir. Ils se reconnaîtront.

Et pour finir, un petit mot plus personnel pour Stéphane qui me supporte dans tous les sens du terme, et qui a également participé à la relecture de ce manuscrit.

# **SOMMAIRE**



Introduction générale	1
Informations générales - Activités d'enseignement et annexes	5
I- CV, formation	7
II- Enseignement et activités pédagogiques	9
III- Activités de communication pour les lycéens et étudiants	11
IV- Activités d'encadrement au CPMOH	12
V- Production scientifique depuis 1996	13

Activités de recherches	19
-------------------------	----

**Chapitre 1 : étude des cibles intracellulaires d'antibiotiques utilisés en chimiothérapie et de leur prise en charge par des protéines de résistance (ATER, Université Paris-Nord, Bobigny)**

I- Contexte de cette étude	21
II- Méthodes et principaux résultats	25
III- Publication	27
IV- Références citées dans le chapitre 1	27

**Chapitre 2 : étude du comportement des glycolipides  $GM_1$  et  $GM_3$  présents dans les rafts membranaires à l'interface air-eau**

I- Contexte de cette étude	31
II- Etude du glycolipide $GM_1$ (stage post-doctoral, TUM)	49
III- Etude du glycolipide $GM_3$ (Université Bordeaux 1)	53
IV- Etude comparative du cholestérol et du dihydrocholestérol	66
V- Etude de l'interaction de la $\beta$ -cyclodextrine avec des monocouches lipidiques	69
VI- Publications	74

VII-	Références citées dans le chapitre 2	74
------	--------------------------------------	----

**Chapitre 3 : applications des films noirs à l'étude de l'organisation lipidique et des interactions protéine-lipide** **79**

I-	Contexte de ces études	81
II-	Apports de la spectroscopie Raman à l'étude de molécules biologiques	82
III-	Thèse de F. Lhert : Etude par microspectroscopie Raman de l'interaction lipide/peptide dans des films noirs de phospholipides.	86
IV-	Thèse de F. Sandras : Etude de l'organisation de films ultraminces de protéines par microscopie Raman et autres techniques.	90
V-	Conclusion générale de ces études et perspectives	96
VI-	Publications	97
VII-	Références citées dans le chapitre 3	98

Conclusion générale et perspectives : membranes artificielles pour le transfert d'énergie et la reconnaissance moléculaire	99
--	----

Publication	103
-------------	-----

# **INTRODUCTION GENERALE**



Ce manuscrit décrit les différentes activités que j'ai menées en tant qu'enseignant-chercheur depuis ma thèse soutenue en mars 1998. Il comporte donc deux volets, l'un résumant mes activités liées à l'enseignement et à la gestion du service dont je suis responsable, l'autre se concentrant sur mes différentes thématiques de recherche. Le premier volet ne concerne que quelques pages sur l'ensemble du manuscrit, ce qui n'est absolument pas proportionnel au temps passé à ces activités.

Les thématiques abordées dans le second volet de ce manuscrit correspondent aux différentes étapes qui se sont succédées après ma thèse. Celle-ci portait sur l'étude de l'interaction d'anthracyclines, des antibiotiques utilisés en chimiothérapie, avec des modèles membranaires simplifiés (monocouches de Langmuir et films de Langmuir-Blodgett constitués de lipides). Bien que réalisés dans des laboratoires différents, la plupart des travaux de recherche que j'ai menés après ma thèse ont également concerné cet élément fondamental de la cellule qu'est la membrane plasmique.

Lors de mon poste d'ATER au Laboratoire de Physicochimie Biomoléculaire et Cellulaire (Université Paris-Nord, Bobigny), j'ai étudié dans l'équipe du Pr. Arlette Garnier-Suillerot, les modes d'entrée de différentes anthracyclines dans des cellules cancéreuses. L'interaction des antibiotiques avec la membrane cellulaire est l'une des étapes clés qui influencent fortement l'efficacité du traitement. Cet aspect de mon travail de recherche fera l'objet du Chapitre 1.

Suite à ce poste d'ATER, j'ai réalisé un stage post-doctoral d'un an au Laboratoire de Biophysique E22 du Pr. Erich Sackmann à l'Université Technique de Munich (TUM, Allemagne). Là encore, la membrane cellulaire était au cœur du sujet, car il s'agissait d'étudier les interactions de lipides présents dans la membrane, par le biais de monocouches de Langmuir. Je me suis plus particulièrement intéressée lors de ce stage au comportement d'un glycolipide, le GM<sub>1</sub>, en présence de lipides fluides ou condensés. Les principaux résultats seront décrits dans le Chapitre 2 de ce manuscrit.

J'ai intégré en septembre 1999 le groupe « Spectroscopie Moléculaire de Films Ultra-Minces » dirigé à l'époque par le Pr. Jean-Marie Turllet au Centre de Physique Moléculaire Optique et Hertzienne (CPMOH, Université Bordeaux 1). Mon travail de recherche s'est alors décomposé en deux grandes parties.

Mes activités propres de recherche, décrites dans le Chapitre 2, se sont concentrées sur un second glycolipide, le GM<sub>3</sub>, présent lui aussi dans les membranes cellulaires. J'ai en particulier comparé ses modes d'interaction avec un lipide de la phase fluide, le POPC, et d'autres lipides susceptibles de former des *rafts* membranaires, la sphingomyéline et le cholestérol. Cette partie sera développée de manière plus conséquente.

Deux études annexes, découlant de ce travail, ont concerné :

-le comportement du dihydrocholestérol, un analogue du cholestérol. Cette étude a été réalisée en partie par Eloïse Lancelot, étudiante en dernière année de l'ENSSAT-Lannion que j'ai encadrée lors de son stage de fin d'études ;

-l'interaction d'un polysaccharide cyclique, la  $\beta$ -cyclodextrine, avec des monocouches lipidiques.

A mon arrivée à Bordeaux, l'activité du groupe était centrée sur l'étude de l'organisation moléculaire de systèmes de basse dimensionnalité comme les films noirs, constitués de détergents (SDS, DOTAB...), par spectroscopie Raman et ellipsométrie. Je me suis donc intégrée à ces thématiques en participant à l'encadrement de deux étudiants qui se sont succédés en thèse dans notre équipe, Florence Lhert et Florent Sandras. Nous nous sommes tournés vers des molécules à intérêt biologique comme les lipides membranaires et les peptides et protéines. Ainsi, la thèse de Florence Lhert portait sur la caractérisation de films noirs lipidiques purs ou en interaction avec la mélittine, un peptide issu du venin d'abeille. Celle de Florent Sandras portait, elle, essentiellement sur la caractérisation de films noirs de puuroindoline, une protéine extraite du grain de blé possédant de remarquables propriétés tensioactives, et sur l'influence d'un lysolipide sur le comportement de cette protéine.

Enfin, suite à une restructuration du laboratoire, notre équipe a fusionné en 2005 avec une autre équipe du CPMOH pour former le GPSM (Groupe de Photophysique des Systèmes Moléculaires complexes). J'ai alors abandonné les molécules biologiques pour me concentrer sur l'élaboration de systèmes biomimétiques pour le transfert et la conversion de l'énergie lumineuse, avec Gediminas Jonusauskas, responsable du GPSM, et Emmanuel Abraham. Cette thématique fait l'objet d'une collaboration avec Nathan McClenaghan, de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM, université Bordeaux 1). Je l'aborderai rapidement dans la dernière partie de ce manuscrit (Conclusion générale et Perspectives).

**INFORMATIONS GENERALES  
ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT  
ET PRODUCTION SCIENTIFIQUE**



## **I- Informations générales (CV, formation)**

### **Christine Grauby-Heywang**

Date et lieu de naissance : 14 février 1971, Enghien-les-Bains (95)

Nationalité : Française

Situation familiale : mariée

Situation professionnelle :

Maître de Conférences à l'université Bordeaux 1

Recrutement : septembre 1999

Titularisation : septembre 2000

Adresse professionnelle :

Centre de Physique Moléculaire Optique et Hertzienne (CPMOH)

Université Bordeaux 1 - UMR du CNRS 5798

351 cours de la libération, 33405 Talence cedex, France

Téléphone : 00 33(5) 40 00 89 97

Fax : 00 33(5) 40 00 69 70

E-mail : [ch.heywang@cpmoh.u-bordeaux1.fr](mailto:ch.heywang@cpmoh.u-bordeaux1.fr)

## **Formation**

Septembre 1999 : poste de maître de conférence, CPMOH, Université Bordeaux 1

Septembre 1998 - août 1999 : stage post-doctoral, Université Technique de Munich (TUM)

-Thème : Formation de surfaces biocompatibles par fonctionnalisation de films plans de polymères par une lectine. Etude de l'interaction de cette lectine avec des monocouches de Langmuir contenant un glycolipide spécifique.

-Financement : bourse de la fondation Alexander von Humboldt (Bonn, Allemagne).

Février 1998 - août 1998 : ATER, Université Paris Nord

-Thème : Etude par spectroscopie de fluorescence et cytométrie en flux de la pénétration et de la localisation de dérivés d'anthracyclines dans des cellules cancéreuses.

Octobre 1994 - mars 1998 : doctorat, Université Paris 6

-Thème : Etude des interactions d'anthracyclines avec des monocouches et bicouches planes lipidiques par mesures de pression de surface et diffusion Raman exaltée de surface (SERS/DRES).

-Financement : bourse MRES.

-Monitorat à l'université Paris Nord pendant les 3 ans.

-Mention « très honorable », avec les félicitations écrites du jury.

1993-1994 : DEA de Biophysique Moléculaire, Université Paris 6, Mention Bien

1992-1993 : Maîtrise de Biochimie, spécialité Biophysique, Université Paris 6, Mention Bien

1991-1992 : Licence de Biochimie, Université Paris 6, Mention Bien

1989-1991 : DEUG B, Université Paris 6, Mention Assez Bien

1988-1989 : Baccalauréat C, Académie Paris-Créteil-Versailles, Mention Bien

1987-1988 : Baccalauréat D, Académie Paris-Créteil-Versailles, Mention Assez Bien

## II- Enseignement et activités pédagogiques

### Enseignement

Mes activités d'enseignement depuis mon arrivée à l'Université Bordeaux 1 sont résumées dans le tableau ci-dessous, avec les volumes horaires correspondants. Elles sont, naturellement, sujettes à modification d'une année sur l'autre.

Semestre	Enseignement
<u>Semestre d'orientation MISMI</u> (Mathématiques, Informatique, Sciences de la Matière et de l'Ingénieur)	Cours magistral « Optique, Lumière et Images », TD et TP, $\approx 40\text{heqTD}$ .  TD de méthodologie du travail universitaire, $\approx 15\text{heqTD}$ .
<u>3<sup>ème</sup> semestre des parcours EEA et Mécanique Aéronautique et Ingénieries</u>	TD et TP d'électrostatique et magnétostatique, $\approx 20\text{heqTD}$ .
<u>Semestre d'orientation SVTE</u> (Sciences de la Vie de la Terre et de l'Environnement)	Cours-TD intégré d'optique géométrique, TP, $\approx 30\text{heqTD}$ .
<u>2<sup>ème</sup> semestre SVTE</u>	Cours-TD intégré de mécanique et mécanique des fluides, TP, $\approx 30\text{heqTD}$ .
<u>3<sup>ème</sup> semestre SVTE</u>	TD d'électrostatique et électrocinétique, TP, $\approx 20\text{heqTD}$ .
<u>6<sup>ème</sup> semestre du parcours Physique</u>	Cours magistral optionnel « Biologie pour les Physiciens », TD, $\approx 30\text{heqTD}$ .
<u>Dernière année de l'ENSSAT-Lannion</u> (depuis janvier 2006)	Cours magistral optionnel « Méthodes optiques appliquées à la biologie », 4 heqTD

## **Activités pédagogiques**

En dehors de mes activités d'enseignement et de recherches, j'ai assuré ou assure actuellement les responsabilités suivantes :

### **-Depuis 2002 : direction du service de TP de Physique pour les étudiants de SVTE**

Dès mon arrivée à l'université Bordeaux 1, je me suis impliquée dans la gestion du service de TP de Physique pour les étudiants de SVTE, sensibilisée sans doute par ma formation de Biophysique. J'ai commencé par co-gérer ce service avec son responsable, Dominique Bertault, et ai finalement pris sa suite à sa retraite en juillet 2007.

Le service suit, plus généralement, les étudiants concernés sur les trois premiers semestres de leur licence, en cours, TD et TP. A ce propos, nous avons mis en place un système de cours-TD intégrés pour les deux premiers semestres. On peut estimer qu'environ 500 étudiants passent par le service de TP aux 1<sup>er</sup> et 2<sup>nd</sup> semestre (environ 300 au 3<sup>ème</sup> semestre).

### **-Depuis 2005 : participation à la réorganisation des enseignements dans le cadre du LMD**

Dans le cadre de la réforme LMD, j'ai participé à la restructuration de l'enseignement de la Physique dans le semestre d'orientation MISMI. Je me suis personnellement impliquée dans la création de séances de travaux pratiques.

J'ai participé également à la réorganisation de l'enseignement de Physique pour les étudiants de SVTE. Notre travail a abouti à un découpage plus cohérent de la Physique sur les trois premiers semestres de ce cursus.

J'ai également travaillé, en collaboration avec des collègues chimistes et mathématiciens, à la réorganisation d'un enseignement pluridisciplinaire de méthodologie destiné aux étudiants du semestre d'orientation MISMI et à l'élaboration des travaux dirigés. Cet enseignement, qui consiste à inculquer aux étudiants les bases d'un travail personnel efficace, est scindé en deux parties, concernant les mathématiques ou les sciences expérimentales (Physique et Chimie). Outre les rappels nécessaires de certaines bases indispensables, notre travail s'appuie fortement sur les TP de Chimie et de Physique faits par les étudiants lors de ce premier semestre.

### **-Depuis 2006 : participation au projet pilote mis en place à l'université Bordeaux 1**

Le Département Licence de notre université a mis en place un système de contrat d'étude dans le cadre d'un projet pilote financé par notre ministère de tutelle. Les objectifs de ce contrat sont de montrer l'impact positif sur la réussite des étudiants d'une coordination pluridisciplinaire et d'un accompagnement renforcé, et d'améliorer l'intégration des étudiants à l'université en réduisant les décrochages lors des deux premiers semestres.

Le projet a été mis en place à la rentrée 2006 avec des étudiants volontaires de deux séries des semestres d'orientation MISMI et SVTE. Ayant un cours d'optique au premier semestre MISMI, je me suis portée volontaire pour la série concernée et j'ai constitué une équipe pédagogique avec mes collègues chargés de TD. Nous avons mis en place divers dispositifs spécifiques à cette série : interrogations en TD et TP, devoirs supplémentaires...

Le projet pilote comprend également un second volet, celui de l'enseignant référent. Ce dernier s'engage à effectuer un suivi personnalisé de quelques étudiants, afin par exemple de les orienter vers les personnes compétentes en cas de nécessité (problème d'orientation, mais aussi assistance sociale, médecine préventive...). Je m'occupe ainsi de dix étudiants de MISMI et SVTE.

### **III- Activités de communication pour les lycéens et étudiants**

#### **Communication de l'UFR de Physique et du Département Licence**

De 1999 à fin 2005, j'ai été responsable de la communication à l'UFR de Physique. Outre la réalisation et la remise à jour des plaquettes présentant les différentes filières de notre UFR, ce travail consistait également :

- à organiser et participer à des journées d'accueil des lycéens et étudiants dans divers salons ou sur le campus. Je suis également intervenue directement dans des lycées de la région.
- à coordonner les opérations de communication des quatre départements de l'UFR de Physique (Physique, Mécanique, Electronique et Maintenance Aéronautique).

Bien que j'aie maintenant quitté cette fonction, je n'ai pas abandonné complètement la communication, puisque j'ai participé à la rénovation et à la réorganisation du site web du Département Licence de notre université, en particulier les pages destinées aux lycéens et étudiants.

### **Accueil des nouveaux bacheliers**

Je co-organise également l'accueil des nouveaux bacheliers à l'université Bordeaux 1 depuis deux ans. Cet accueil, organisé sur plusieurs demi-journées successives fin juillet et début septembre, comporte deux volets : la présentation en amphi d'un diaporama présentant le Département Licence, son mode de fonctionnement, et les enseignements, puis un entretien individuel avec chaque nouveau bachelier. Au cours de cet entretien, nous abordons différents sujets, en particulier le projet professionnel de l'étudiant.

### **IV- Activités d'encadrement au CPMOH**

Au cours de ces neuf années passées au CPMOH, j'ai participé à l'encadrement de plusieurs étudiants sur des sujets variés.

#### **Thèses :**

- Thèse de Florence Lhert soutenue en février 2002 et intitulée « Etude par microspectroscopie Raman de l'interaction lipide/peptide dans des films noirs de phospholipides » (co-encadrants : D.Blaudez et J.-M. Turlet). F. Lhert a fait un stage post-doctoral aux Etats-Unis, puis est revenue en France.
- Thèse de Florent Sandras soutenue en juin 2006 et intitulée « Etude de l'organisation de films ultraminesces de protéines par microspectroscopie Raman et autres techniques » (co-encadrant : J.-M.Turlet). F. Sandras est actuellement en stage post-doctoral au CEA (Dijon).

#### **Stage de dernière année de l'ENSSAT Lannion :**

- Stage d'Eloïse Lancelot : « Etude de films monomoléculaires par mesures de pression de surface et microspectroscopie Raman : application à l'étude de l'organisation lipidique dans les membranes biologiques ». Soutenance en septembre 2005.
- E. Lancelot a enchaîné ensuite deux contrats au Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy (équipe de D. Marguet, mars-juin 2006), puis au CBMN dans le groupe de B. Desbat (Université Bordeaux 1, juillet 2006-décembre 2007). Elle a dernièrement obtenu un poste dans la société Jobin-Yvon (Lille).

### **Stages de master**

- Master 2 de Florent Sandras : « Etude de films de Langmuir comme modèle du surfactant pulmonaire par différentes méthodes d'analyse de surface ». Co-encadrants : D. Blaudez et J.-M. Turllet. Soutenance en juillet 2000.
- Master 1 de Laure Martineau : « Etude par mesures de pression superficielle, absorption et microscopie de fluorescence de films de Langmuir et Langmuir-Blodgett d'une hémicyanine à longue chaîne carbonée ». Co-encadrant : E. Abraham. Soutenance en juillet 2006.
- Master 1 d'Edward Johnston : « Etude par différentes méthodes complémentaires de films de Langmuir-Blodgett constitués d'une hémicyanine à longue chaîne ». Co-encadrant : E. Abraham. Soutenance en juillet 2007.
- Master 1 de Kelly Monjoly : « Etude photophysique de membranes artificielles fonctionnalisées ». Soutenance en juin 2008.

### **Stages dans le cadre d'un projet Erasmus (étudiants Roumains)**

- Silviu Iacovescu et Marius Ghica : « Etude par mesures de pression de surface et microscopie de fluorescence de monocouches de lipides membranaires ». Soutenance en juillet 2003.
- Ionela Paun : « Etude par mesures de pression de surface de l'interaction de monocouches de lipides avec la  $\beta$ -cyclodextrine ». Soutenance en juillet 2004.

## **V- Production scientifique depuis 1996**

### **Articles dans des revues à comité de lecture**

- 1- **C. Heywang**, M. Saint-Pierre Chazalet, M. Masson, A. Garnier-Suillerot, J. Bolard. *Incorporation of exogenous molecules inside mono- and bilayers of phospholipids : influence of the mode of preparation revealed by SERRS and surface pressure studies.* Langmuir 12 (1996) 6459-6467.
- 2- **C. Heywang**, M. Saint-Pierre Chazalet, M. Masson, J. Bolard. *SERR study of the interaction of anthracyclines with mono- and bilayers of charged phospholipids.* Langmuir 13 (1997) 5634-5643.

- 3- **C. Heywang**, M. Saint-Pierre Chazalet, M. Masson, J. Bolard. *Orientation of anthracyclines in lipid monolayers and planar asymmetrical bilayers : a surface-enhanced resonance Raman scattering study*. Biophys. J. 75 (1998) 2368-2381.
- 4- F. Lhert, F. Capelle, D. Blaudez, **C. Heywang**, J.-M. Turllet. *Raman spectroscopy of phospholipid black films*. J. Phys. Chem. B 104 (2000) 11704-11707.
- 5- C. Loetchutinat, **C. Heywang**, W. Priebe, A. Garnier-Suillerot. *The absence of stereoselective P-glycoprotein- and multidrug resistance-associated protein-mediated transport of daunorubicin*. Biochem. Pharm. 62 (2001) 561-567.
- 6- **C. Heywang**, G. Mathe, D. Hess, E. Sackmann. *Interaction of GM1 glycolipid in phospholipids monolayers with wheat germ agglutinin: effect of phospholipidic environment and subphase*. Chem. Phys. Lipids 113 (2001) 41-53.
- 7- F. Lhert, D. Blaudez, **C. Heywang**, J.-M. Turllet. *Free-standing blackfilms : an alternative to Langmuir monolayers for the study by Raman spectroscopy of peptide-phospholipid interaction in ultrathin films*. Langmuir 18 (2002) 512-518.
- 8- F. Sandras, **C. Grauby-Heywang**, J.-M. Turllet. *Spectroscopic study of lysopalmitoylphosphatidylcholine Newton black films*. J. Phys. Chem. B 109 (2005) 21167-21171.
- 9- **C. Grauby-Heywang**, J.-M. Turllet. *Behavior of GM3 ganglioside in lipid monolayers mimicking rafts or fluid phase in membranes*. Chem. Phys. Lipids 139 (2006) 68-76.
- 10- **C. Grauby-Heywang**, J.-M. Turllet. *Study of the cholesterol-GM3 ganglioside interaction by surface pressure measurements and fluorescence microscopy*. Coll. Surf. B 54 (2007) 211-216.
- 11- E. Lancelot, **C. Grauby-Heywang**. *Comparison of the interaction of dihydrocholesterol and cholesterol with sphingolipid or phospholipid Langmuir monolayers*. Coll. Surf. B 59 (2007) 81-86.
- 12- **C. Grauby-Heywang**, J.-M. Turllet. *Study of the interaction of  $\beta$ -cyclodextrin with phospholipid monolayers by surface pressure measurements and fluorescence microscopy*. J. Coll. Interf. Sci. 322 (2008) 73-78.
- 13- E. Abraham, **C. Grauby-Heywang**, S. Selector, G. Jonusauskas. *Characterization of hemicyanine Langmuir-Blodgett films by picosecond time-resolved fluorescence*. J. Photochem. Photobiol. B. 93 (2008) 44-52.
- 14- **C. Grauby-Heywang**, S. Selector, E. Abraham, G. Jonusauskas. *Complex behaviour of hemicyanine Langmuir-Blodgett films revealed by surface pressure measurements and fluorescence microscopy*. En cours de rédaction.

- 15- F. Sandras, M. Pézolet, D. Marion, **C. Grauby-Heywang**. *Raman study of the puoindoline-a/lysopalmitoylphosphatidylcholine interaction in free standing black films*. En cours de rédaction.

### **Communications orales (O) et par affiches (A) dans des congrès**

L'auteur souligné a présenté la communication orale ou l'affiche.

#### Conférences invitées

- 1- **C. Heywang**, M. Saint-Pierre Chazalet, M. Masson, J. Bolard. *The passive diffusion of anthracyclines through lipid bilayers studied by surface enhanced Raman spectroscopy*. 8<sup>th</sup> European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules, Enschede, Pays-Bas, septembre 1999.
- 2- F. Lhert, F. Capelle, D. Blaudez, **C. Heywang**, J.-M. Turllet. *Interaction of melittin with DMPC black films and Langmuir films studied by confocal Raman microspectroscopy*. Vibrational Spectroscopy in Colloid and Interface Science, Oxford, Grande-Bretagne, septembre 2001.
- 3- **C. Grauby-Heywang**. Films autosupportés/Spectroscopie Raman: un couple performant pour l'étude des biomolécules. Journée CRPP/CPMOH, octobre 2006.

#### Conférences avec proceedings

- 1- **C. Heywang**, M. Saint-Pierre Chazalet, M. Masson, J. Bolard. *Surface enhanced Raman scattering and surface pressure studies of the interaction of pirarubicin with phospholipids planar bilayers in water*. Proc. 6<sup>th</sup> European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules, Lille, France, septembre 1995 (A). Spectroscopy of Biological Molecules. J.C. Merlin, S. Turell, J.P. Huvenne (Eds), Kluwer, Dordrecht. 543-544.
- 2- **C. Heywang**, M. Saint-Pierre Chazalet, M. Masson, J. Bolard. *SERS study of the interaction of pirarubicin antibiotic with planar bilayers used as a simplified membrane model*. Proc. 2<sup>nd</sup> European Biophysics Congress, Orléans, France, juillet 1997 (O), Eur. Biophys. J. Volume 26, Number 1.
- 4- M. Saint-Pierre Chazalet, **C. Heywang**, M. Masson, J. Bolard. *SERS and fluorescence studies of the interaction of exogenous molecules with phospholipid planar bilayers*. Proc. 7<sup>th</sup> European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules, Madrid,

- Espagne, septembre 1997 (A). Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends. P. Carmona, R. Navarro, A. Hernanz (Eds). Kluwer, Dordrecht. 319-320.
- 5- M. Saint-Pierre Chazalet, **C. Heywang**, M. Masson, J. Bolard. *Orientation of anthracyclines into phospholipid planar bilayers depending on their hydrophilic-lipophilic balance*. Proc. 7<sup>th</sup> European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules, Madrid, Espagne, septembre 1997 (A). Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends. P. Carmona, R. Navarro, A. Hernanz (Eds). Kluwer, Dordrecht. 341-342.
  - 6- **C. Heywang**, M. Saint-Pierre Chazalet, M. Masson, J. Bolard. *The passive diffusion of anthracyclines through lipid bilayers studied by surface enhanced Raman spectroscopy*. Proc. 8<sup>th</sup> European Conference on Spectroscopy of Biological Molecules, Enschede, Pays-Bas, septembre 1999 (O). Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions. J. Greve, G.J. Puppels, C. Otto (Eds). Kluwer, Dordrecht. 339-342.
  - 7- F. Lhert, F. Capelle, D. Blaudez, **C. Heywang**, J.-M. Turlet. *Raman microspectroscopy of phospholipid-peptide black films*. Proc. 3<sup>rd</sup> European Biophysics Congress, Munich, Allemagne, septembre 2000 (A). Eur. Biophys. J. Volume 29, Number 4-5, 290.
  - 8- **C. Heywang**, F. Sandras, J.M. Turlet. *Behavior of GM<sub>3</sub> ganglioside in lipid monolayers mimicking the raft composition*. Proc. 4<sup>th</sup> European Biophysics Congress, Alicante, Espagne, juin 2003, (A). Eur. Biophys. J. Volume 32, Number 3, 288.

#### Autres

- 1- M. Saint-Pierre Chazalet, **C. Heywang**, M. Masson, J. Bolard. *SERS studies of the interaction of anthracyclines with phospholipids planar bilayers in water*. 7<sup>th</sup> International Conference on Organized Molecular Films, Ancona, Italie, septembre 1995 (A).
- 2- F. Lhert, F. Capelle, D. Blaudez, **C. Heywang**, J.-M. Turlet. *Etude par spectroscopie Raman de films noirs phospholipidiques en présence de méliittine*. Congrès du Groupe d'Etudes des Interactions Molécules Membranes (GEIMM), Vals-les-Bains, France, septembre 2000 (O, A).
- 3- F. Lhert, F. Sandras, D. Blaudez, **C. Heywang**, J.-M. Turlet. *Unenhanced Raman scattering of monolayer films*. 2<sup>nd</sup> international Workshop on Vibrational Spectroscopy of Monolayer Films, Bordeaux, France, juillet 2002, (O).

- 4- **C. Heywang**, J.-M. Turllet. *Etude dans des monocouches de Langmuir des interactions du ganglioside GM<sub>3</sub> avec des lipides de la phase fluide ou des rafts membranaires*. Congrès du Groupe d'Etudes des Interactions Molécules Membranes (GEIMM), Dinard, France, septembre 2004, (O).
- 5- F. Sandras, **C. Grauby-Heywang**, J.-M. Turllet. *Study of puroindoline-*a*/lysopalmitoylphosphatidylcholine free-standing black films by Raman microspectroscopy*. 3<sup>rd</sup> International Workshop on Vibrational Spectroscopy of Monolayer Films, Québec, Canada, juillet 2005, (O).
- 6- S. Selector, **C. Grauby-Heywang**, E. Abraham, G. Jonusauskas. *Structure of Langmuir monolayers and Langmuir-Blodgett films of hemicyanine*. 18<sup>th</sup> Mendeleev Congress, Moscou, Russie, septembre 2007, (O).
- 7- E. Abraham, **C. Grauby-Heywang**, S. Selector, G. Jonusauskas. *Picosecond time-resolved fluorescence studies of hemicyanine Langmuir-Blodgett films*. 18<sup>th</sup> Mendeleev Congress, Moscou, Russie, septembre 2007, (A).



# **ACTIVITES DE RECHERCHES**

## **CHAPITRE 1**

### **ETUDE DES MODES D'ENTREE ET DES CIBLES INTRACELLULAIRES D'ANTIBIOTIQUES UTILISES EN CHIMIOOTHERAPIE**



## I- Contexte de cette étude

Chez un adulte en bonne santé, la mortalité des cellules de l'organisme est compensée par la formation de nouvelles cellules due à des divisions cellulaires successives. Il y a donc un état d'équilibre : les tissus n'augmentent pas de volume, grâce à des mécanismes de régulation contrôlant les divisions. Malheureusement, ces mécanismes de régulation peuvent s'avérer défaillants pour des raisons multiples : causes génétiques, mauvaise surveillance du système immunitaire, virus, facteurs extérieurs (tabac, UV par exemple)... Dans ces conditions, les cellules concernées finissent, après plusieurs étapes, par se multiplier de manière anarchique, envahissant peu à peu l'organe et formant une tumeur cancéreuse. Certaines cellules peuvent ensuite se détacher de la tumeur primitive, passer dans le flux sanguin puis coloniser d'autres organes. Ce sont les métastases.

On dispose à l'heure actuelle de différents traitements adaptés à certains types de cancers. Cependant, tous les cancers ne sont pas équivalents en terme de rémission et taux de récurrence, et le développement de nouveaux traitements est toujours malheureusement d'actualité. Parmi les traitements les plus classiques, on peut citer la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cette dernière est basée sur l'injection de médicaments toxiques pour les cellules cancéreuses, agissant à divers niveaux (perturbation du métabolisme, inhibition de la division cellulaire, atteinte à l'intégrité de l'ADN...). Cependant les cellules saines sont également sensibles au traitement, et celui-ci provoque des symptômes associés plus ou moins graves (fatigue importante, cardiotoxicité, alopecie ...). Ces dernières années, d'autres méthodes prometteuses sont également apparues : la thérapie génique, l'hormonothérapie ou encore l'utilisation de molécules qui étouffent littéralement la tumeur en bloquant le développement de nouveaux vaisseaux sanguins censés l'alimenter (phénomène d'angiogénèse).

Différentes familles de composés sont utilisées en chimiothérapie. C'est le cas par exemple des anthracyclines, molécules polycycliques plus ou moins substituées. Ces molécules de par leur hydrophobicité sont capables de pénétrer dans les cellules par diffusion passive à travers la membrane plasmique. La cible intracellulaire principale des anthracyclines est l'ADN, dans lequel elles s'intercalent. La topoisomérase II est également une cible privilégiée, la fixation de l'anthracycline sur cette enzyme entraînant une coupure de

l'ADN en améliorant la stabilité du complexe topoisomérase-ADN (Gate et coll. 2003). Certains dérivés d'anthracyclines sont également capables d'inhiber l'interaction de l'ADN avec des facteurs de transcription se fixant sur les zones promoteur de gènes. Cette interaction inhibe donc l'expression des gènes et déclenche la production de stimuli conduisant à la mort cellulaire (Mansilla et coll., 2007 ; 2008). D'autres dérivés provoquent une forte dépolarisation de la membrane mitochondriale et génèrent ainsi un profond stress oxydatif par production d'espèces réactives de l'oxygène. Ils entraînent également la surexpression des protéines de rejet (Korynevskaya et coll. 2007 ; Vibet et coll., 2008). Des travaux récents soulignent également le rôle du cytoplasme dans la sensibilité des cellules au traitement, l'accumulation intracellulaire des anthracyclines étant inversement proportionnelle à la conductivité du cytoplasme (Coley et coll., 2007).

Malheureusement l'utilisation des anthracyclines sur le long terme déclenche l'apparition d'une résistance au traitement, due à la surexpression dans les membranes cellulaires d'une protéine qui expulse l'antibiotique hors de la cellule, diminuant son taux intracellulaire et du même coup son efficacité (Figure 1). On peut citer selon les lignées cellulaires la P-gp (*P-glycoprotein*) et la MRP (*Multidrug Resistance Protein*). Ces deux protéines rejettent, en hydrolysant de l'ATP, les antibiotiques de la famille des anthracyclines, mais également d'autres molécules. On peut noter que la plupart des substrats de la P-gp sont des molécules hydrophobes contenant une structure aromatique et un groupe protonable à pH physiologique. De plus, les cellules résistantes expriment également en grande quantité des enzymes diminuant la toxicité des anthracyclines et augmentant leur élimination. Enfin, l'expression ou l'action de la topoisomérase II est réduite (Gate et coll., 2003).

Plusieurs stratégies peuvent être alors envisagées :

- la première consiste à bloquer le fonctionnement de la protéine à l'aide d'un traitement médicamenteux associé à la chimiothérapie. Des molécules telles que le vérapamil ou la cyclosporine A s'avèrent efficaces dans le cas de cellules surexprimant la P-gp. La situation est plus délicate dans le cas de la MRP, pour laquelle il existe moins d'inhibiteurs efficaces (Glowacka-Rogacka et coll., 2004),

- le groupe amine chargé positivement sur le sucre des anthracyclines pourrait être responsable de leur transport par la P-gp. On peut alors envisager une modification du degré de N-méthylation de l'anthracycline diminuant l'affinité de la protéine de rejet (Gate et coll., 2003),

- certaines molécules fournies avant ou en même temps que l'anthracycline augmentent son efficacité en augmentant le taux de peroxydes et l'accumulation de l'anthracycline en interférant avec la P-gp (Gariboldi et coll., 2006). Les benzopérimidines inhibent, eux, l'efflux d'antibiotiques (cycles futiles des pompes de rejet) et restaurent également leur accumulation (Glowacka-Rogacka et coll., 2004),

- enfin, on peut envisager des modifications chimiques des anthracyclines afin qu'elles rentrent en plus grande quantité dans les cellules. On augmente ainsi leur taux intracellulaire, même si elles sont toujours substrats des protéines de rejet.

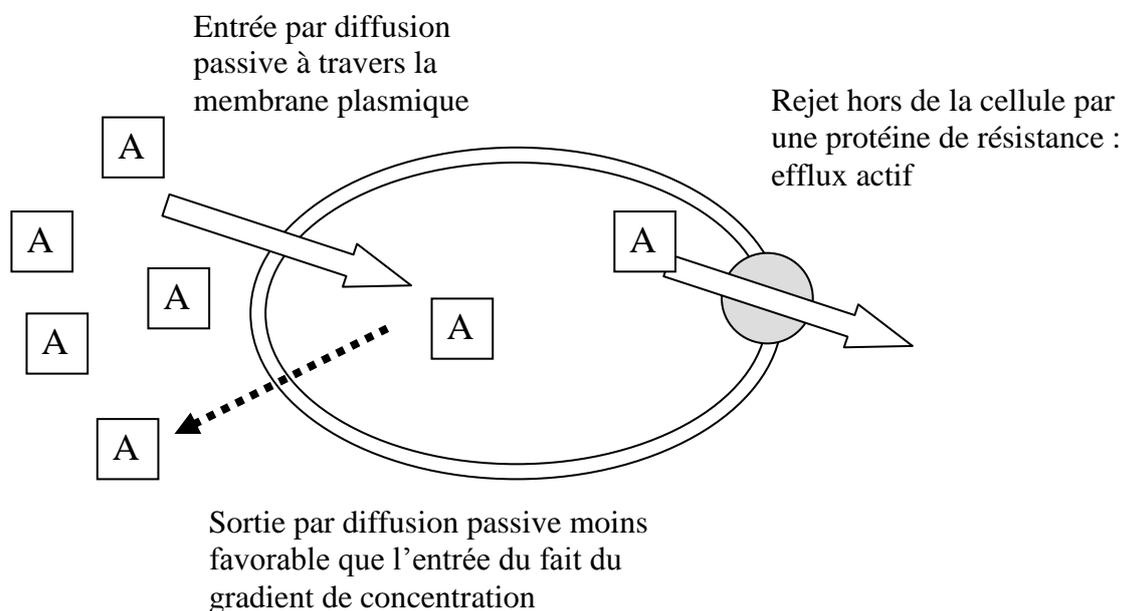


Figure 1 : processus de résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis d'un traitement par chimiothérapie.

D'autres pistes concernant les anthracyclines et leur efficacité sont également l'objet de nombreuses études. Ainsi le stress oxydatif engendré par les anthracyclines est une arme à double tranchant. En effet, la production d'espèces radicalaires entraîne la peroxydation des lipides membranaires, endommageant par exemple la membrane des cardiomyocytes (Horenstein et coll., 2000). L'interaction des anthracyclines avec les lipides anioniques comme la cardiolipine contribue également à la cytotoxicité de ces molécules (Parker et coll., 2001).

Une première solution consiste à développer des anthracyclines moins cardiotoxiques (Olson et coll., 2007 ; Turdi et coll., 2008). Une seconde solution consiste à utiliser un co-traitement réunissant l'anthracycline et une molécule limitant le stress oxydatif. Parmi ces molécules, on peut citer divers agents chélateur du fer, comme les flavonoïdes (Kaiserova et coll., 2007), ou un dérivé de l'hydrazone (Simunek et coll., 2008). Certaines molécules inhibent également le fonctionnement d'enzymes impliqués dans la protection de la cellule. Les flavonoïdes inhibent par exemple certaines réductases (Kaiserova et coll., 2007). Quant à l'acide docosahexanoïque, il diminue l'activité intracellulaire de la glutathione peroxydase, enzyme primordiale pour la protection de la cellule (Vibet et coll., 2008).

Certaines équipes cherchent également à améliorer la formulation des traitements. Leur efficacité est fortement liée à la distribution et la concentration de l'antibiotique dans l'environnement immédiat de la tumeur. Or la plupart des molécules anti-cancéreuses sont insolubles en milieu aqueux. Différents solvants ou surfactants sont généralement injectés en même temps que l'antibiotique dans le corps du patient. De nouveaux systèmes délivrant le médicament ont également été mis au point, basés sur la formation de bioconjugués macromoléculaires. Ces systèmes améliorent la biodistribution en augmentant la solubilité de l'anthracycline en milieu aqueux, en prolongeant sa circulation dans le flux sanguin et en provoquant son accumulation dans les tumeurs. Parmi ces systèmes on peut citer :

- les micelles mixtes antibiotique/polymère, qui peuvent également contenir une molécule de co-traitement (Bae et coll., 2007),

- les liposomes encapsulant l'antibiotique. Dans ce cas, différents problèmes se posent comme la charge des liposomes (charge qui peut être améliorée par un traitement des liposomes par l'éthanol), leur composition lipidique, leur stabilité ou la biodisponibilité de l'anthracycline (Dos Santos et coll., 2004).

L'étude que je présente dans la suite de ce chapitre est antérieure à ces résultats. L'hypothèse de départ était de contourner le problème de résistance en utilisant des anthracyclines pénétrant plus facilement dans les cellules et/ou n'étant pas substrats des protéines de rejet. Je me suis ainsi intéressée à l'efficacité d'entrée et aux cibles intracellulaires d'une anthracycline connue, la daunorubicine, et de son énantiomère, la WP900.

## II- Méthodes et principaux résultats

### II-1 Lignées cellulaires et méthodes

Deux lignées cellulaires ont été étudiées : des cellules K562 leucémiques et des cellules GLC4 du cancer du poumon dit « à petites cellules ». Pour chaque lignée, nous disposons de cellules sensibles (dépourvues d'une des protéines de rejet), et résistantes. Ces dernières possèdent dans leur membrane soit la P-gp (cellules K562) soit la MRP (cellules GLC4). Ces cellules étaient mises en culture sur un milieu nutritif à 37°C. Après croissance, elles étaient comptées, centrifugées et resuspendues dans un milieu d'incubation dans lequel l'antibiotique était ajouté.

Nous avons profité des propriétés de fluorescence des anthracyclines pour suivre leur entrée dans les cellules. Les spectres d'absorption et d'émission de ces molécules sont centrés respectivement sur 480 nm et 590 nm. L'entrée de l'antibiotique dans une cellule s'accompagne d'une diminution du signal de fluorescence à 590 nm, soit par *quenching* dû à l'intercalation de la molécule entre les paires de bases de l'ADN, soit par accumulation dans des compartiments intracellulaires, comme les vacuoles. On dispose alors de deux paramètres importants : la cinétique d'entrée (ou de sortie) de l'antibiotique, mais aussi le pourcentage global d'antibiotique entré dans la cellule, directement lié à l'intensité de fluorescence à un temps  $t$  par rapport à l'intensité de départ (Figure 2).

D'autres molécules ont été éventuellement ajoutées au milieu d'incubation :

- le détergent triton X-100. Cette molécule permet de solubiliser les membranes cellulaires externes et internes. Cette solubilisation entraîne la libération de l'antibiotique, si celui-ci est libre dans le cytoplasme ou enfermé dans un organite intracellulaire, lui-même limité par une membrane. Par contre il ne provoque pas la dissociation du complexe anthracycline-ADN.
- la concanamycine A (CCA). La CCA est un inhibiteur de la pompe ATPase à l'origine de l'acidification des vacuoles intracellulaires. Cette pompe n'intervient pas dans le processus de concentration dans le noyau, mais dans celui de concentration dans les vacuoles.

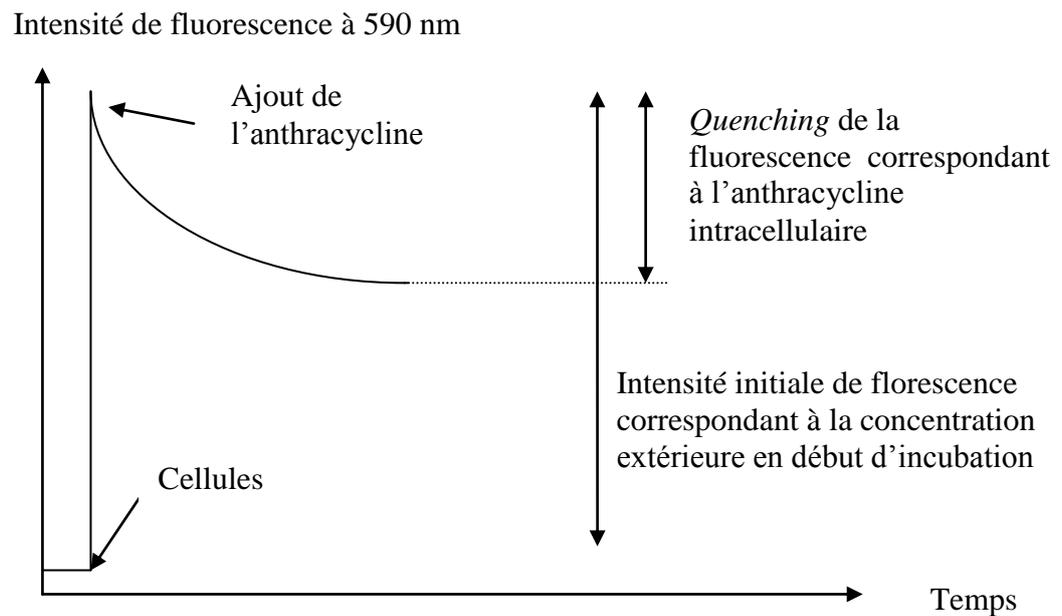


Figure 2 : principe de la mesure de fluorescence pour déterminer la cinétique d'entrée et le taux intracellulaire d'anthracycline.

## II-2 Principaux résultats

L'analyse des cinétiques d'entrée des deux anthracyclines a permis de mettre en évidence plusieurs points importants résumés ci-dessous.

### Cas des cellules sensibles :

-si les cellules sont incubées en présence d'une faible concentration de daunorubicine ( $1\mu\text{M}$ ), celle-ci pénètre facilement dans les cellules pour se localiser dans les noyaux cellulaires où elle interagit avec l'ADN, comme l'atteste le peu d'effet du triton X-100 ou de la CCA.

-à plus forte concentration de daunorubicine ( $10\mu\text{M}$ ), les résultats sont différents selon que la CCA est ajoutée ou non dans le milieu d'incubation. En sa présence, la daunorubicine se localise uniquement dans le noyau après être entrée dans les cellules. En son absence, le *quenching* de fluorescence plus important suggère que l'anthracycline se localise dans le noyau et les vacuoles. Le triton X-100 confirme cette hypothèse. La comparaison des résultats à  $1\mu\text{M}$  et  $10\mu\text{M}$  montre que l'affinité de la daunorubicine est plus importante pour le noyau :

les vacuoles acides sont uniquement remplies quand les sites accessibles sur l'ADN sont saturés.

-la WP900 se comporte différemment de son énantiomère. A toutes les concentrations testées, cette molécule pénètre dans les cellules, mais se concentre uniquement dans les vacuoles acides, comme le confirme l'absence de *quenching* en présence de CCA. On peut attribuer cette différence à sa structure en « image dans un miroir » de celle de la daunorubicine, l'empêchant de se loger entre les paires de bases de l'ADN.

#### Cas des cellules résistantes :

-l'accumulation de la daunorubicine est très faible dans les deux lignées cellulaires, confirmant que cet antibiotique est un substrat des deux protéines P-gp et MRP.

-on ne constate pas d'accumulation de la WP900 dans les cellules résistantes des deux lignées. Cela montre que la WP900 est reconnue comme substrat par la P-gp et la MRP, même si c'est un énantiomère de la daunorubicine. Le transport des anthracyclines par ces protéines ne semble donc pas être stéréosélectif, la chiralité de l'antibiotique n'ayant aucune influence sur l'efficacité du transport. Ce résultat est surprenant, car l'anthracycline est censée interagir avec un site de structure tridimensionnelle donnée de la protéine.

### **III- Publication**

Cette étude a donné lieu à une publication :

C. Loetchutinat, **C. Heywang**, W. Priebe, A. Garnier-Suillerot. *The absence of stereoselective P-glycoprotein and multidrug-resistance-associated protein-mediated transport of daunorubicin*. *Biochemical Pharmacology* 62 (2001) 561-567.

### **IV- Références citées dans le chapitre 1**

- Y. Bae, T.A. Diezi, A. Zhao, G.S. Kwon, J. Controlled Release 122 (2007) 324.
- H.M. Coley, F.H. Labeed, H. Thomas, M.P. Hughes, *Biochim. Biophys. Acta* 1770 (2007) 601.

- N. Dos Santos, K.A. Cox, C.A. McKenzie, F. van Baarda, R.C. Gallagher, G. Karlsson, K. Edwards, L.D. Mayer, C. Allen, M.B. Bally, *Biochim. Biophys. Acta* 1661 (2004) 47.
- M.B. Gariboldi, F. Terni, R. Ravizza, S. Meschini, M. Marra, M. Condello, G. Arancia, E. Monti, *Free Radical Biology and Medicine* 40 (2006) 1409.
- L. Gate, P. Couvreur, G. Nguyen-Ba, H. Tapiero, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 57 (2003) 301.
- D. Glowacka-Rogacka, M. Arciemiuk, A. Kupiec, M.M. Bontemps-Gracz, E. Borowski, J. Tarasiuk, *Cancer Detection and Prevention* 28 (2004) 283.
- M.S. Horenstein, R.S. Vander Heide, T.J. L'Ecuyer, *Molec. Genetics and Metabolism* 71 (2000) 436.
- H. Kaiserova, T. Simunek, W.J.F. van der Vijgh, A. Bast, E. Kvasniekova, *Biochim. Biophys. Acta* 1772 (2007) 1065.
- A. Korynevskaya, P. Heffeter, B. Matselyukh, L. Elbling, M. Micksche, R. Stoika, W. Berger, *Biochemical Pharmacology* 74 (2007) 1713.
- S. Mansilla, M. Rojas, M. Bataller, W. Priebe, J. Portugal, *Biochemical Pharmacology* 73 (2007) 934.
- S. Mansilla, J. Portugal, *Biochimie* 90 (2008) 976.
- R.D. Olson, M.B. Headley, A. Hodzic, G.M. Walsh, D.G. Wingett, *International Immunopharmacology* 7 (2007) 734.
- M.A. Parker, V. King, K.P. Howard, *Biochim. Biophys. Acta* 1514 (2001) 206.
- T. Simunek, M. Sterba, O. Popelova, H. Kaiserova, M. Adamcova, M. Hroch, P. Haskova, P. Ponka, V. Gersl, *Abstracts/Toxicology Letters* 1805 (2008) S32.
- S. Turdi, P. Xu, Q. Li, Y. Shen, *Toxicology Letters* 178 (2008) 197.
- S. Vibet, C. Goupille, P. Bougnoux, J.-P. Steghens, J. Goré, K. Mahéo, *Free Radical Biology and Medicine* 44 (2008) 1483.

**ACTIVITES DE RECHERCHES**

**CHAPITRE 2**

**ETUDE DU COMPORTEMENT A L'INTERFACE AIR-  
EAU DES GLYCOLIPIDES GM<sub>1</sub> ET GM<sub>3</sub> PRESENTS  
DANS LES *RAFTS* MEMBRANAIRES**

**ETUDES ANNEXES**



## I- Contexte de cette étude

Suite à mon poste d'ATER, j'ai effectué mon stage post-doctoral dans l'équipe du professeur Erich Sackmann à la Technische Universität de München (TUM). Au cours de ce stage je me suis particulièrement intéressée au comportement d'un glycolipide membranaire, le GM<sub>1</sub> en présence d'autres lipides présents dans les membranes. Cette étude s'inscrit dans la thématique plus large des *rafts* membranaires. Ayant poursuivi cette étude après mon arrivée au CPMOH, je décris assez largement le contexte dans les paragraphes qui suivent.

### I-1 Notion de *rafts* membranaires

Les membranes cellulaires ont pour fonction première d'isoler l'intérieur des cellules du milieu extérieur, afin, entre autres, de maintenir des gradients de concentration entre les deux milieux. Cette fonction de barrière est assurée principalement par les lipides. Dans le cas des archaebactéries, la membrane est constituée d'une couche de bolalipides, molécules possédant deux longues chaînes hydrocarbonées et deux têtes polaires. Dans les autres cas, et en particulier celui des mammifères, la membrane est une bicouche de lipides, constitués d'une tête polaire et deux chaînes hydrophobes, en interaction avec des protéines (Figure 1). Plus de 2000 espèces lipidiques sont présentes dans les membranes de mammifères (Barenholz, 2002). Ce grand répertoire des lipides membranaires permet aux cellules d'optimiser leurs interactions avec l'environnement et leur fonctionnement (changement de milieu, passage aux organismes pluricellulaires dans l'évolution, régulation de la fluidité membranaire...).

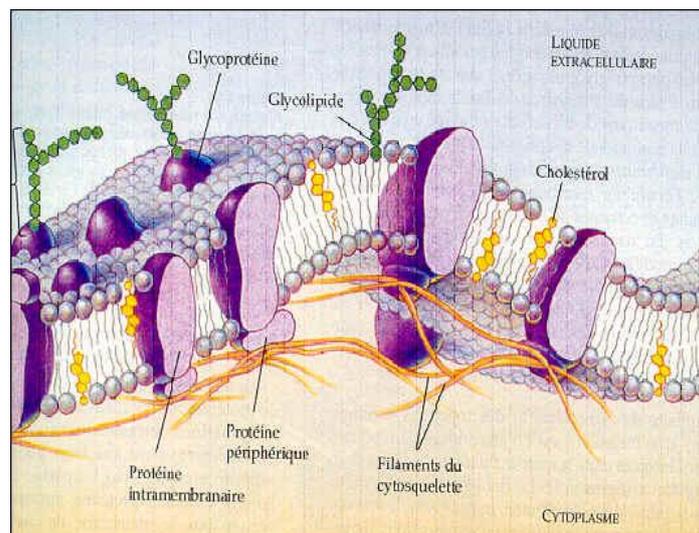


Figure 1 : structure d'une membrane plasmique.

(<http://home.tiscali.be/jp.boseret/membrane.htm>)

Le premier modèle cohérent de membrane est celui de la « mosaïque fluide » développé par Singer et Nicolson (1972), dans lequel les lipides jouent un rôle de « solvant » pour les protéines membranaires, et diffusent plus ou moins librement dans la membrane en phase fluide. Cependant Singer et Nicolson décrivaient déjà la possibilité de domaines présents dans ces membranes, définis comme des zones où les concentrations en certains constituants (lipides et protéines) et les propriétés physicochimiques seraient différentes de celles du reste de la membrane.

Depuis quelques années cette idée de domaines s'est développée, avec l'apparition de la notion de *rafts*, ou radeaux lipidiques, présents dans le feuillet externe de la membrane (par exemple Simons et Ikonen, 1997). Dans ce modèle, certains lipides s'organisent latéralement en domaines, les *rafts*, où l'organisation est plus compacte que celle de la phase fluide, du fait d'interactions préférentielles entre des lipides spécifiques, comme le cholestérol, les sphingolipides ou glycolipides. Cependant, un certain flou règne à propos de ces domaines, comme le montrent leurs différentes dénominations dans la bibliographie. On distingue ainsi les DRM (*detergent resistant membranes*), les DIGS (*detergent-insoluble glycolipid-enriched membranes*), les GEM (*glycolipid-enriched membranes*), les GEDS (*glycolipid-enriched domains*), les DRF (*detergent-resistant fractions*), les TIFF (*triton-insoluble floating fractions*)... (Brown et London, 2000). Tous ces types de domaines ne sont d'ailleurs pas tous équivalents.

Bien que l'existence des *rafts* soit maintenant reconnue par de nombreux chercheurs, leur mise en évidence est difficile pour plusieurs raisons, comme leurs petites dimensions (20-500 nm), leur caractère dynamique (échanges continus des molécules entre les domaines et le reste de la membrane), ou la concentration relative des constituants. Certaines molécules intrinsèques des *rafts* sont en effet souvent utilisées comme marqueur pour des expériences de microscopie (Brown et London, 2000). La présence de ces molécules est révélée par la fixation d'une deuxième molécule reconnaissant spécifiquement le marqueur. Ainsi le glycolipide GM<sub>1</sub> est repéré après fixation de la toxine du choléra. Des anticorps sont aussi utilisés (Jacobson et Dietrich, 1999). Mais si la différence de concentration entre les *rafts* et la phase fluide environnante est trop faible, le domaine peut ne pas être détecté. La réaction en elle-même peut aussi induire des artéfacts (par exemple la toxine du choléra est pentavalente et peut donc induire elle-même une association des molécules de GM<sub>1</sub>). D'autres méthodes

nécessitent la fixation des cellules, autre source d'artéfacts (Jacobson et Dietrich, 1999). Enfin le détergent triton X-100 est aussi utilisé, car les *rafts* y seraient moins solubles que les lipides de la phase fluide et donneraient donc des fractions insolubles lors des purifications. Certains suggèrent toutefois que ces fractions seraient en fait un artéfact dû au traitement par le triton X100 lui-même (Heerklotz, 2002). Sengupta et coll. (2007) soulignent à ce propos que les *rafts* sont définis la plupart du temps par des critères purement biochimiques comme la résistance à la solubilisation par un détergent doux ou l'effet d'une déplétion en cholestérol. Or certains détergents peuvent provoquer une extraction non sélective des lipides, la fusion des domaines ou leur ségrégation. De même, la déplétion en cholestérol peut perturber l'organisation de l'actine du cytosquelette et une endocytose, ces phénomènes modifiant le comportement de la membrane. Malgré cela, l'enrichissement spécifique en certains lipides et leur distribution latérale hétérogène dans la membrane sont des indices expérimentaux sérieux de l'existence de ces domaines (McMullen et coll., 2004).

Les lipides présents dans ces *rafts* sont essentiellement des sphingolipides, des glycolipides et le cholestérol. Ces molécules interagissent par des liaisons hydrogène entre un groupe donneur sur une molécule et un groupe accepteur sur une molécule voisine (cas des interactions sphingomyéline-cholestérol), des interactions électrostatiques et des interactions de Van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées saturées des sphingolipides et glycolipides.

Ces derniers sont également caractérisés par le fait que la surface occupée par leurs têtes polaires est supérieure à celle occupée par leurs chaînes. Il existerait donc des « vides » entre ces lipides comblés par des molécules de cholestérol (Figure 2), (Simons et Ikonen, 1997, Fantini et coll., 2002).

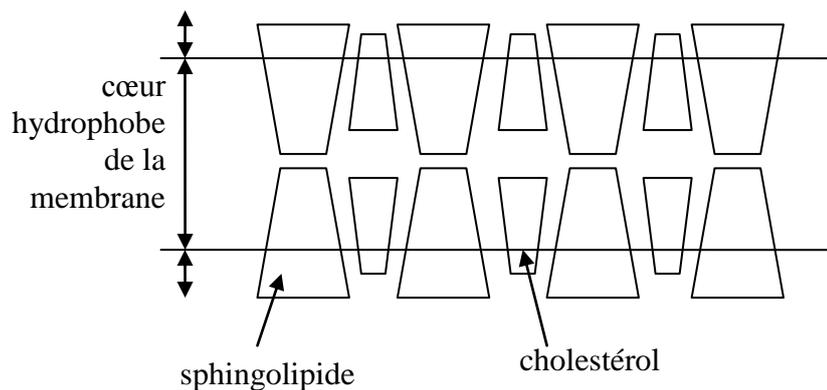


Figure 2 : organisation supposée des sphingolipides et du cholestérol dans les rafts (adapté de Fantini et coll., 2002).

Ces interactions plus ou moins spécifiques sont à l'origine de la phase lipidique particulière présente dans les *rafts*, intermédiaire entre la phase fluide et la phase condensée. On parle de phase *liquid ordered* ou  $l_o$  (McMullen et coll., 2004). Cette phase, liée à la présence de cholestérol, est caractérisée par une mobilité des molécules supérieure à celle observée en phase gel. Cependant, les molécules sont plus ordonnées que dans la phase fluide : les chaînes sont étendues et proches les unes des autres, tout en présentant un grand degré de liberté.

Quant aux glycolipides, ces molécules présentent une nette propension à former des liaisons hydrogène en tant que donneur et accepteur, grâce aux groupes hydroxyle et amides présents sur la sphingosine ou les résidus glycosyles. De telles interactions favorisent leur agrégation (Yoshizaki et coll., 2008).

Outre les lipides, les *rafts* contiennent également certaines protéines, indispensables à leur fonctionnalité (Masserini et Ravasi, 2001). De nombreuses protéines membranaires sont ainsi associées aux *rafts* : les *GPI-anchored proteins*, des tyrosine-kinases, des transporteurs... Beaucoup d'entre elles ont des chaînes acylées saturées leur permettant de s'ancrer dans la membrane, plus particulièrement dans des régions ordonnées (Jacobson et Dietrich, 1999). Par contre il y a peu de protéines transmembranaires (Brown et London, 2000). On peut noter que la diversité des noms donnés aux *rafts* dans la littérature est également liée à la diversité des protéines.

Différents types d'interactions peuvent expliquer la co-localisation des protéines et lipides dans les domaines membranaires (Poveda et coll., 2008). Des interactions lipide-lipide permettraient de former des compartiments dans la membrane, où les protéines seraient stockées en fonction de leur affinité pour les lipides impliqués. Des interactions lipide-protéine permettraient, elles, la formation de domaines lipidiques environnant la protéine. Le concept d'anneau lipidique a ainsi été proposé dernièrement, l'anneau étant constitué d'une couche de lipides particuliers dont le temps de résidence dans le domaine serait dix fois plus élevé que dans le reste de la membrane. L'oligomérisation des protéines favoriserait également la formation des domaines. Enfin, le rôle du cytosquelette pourrait s'avérer primordial en empêchant la diffusion à longue distance des molécules entrant dans leur composition. Quant à la nature des interactions au niveau moléculaires, les possibilités sont multiples : interactions électrostatiques ou liaisons hydrogène dans les régions interfaciales de la membrane, forces de Van der Waals ... D'autres interactions comme les interactions saccharide-saccharide ou celles entre glycolipides et résidus polyalcools des protéines sont également probables (Masserini et Ravasi, 2001). Le phénomène d'*hydrophobic matching* basé sur l'exposition énergétiquement défavorable des parties hydrophobes des lipides et protéines à un environnement aqueux pourrait également favoriser une interaction lipide-protéine particulière (Poveda et coll., 2008).

Enfin, la phase des lipides est également importante : Hanzal-Bayer et coll. soulignent que de nombreuses protéines associées *in vivo* aux DRM se localisent préférentiellement dans la phase  $l_0$  quand elles sont insérées dans des modèles membranaires. De plus, dans le cas des protéines maintenues dans la membrane par une ancre lipidique, son remplacement par une ancre se solubilisant préférentiellement dans la phase fluide altère la fonction de la protéine.

La variété de ces protéines confinées localement suggère des fonctions assez étendues pour les *rafts* : transduction du signal, adhésion cellulaire, croissance, apoptose, transport de protéines par endocytose... Certaines protéines ont également besoin d'un environnement lipidique approprié (cholestérol ou sphingomyéline) pour fonctionner ou sont activées à l'interface de domaines lipidiques (Pilar-Veiga et coll., 2000).

Enfin, d'un point de vue technologique, la complexité des études portant sur les *rafts* et les phases lipidiques associées a conduit de nombreuses équipes à développer des techniques complémentaires des méthodes déjà appliquées, telles que la DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) ou l'AFM (*Atomic Force Microscopy*). Ainsi la DSC permet de déterminer le diagramme de phases de mélanges lipidiques, mais cette méthode n'est

applicable qu'à des mélanges contenant au mieux trois lipides différents, et ne donne que des informations moyennées sur une population de vésicules. L'AFM permet, elle, d'observer des domaines et hétérogénéités de dimensions nanométriques dans des modèles membranaires, ainsi que l'agrégation de protéines. Cependant, il s'agit ici de mesures stationnaires, alors que par définition les *rafts* sont des structures hautement dynamiques. De plus, cette méthode n'est pas applicable *in vivo*.

Les nouveaux challenges portent sur le développement de méthodes dynamiques, résolues spatialement, couplées à des techniques spectroscopiques. La fin des années 1990 a vu ainsi l'apparition de techniques dérivées de la spectroscopie de fluorescence et des différents types de microscopie : microscopie confocale, microscopie de fluorescence en réflexion totale interne (TIRFM), recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP)... (Kahya et coll., 2004 ; Bagatolli, 2006 ; Owen, 2007 ; de Almeida et coll., 2008 par exemple). Parmi ces méthodes, on peut citer :

- la microscopie à deux photons : il s'agit d'un processus non linéaire, dans lequel la sonde fluorescente est excitée par l'absorption simultanée de deux photons, chaque photon apportant la moitié de l'énergie nécessaire à l'excitation du fluorophore. Elle nécessite une forte focalisation de la source lumineuse. Les avantages de cette méthode sont multiples (discrimination du fond, diminution du photoblanchiment, dommages cellulaires réduits).

- la fluorescence résolue en temps : il s'agit de mesurer le déclin de fluorescence de la sonde excitée par un pulse court, de l'ordre de la ps ou de la fs. En pratique, le déclin n'est généralement pas de forme mono-exponentielle, mais plus complexe du fait des micro-hétérogénéités membranaires.

- la FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*) : cette méthode exploite la dimension temporelle des fluctuations de fluorescence dans un petit volume de l'échantillon, les fluctuations étant dues aux modifications de propriétés de la sonde. Elle peut être appliquée à l'échelle de la molécule unique, ce qui la rend peu invasive du fait du faible marquage. Elle donne accès aux propriétés dynamiques de l'échantillon sur un temps plus ou moins long (de la microseconde à la seconde), et permet donc de déterminer des coefficients de diffusion translationnelle ou rotationnelle, des constantes d'association/dissociation...

En parallèle, les méthodes de simulation ont également été largement exploitées. Elles ont permis par exemple d'étudier :

- les capacités des lipides impliqués dans les *rafts* à former des liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires ;

- les dynamiques de rotation et diffusion latérale des lipides ;
- les effets induits sur la répartition des lipides par des chaînes lipidiques de longueur variable, et en particulier les effets d'interdigitation (couplage des domaines dans les deux feuillets opposés de la membrane *via* des lipides à longues chaînes comme les sphingolipides) ;
- l'influence du cholestérol et de ses précurseurs sur l'ordre des lipides environnants (Niemelä et coll., 2008).

Malheureusement, les temps sur lesquelles ces expériences de simulation sont réalisées sont encore trop courts, car limités à quelques nanosecondes. De plus, peu d'études concernent les mélanges ternaires phosphatidylcholine/sphingomyéline/cholestérol largement utilisés pour mimer la répartition des lipides dans les régions de type *raft* et non-*raft* dans les membranes.

Finalement, malgré un consensus qui se dégage autour de l'existence des *rafts*, de nombreuses questions restent en suspens :

- quelles sont les dimensions des *rafts* ? Différentes gammes sont données dans la littérature, allant d'une vingtaine de molécules à quelques dizaines de microns carrés (Jacobson et Dietrich, 1999 ; Brown et London, 2000 ; Shaikh et coll., 2001). Or on estime que seuls 30 à 40 lipides et 6 à 10 protéines seraient présents dans un domaine de diamètre 10 nm. Quelle est alors l'utilité biologique de domaines aussi petits (Sengupta et coll., 2007). On peut également noter que la présence du cytosquelette pourrait réguler la taille de ces structures en confinant de petits domaines diffusants (Jacobson et Dietrich, 1999).
- quelles sont leur dynamique et leur stabilité? Ici encore les ordres de grandeurs sont variables, allant de quelques nanosecondes à la durée de vie de la cellule (Shaikh et coll., 2001).
- existe-t-il des domaines dans le feuillet interne des membranes, et si oui, sont-ils couplés aux domaines du feuillet externe ? La sphingomyéline et les glycolipides sont concentrés dans le feuillet externe des membranes, mais on retrouve également dans des fractions membranaires riches en ces lipides, des phosphatidyléthanolamines (PE), phosphatidylinositols et phosphatidylsérines, présents eux dans le feuillet interne (Masserini et Ravasi, 2001), ou des protéines cytofaciales (Brown et London, 2000). La forte concentration en PE (phospholipides à température de transition élevée) favoriserait la formation de domaines dans le feuillet interne (Brown et London, 2000). De plus les domaines de la couche externe pourraient dicter l'organisation de la couche interne, peut-être par interdigitation des longues chaînes de sphingolipides. Enfin, les céramides (sphingolipides à petite tête polaire issus de la digestion



Les sphingolipides diffèrent des phospholipides :

- au niveau de la tête polaire : des groupes donneur (hydroxyle et azote de l'amide) et accepteur (groupe carboxyle de l'amide et hydroxyle) sont présents, favorisant la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires. Dans le cas des phospholipides, seuls sont présents des groupements accepteur (Lalitha et coll., 2001).
- au niveau des chaînes : les chaînes sont plus longues que celles des phospholipides. Elles sont également plus saturées : ainsi les sphingomyélines comportent en moyenne 0,1 à 0,35 double liaison en *cis*, alors que les phospholipides de type phosphatidylcholines (PC) en comptent 1,1 à 1,5 (Barenholz et Thompson, 1980). Les doubles liaisons éventuellement présentes permettent des interactions de type  $\pi$ - $\pi$  entre molécules voisines, ou avec le cholestérol (Lalitha et coll., 2001).

Ces interactions sont à l'origine d'un arrangement plus compact que dans le cas des phospholipides et de températures de transition plus élevées. Les températures de transition des sphingomyélines sont de l'ordre de 40°C (Sripada et coll., 1987). Celle de la sphingomyéline d'œuf (utilisée ici) est de 39,4°C (Shaikh et coll., 2001 ; Ferraretto et coll., 1997). Ces différences conduisent probablement à une séparation de phase des sphingolipides et phospholipides dans la membrane (Brown et London, 2000).

### **Les glycolipides**

Les glycosphingolipides (ou glycolipides) sont des sphingolipides particuliers possédant un ou plusieurs résidus glucidiques au niveau de la tête polaire. Le nombre de résidus glucidiques peut atteindre la trentaine dans les molécules les plus compliquées. Ces molécules sont présentes dans toutes les membranes cellulaires animales (elles sont en particulier très abondantes dans les cellules du système nerveux), uniquement dans le feuillet externe de la membrane: les résidus glucidiques sont donc exposés à la surface des cellules (Luckam et coll., 1993). Les fonctions de ces molécules sont variées : elles interviennent dans la reconnaissance cellulaire, la différenciation, l'oncogénèse... Elles jouent également le rôle de médiateur, de récepteur pour des protéines ou des toxines (le GM<sub>1</sub> est un récepteur de la toxine du choléra), ou encore d'agent modulant pour d'autres récepteurs. Certains glycolipides sont enfin présents dans les *rafts* (le GM<sub>3</sub> est par exemple présent dans des fractions isolées de mélanomes, avec le cholestérol et la sphingomyéline).

Leurs quantités et compositions sont très variables d'un type cellulaire à un autre, et une altération de leur composition peut provoquer une déstabilisation de la membrane. Chez les animaux, les glycolipides dérivent généralement de la sphingosine, forme insaturée du céramide (Luckam et coll., 1993). Leurs têtes polaires sont très diversifiées du fait de la grande variabilité des résidus saccharidiques et de leurs dérivés, la multiplicité des liaisons entre résidus (plusieurs groupes hydroxyle par saccharide), les liaisons de type  $\alpha$  ou  $\beta$ , et les ramifications possibles.

Les glycolipides sont classés en plusieurs catégories selon la nature de leur tête polaire (Masserini et Ravasi, 2001) :

- les glycolipides neutres, comportant des résidus glucose, galactose, N-acétylgalactosamine... Parmi eux, on trouve les cérébrosides qui ne contiennent qu'un résidu galactose ou glucose ;
- les glycolipides acides, comme les sulfatides (la partie saccharidique est liée au reste de la molécule par un groupe sulfate) et les gangliosides. Ces derniers constituent une classe particulière: un ou plusieurs sucres comportent une fonction « acide sialique » (acide N-acetyl-neuraminique), chargée négativement. Les chaînes comportent un fort taux de C20-sphingosine, et un taux mineur de C20-sphinganine (forme saturée du céramide). L'acide gras prépondérant est l'acide stéarique (C18). Le GM<sub>1</sub> et le GM<sub>3</sub> appartiennent à la classe des gangliosides (Figure 4).

D'un point de vue physicochimique, les gangliosides sont des molécules hautement polaires aux propriétés complexes. Ces propriétés sont essentiellement liées au fait que les parties hydrophobes et hydrophiles de ces molécules sont de tailles comparables. Dans les membranes, la ségrégation des glycolipides est probablement facilitée par des interactions entre oligosaccharides. La partie polaire étant hautement variable, plusieurs sites de fixation de faible affinité sont possibles. Cependant les interactions sont difficiles à mettre en évidence du fait de leur faiblesse et des interactions possibles avec les molécules d'eau environnantes : on estime ainsi que 40 à 70 molécules d'eau peuvent être liées aux chaînes saccharidiques (Masserini et Ravasi, 2001).

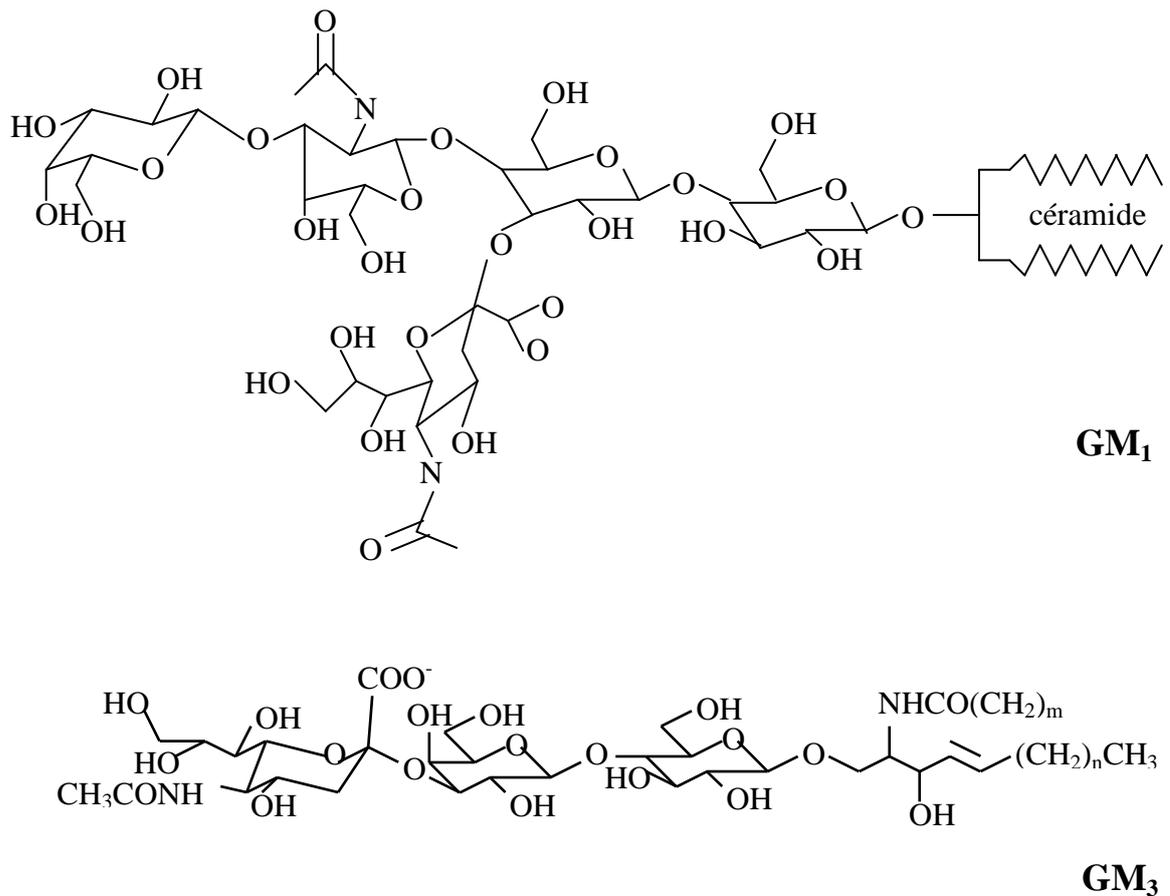


Figure 4 : structure des gangliosides GM<sub>1</sub> et GM<sub>3</sub>.

### Les phospholipides

Les phospholipides (ou glycérophospholipides) sont des molécules comportant deux chaînes hydrocarbonées greffées en position 1 et 2 sur un squelette glycérol par des liaisons esters. Les chaînes sont de longueur moyenne (chaîne palmitique en position *sn-1* et chaîne mono- ou polyinsaturée en position *sn-2*). Un dérivé de l'acide phosphorique est greffé en position 3, et constitue la tête polaire de la molécule. Ces phospholipides forment la classe la plus abondante des lipides des cellules animales (Shechter, 1997).

Les phospholipides comportant une tête phosphatidylcholine (PC) zwitterionique sont les plus répandus.

Dans les études présentées dans ce chapitre, différents phospholipides ont été utilisés :

- le POPC : il représente un bon modèle de phospholipide membranaire pour plusieurs raisons. Il comporte une tête polaire PC, ses chaînes sont les plus répandues dans les membranes (16:0-18:1), et sa fluidité est bien représentative de celle des membranes biologiques. Sa température de transition phase gel / phase fluide est d'environ -2°C.

-le SOPC : il diffère du POPC par une de ses chaînes (18 :0-18 :1), ce qui élève légèrement sa température de transition à 9°C.

-le DMPC et le DPPC : ils présentent tous deux une tête PC, et deux chaînes hydrophobes de 14 et 16 carbones, respectivement. Leurs températures de transition sont de 23°C et 41°C.

-le DMPG : contrairement aux phospholipides décrits ci-dessus, la tête polaire de ce lipide est un phosphatidylglycérol (PG) chargé négativement. Les deux chaînes sont saturées et sa température de transition est de 23°C.

### Le cholestérol et le dihydrocholestérol

Le cholestérol est le stérol majoritaire dans les cellules de mammifères. Son taux atteint jusqu'à 50 mol% des lipides de la membrane plasmique (Straume et Litman, 1987). L'apparition des stérols dans les membranes a été une grande étape de l'évolution, car ils peuvent moduler leurs propriétés physicochimiques (Barenholz, 2002).

Selon la définition de Barenholz, un stérol « actif » comporte la structure minimale suivante: un système de cycles plans, une petite tête polaire, et une chaîne latérale (Barenholz, 2002). Son aire moléculaire est faible ( $< 40\text{\AA}^2$ ). Le cholestérol remplit ces critères. En effet, cette molécule est constituée d'une partie tétracyclique plane, d'une chaîne isoocetyl flexible, et d'un groupement  $3\beta\text{-OH}$ . Les groupements méthyle, la chaîne et le groupe OH sont tous du même côté de la molécule (Figure 5).

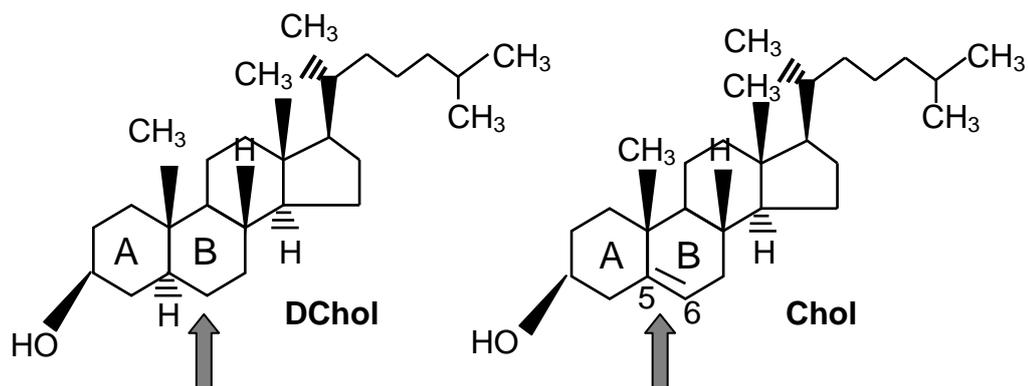


Figure 5 : structure du dihydrocholestérol et du cholestérol (les flèches indiquent la différence dans les deux structures).

Le groupe -OH est la seule partie polaire de la molécule. Il lui donne son caractère amphiphile et il est responsable de son orientation dans les membranes. Il participe également à des liaisons hydrogène avec d'autres molécules lipidiques ou des molécules d'eau.

La distribution du cholestérol dans les membranes cellulaires est hétérogène : 40 à 90 % du cholestérol non estérifié est localisé dans la membrane plasmique. Au niveau de cette membrane plasmique, on observe une co-localisation du cholestérol et de la sphingomyéline, suggérant que la capacité de la membrane à solubiliser ce stérol serait due aux sphingolipides *via* des liaisons hydrogène entre le 3 $\beta$ -OH et les groupes amide de la sphingomyéline, et des liaisons de type  $\pi$ - $\pi$ , ou de Van der Waals entre les cycles plans du cholestérol et les longues chaînes des sphingomyélines (Masserini et Ravasi, 2001). La dégradation sélective de la sphingomyéline dans une cellule entraîne une redistribution partielle du cholestérol dans cette cellule, une diminution de sa synthèse, et une augmentation de sa désorption si la cellule est traitée à la cyclodextrine, molécule présentée au paragraphe I-3 (Mattjus et Slotte, 1996 ; Ohvo et coll., 1997). En revanche, il n'y a pas de co-localisation aussi nette entre le cholestérol et les phospholipides de type PC.

Le cholestérol a de nombreux effets sur le comportement des lipides environnants aussi bien dans les membranes que dans les modèles membranaires :

- il minimise les volumes libres dans les membranes, réduisant ainsi la perméabilité membranaire (Barenholz, 2002).
- il « assèche » l'interface lipide-eau, et augmente donc les interactions de contact et de Van der Waals entre molécules adjacentes. Ceci diminue également la perméabilité et augmente la stabilité de la membrane vis-à-vis des oxydations et hydrolyses. L'effet d'ordonnement et d'assèchement est plus faible dans le cas des PC mono- ou bi-insaturés que des sphingolipides (Barenholz, 2002).
- il abolit la transition de phase normale des bicouches de phospholipides et entraîne l'apparition d'une phase aux propriétés intermédiaires entre la phase liquide condensé et la phase liquide expansé (Brown et London, 2000) .
- il induit des séparations de phase, probablement à cause d'interactions plus favorables avec les lipides saturés (Brown et London, 2000). Il peut également ordonner les chaînes et diminuer les isomérisations *trans-gauche* (la longueur de la molécule de cholestérol correspond à environ 17 atomes de carbone dans une chaîne : l'ordonnement est donc moins marqué pour le reste des chaînes).

-il participe à la formation des *rafts* membranaires, sa déplétion provoquant une destruction du *raft* ou affectant son fonctionnement (Brown et London, 2000).

Récemment une attention particulière a été portée aux groupes méthyl présents sur la partie cyclique du cholestérol. Ces groupes sont tous positionnés d'un même côté de cette partie cyclique. On peut donc repérer deux faces aux propriétés différentes : une face  $\alpha$  « lisse » dépourvue de méthyl, et une face  $\beta$  « rugueuse » où les groupes méthyl sont localisés. Cette asymétrie du cholestérol semble jouer un rôle important comme le montrent des expériences de simulation réalisées sur des mélanges DOPC/SM/cholestérol : le cholestérol se localise préférentiellement à l'interface DOPC/SM, l'arrangement avec la SM étant favorable sur la face  $\alpha$ , alors que celui avec le DOPC est favorable sur la face  $\beta$ . De plus, il existe une corrélation forte entre la capacité d'ordonnement et de condensation du stérol et son inclinaison dans la bicouche lipidique : plus l'inclinaison est faible, plus la bicouche est ordonnée (Rog et coll., 2008).

Enfin, le cholestérol est sensible à l'oxydation, induite par exemple par l'oxygène de l'air. Il est donc parfois remplacé dans certaines expériences par le dihydrocholestérol (Figure 5), plus stable chimiquement. Cette molécule fait l'objet d'une étude présentée au paragraphe IV de ce chapitre.

### **I-3 Les différents modèles membranaires**

Compte tenu de la grande complexité de la composition membranaire, tant au niveau lipidique que protéique, il peut s'avérer utile d'utiliser des modèles membranaires simplifiés, composés de un à quelques lipides différents et contenant éventuellement un type de protéine.

Un modèle membranaire idéal est une bicouche simple, fermée, de rayon de courbure proche de celui d'une membrane cellulaire, dans laquelle des protéines peuvent être insérées. Sa structure doit être régulière et stable, et présenter les propriétés appropriées de conductance, fluidité... (Kahya et coll., 2004). Généralement, les modèles ne répondent pas à la totalité des critères précédents.

Parmi les différents modèles possibles, les GUV (*Giant Unilamellar Vesicles*, ou vésicules unilamellaires géantes, diamètre de plusieurs dizaines de microns) constituent un modèle particulièrement intéressant car répondant aux critères précédents. Comme nous

l'avons vu précédemment, les GUV sont très utilisées actuellement dans les études portant sur les mélanges lipidiques susceptibles de former des *rafts*, ou le rôle des protéines dans leur formation.

D'autres modèles de type bicouche existent, comme les BLM (*Black Lipid Membranes*), formées entre deux phases aqueuses séparées par une paroi percée d'un trou au niveau duquel est formée la BLM. Cependant, les BLM ne sont pas toujours unilamellaires dans leur ensemble. On peut alors se tourner vers les bicouches planes supportées, déposées sur un support plan. L'inconvénient majeur de ce modèle est la présence du support qui peut modifier le comportement des lipides et protéines constituant la bicouche (interactions lipide/support, faible épaisseur de la couche d'eau séparant la bicouche du support, perte de la fonctionnalité des protéines...).

Enfin, on peut envisager un modèle de type monocouche, comme les monocouches de Langmuir, utilisées dans l'étude présentée dans ce chapitre. Il s'agit de monocouches étalées à l'interface air-eau, les lipides étant comprimés pour arriver à une cohésion similaire à celle observée dans les membranes. Ces monocouches présentent des avantages (simplicité de préparation, structure régulière et stable, contrôle de la cohésion), mais aussi un inconvénient de taille, puisqu'elles ne miment qu'un feuillet de la membrane. Cela empêche l'insertion de protéines intégrales ou les effets d'interdigitation (influence des lipides à longues chaînes présents dans l'autre feuillet). Par contre, ce modèle est bien adapté aux études portant sur les interactions latérales entre lipides, ou les interactions de protéines périphériques avec les têtes polaires. De plus, dans le cas des mélanges, le rapport molaire de chaque lipide est bien défini, ce qui n'est pas le cas par exemple dans les liposomes où les lipides peuvent se répartir de manière différente entre les deux feuillets. Le paragraphe suivant résume les points essentiels concernant ce modèle membranaire.

#### **I-4 Brefs rappels sur les méthodes utilisées**

##### **Mesures de pression de surface**

Comme nous l'avons vu, les monocouches de Langmuir sont constituées par étalement des lipides et leur compression à l'interface air-eau. La compression permet d'obtenir une isotherme pression-aire moléculaire moyenne ( $\pi$ -A) donnant de nombreuses informations telles que les phases et transitions de phase des lipides purs. Elles permettent également de quantifier l'influence sur ces phases d'une molécule solubilisée dans la

sousphase ou d'un autre lipide dans la monocouche. En particulier l'analyse des aires moléculaires moyennes à une pression donnée en fonction de la fraction molaire d'un des deux lipides indique s'il y a des interactions entre les lipides présents. On distingue à ce propos trois cas :

- l'aire moléculaire moyenne du mélange est supérieure à l'aire des lipides purs pondérée des fractions molaires. Dans ce cas, les interactions entre les deux types de lipides dans la monocouche sont répulsives, provoquant l'expansion de la monocouche.
- l'aire moléculaire moyenne du mélange est égale à l'aire des lipides purs pondérée des fractions molaires. Le mélange est alors dit « idéal » : aucune interaction particulière n'a lieu entre les deux lipides.
- l'aire moléculaire moyenne du mélange est inférieure à l'aire des lipides purs pondérée des fractions molaires. Les interactions entre les deux types de lipides dans la monocouche sont attractives et provoquent la condensation de la monocouche.

Dans le cas de monocouches contenant un stérol, il est également possible de sonder les interactions lipide/stérol en utilisant la  $\beta$ -cyclodextrine ( $\beta$ -CD, Figure 6). Cette molécule est un oligomère cyclique de 7 molécules d' $\alpha$ -D-glucose caractérisé par une surface externe hydrophile et une cavité interne hydrophobe. Solubilisée dans la sousphase, elle est capable de séquestrer le stérol dans sa cavité interne et de l'extraire de la monocouche. D'une manière schématique, plus les interactions lipide/stérol dans la monocouche sont faibles, plus la désorption du cholestérol est forte. De telles expériences de désorption peuvent être réalisées à pression de surface constante afin de conserver la même cohésion lipidique durant toute l'expérience, ou à aire constante.

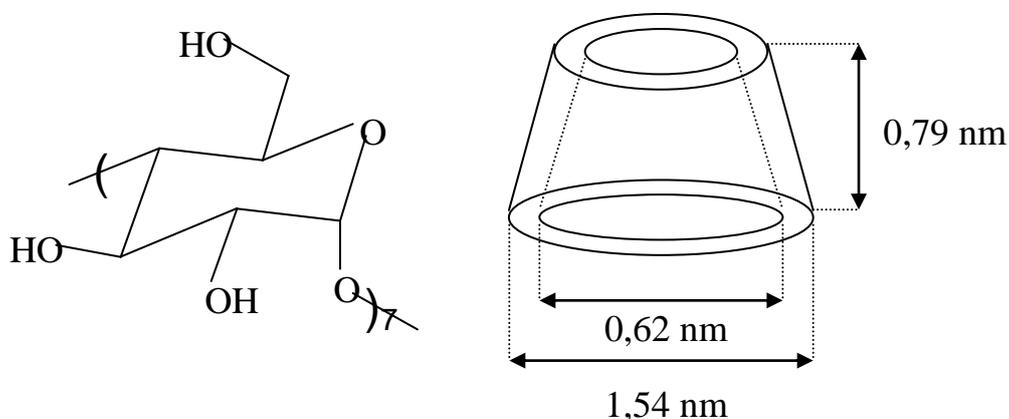


Figure 6 : structure de la  $\beta$ -CD (d'après Greenhall et coll., 1995)

Bien que les mesures de pression de surface apportent beaucoup d'informations sur le comportement des lipides à l'interface, ces mesures sont moyennées sur l'ensemble de la monocouche. De plus, elles ne donnent aucune information sur la répartition des molécules, la présence éventuelle de domaines... Il est donc nécessaire de les coupler à une observation directe de la monocouche. Nous avons utilisé deux méthodes d'observation : la microscopie de fluorescence et la microscopie à l'angle de Brewster (BAM). La première est disponible dans notre équipe. Les images de BAM ont, elles, été réalisées dans l'équipe de Bernard Desbat (CBMN, Université Bordeaux 1).

### Microscopie de fluorescence

Les lipides ne sont pas naturellement fluorescents. Il est donc nécessaire de marquer la monocouche en ajoutant aux lipides étalés une sonde lipidique fluorescente en faible quantité afin de ne pas perturber le système (typiquement de l'ordre de 1 mol%). Nous avons utilisé le NBD-PC (Figure 7) dans notre étude. Ce lipide se solubilise dans les zones en phase fluide et est exclu des zones en phase condensée, la sonde fluorescente étant fixée au niveau d'une des deux chaînes (Slotte et Mattjus, 1995). Les zones fluides apparaissent donc lumineuses, au contraire des zones condensées sombres. Le spectre d'absorption du NBD est centré sur 470 nm, tandis que son spectre d'émission est centré sur 540 nm.

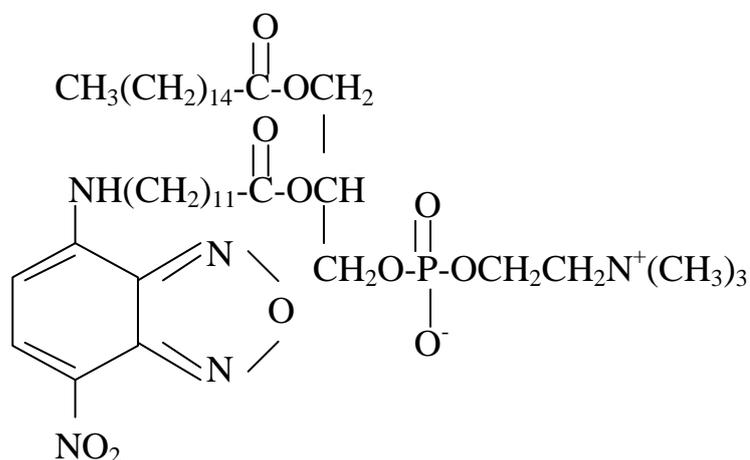


Figure 7 : structure de la sonde NBD-PC.

Notre microscope de fluorescence (BX51WI, Olympus) possède une platine fixe, les objectifs étant mobiles afin de réaliser la mise au point. Le montage comprend également une lampe à vapeur de mercure comme source excitatrice, et un jeu de filtres d'excitation et

d'émission adaptés aux longueurs d'onde du NBD-PC, mais aussi à celles des hémicyanines abordées dans la partie « Conclusion générale et Perspectives ».

### Microscopie à l'angle de Brewster (BAM)

Contrairement à la microscopie de fluorescence, le BAM ne nécessite pas de marquage préalable de la monocouche, car cette méthode est basée sur les propriétés de réflexion de la lumière polarisée. Considérons l'interface air-eau comme un dioptre plan séparant deux milieux d'indices  $n_1$  et  $n_2$  respectivement (Figure 8). La réflectivité d'un faisceau lumineux polarisé parallèlement au plan d'incidence est nulle à l'angle de Brewster  $\theta_B = \arctan\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$ .

En présence d'une monocouche à l'interface, l'indice varie, et la réflectivité, bien que très faible, n'est plus nulle. L'analyse de la lumière émise permet donc d'obtenir des informations sur le film en terme de morphologie : monocouche fluide ou condensée, homogène ou non. On peut aussi avoir des informations sur l'épaisseur optique du film, après conversion de l'intensité réfléchie en niveaux de gris.

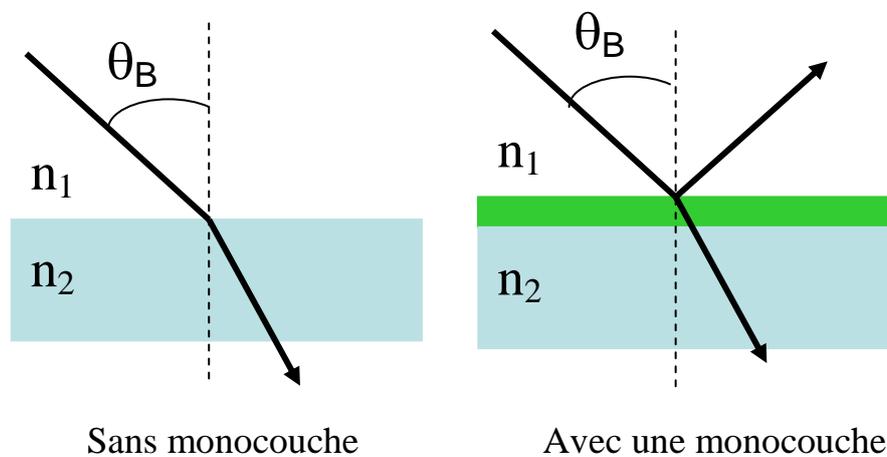


Figure 8 : principe du BAM.

## II- Etude du glycolipide GM<sub>1</sub> (E22, Technische Universität München)

Cette étude comporte deux parties complémentaires :

-des monocouches de GM<sub>1</sub> pur ou mélangé au DPPC ou au SOPC ont été étalées à l'interface air-eau, la sousphase étant de l'eau pure ou un tampon NaHCO<sub>3</sub> (pH 7,5). Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux aires moléculaires moyennes des mélanges et aux modifications de la transition de phase du DPPC. Les pourcentages de GM<sub>1</sub> étudiés sont compris entre 1 et 20 mol%.

-l'accessibilité du GM<sub>1</sub> dans ces monocouches a ensuite été étudiée en observant l'amplitude de l'adsorption de la WGA (*wheat germ agglutinin*), une protéine de la famille des lectines reconnaissant spécifiquement le GM<sub>1</sub>.

Les principaux résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

### II-1 Isothermes du GM<sub>1</sub> pur

L'isotherme du GM<sub>1</sub> étalé sur de l'eau pure est caractérisée par des aires moléculaires moyennes assez élevées, la pression de surface augmentant à partir d'environ 200 Å<sup>2</sup> lors de la compression. Une transition de phase est observée entre 15 et 20 mN/m. Si le GM<sub>1</sub> est étalé sur le tampon, l'isotherme est décalée vers les aires moléculaires plus élevées, et la transition de phase est nettement moins visible.

Les aires moléculaires élevées ne sont pas vraiment surprenantes : la tête polaire du GM<sub>1</sub> est un oligosaccharide branché, chargé négativement. Cette charge est donc à l'origine de fortes répulsions électrostatiques (le pH de la sousphase n'est pas supposé jouer ici un rôle prépondérant, car dans les deux cas, il est nettement supérieur au pK<sub>a</sub> de l'acide sialique). De plus, on peut supposer que le taux d'hydratation de cette tête est élevé. Enfin, l'étude en IRRAS (*InfraRed Reflection-Absorption Spectroscopy*) de monocouches de GM<sub>1</sub> a montré que les molécules sont fortement inclinées sur la surface (Gericke et al., 1999), ce qui augmente également les aires moléculaires moyennes.

L'effet du tampon est, lui, plus surprenant. On pouvait en effet s'attendre plutôt à une réduction des aires moléculaires, due à un écrantage des répulsions électrostatiques par les ions Na<sup>+</sup>. Il est possible que l'interaction GM<sub>1</sub>-Na<sup>+</sup> influe sur l'orientation des molécules les unes par rapport aux autres, modifiant les aires moléculaires.

## II-2 Etude des monocouches de GM<sub>1</sub>/DPPC et GM<sub>1</sub>/SOPC

Pour plus de clarté, les principaux résultats sont résumés dans le Tableau 1.

Mélanges lipidiques	Sous-phase	Aires moléculaires moyennes des monocouches mixtes et transition de phase (dans le cas du DPPC uniquement)
GM <sub>1</sub> /DPPC	Eau, 20°C	%GM <sub>1</sub> < 10 mol% : aires moléculaires des mélanges « idéales » et transition de phase du DPPC visible (élargissement maximal de la transition à 10 mol% de GM <sub>1</sub> ). %GM <sub>1</sub> ≥ 10 mol% : aires moléculaires inférieures aux aires « idéales » et disparition de la transition du DPPC.
GM <sub>1</sub> /DPPC	Tampon, 20°C	Aires moléculaires supérieures aux aires « idéales ». Transition de phase du DPPC visible pour tous les mélanges étudiés (largeur de la transition stable).
GM <sub>1</sub> /SOPC	Eau, 20°C	Monocouches fluides. %GM <sub>1</sub> ≤ 5 mol% : aires moléculaires « idéales ». %GM <sub>1</sub> > 5 mol% : aires moléculaires inférieures aux aires « idéales ».
GM <sub>1</sub> /SOPC	Tampon, 20°C	Monocouches fluides. Aires moléculaires supérieures aux aires « idéales ».

Tableau 1 : principaux résultats sur les monocouches de GM<sub>1</sub>/DPPC ou SOPC.

Leur analyse permet de dégager les points suivants.

### Sousphase « eau »

L'élargissement de la transition de phase du DPPC suggère que les lipides subissent une séparation latérale de phase (Albrecht et coll., 1981). Cette hypothèse est en accord avec des résultats obtenus par calorimétrie différentielle (Kojima et coll, 1988), ainsi qu'avec les aires moléculaires moyennes « idéales », suggérant la formation de *clusters* de GM<sub>1</sub> dans une phase enrichie en DPPC. Si le taux de GM<sub>1</sub> augmente, les monocouches deviennent plus condensées, comme le montrent les aires moléculaires, ce qui implique que le GM<sub>1</sub> et le DPPC seraient alors, au moins en partie, miscibles. Cette miscibilité est plutôt surprenante, les deux lipides ayant des températures de transition très différentes : 41°C pour le DPPC, 12 à

28°C pour le GM<sub>1</sub> (Maggio et coll., 1985). Une telle différence ne favorise pas l'homogénéité de la monocouche. De plus, des mesures en IRRAS ont montré que l'orientation du DPPC à l'interface air-eau n'est pas modifiée en présence du glycolipide (Gericke et coll., 1999). Ce résultat supporte plutôt l'idée de la co-existence de deux phases séparées, bien que la répulsion électrostatique induite par la charge négative du GM<sub>1</sub> empêche la formation de *clusters* (Maggio et coll., 1981). Cependant, l'angle de *tilt* du GM<sub>1</sub> est, lui, modifié, diminuant de 37° à 15° en présence du DPPC (Gericke et coll., 1999). L'aire moyenne occupée par le GM<sub>1</sub> est donc supposée diminuer aussi, ce qui affecterait l'aire des mélanges étalés à l'interface. On peut finalement envisager que ces monocouches mixtes GM<sub>1</sub>/DPPC contiennent des domaines enrichis en glycolipide ou DPPC, la cohésion des domaines enrichis en GM<sub>1</sub> étant assurée par le partage des molécules d'eau hydratant les têtes polaires (Müller et coll., 1996).

En présence de SOPC, les aires moléculaires varient dans l'ensemble de la même manière en fonction du pourcentage de GM<sub>1</sub>. Cela suggère que le GM<sub>1</sub> a le même comportement quelle que soit la phase (liquide condensé ou liquide expansé) du lipide environnant. L'étude de monocouches supportées de GM<sub>1</sub> et DOPC (dioléoyl-phosphatidylcholine, un autre phospholipide fluide) par AFM (*Atomic Force Microscopy*) montre également que ces deux lipides ne sont pas miscibles (Vié et coll., 1998).

### **Sousphase « tampon »**

Les résultats obtenus avec cette sousphase sont très différents des précédents, les aires moléculaires moyennes étant en particulier supérieures aux aires « idéales ». Il semble donc que la présence d'électrolytes dans la phase aqueuse soit un paramètre déterminant. Ainsi, le GM<sub>1</sub> est miscible avec le SOPC ou le POPC en présence d'un électrolyte (Bunow et Bunow, 1979 ; Thompson et coll., 1985), alors qu'il est non miscible avec le DOPC dans un film transféré d'une interface air-eau pure (Vié et coll., 1998).

### **II-3 Interaction de la WGA avec les monocouches de GM<sub>1</sub>/DPPC et GM<sub>1</sub>/SOPC**

La WGA est capable de s'adsorber à l'interface air-eau en absence de monocouche lipidique. La pression maximale atteinte est alors de 12 mN/m. Les expériences d'adsorption en présence d'une monocouche lipidique ont donc été réalisées à 20 mN/m, afin de s'affranchir du problème d'adsorption non spécifique.

En présence d'une monocouche de SOPC pur, on observe une adsorption de la WGA, visible à l'augmentation de pression après injection de la lectine dans la sousphase. La forte

augmentation de la pression suggère que la protéine s'insère entre les chaînes hydrophobes du SOPC. L'amplitude de l'adsorption augmente avec la concentration en WGA, jusqu'à saturation à 0,1  $\mu\text{M}$ . Paradoxalement, l'ajout de 2 mol% de  $\text{GM}_1$  dans la monocouche diminue l'adsorption, alors que la WGA est censée reconnaître spécifiquement le  $\text{GM}_1$ . Si le pourcentage de  $\text{GM}_1$  monte à 5 ou 10 mol%, l'adsorption augmente et sature. L'ajout dans la sousphase de N-acétylglucosamine, molécule soluble reconnue par la WGA, diminue fortement son adsorption, confirmant la spécificité de l'interaction WGA- $\text{GM}_1$ . De plus, en tenant compte du fait que l'aire disponible autour d'une molécule de  $\text{GM}_1$  diminue quand son taux augmente dans la monocouche, et que la WGA adsorbée occupe une aire moyenne de l'ordre de 20  $\text{\AA}^2$  (Sato et coll., 1994), on peut estimer que la saturation de la monocouche a lieu théoriquement pour un pourcentage d'environ 5 mol% de  $\text{GM}_1$ , estimation en accord avec les résultats expérimentaux. Enfin, la WGA induit une diminution sensible de la pression, quand elle est injectée à forte concentration (0,05  $\mu\text{M}$ ) sous la monocouche de SOPC/ $\text{GM}_1$ . Nous avons attribué cet effet à un réarrangement des lipides à l'interface, des études antérieures ayant montré que la WGA est capable de réduire les mouvements de la tête polaire du glycolipide (Grant et Peters, 1984) et d'induire sa ségrégation (Bunow et Bunow, 1979). On peut aussi envisager une solubilisation partielle du  $\text{GM}_1$  dans la phase aqueuse.

L'augmentation de pression induite par l'injection de la WGA sous une monocouche de DPPC est, elle, très faible : la WGA s'adsorbe probablement en faible quantité et uniquement au niveau des têtes polaires dans ce cas. L'ajout de 2 ou 5 mol% de  $\text{GM}_1$  n'augmente pas l'adsorption. Une adsorption significative n'est observée qu'à 10 mol% de  $\text{GM}_1$  et pour de fortes concentrations de protéine. La comparaison des aires moléculaires des monocouches mixtes SOPC/ $\text{GM}_1$  et DPPC/ $\text{GM}_1$  montre que ces dernières sont beaucoup plus condensées. Cet arrangement plus compact limite sans doute l'accessibilité du  $\text{GM}_1$  à la protéine.

#### **II-4 Conclusion de cette étude**

Cette première étude sur des monocouches contenant le  $\text{GM}_1$  montre la complexité du comportement de ce type de molécule à l'interface air-eau. Un des paramètres importants semble être la force ionique de la sousphase.

Le  $\text{GM}_1$ , inclus dans une monocouche de phospholipides, est capable d'interagir spécifiquement avec la WGA dans certaines conditions. La fluidité de la monocouche joue un rôle prépondérant en permettant ou non l'accessibilité du glycolipide à la protéine. La WGA à forte concentration est probablement capable d'induire une réorganisation de la monocouche,

hypothèse non confirmée, ces expériences ayant été réalisées à la fin de mon stage post-doctoral.

### **III- Etude du glycolipide GM<sub>3</sub> (CPMOH, Université Bordeaux 1)**

Suite à l'étude du GM<sub>1</sub> développée lors de mon stage post-doctoral, j'ai entrepris au CPMOH l'étude d'un autre glycolipide membranaire, le GM<sub>3</sub>. Je me suis focalisée sur les interactions de ce glycolipide avec des lipides présents dans les *rafts* : la sphingomyéline (SM) et le cholestérol.

#### **III-1 Monocouches mixtes GM<sub>3</sub>/SM et GM<sub>3</sub>/POPC**

##### **Monocouches des lipides purs**

L'isotherme du GM<sub>3</sub> étalé à l'interface air-eau est de type « liquide expansé » tout au long de la compression, les aires moléculaires moyennes étant comprises entre 150 Å<sup>2</sup> en début de compression et 60 Å<sup>2</sup> à 40 mN/m (Figure 9). Les images de fluorescence de ces monocouches marquées au NBD-PC montrent cependant l'apparition de petits domaines sombres pour des pressions comprises entre 10 et 25 mN/m (Figure 9). Ces monocouches subissent donc une transition de phase lors de la compression, bien que celle-ci ne soit pas apparente sur l'isotherme.

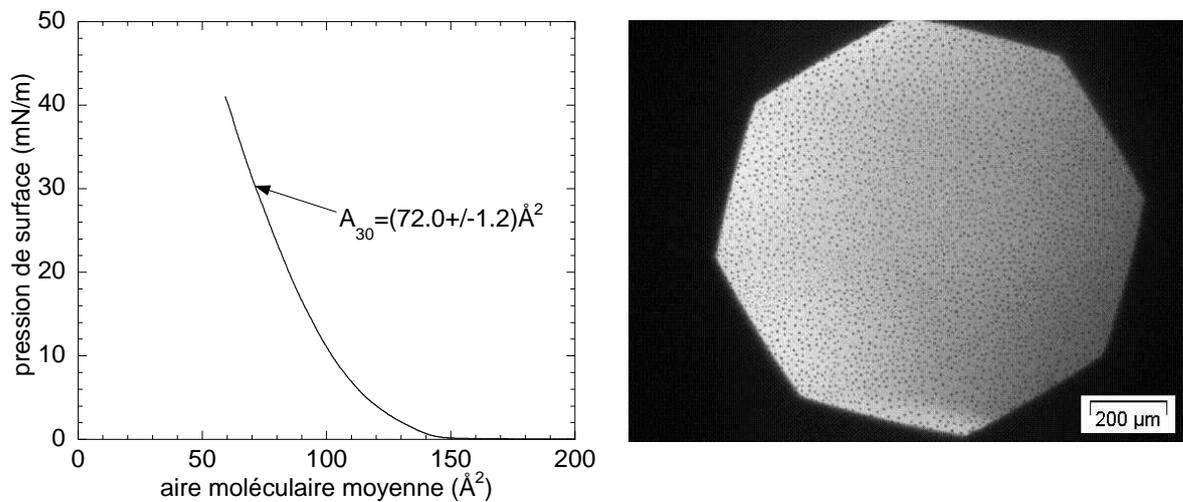


Figure 9: isotherme de compression du GM<sub>3</sub> à l'interface air-eau (sousphase eau ultrapure pH 5.5, 20°C, vitesse de compression 5cm<sup>2</sup>/min) et image de fluorescence obtenue à 10 mN/m après marquage de la monocouche avec 1 mol% de NBD-PC.

Dans le cas de la SM, la compression induit aussi une transition de phase liquide expansé / liquide condensé, également peu visible sur l'isotherme de compression. Les images de fluorescence montrent la formation de domaines sombres à partir de 5 mN/m (Figure 10). Ces domaines grossissent avec la compression et couvrent progressivement la totalité de la surface. Leur forme caractéristique est attribuée à la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires (Lalitha et coll., 2001).

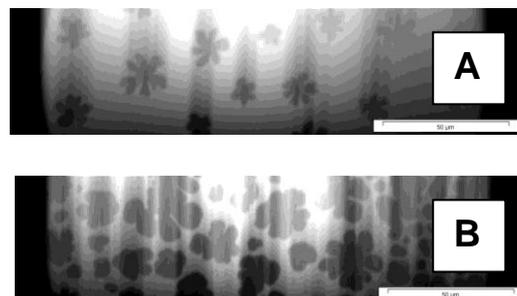


Figure 10: images de fluorescence obtenues à 5 mN/m (A) et 30 mN/m (B) après marquage de la monocouche de SM avec 1 mol% de NBD-PC. La barre d'échelle vaut 50 µm.

Quant au POPC, son isotherme montre qu'il reste en phase liquide expansé pendant la compression. Les images de fluorescence confirment les mesures de pression de surface en restant totalement homogènes tout au long de la compression.

### **Monocouches SM/GM<sub>3</sub>**

Les aires moléculaires ont été mesurées sur les isothermes de ces mélanges à 10 mN/m, 20 mN/m et 30 mN/m (Figure 11). A ces trois pressions, elles sont « idéales » quand le pourcentage de GM<sub>3</sub> dans la monocouche n'excède pas 20 mol%. Au-delà de cette limite, les aires moléculaires expérimentales sont plus faibles que les aires « idéales », montrant une condensation des monocouches. Des images de fluorescence ont été réalisées pour deux mélanges significatifs contenant 10 mol% et 40 mol% de GM<sub>3</sub>. Des domaines apparaissent dans les deux cas quand la pression excède 5 mN/m (Figure 12). A 10 mol% de GM<sub>3</sub>, le bord de ces domaines est soit irrégulier, soit circulaire. A 40 mol% de GM<sub>3</sub>, seuls des domaines circulaires sont observés.

### **Monocouches POPC/GM<sub>3</sub>**

Les isothermes des mélanges sont toutes de type « liquide expansé ». Les aires moléculaires ont été mesurées sur ces isothermes à 10 mN/m, 20 mN/m et 30 mN/m (Figure 13). Quand le pourcentage de GM<sub>3</sub> dans le monocouche est inférieur à 20 mol%, les aires expérimentales sont soit « idéales », soit légèrement supérieures. A plus fort pourcentage de GM<sub>3</sub>, les monocouches sont au contraire plus condensées que des monocouches « idéales ». Les images de fluorescence des monocouches contenant 40 mol% de GM<sub>3</sub> sont homogènes quand la pression n'excède pas 20 mN/m. Des domaines sombres apparaissent entre 20 et 25 mN/m, de dimensions et densité surfacique variables selon l'endroit où la mise au point est effectuée (Figure 14).

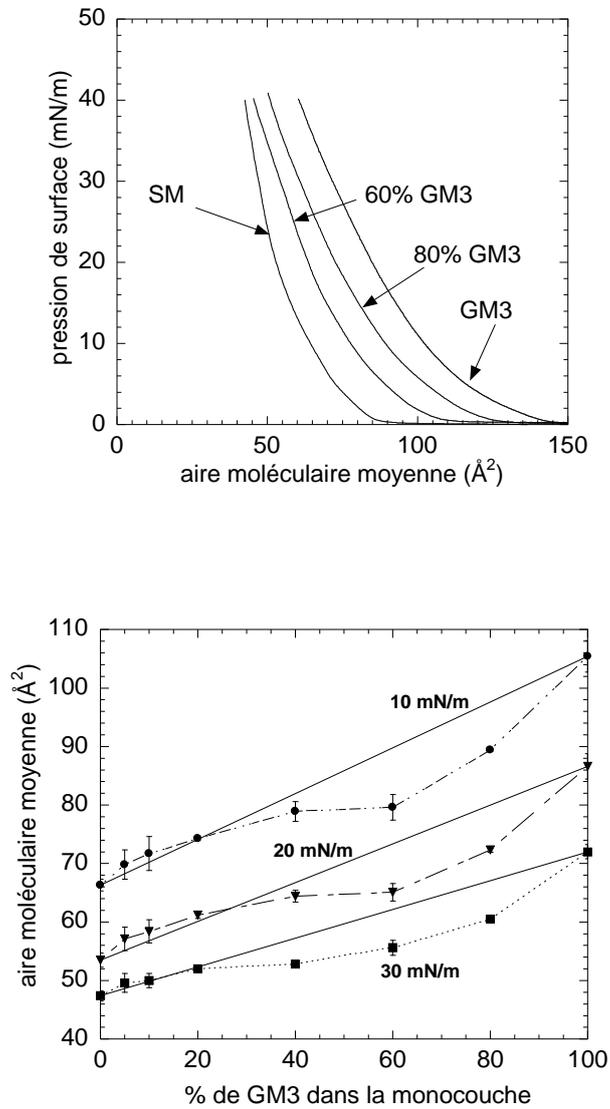


Figure 11: isothermes de compression des monocouches mixtes SM/GM<sub>3</sub> à l'interface air-eau (sousphase eau ultrapure pH 5.5, 20°C, vitesse de compression 5cm<sup>2</sup>/min) et aires moléculaires moyennes en fonction du pourcentage de GM<sub>3</sub> dans la monocouche.

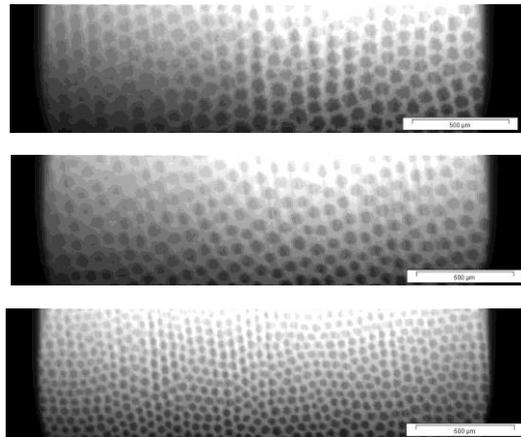


Figure 12: images de fluorescence de monocouches de SM/GM<sub>3</sub> 10 mol% obtenues à 25 mN/m après marquage avec 1 mol% de NBD-PC. La barre d'échelle vaut 500 μm.

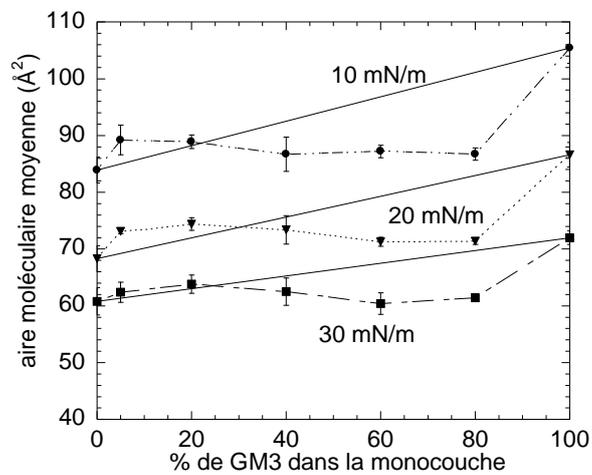


Figure 13: aires moléculaires moyennes des monocouches mixtes POPC/GM<sub>3</sub> en fonction du pourcentage de GM<sub>3</sub> dans la monocouche.

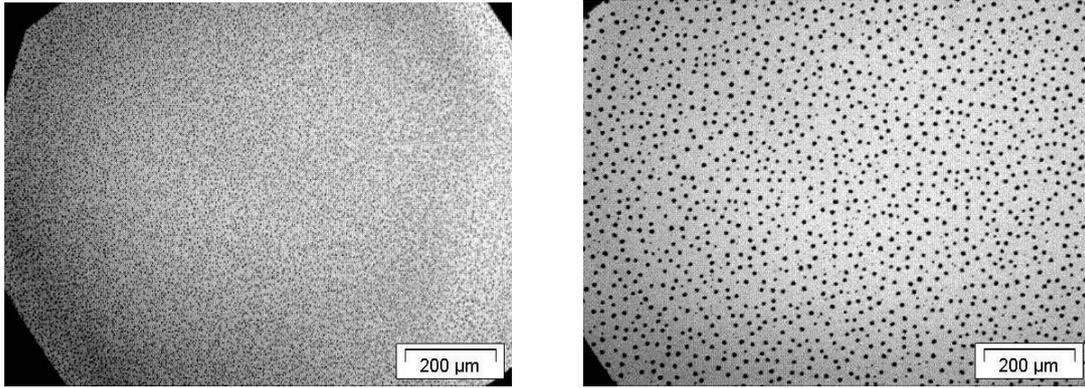


Figure 14: images de fluorescence de monocouches de POPC/GM<sub>3</sub> 40 mol% obtenues à 25 mN/m après marquage avec 1 mol% de NBD-PC.

### III-2 Monocouches GM<sub>3</sub>/cholestérol

Les résultats expérimentaux obtenus avec les monocouches de GM<sub>3</sub>/cholestérol ont été systématiquement comparés à ceux obtenus avec des monocouches de SM/cholestérol et POPC/cholestérol, ces dernières étant mieux connues et déjà largement décrites dans la littérature.

#### Isotherme du cholestérol pur

Cette isotherme est caractérisée par une augmentation rapide de la pression à partir d'une aire moléculaire d'environ 42 Å<sup>2</sup>. Cette aire varie peu quand la compression se poursuit, atteignant 38 Å<sup>2</sup> à 30 mN/m. Cette forme caractéristique de l'isotherme est due à la structure plane et rigide du cholestérol.

#### Isothermes des monocouches GM<sub>3</sub>/cholestérol

Ces isothermes sont décalées vers les aires moléculaires plus faibles quand le pourcentage de cholestérol augmente. Quels que soient la pression de surface et le pourcentage de cholestérol, les aires moléculaires moyennes sont inférieures aux aires « idéales » (Figure 15). Le cholestérol induit donc une condensation de la monocouche : la diminution de l'aire moléculaire globale est majoritairement due à une diminution de l'aire du GM<sub>3</sub>, l'aire moléculaire du cholestérol variant peu au cours de la compression.

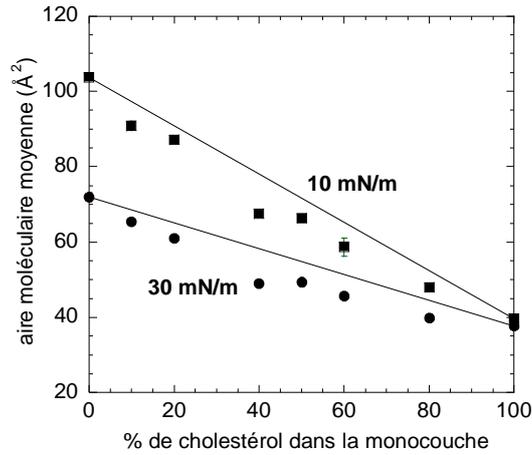


Figure 15: aires moléculaires moyennes des monocouches mixtes  $GM_3$ /cholestérol en fonction du pourcentage de cholestérol dans la monocouche.

Afin de comparer simplement les résultats obtenus avec les différents lipides testés, nous avons quantifié cette condensation de la manière suivante :

-en estimant d'abord l'aire occupée par le lipide à l'interface :  $A_{lipide} = \frac{A_{mélange} - A_{chol} \times X_{chol}}{1 - X_{chol}}$ ,

où  $X_{chol}$  est la fraction molaire de cholestérol dans la monocouche ;

-puis en comparant cette aire à celle qu'occuperait le lipide dans une monocouche pure grâce

au pourcentage de condensation:  $\%_{condensation} = \frac{A_{lipide-pur} - A_{lipide}}{A_{lipide-pur}} \times 100$ .

Les calculs montrent que le pourcentage de condensation du  $GM_3$  augmente régulièrement avec le taux de cholestérol. Ainsi à 30 mN/m, le pourcentage de condensation est de 5% à 10 mol% de cholestérol, et de 34% à 80 mol%. Les mêmes calculs ont été faits dans le cas des monocouches de POPC/cholestérol et SM/cholestérol. A 30 mN/m, les pourcentages de condensation sont de 17% pour la SM et de 28% pour le POPC à 50 mol% de cholestérol. Ces pourcentages stagnent au-delà de 50 mol% de cholestérol.

Ces monocouches ont été observées en microscopie de fluorescence après leur marquage par 1 mol% de NBD-PC. Les monocouches de  $GM_3$ /cholestérol 20 mol% sont caractérisées en début de compression par la présence de domaines sombres de formes

variables, distribués de manière homogène dans une phase lumineuse. Ces domaines deviennent circulaires à 10 mN/m (diamètre moyen estimé à 2  $\mu\text{m}$ ) puis disparaissent à plus forte pression. Cependant, les images semblent « floues » (Figure 16), suggérant que les monocouches ne sont pas homogènes. De telles images sont également obtenues à forte pression dans le cas de monocouches de GM<sub>3</sub>/cholestérol 40 mol%.

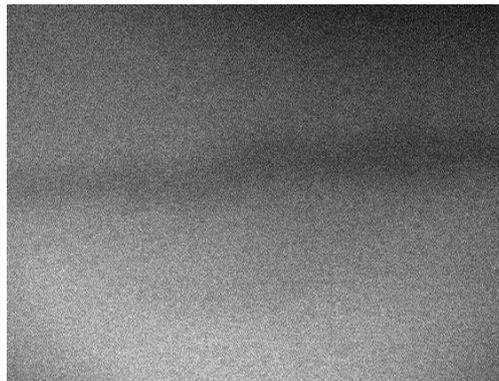


Figure 16: image de fluorescence de monocouches de GM<sub>3</sub>/cholestérol 20 mol% ou 40 mol% obtenues à 30 mN/m après marquage avec 1 mol% de NBD-PC (dimensions : 1150  $\mu\text{m}$  x 865  $\mu\text{m}$  ; x10).

Les monocouches de SM/cholestérol et POPC/cholestérol (20 mol%) ont aussi été caractérisées par microscopie de fluorescence. Les images des monocouches de SM/cholestérol montrent la co-existence de zones homogènes et hétérogènes, ces dernières contenant de petits domaines plus ou moins circulaires de diamètre moyen 1-3  $\mu\text{m}$ . A 2,5 mN/m, ces domaines fusionnent pour former une phase particulière appelée *stripe phase* (*stripe*=rayure) qui disparaît à 5 mN/m (Figure 17). Les images restent ensuite homogènes au-delà de cette pression. Quant aux monocouches de POPC/cholestérol, leurs images sont homogènes à des pressions supérieures à 10 mN/m, à la résolution de notre montage.

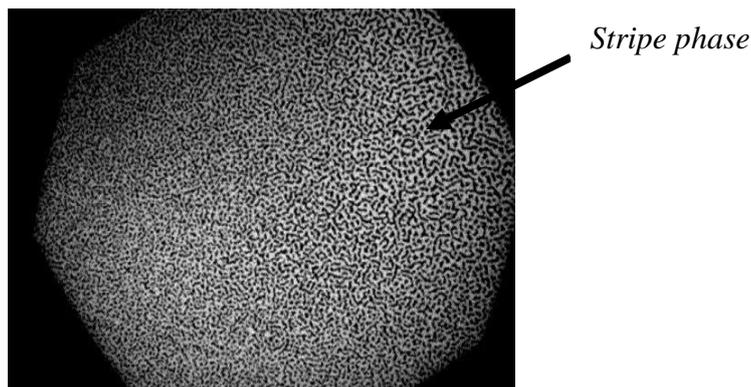


Figure 17: image de fluorescence de monocouches de SM/cholestérol 20 mol% obtenues à 2,5 mN/m après marquage avec 1 mol% de NBD-PC (dimensions : 230  $\mu\text{m}$  x 175  $\mu\text{m}$  ; x50).

### Désorption du cholestérol par la $\beta$ -CD

Comme nous l'avons vu précédemment (paragraphe I-3 de ce chapitre), la  $\beta$ -CD est capable de désorber le cholestérol d'une monocouche, l'amplitude de la désorption étant d'autant plus importante que les interactions retenant le stérol dans la monocouche sont faibles. Des expériences de désorption ont donc été réalisées à pression constante pour conserver la cohésion de la monocouche. Afin de quantifier les résultats obtenus, nous avons estimé après 90 minutes la désorption du cholestérol, en calculant un pourcentage de

désorption défini tel que  $\%_{désorption} = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100$  où  $S_i$  et  $S_f$  sont les surfaces initiale et finale

occupées par la monocouche. Les résultats sont résumés dans le Tableau 2 (deux types de monocouches ont été testés pour chaque lipide, contenant 20 ou 40 mol% de cholestérol). La désorption minimale est obtenue en présence de SM. Elle est plus importante et de même ordre de grandeur en présence de GM<sub>3</sub> et POPC.

	20 mol% de cholestérol	40 mol% de cholestérol
GM <sub>3</sub> /cholestérol	39%	30%
SM/cholestérol	12%	12%
POPC/cholestérol	43%	32%

Tableau 2 : pourcentages moyens de désorption du cholestérol par la  $\beta$ -CD (0,5 mM) après 90 minutes, à 30 mN/m.

### **III-3 Analyse des résultats et conclusions de ces études**

#### **Interaction du GM<sub>3</sub> avec la SM et le POPC**

Le comportement du GM<sub>3</sub> dans les monocouches de SM et POPC est très similaire. Dans les deux cas, nous avons mis en évidence l'existence d'un pourcentage « seuil » entre 20 et 40 mol%. Si le pourcentage de GM<sub>3</sub> est inférieur à ce seuil, la monocouche mixte se comporte comme une monocouche « idéale » ou est légèrement expansée. Au dessus du seuil, la monocouche mixte est plus condensée. Un tel seuil a également été mis en évidence dans le cas des monocouches de GM<sub>1</sub>-SOPC présentées précédemment, ou dans le cas de liposomes de DPPC contenant différents gangliosides (Cametti et coll., 1996). Les courbes donnant l'aire moléculaire en fonction du pourcentage de GM<sub>3</sub> étant similaires à toutes les pressions testées (10, 20 et 30 mN/m), on peut supposer que l'organisation des lipides dans la monocouche est déjà définie à faible pression.

Selon la théorie développée par Gaines (1966), l'obtention d'aires expérimentales « idéales » implique que les deux lipides en présence sont non miscibles. SM ou POPC et GM<sub>3</sub> ne seraient donc pas miscibles si le pourcentage de GM<sub>3</sub> est inférieur au seuil. Cependant, des aires « idéales » sont aussi obtenues dans le cas de deux lipides parfaitement miscibles mais n'ayant aucune interaction. Ce paramètre n'est donc pas à lui seul suffisant pour décrire le comportement d'une monocouche mixte. La condensation observée à des concentrations plus importantes de GM<sub>3</sub> dans la monocouche est, elle, en faveur d'une miscibilité au moins partielle des deux lipides en présence. Une interaction entre les deux lipides étant donc possible, on peut envisager que les lipides ne sont effectivement pas miscibles à faible de taux de GM<sub>3</sub>. Dans le cas contraire, on s'attendrait à observer une condensation quel que soit le pourcentage de GM<sub>3</sub> dans la monocouche. On aboutit donc au modèle présenté sur la Figure 18 montrant une modification de la miscibilité du GM<sub>3</sub> en fonction de sa concentration dans la monocouche : au dessus du seuil, les molécules de GM<sub>3</sub> supplémentaires se solubiliserait dans la phase lipidique environnante sans former d'agrégat.

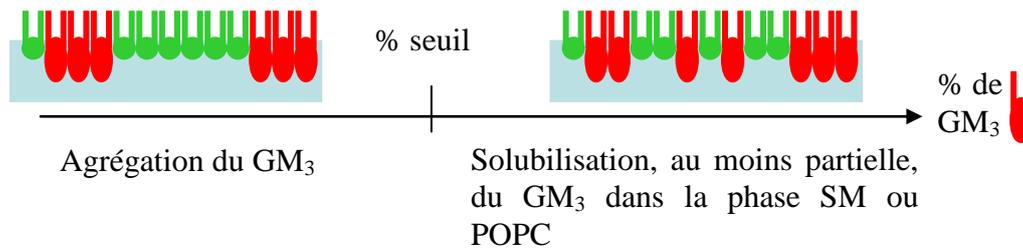


Figure 18: comportement possible du GM<sub>3</sub> dans une monocouche de SM ou POPC selon sa concentration.

Dans ce modèle, la non miscibilité du GM<sub>3</sub> et de la SM peut s'expliquer par la nature très différente de leurs chaînes hydrophobes. Mais cette explication est moins satisfaisante dans le cas du POPC, ces deux lipides ayant des chaînes plus similaires. De plus, la formation d'une phase enrichie en GM<sub>3</sub> est rejetée par Maggio et coll. (1981) à cause des répulsions électrostatiques supposées fortes entre molécules adjacentes, bien que des interactions sucre/sucre pourraient limiter la répulsion selon Cametti et coll. (1996).

Dans ces conditions, la microscopie de fluorescence s'avère utile pour observer directement la monocouche. Dans cette étude, son premier apport concerne les monocouches de GM<sub>3</sub> pur. Leur observation montre en effet la formation de domaines ayant exclu la sonde fluorescente (Figure 9). Ces domaines sont donc constitués de molécules de GM<sub>3</sub> plus condensées que le reste de la monocouche, ce qui implique que le GM<sub>3</sub> est capable de former des *clusters*, et ce en dépit des répulsions électrostatiques.

La microscopie de fluorescence montre également que les monocouches de SM/GM<sub>3</sub> comportent des domaines condensés, en dessous et au dessus du pourcentage seuil de GM<sub>3</sub>. La forme irrégulière de certains domaines suggère qu'ils ne sont pas à l'équilibre (Vollhardt, 1996, 2002). Cette observation n'est pas en contradiction avec le modèle proposé, étant donné que GM<sub>3</sub> et SM sont capables de former des domaines condensés. Enfin, les images homogènes obtenues avec les monocouches de POPC/GM<sub>3</sub> en dessous du seuil pourraient être dues à une solubilisation équivalente de la sonde fluorescente dans les deux phases enrichies en GM<sub>3</sub> ou POPC.

Une question demeure : quelle est la cause de la condensation observée dans les deux types de monocouche à fort taux de GM<sub>3</sub> ? On doit envisager un effet autre qu'une « simple » interaction rapprochant les molécules, car dans ce cas la condensation aurait probablement

lieu pour tous les rapports molaires. Comme nous l'avons vu précédemment, Gericke et coll. ont montré par IRRAS que le GM<sub>1</sub> se redresse en présence de DPPC (Gericke et coll., 1996), ce qui a pour effet de diminuer l'aire moléculaire moyenne. Si un tel redressement se produit dans le cas du GM<sub>3</sub>, on peut estimer son aire dans les monocouches condensées SM/GM<sub>3</sub> ou POPC/GM<sub>3</sub>, en utilisant les résultats présentés sur les Figures 12 et 14 respectivement. Pour cela, on considère qu'il existe une relation linéaire entre l'aire moléculaire moyenne des lipides présents dans la monocouche et le pourcentage de GM<sub>3</sub>. La droite ainsi obtenue coupe alors l'axe des ordonnées à 100% de GM<sub>3</sub> en un point donnant l'aire moléculaire moyenne du glycolipide dans son environnement lipidique. Ainsi dans le cas des monocouches mixtes SM/GM<sub>3</sub> ou POPC/GM<sub>3</sub> à 30 mN/m et au dessus du seuil, l'aire estimée du GM<sub>3</sub> vaudrait entre 62 et 64 Å<sup>2</sup> au lieu de 72 Å<sup>2</sup> (Figure 9). Si on suppose que l'inclinaison du GM<sub>3</sub> est équivalente à celle du GM<sub>1</sub> définie par Gericke et coll., on peut estimer que cet angle diminue d'environ 5° quand le GM<sub>3</sub> est en présence de SM ou de POPC.

### **Interaction du GM<sub>3</sub> avec le cholestérol**

Les résultats montrent que le cholestérol est capable d'induire la condensation du GM<sub>3</sub>. Ce résultat n'est pas surprenant en soi, car le GM<sub>3</sub> possède deux chaînes hydrophobes comme la SM et le POPC. L'efficacité de condensation est similaire dans le cas du GM<sub>3</sub> et du POPC, et plus limitée dans le cas de la SM. La plus grande efficacité de condensation observée pour le GM<sub>3</sub> et le POPC est liée à la phase liquide expansé de ces deux lipides. De même, l'efficacité de désorption du cholestérol par la β-CD est similaire quand il est en présence de GM<sub>3</sub> ou de POPC, la désorption étant plus limitée en présence de SM. Ce dernier résultat suggère que l'interaction GM<sub>3</sub>/cholestérol est relativement faible, le cholestérol n'étant pas maintenu fortement dans la monocouche.

Les images de microscopie de fluorescence des monocouches de SM/cholestérol et POPC/cholestérol sont homogènes à la résolution de notre montage, suggérant une répartition elle-même homogène des deux lipides. La formation des domaines condensés de SM (Figure 10) est donc inhibée en présence de cholestérol. Ces résultats sont en accord avec d'autres études publiées auparavant (Smaby et coll., 1996 ; Lalitha et coll., 2001, Crane et Tamm, 2004), ainsi qu'avec le modèle proposé par McConnell et Radhakrishnan en 2003. Ce modèle prédit que le phospholipide et le cholestérol forment trois phases, deux étant enrichis en l'un des lipides, la troisième ayant une composition intermédiaire. A forte pression, ces trois phases deviennent miscibles et n'en forment plus qu'une. Il semble que ce modèle s'applique

également au cas des monocouches de GM<sub>3</sub>/cholestérol, mais que la miscibilité à forte pression soit imparfaite, les images obtenues n'étant pas parfaitement homogènes (Figure 16).

Ces études montrent finalement que le GM<sub>3</sub> ne présente pas d'affinité particulière pour la SM et le cholestérol, bien que ce type de molécule soit supposé être présent dans les *rafts*. Le peu d'interaction du GM<sub>3</sub> avec la SM peut s'expliquer par la nature différente des chaînes, qui ne facilite pas la miscibilité. On peut également supposer que les têtes polaires des deux lipides n'interagissent pas particulièrement, bien qu'ils soient tous deux susceptibles de former des liaisons hydrogène intermoléculaires.

Quant à la faiblesse de l'interaction GM<sub>3</sub>-cholestérol, plusieurs facteurs peuvent l'expliquer. Comme dans le cas de la SM, on peut penser aux chaînes partiellement insaturées du GM<sub>3</sub>, et à l'absence de liaison hydrogène entre le groupe β-OH du cholestérol et la tête polaire du GM<sub>3</sub>. Un autre facteur peut aussi intervenir : le concept de forme moléculaire développé par Israelachvili (1991). Dans ce modèle, les lipides membranaires sont tous caractérisés par une forme tridimensionnelle particulière. Ainsi la SM et le cholestérol ont la forme de cônes, inversés l'un par rapport à l'autre, favorisant un arrangement régulier de ces molécules dans la membrane (Figure 2). Au contraire, le GM<sub>3</sub> rentre dans la catégorie des « cylindres », ce qui limiterait l'emboîtement régulier du GM<sub>3</sub> et du cholestérol.

Les résultats présentés ici expliquent finalement la large distribution du GM<sub>3</sub> observée dans les membranes d'adipocytes de rat (Örtgren et coll., 2004), ce glycolipide étant présent aussi bien dans les *caveolae* qu'en dehors (les *caveola* sont des invaginations de la membrane plasmique présentes dans les cellules épithéliales et les adipocytes de certains vertébrés ; elles entrent dans la catégorie des *rafts*, compte tenu de la spécificité de leur contenu lipidique). Aucune interaction particulière ne semble retenir spécifiquement ce glycolipide dans les *caveolae*. A plus long terme, il serait sans doute utile d'étudier des monocouches de composition plus complexe, comme les mélanges ternaires GM<sub>3</sub>/SM/cholestérol, afin de préciser le comportement de ce glycolipide dans les membranes, et plus généralement les interactions lipidiques présentes dans les *rafts*. Dans ce type d'études, les monocouches constituent un modèle de choix permettant de contrôler précisément les rapports molaires et la cohésion des molécules.

## **IV- Etude comparative du cholestérol et du dihydrocholestérol**

Comme nous l'avons vu précédemment, le cholestérol est sujet à l'oxydation. Il peut alors s'avérer intéressant de le remplacer par un analogue plus stable, comme le dihydrocholestérol. Une alternative, plus lourde expérimentalement, consiste, dans le cas des monocouches, à travailler sous atmosphère inerte (Benvegnu et McConnell, 1993).

Les comportements du cholestérol et du dihydrocholestérol ont été comparés en présence de phospholipides, tels que des PC ou PE, et se sont révélés très similaires (Yamauchi et coll., 1993 ; Leppimäki et coll., 2000 ; Xu et London, 2000). Cependant, à notre connaissance, il n'y a aucune étude systématique sur les interactions du dihydrocholestérol avec les sphingolipides. Cela nous a conduits à développer l'étude comparative du cholestérol et du dihydrocholestérol en interaction avec la SM ou le POPC dans des monocouches de Langmuir par mesures de pression de surface et microscopie à l'angle de Brewster (BAM). Une partie de cette étude a fait l'objet du stage de fin d'études d'Eloïse Lancelot, étudiante à l'ENSSAT (Lannion). Les principaux résultats obtenus sont résumés dans les paragraphes suivants.

### **IV-1 Comportement des monocouches de POPC/dihydrocholestérol**

Des monocouches mixtes de POPC/dihydrocholestérol à différents rapports molaires ont été comprimées à l'interface air-eau. L'analyse des aires moléculaires en fonction de la fraction molaire de stérol montre que le dihydrocholestérol induit la condensation des molécules de POPC, quels que soient le rapport molaire et la pression, de manière très similaire au cholestérol (Figure 19). De plus, le BAM montre que les monocouches de POPC/dihydrocholestérol sont homogènes, se comportant dans l'ensemble comme les monocouches de POPC/cholestérol. Ce résultat est en accord avec le fait que les interactions entre les phospholipides de type PC et le cholestérol sont peu spécifiques. Les modifications modestes de structure entre le cholestérol et le dihydrocholestérol n'induisent donc pas de changement notable dans l'interaction.

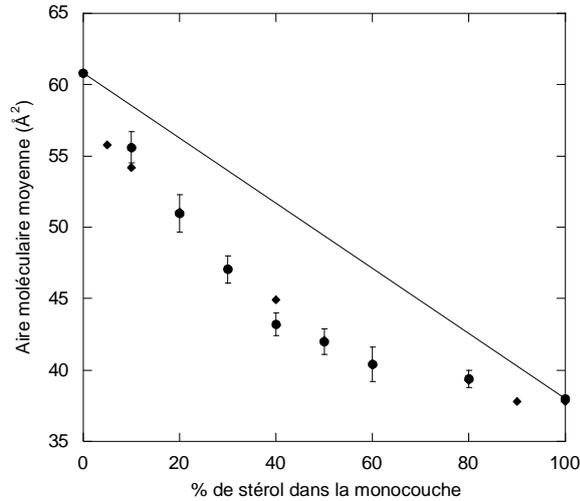


Figure 19 : aires moléculaires moyennes relevées à 30 mN/m sur les isothermes de POPC/cholestérol (◆) et POPC/dihydrocholestérol (●) en fonction du pourcentage de stérol dans la monocouche.

#### IV-2 Comportement des monocouches de SM/ dihydrocholestérol

L'analyse des aires moléculaires en fonction de la fraction molaire de stérol montre, dans ce cas, des différences importantes entre dihydrocholestérol et cholestérol. Alors que le cholestérol induit une condensation importante de la SM quels que soient la pression et le rapport molaire, le dihydrocholestérol induit une condensation surtout à faible pression, de l'ordre de 10 mN/m par exemple. Cette condensation n'est pas régulière en fonction du pourcentage de stérol : la courbe représentant l'aire moléculaire moyenne en fonction de la fraction molaire de dihydrocholestérol montre un décrochage marqué à 30 mol% de stérol, synonyme d'une forte condensation (Figure 20). Quand la monocouche est comprimée à une pression de surface plus élevée, le décrochage demeure à 30 mol%, mais l'efficacité de condensation diminue fortement, et disparaît même pour certains mélanges.

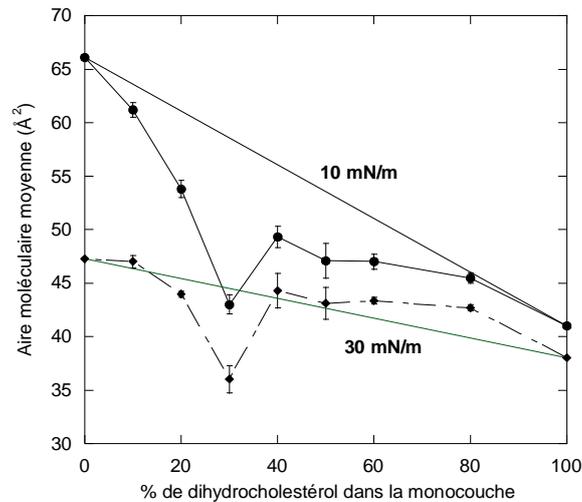


Figure 20 : aires moléculaires moyennes relevées à 10 mN/m et 30 mN/m sur les isothermes de SM/dihydrocholestérol en fonction du pourcentage de dihydrocholestérol dans la monocouche.

Les images BAM confirment la différence de comportement des deux stérols en présence de SM. En particulier nous n'observons pas la formation de la *stripe phase* décrite précédemment dans les monocouches de SM/cholestérol (Figure 17). Des domaines sont également observés dans les monocouches de SM/ dihydrocholestérol, alors que les monocouches de SM/cholestérol sont homogènes.

#### IV-3 Analyse des résultats et conclusion de cette étude

Cette étude montre que l'utilisation du dihydrocholestérol à la place du cholestérol ne doit pas être systématique. Si l'interaction lipide/stérol n'est pas spécifique (cas des phospholipides de type PC par exemple), le cholestérol peut être remplacé par son analogue, le principal avantage étant la plus grande stabilité du dihydrocholestérol vis-à-vis de l'oxydation.

Cependant, si l'interaction est plus spécifique, les modifications pourtant modestes de structure entre les deux stérols se traduisent par des comportements assez différents à l'interface. Dans le cas des monocouches de SM/stérol, on peut supposer que deux facteurs sont importants :

-sur le stérol : l'absence de double liaison dans le cycle B du dihydrocholestérol favorise la forme *trans* de la molécule, alors que le cholestérol est plutôt sous la forme *cis* (Yamauchi et coll., 1993). De plus le cholestérol est plus compressible que son analogue (Kodama et coll., 2004).

- sur la SM : des simulations Monte-Carlo réalisées sur des bicouches de SM C18 :0 ont montré que la double liaison sur la chaîne sphingosine augmente fortement la rigidité de la chaîne, quand elle est perpendiculaire à l'interface (Khelashvili et Scott, 2004). Une telle rigidification pourrait avoir lieu lors de la compression de la monocouche à l'interface air-eau.

Ces deux facteurs combinés expliqueraient alors les différences entre les deux stérols dans les monocouches de sphingomyéline, surtout à forte pression.

## **V- Interaction de la $\beta$ -CD avec des monocouches de phospholipides**

Comme nous l'avons vu, la  $\beta$ -CD est capable de désorber le cholestérol de monocouches lipidiques maintenues à pression ou aire constante. Cependant, les expériences précédentes nous ont conduits à nous intéresser à la spécificité de cette molécule vis-à-vis des autres lipides présents dans la monocouche, car on pouvait suspecter dans certains cas que la  $\beta$ -CD n'entraînait pas uniquement le cholestérol dans la phase aqueuse.

Différents lipides ont ainsi été étudiés: SM, DMPC, DPPC, POPC, DMPG, afin de mettre en évidence des effets éventuels de charge ou de chaîne (longueur et saturation). Chaque monocouche était préalablement « stabilisée » en maintenant sa pression de surface constante pendant 15 minutes, puis la  $\beta$ -CD injectée sous la monocouche lipidique dans les mêmes conditions que précédemment, la monocouche étant maintenue à pression de surface ou surface d'étalement constante. De plus, les monocouches lipidiques étant susceptibles de relaxer ou de se réorganiser au cours du temps, le comportement des monocouches a été étudié en absence de  $\beta$ -CD dans la sousphase.

### **V-1 Mesures à pression de surface constante**

Ces mesures ont été réalisées à 30 mN/m. La diminution de la surface d'étalement a été quantifiée comme précédemment en posant :  $\%_{\text{dim}} = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100$ , où  $S_i$  et  $S_f$  sont les

surfaces d'étalement avant et après 90 minutes respectivement. Le Tableau 3 indique les pourcentages de diminution pour les cinq lipides testés, en absence et présence de  $\beta$ -CD.

Lipide	% <sub>dim</sub> sans $\beta$ -CD	% <sub>dim</sub> avec $\beta$ -CD
SM	1 %	14-21 %
DMPC	6-19 %	4-11 %
DPPC	1 %	9-17%
POPC	8-11 %	28-32%
DMPG (eau)	17-31 %	24-32 %
DMPG (NaCl 10 mM)	8-12 %	8-25 %

*Tableau 3 : diminution de la surface d'étalement des monocouches lipidiques (en %) à 30 mN/m après 90 minutes, en absence et présence de  $\beta$ -CD dans la sousphase.*

Comme le montre le Tableau 3, la stabilité des monocouches en absence de  $\beta$ -CD est variable : les lipides en phase liquide condensé à 30 mN/m (DPPC et SM) sont moins sujets à la relaxation ou à la réorganisation que les lipides en phase liquide expansé (DMPC et POPC). Le DMPG est un cas particulier, son pourcentage %<sub>dim</sub> étant élevé, même s'il est en phase liquide condensé. La charge négative de sa tête polaire et la répulsion électrostatique qui en découle expliquent sans doute ce fort pourcentage. Cette hypothèse est confirmée par la stabilité accrue de la monocouche quand elle est étalée sur une solution aqueuse de NaCl 10 mM. En présence de  $\beta$ -CD, les résultats varient également selon les lipides. Elle provoque probablement la désorption de la SM, du POPC et du DPPC. Dans les autres cas, les différences de pourcentages observées avec et sans  $\beta$ -CD ne sont pas significatives.

## **V-2 Mesures à aire constante**

Dans ces expériences, on suit maintenant le déclin de pression de surface au cours du temps, en absence et en présence de  $\beta$ -CD dans la sousphase. Les cinétiques sont présentées Figure 21.

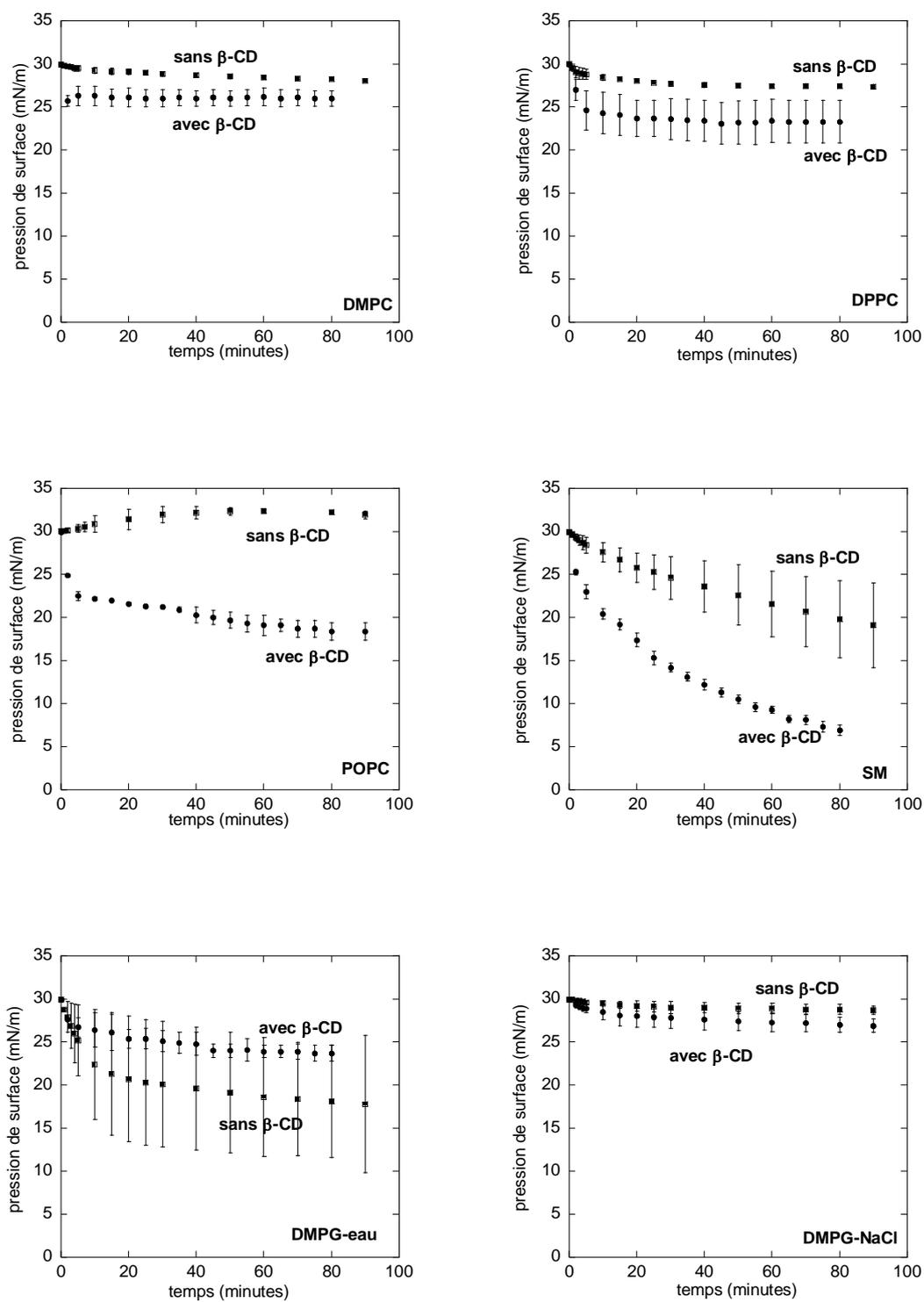


Figure 21 : cinétique de diminution de la pression de surface en absence et en présence de  $\beta$ -CD dans les expériences à aire constante.

En absence de  $\beta$ -CD, les monocouches de DMPC, DPPC et POPC semblent assez stables, la pression de surface variant peu. Par contre, on observe une diminution nette de la pression pour la SM et le DMPG étalés sur eau pure. Dans ce dernier cas, la stabilité de la monocouche est accrue si elle est étalée sur une solution de NaCl, confirmant comme précédemment l'importance des répulsions électrostatiques dans l'instabilité.

L'injection de  $\beta$ -CD a peu d'effet dans le cas du DMPC et du DPPC, suggérant qu'il n'y a pas de désorption. Par contre, elle provoque une diminution de la pression significativement plus importante avec la SM et le POPC, suggérant donc une désorption de ces lipides induite par la  $\beta$ -CD. Dans le cas du DMPG étalé sur eau pure, les variations de pression sont plus limitées en présence de  $\beta$ -CD. Ceci pourrait être dû à une adsorption de la  $\beta$ -CD sous la monocouche, probablement grâce à des interactions électrostatiques. Le NaCl a d'ailleurs le même effet que le  $\beta$ -CD en terme de stabilisation de la pression. De plus, aucune désorption n'est observée quand  $\beta$ -CD et NaCl sont présents ensemble dans la sousphase.

Enfin, la désorption la plus importante a lieu dans le cas de la SM. Cette interaction est confirmée par des images de microscopie de fluorescence réalisées sur des monocouches de SM marquées avec 1 mol% de NBD-PC. La cuve utilisée dans ce cas ne permettant pas de comprimer les lipides, le nombre de molécules étalées a été calculé pour obtenir une pression de surface estimée à 30 mN/m avant injection. Les images montrent que ces monocouches de SM sont hétérogènes et caractérisées par la présence de domaines sombres probablement en phase liquide condensé dans une phase fluide de type liquide expansé (Figure 22). Ces domaines sont cependant différents de ceux décrits précédemment (Figure 10), probablement à cause du mode différent de préparation de la monocouche. Après injection de la  $\beta$ -CD, les images deviennent plus homogènes, les domaines sombres disparaissant progressivement.

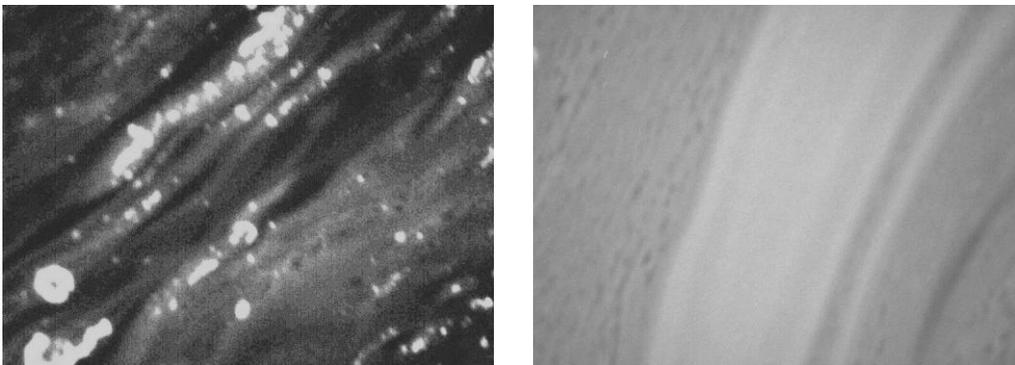


Figure 22 : images par microscopie de fluorescence de monocouches de SM marquées au NBD-PC, étalées à 30 mN/m (dimensions : 400  $\mu$ m x 600  $\mu$ m ; x10).

### V-3 Analyse des résultats et conclusion sur cette étude

La  $\beta$ -CD est un cône tronqué dont le diamètre interne est de l'ordre de 6,2 Å (Greenhall et coll., 1995). La surface correspondante est donc d'environ 30 Å<sup>2</sup>, et inférieure aux sections droites des lipides étudiés. Si un complexe d'inclusion lipide/ $\beta$ -CD est formé, seule une chaîne hydrophobe est *a priori* capable de s'insérer dans la cavité (Fauvelle et coll. 1997). Tous les lipides étudiés présentant deux chaînes hydrophobes, nous ne devrions donc pas observer de différence drastique entre les lipides, si la présence de chaînes était le seul pré requis à l'interaction.

Cependant, les expériences précédentes montrent que l'affinité de la  $\beta$ -CD est différente selon le lipide étudié : nulle ou faible dans le cas du DMPC et du DPPC, plus importante dans le cas du POPC et de la SM. Quant au DMPG, la  $\beta$ -CD s'adsorbe probablement sous la monocouche par des interactions électrostatiques, mais sans en provoquer la désorption.

Le POPC est caractérisé par la présence d'une double liaison *cis* sur une chaîne. Cette double liaison forme un coude, responsable de la phase liquide expansé de la monocouche et empêchant les interactions entre molécules adjacentes. Le désordre induit par le coude favorise sans doute la désorption du POPC. Le coude facilite aussi probablement la formation d'un complexe d'inclusion en diminuant la gêne stérique occasionné par la présence des deux chaînes sur le POPC. Quant à la SM, ses chaînes sont majoritairement palmitiques comme celles du DPPC pour lequel il y a peu d'interaction. Il faut donc chercher ailleurs l'origine de l'interaction  $\beta$ -CD/SM. La SM comportant des groupes donneur et accepteur de liaison hydrogène, on peut supposer que des liaisons hydrogène se forment entre la SM et la  $\beta$ -CD, favorisant la désorption.

En conclusion, la  $\beta$ -CD est capable d'induire la désorption de certains phospholipides dans des conditions particulières. Il est donc nécessaire de prendre en compte cet effet quand on utilise la  $\beta$ -CD dans des expériences de désorption de stérol. Des expériences complémentaires permettraient de préciser les résultats précédents : variation de pH et de force ionique pour infirmer ou confirmer la présence de liaisons hydrogène dans le cas de la SM, ou modélisation du complexe  $\beta$ -CD/POPC pour vérifier l'importance de la double liaison.

## VI- Publications

Ces études ont donné lieu à cinq publications :

**C. Heywang**, G. Mathe, D. Hess, E. Sackmann. *Interaction of GM<sub>1</sub> glycolipid in phospholipids monolayers with wheat germ agglutinin: effect of phospholipidic environment and subphase*. Chem. Phys. Lipids 113 (2001) 41-53.

**C. Grauby-Heywang**, J.-M. Turllet. *Behavior of GM<sub>3</sub> ganglioside in lipid monolayers mimicking rafts or fluid phase in membranes*. Chem. Phys. Lipids 139 (2006) 68-76.

**C. Grauby-Heywang**, J.-M. Turllet. *Study of the cholesterol-GM<sub>3</sub> ganglioside interaction by surface pressure measurements and fluorescence microscopy*. Coll. Surf. B 54 (2007) 211-216.

E. Lancelot, **C. Grauby-Heywang**. *Comparison of the interaction of dihydrocholesterol and cholesterol with sphingolipid or phospholipid Langmuir monolayers*. Coll. Surf. B 59 (2007) 81-86.

**C. Grauby-Heywang**, J.-M. Turllet. *Study of the interaction of  $\beta$ -cyclodextrin with phospholipid monolayers by surface pressure measurements and fluorescence microscopy*. J. Interf. Coll. Sci. 322 (2008) 73-78.

## VII- Références citées dans le chapitre 2

- O. Albrecht, H. Gruler, E. Sackmann, J. Coll. Interf. Sci. 79 (1981) 319.
- R.F.M. de Almeida, L.M.S. Louba, M. Priebo, Chem. Phys. Lipids (2008).  
doi: 10.1016/j.chemphyslip.2008.07.011.
- L.A. Bagatolli, Biochim. Biophys. Acta 1758 (2006) 1541.
- Y. Barenholz, T. E. Thompson, Biochim. Biophys. Acta 604 (1980) 129.
- Y. Barenholz, Prog. Lipid Res. 41 (2002) 1.
- D.J. Benvegnu, H.M. McConnell, J. Phys. Chem. 97 (1993) 6686.

- D. A. Brown, E. London, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17221.
- M.R. Bunow, B. Bunow, *Biophys. J.* 27 (1979) 325.
- C. Cametti, F. de Luca, M.A. Macri, B. Maraviglia, R. Misasi, M. Sorice, A. Pavan, T. Garofalo, G.M. Pontieri, F. Bordi, G. Zimatore, *Coll. Surf. B* 7 (1996) 39.
- J.M. Crane, L.K. Tamm, *Biophys. J.* 86 (2004) 2965.
- J. Fantini, N. Garmy, R. Mahfoud, N. Yahi, *Expert Rev. Mol. Med.* (2002) 1.
- F. Fauvelle, J.C. Debouzy, S. Crouzy, M. Göschl, Y. Chapron, *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 935.
- A. Ferraretto, M. Pitto, P. Palestini, M. Masserini, *Biochem.* 36 (1997) 9232.
- G. L. Gaines, *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, Intersciences, New York (1966).
- A. Gericke, A. Kerth, A. Blume, Bruker Application Note 51 (1999).
- C.W.M. Grant, M.W. Peters, *Biochim. Biophys. Acta* 779 (1984) 403.
- M. H. Greenhall, P. Lukes, R. Katakay, N. E. Agbor, J. P. S. Badyal, J. Yarwood, D. Parker, M. C. Petty, *Langmuir* 11 (1995) 3997.
- M.F. Hanzal-Bayer, J.F. Hancock, *FEBS Letters* 581 (2007) 2098.
- H. Heerklotz, *Biophys. J.* 83 (2002) 2693.
- M. Ivanova, R. Verger, I. Panaiotov, *Coll. Surf. B* 10 (1997) 1.
- K. Jacobson, C. Dietrich, *Trends in Cell Biology* 9 (1999) 87C.
- N. Kahya, D. Scherfeld, K. Bacia, P. Schwille, *J. Struct. Biol.* 147 (2004) 77.
- G. A. Khelashvili, H.L. Scott, *J. Chem. Phys.* 120 (2004) 9841.
- M. Kodama, O. Shibata, S. Nakamura, S. Lee, G. Sugihara, *Coll. Surf. B* 33 (2004) 211.
- H. Kojima, K. Hanada-Yoshikawa, A. Katagiri, Y. Tamai, *J. Biochem.* 103 (1988) 126.
- M. Koval, R. E. Pagano, *Biochim. Biophys. Acta* 1082 (1991) 113.
- S. Lalitha, A. Sampath Kumar, K. J. Stine, D. F. Covey, *J. Supramolec. Chem.*, 1 (2001) 53.
- S. Laurent, M. Ivanova, D. Pioch, J. Graille, R. Verger, *Chem. Phys. Lipids* 70 (1994) 35.
- P. Leppimäki, J. Mattinen, J. P. Slotte, *Eur. J. Biochem.*, 267 (2000) 6385.
- E. London, *Biochim. Biophys. Acta* 1746 (2005) 203.
- P. Luckam, J. Wood, S. Froggatt, R. Swart, *J. Coll. Interf. Sci.* 156 (1993) 164.
- B. Maggio, F.A. Cumar, R. Caputto, *Biochim. Biophys. Acta* 650 (1981) 69.
- B. Maggio, T. Ariga, J. M. Sturtevant, R. K. Yu, *Biochim. Biophys. Acta* 818 (1985) 1.
- M. Masserini, D. Ravasi, *Biochim. Biophys. Acta*, 1532 (2001)149.
- P. Mattjus, J. P. Slotte, *Chem. Phys. Lipids* 81 (1996) 69.
- H.M. McConnell, A. Rahakrishnan, *Biochim. Biophys. Acta* 1610 (2003) 159.

- T.P.W. McMullen, R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8 (2004) 459.
- E. Müller, A. Giehl, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, A. Blume, *Biophys. J.* 71 (1996) 1400.
- P.S. Niemelä, M.T. Hyvönen, I. Vattulainen, *Biochim. Biophys. Acta* (2008).  
doi : 10.1016/j.bbamem.2008.08.018
- J. Nishijo, S. Shiota, K. Mazima, Y. Inoue, H. Mizuno, J. Yoshida, *Chem. Pharm. Bull.* 48 (2000) 48.
- H. Ohvo, C. Olsio, J. P. Slotte, *Biochim. Biophys. Acta* 1349 (1997) 131.
- U. Örtengren, M. Karlsson, N. Blazic, M. Blomqvist, F.H. Nystrom, J. Gustavsson, P. Fredman, P. Stralfors, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 2028.
- D.M. Owen, M.A.A. Neil, P.M.W. French, A.I. Magee, *Seminars in Cell and Developmental Biology* 18 (2007) 591.
- M. Pilar Veiga, F. M. Goni, A. Alonso, D. Marsh, *Biochem.* 39 (2000) 9876.
- J.A. Poveda, A.M. Fernandez, J.A. Encinar, J.M. Gonzalez-Ros, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008) 1583.
- T. Rog, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, *Biochim. Biophys. Acta* (2008). doi: 10.1016/j.bbamem.2008.08.022
- P. Sengupta, B. Baird, D. Holowka, *Seminars in Cell and Developmental Biology* 18 (2007) 583.
- T. Sato, T. Serizawa, Y. Okahata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204 (1994) 551.
- S. R. Shaikh, A. C. Dumaul, L. J. Jenki, W. Stillwell, *Biochim. Biophys. Acta*, 1512 (2001) 317.
- E. Shechter, *Biochimie et Biophysique des Membranes*, 2<sup>ème</sup> édition, Masson (1997).
- K. Simons, E. Ikonen, *Nature* 387 (1997) 569.
- S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* 175 (1972) 720.
- J. P. Slotte, P. Mattjus, *Biochim. Biophys. Acta* 1254 (1995) 22.
- J.M. Smaby, M. Momsen, V.S. Kulkarni, R.E. Brown, *Biochem.* 35 (1996) 5696.
- P. K. Sripada, P. R. Maulik, A. Hamilton, G. G. Shipley, *J. Lipid Res.* 28 (1987) 710.
- M. Straume, B. Litman, *Biochim.* 26 (1987) 5121.
- T.E. Thompson, M. Alietta, R.E. Brown, *Biochim. Biophys. Acta* 817 (1985) 229.
- V. Vié, N. Van Mau, E. Lesniewska, J.P. Goudonnet, F. Heitz, C. Le Grimellec, *Langmuir* 14 (1998) 4574.
- D. Vollhardt, *Adv. Coll. Interf. Sci.* 64 (1996) 143.
- D. Vollhardt, *Mater. Sci. Eng. C* 22 (2002) 121.

- X. Xu, E. London, *Biochem.*, 39 (2000) 843.
- H. Yamauchi, Y. Takao, M. Abe, K. Ogino, *Langmuir*, 9 (1993) 300.
- F. Yoshizaki, H. Nakayama, C. Iwahara, K. Takamori, H. Ogawa, K. Iwabuchi, *Biochim. Biophys. Acta* 1780 (2008) 383.



# **ACTIVITES DE RECHERCHES**

## **CHAPITRE 3**

### **APPLICATIONS DES FILMS NOIRS A L'ETUDE DE L'ORGANISATION LIPIDIQUE ET DES INTERACTIONS PROTEINE-LIPIDE**



## I- Contexte de ces études

Avant mon arrivée au CPMOH, l'équipe « Spectroscopie aux Interfaces » dirigée à l'époque par Jean-Marie Turllet avait acquis une solide réputation dans l'étude par ellipsométrie et spectroscopie Raman confocale de films noirs. La structure d'un film noir (ou film de Newton) est similaire à celle d'une bulle de savon : deux monocouches de molécules amphiphiles emprisonnent un cœur aqueux d'épaisseur nanométrique, les chaînes hydrophobes des molécules amphiphiles étant orientées vers l'air environnant (Figure 1). Historiquement, l'équipe s'est d'abord intéressée à des films de détergent, mais le système des films noirs peut également être appliqué à l'étude de molécules à intérêt biologique. En effet, même si la structure représentée sur la Figure 1 est très éloignée de celle d'une membrane biologique, elle peut être considérée comme l'association de deux monocouches orientées tête-bêche. Cet aspect est important pour un spectroscopiste, puisque le nombre de molécules sondées est doublé.

Dans ce contexte, Florence Lhert et Florent Sandras ont donc étudié par spectroscopie Raman des films noirs constitués de molécules biologiques. La thèse de Florence Lhert portait sur la caractérisation de films noirs de phospholipides, puis sur leur interaction avec la melittine, un peptide tiré du venin d'abeille et connu pour interagir fortement avec les membranes cellulaires. Celle de Florent Sandras concernait l'étude de films noirs d'une protéine connue pour ses propriétés tensioactives particulières, la puroindoline-a et sur les modifications induites sur sa structure par l'ajout d'un lysophospholipide. Cette étude a fait l'objet d'une collaboration avec Michel Pézolet (Professeur à l'Université Laval de Québec, Canada) et Didier Marion (Directeur de Recherches au Laboratoire de Biochimie et technologies de Protéines, INRA, Nantes). Dans la suite de ce chapitre, je résumerai rapidement les informations qu'on peut obtenir par spectroscopie Raman sur de tels systèmes, puis présenterai les principaux résultats obtenus par Florence Lhert et Florent Sandras, dont j'ai co-encadré les thèses avec Daniel Blaudez et Jean-Marie Turllet.

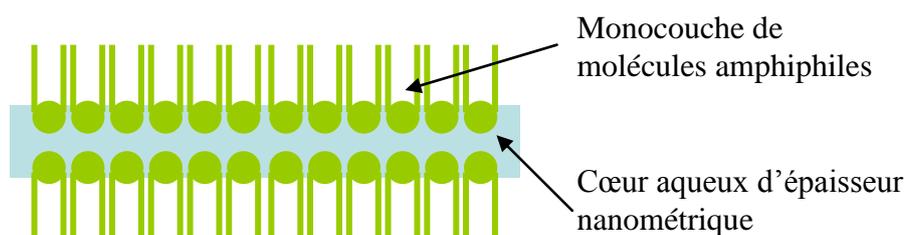


Figure 1 : structure d'un film noir.

## II- Apports de la spectroscopie Raman à l'étude de molécules biologiques

### II-1 Etude des lipides membranaires

Toutes les molécules à intérêt biologique (lipide, protéine, acide nucléique...) donnent des spectres vibrationnels en Raman ou infra-rouge, souvent sensibles à la conformation des molécules, leur structure secondaire ou leurs interactions moléculaires (Lee et Bain, 2005). Dans le cas des phospholipides, deux régions spectrales sont particulièrement intéressantes:

-la région "basses fréquences" comprise entre 1800 et 700  $\text{cm}^{-1}$  (même si des modes apparaissent à des nombres d'ondes plus faibles). Elle apporte surtout des informations sur les parties polaires des lipides ;

-la région "hautes fréquences" comprise entre 3200 et 2600  $\text{cm}^{-1}$  qui nous renseigne essentiellement sur le comportement des chaînes hydrophobes.

Les Tableaux 1 et 2 résument les principales attributions utilisées dans nos études.

Trois paramètres peuvent être pris en compte dans l'analyse des spectres de lipides, permettant de caractériser l'échantillon en terme de conformation, d'ordre ou d'interaction : la position des bandes en fréquence, leur largeur et certains rapports d'intensité. En général, on s'appuie sur la variation de ces rapports d'intensité plutôt que sur leur valeur précise pour caractériser un système. Ainsi, deux rapports d'intensité ont été utilisés dans la thèse de Florence Lhert :

-le rapport des hauteurs des bandes dues aux modes d'élongation C-H antisymétrique et symétrique des groupes méthylène  $R = \frac{I(\nu_a CH_2)}{I(\nu_s CH_2)}$ . Ce rapport caractéristique de l'ordre

latéral des molécules augmente avec l'ordre du système étudié.

-le rapport des intensités intégrées  $D_f = \frac{(I(\nu_s CC_{trans}) / I(\nu CN))_{\text{échantillon}}}{(I(\nu_s CC_{trans}) / I(\nu CN))_{\text{cristal}}}$  permet, lui, d'estimer

le degré de fluidité des chaînes. La bande due à l'élongation des liaisons C-N à 716  $\text{cm}^{-1}$  est prise comme référence car elle varie peu avec la température. Le dénominateur de ce paramètre vaut 1,90 pour des cristaux de DMPC à  $-40^\circ\text{C}$ . Plus les chaînes lipidiques sont fluides, plus le rapport  $D_f$  diminue.

Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Attributions et références
716	$\nu_s(\text{C-N})$ dans le segment O-C-C-N+, conformation <i>gauche</i> (Levin et coll., 1984)
770	$\nu_s(\text{C-N})$ dans le segment O-C-C-N+, conformation <i>trans</i> (Levin et coll., 1984)
875	$\nu(\text{C-N})$ dans le segment O-C-C-N+, conformation <i>gauche</i> (Levin et coll., 1984)
910	$\nu(\text{C-N})$ dans le segment O-C-C-N+, conformation <i>trans</i> (Levin et coll., 1984)
1065	Vibrations C-C du squelette
1088	Vibrations C-C du squelette en présence de défauts <i>gauche</i> (Snyder, 1967 ; Zerbi et coll., 1981)
1124	Vibrations C-C du squelette, chaîne tout <i>trans</i> (Gaber et Peticolas, 1977 ; Pigeon et coll., 1991)
1300	$t(\text{CH}_2)$
1441	$\delta(\text{CH}_2)$
1736	$\nu(\text{C=O})$ des groupes ester

Tableau 1 : attributions des modes « basses fréquences » des lipides ( $\nu$ : élongation ;  $\delta$ : cisaillement,  $t$ : torsion).

Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Attributions et références
2727	$\delta(\text{CH}_2) + \gamma(\text{CH}_2)$ (Capelle et coll., 2000)
2853	$\nu_s(\text{CH}_2)$ (Gaber et Peticolas, 1977 ; Spiker et Levin, 1975 ; Snyder et coll., 1978)
2885	$\nu_a(\text{CH}_2)$ (Gaber et Peticolas, 1977 ; Spiker et Levin, 1975 ; Snyder et coll., 1978)
2925	$\delta(\text{CH}_2) + \nu_s(\text{CH}_2)$
2965	$\nu_a(\text{CH}_3)$ des groupes méthyle de fin de chaîne
3042	$\nu_a(\text{CH}_3)$ des groupes méthyle des têtes polaires

Tableau 2 : attributions des modes « hautes fréquences » des lipides ( $\nu$  : élongation ;  $\delta$  : déformation angulaire ;  $\gamma$  : wagging ;  $s$  : symétrique,  $a$  : antisymétrique).

## II-2 Etude des protéines

Comme dans le cas des lipides, deux domaines de fréquence sont particulièrement utiles pour caractériser une protéine : un domaine « basses fréquences » (1800-400 cm<sup>-1</sup>) et un domaine « hautes fréquences » (3500-2000 cm<sup>-1</sup>). Le Tableau 3 résume les principales attributions utiles dans le cas de la puuroindoline-a (paragraphe IV). Parmi ces modes, certains sont attribués aux chaînes latérales des acides aminés, et peuvent donner des informations sur la conformation de l'acide aminé ou son environnement. D'autres sont dus aux vibrations du squelette peptidique. Ainsi, les modes amide dus aux vibrations complexes de la liaison peptidique sont particulièrement utiles, car leur fréquence dépend du type de structure secondaire dans laquelle la liaison peptidique est impliquée. Ces modes permettent donc d'identifier les structures secondaires présentes dans une protéine (hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , structure désordonnée).

Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Attributions
510-525-540 (triplet)	Modes d'étirement des liaisons S-S dans les ponts disulfure (informations sur la conformation du pont)
758	Mode W18 du tryptophane
850-830 (doublet)	Tyrosine (Rapport d'intensité donnant des informations sur la nature accepteur ou donneur de liaison hydrogène du groupe OH)
877	Mode W17 du tryptophane (noyau indol partiellement accessible à l'eau)
930	Etirement des liaisons C-C du squelette (hélice $\alpha$ )
1003	Etirement du noyau de la phénylalanine
1030	Déformation des liaisons C-H de la phénylalanine
1126	Mode W13 du tryptophane
1220-1320	Amide III
1340-1363	Mode W7 du tryptophane (information sur l'environnement du noyau indol)
1448	Déformation des groupes -CH <sub>2</sub> -
1552	Mode W3 du tryptophane
1580	Mode W2 du tryptophane
1605	Etirement du noyau de la phénylalanine
1620	Etirement du noyau de la tyrosine
1640-1680	Amide I
2848	Etirements symétriques des groupes -CH <sub>2</sub> -
2880	Etirements antisymétriques des groupes -CH <sub>2</sub> -
2940	Etirements antisymétriques des groupes -CH <sub>3</sub>

Tableau 3 : attributions des modes « basses et hautes fréquences » des protéines.

### **III- Thèse de F. Lhert : Etude par microspectroscopie Raman de l'interaction lipide/peptide dans des films noirs de phospholipides**

#### **III-1 Films noirs et monocouches de DMPC**

Les films noirs de DMPC sont formés au niveau d'un trou percé dans un verre fritté poreux. Ce dernier est imbibé d'une solution aqueuse de SUV (*Small Unilamellar Vesicles*). Le film se forme spontanément et draine en général naturellement. Dans le cas contraire, le montage permet d'appliquer une légère dépression pour accélérer ce drainage. Le verre fritté est enfermé dans une enceinte dont le fond est rempli d'eau afin de conserver une certaine humidité autour du film. Cette enceinte est fermée hermétiquement par l'objectif du microscope équipé d'un soufflet. Le film est ensuite étudié au moyen d'un montage de microspectroscopie Raman confocale. L'addition d'une douzaine de spectres de 10 minutes chacun est nécessaire pour obtenir un rapport signal/bruit satisfaisant.

La Figure 2 montre les spectres Raman de films noirs de DMPC, réalisés à 28°C, dans les domaines « hautes fréquences » et « basses fréquences ». Ces spectres montrent la présence des bandes décrites dans les Tableaux 1 et 2. Le DMPC est caractérisé par une température de transition (phase gel → phase fluide) de 23°C. Les spectres Raman des films noirs de DMPC ont donc été réalisés à trois températures (19,5°C, 21,5°C et 28°C) afin de vérifier si une telle transition se produit également en film noir, et d'en obtenir éventuellement la signature Raman. Comme le montre le Tableau 4 résumant les valeurs des paramètres  $R$  et  $D_f$ , une élévation de la température se traduit sur les spectres Raman par une diminution des deux paramètres.

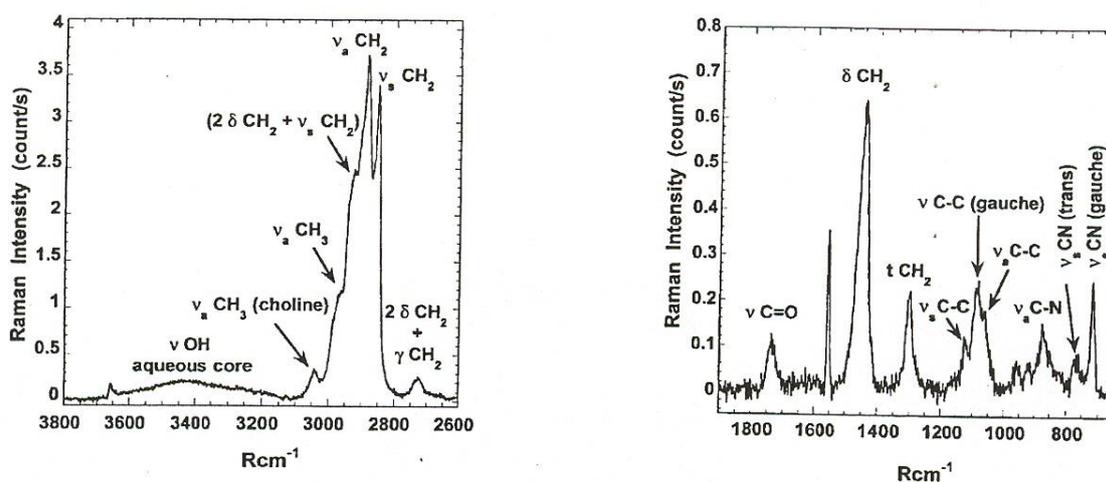


Figure 2 : spectre Raman d'un film noir de DMPC, réalisé à 28°C, dans les domaines « hautes fréquences » et « basses fréquences ».

Température et phase du DMPC	Paramètre R	Paramètre $D_f$
19,5°C (phase gel)	1,36	0,41
28°C (phase fluide)	1,06	0,33

Tableau 4 : paramètres R et  $D_f$  estimés à partir des spectres Raman de films noirs de DMPC.

L'évolution de ces paramètres et leur comparaison à d'autres systèmes (cristaux et solution de vésicules) montre que le DMPC subit une transition de phase en film noir. Comme dans le cas des autres systèmes étudiés, cette transition a lieu sur une gamme de température relativement large. On peut noter cependant que la rigidité du DMPC en phase gel est plus importante dans les films noirs, que dans les autres systèmes, comme le montrent les valeurs du paramètre R à 19,5°C : 1,36 dans les films noirs, 1,30 dans les phases *sandwich* et 1,15 dans les liposomes multilamellaires.

De plus, le spectre « hautes fréquences » montre une bande large centrée à 3400  $\text{cm}^{-1}$ . Cette bande est attribuée au cœur aqueux présent entre les deux monocouches de DMPC. Une méthode, développée dans l'équipe avant mon arrivée, permet d'estimer simplement

l'épaisseur de ce cœur aqueux, en comparant les intensités de la bande de l'eau sur les spectres de deux échantillons, le film noir et de l'eau en « volume », et en tenant compte de la résolution axiale du montage. L'épaisseur moyenne du cœur aqueux d'un film noir de DMPC est ainsi estimée à  $22 \pm 4 \text{ \AA}$ . Le cœur aqueux donne d'ailleurs une signature spectrale différente de celle de l'eau en « volume », les différences observées étant liées au confinement de l'eau dans le film noir (Berger et coll., 2003).

Enfin, nous avons comparé la qualité des spectres Raman des films noirs et des monocouches de DMPC. L'intensité des spectres de films noirs est 5 fois supérieure à celle des spectres de monocouches, au lieu du facteur 2 attendu et le rapport signal/bruit est nettement meilleur. Plusieurs facteurs contribuent à la médiocrité des spectres de monocouches. L'évaporation de la sousphase lors des 10 minutes d'acquisition entraîne une défocalisation continue du laser à l'interface. De plus, il est nécessaire de soustraire au spectre la contribution très intense de l'eau. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes focalisé dans la suite sur les films noirs aux dépens des monocouches.

### **III-2 Films noirs lipidiques : une alternative aux monocouches pour étudier les interactions peptide-lipide**

Après avoir vérifié que le DMPC avait un comportement similaire dans les films noirs et les autres systèmes moléculaires (solution de SUV ou monocouche), nous avons appliqué ce système à l'étude de l'interaction du DMPC avec la mélittine, un peptide de 26 acides aminés, extrait du venin d'abeille et connu pour ses propriétés hémolytiques. Notre choix s'est porté sur ce peptide, car il a déjà fait l'objet de nombreuses études, donnant cependant pour certaines des résultats contradictoires.

L'extrémité N-terminale de la mélittine est hydrophobe (résidus 1 à 20), tandis que l'extrémité C-terminale est, elle, fortement cationique et hydrophile. Le comportement du peptide dépend de paramètres extérieurs tels que le pH, la force ionique, la concentration... Ainsi à faible concentration et faible force ionique, la mélittine est soluble sous forme de monomères non structurés (« pelote statistique »). A forte concentration ou forte force ionique, la mélittine acquiert une structure secondaire essentiellement sous forme d'hélice  $\alpha$ , et s'agrège pour former des tétramères. Elle est capable d'interagir avec les lipides, organisés en monocouches, SUV... La nature du modèle membranaire et les conditions expérimentales semblent avoir une grande importance. Ainsi, dans les bicouches, l'hélice  $\alpha$  serait soit

parallèle au plan de la bicouche soit perpendiculaire et donc transmembranaire, selon le taux d'hydratation (Frey et Tamm, 1991). De même, la mélittine induit une isomérisation *gauche* → *trans* des chaînes du DPPC en monocouches (Flach et coll., 1996), alors qu'elle augmente le désordre conformationnel des lipides en bicouche (Akyüz et Davies, 1993).

Nous avons donc réalisé des films mixtes de DMPC/mélittine. Cette dernière a été ajoutée à la suspension de DMPC avant formation du film au niveau du verre fritté. Il est aisé de définir le rapport molaire des deux molécules en solution, mais impossible de savoir si ce rapport molaire est conservé dans le film après sa formation. Pour plus de clarté, nous avons cependant conservé le rapport molaire en solution pour caractériser chaque film, et posé  $R_m = [\text{mélittine}]/[\text{DMPC}]$ . Nous avons fait varier ce rapport de 1/1000 à 1/55.

Aucune modification du spectre du DMPC n'est observée pour des rapports  $R_m$  inférieurs ou égaux à 1/500, le nombre de molécules de peptide étant probablement trop faible pour induire un changement notable dans le comportement des lipides. Au-delà de cette valeur, on observe des modifications graduelles des spectres « hautes fréquences » et « basses fréquences » du DMPC quand la concentration en mélittine augmente (Figure 3). Ces modifications se traduisent par une augmentation des deux paramètres  $R$  et  $D_f$  définis précédemment. L'épaisseur du cœur aqueux augmente elle aussi fortement (Tableau 5). On peut noter qu'aucune bande attribuable à la mélittine n'est observée sur les spectres Raman. Ceci est probablement dû au faible nombre de molécules de peptide et au fait que les modes Raman du peptide sont moins actifs que ceux des lipides.

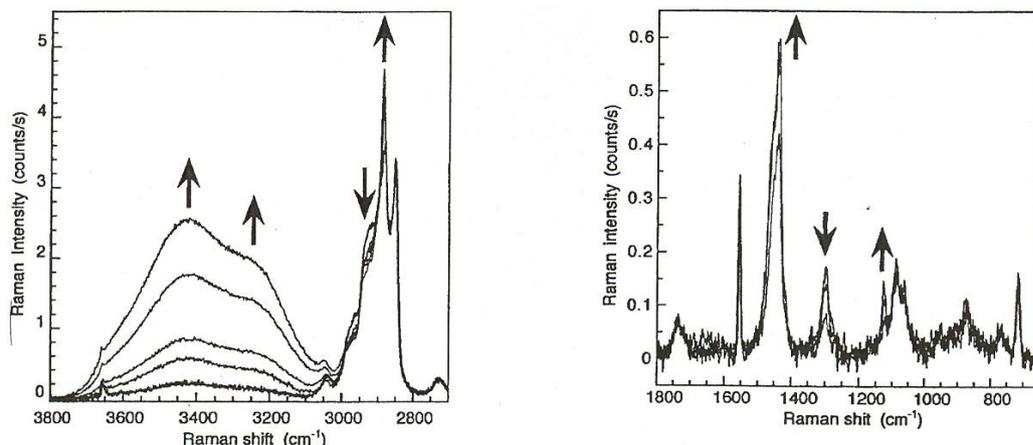


Figure 3 : spectre Raman de film noirs de DMPC/mélittine à différents rapports molaires, dans les domaines « hautes fréquences » et « basses fréquences ». Le sens des flèches indique les variations des bandes quand  $R_m$  augmente de 1/1000 à 1/55.

Rapport $R_m$	Valeur de $R$	Valeur de $D_f$	Epaisseur du cœur aqueux
1/1000	1,07	0,36	25±5 nm
1/55	1,36	0,71	400±40 nm

Tableau 5 : évolution des paramètres  $R$  et  $D_f$  et de l'épaisseur du cœur aqueux en fonction de la concentration en mélittine (seules les valeurs extrêmes sont données).

L'augmentation des paramètres  $R$  et  $D_f$  en présence de mélittine montre que le peptide augmente l'ordre latéral des chaînes de DMPC ainsi que leur ordre conformationnel en diminuant le nombre de conformères *gauche*. L'effet de la mélittine sur les films noirs est donc similaire à celui observé en présence de monocouches, et inverse de celui observé dans des systèmes lipidiques de type bicouche. Cette observation conforte l'hypothèse qu'on peut considérer les films noirs comme l'association de deux monocouches.

L'augmentation de l'épaisseur du cœur aqueux induite par la mélittine peut, elle, s'expliquer dans le cadre de la théorie DLVO (« Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek », voir Bergeron, 1999 dans le cas des films de savon). Dans cette théorie, l'épaisseur du cœur aqueux à l'équilibre est gouvernée par la balance entre les forces attractives de Van der Waals et les forces électrostatiques répulsives. La mélittine étant chargée 6+, une augmentation de sa concentration entraîne une augmentation importante de la concentration en contre-ions (ions chlorure), ce qui déplace l'épaisseur du cœur aqueux à l'équilibre vers de plus fortes valeurs.

#### **IV- Thèse de F. Sandras : Etude de l'organisation de films ultraminces de protéines par microspectroscopie Raman et autres techniques**

L'idée de départ de la thèse de Florent Sandras était, au contraire de celle de Florence Lhert, de réaliser et de caractériser par spectroscopie Raman des films noirs de protéines et d'étudier les perturbations induites dans ces films par une quantité croissante de lipide. Sa thèse comportait également une partie dédiée au choix d'une caméra ultrasensible pour notre montage, que je ne développerai pas dans ce manuscrit. Je me concentrerai plus

particulièrement sur la partie que j'ai co-encadrée concernant l'étude des films de protéine et lipide.

Notre choix s'est porté sur la puroindoline-a, une protéine extraite du grain de blé. Elle possède des propriétés moussantes remarquables, présentant un grand intérêt dans l'industrie alimentaire (Clark et coll., 1994 ; Dubreil et coll., 1997). Elle est également capable d'interagir fortement avec certains lipides, le système protéine/lipide formant une mousse extrêmement stable. C'est la raison pour laquelle nous avons également étudié son interaction avec le LPC (lysopalmitoylphosphatidylcholine), un lysolipide interagissant *in vivo* avec la puroindoline-a.

#### **IV-1 Films noirs de LPC**

A notre connaissance, peu d'études spectroscopiques ont été réalisées sur le LPC. C'est la raison pour laquelle nous avons débuté cette étude en comparant l'organisation du LPC dans divers systèmes : forme massique, solution micellaire et film noir.

Les spectres « hautes et basses fréquences » du LPC présentent dans l'ensemble les mêmes bandes que les spectres du DMPC décrits précédemment. Le Tableau 6 regroupe ces bandes ainsi que les principales informations concernant les spectres. Comme précédemment, les spectres des films noirs présentent un bon rapport signal/bruit, même si leur intensité est faible. Le spectre « hautes fréquences » est très similaire à celui du LPC sous forme massique, mais montre en plus la présence de la bande large à  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , attribuée au cœur aqueux. Cette bande permet d'estimer l'épaisseur du cœur à environ  $18 \text{ \AA}$ .

Le paramètre  $R = \frac{I(v_a CH_2)}{I(v_s CH_2)}$  a été estimé pour les trois formes du LPC. Il est de 1,46

dans le cas du LPC massique, 1,03 en solution, et 1,5 en film noir.

Les principales conclusions tirées de l'analyse de ces spectres sont les suivantes :

-le LPC sous forme massique est ordonné, comme l'attestent la valeur élevée du paramètre R (1,46) et la forte intensité des bandes attribuées aux vibrations des chaînes en conformation *trans*. La faible intensité de la bande attribuée aux vibrations des chaînes en conformation *gauche* conforte cette hypothèse. On peut noter que le paramètre R vaut également 1,46 dans le cas du DPPC, un phospholipide caractérisé par la présence de deux chaînes au lieu d'une (Gaber et Peticolas, 1977), leur longueur étant similaire à celle du LPC.

-en solution, la diminution d'intensité des bandes à 1296, 1130 et 1063  $\text{cm}^{-1}$  et l'augmentation de celle à 1090  $\text{cm}^{-1}$  montrent que le LPC est moins ordonné, sa mobilité étant plus grande. Cela est confirmé par la faible valeur du paramètre  $R$ .

-dans les films noirs, l'épaisseur du cœur aqueux est du même ordre de grandeur que dans les films de DMPC, ce qui confirme que cette épaisseur dépend de la nature des têtes polaires, mais pas de la longueur et du nombre de chaînes. Quant au LPC, il est ordonné et caractérisé par un faible taux de défaut *gauche*. Ce résultat est *a priori* surprenant, le LPC ne possédant qu'une seule chaîne. Ce résultat nous a incités à étudier des monocouches de LPC par PMIRRAS (*Polarized Modulated InfraRed Reflection Absorption Spectroscopy*), cette méthode donnant des informations sur l'orientation des molécules à l'interface air-eau. Nous avons donc réalisé, dans l'équipe de Bernard Desbat (Université Bordeaux 1), les spectres de monocouches de Gibbs de LPC à 32 mN/m. Les spectres ont montré, entre autres, la présence d'une bande positive très intense à 973  $\text{cm}^{-1}$  attribuée à la vibration  $\nu_a(\text{N}^+(\text{CH}_3))$  de la tête polaire. Cette forte intensité implique que le moment de transition de ce mode est perpendiculaire à l'interface. Compte tenu de la structure du LPC, il semble donc que la tête polaire du LPC soit elle-même perpendiculaire à l'interface. Si un tel arrangement existe dans les films noirs, il peut expliquer l'ordre élevé y régnant, les molécules étant organisées régulièrement et parallèlement les unes aux autres.

#### **IV-1 Films noirs de puuroindoline-a ; effets induits par la présence du LPC**

La puuroindoline-a est une protéine de 115 acides aminés. Sa séquence primaire comporte un domaine riche en résidus tryptophane (en position 39-45) ainsi que 10 résidus cystéine, tous impliqués dans la formation de ponts disulfure. Elle est essentiellement structurée en hélices  $\alpha$  (Le Bihan et coll., 1996).

La puuroindoline-a interagit fortement avec certains lipides, en particulier les lipides anioniques (Dubreil et coll., 1997, 2003 ; Kooijman et coll., 1998). L'environnement du domaine riche en tryptophanes devient plus hydrophobe en présence de lipides (Kooijman et coll., 1997). Cette observation suggère que l'interaction protéine/lipide modifie la conformation de la protéine. Cependant, ces modifications ne sont pas totalement élucidées. De plus, on dispose de peu d'informations concernant l'influence de la puuroindoline-a sur l'organisation des lipides environnants.

Bandes du LPC ( $\text{cm}^{-1}$ )	Informations complémentaires
3040 ( $\nu_a\text{CH}_3$ , tête polaire)	-
2985 ( $\nu_s\text{CH}_3$ , tête polaire)	-
2964 ( $\nu_a\text{CH}_3$ , chaîne)	Epaulement dans la forme solide du LPC. Déplacement à $2970 \text{ cm}^{-1}$ , forte augmentation et élargissement en solution.
2935 ( $\delta\text{CH}_2$ , $\nu_s\text{CH}_2$ )	Epaulement dans la forme solide du LPC. Forte augmentation d'intensité en solution.
2883 ( $\nu_a\text{CH}_2$ )	Bande très intense par rapport aux autres dans la forme solide du LPC. Intensité similaire à la bande à $2849 \text{ cm}^{-1}$ en solution.
2871 ( $\nu_s\text{CH}_3$ , chaîne)	Epaulement dans la forme solide du LPC.
2849 ( $\nu_s\text{CH}_2$ )	-
1737 ( $\nu\text{C}=\text{O}$ )	-
1450 ( $\delta\text{CH}_2$ )	Bande éclatée en deux composantes à $1448$ et $1465 \text{ cm}^{-1}$ dans la forme solide, $1440$ et $1460 \text{ cm}^{-1}$ en film noir. L'éclatement disparaît en solution.
1296 (t $\text{CH}_2$ )	Bande élargie et moins intense en solution par rapport à la forme solide.
1130 ( $\nu_s\text{C}-\text{C}$ , <i>all trans</i> )	Diminution d'intensité en solution par rapport à la forme solide. Bande mieux résolue dans les spectres de film noir que dans ceux de la forme massique.
1100 ( $\nu\text{C}-\text{C}$ , défaut <i>gauche</i> )	Augmentation d'intensité en solution par rapport à la forme solide.
1062 ( $\nu_a\text{C}-\text{C}$ , <i>all trans</i> )	Diminution d'intensité en solution par rapport à la forme massique. Bande moins bien résolue en film noir.
959 ( $\nu_a\text{C}-\text{N}$ )	-
874 ( $\nu_a\text{C}-\text{N}$ )	-
770 ( $\nu_s(\text{C}-\text{N})$ dans le segment $\text{O}-\text{C}-\text{C}-\text{N}^+$ , conformation <i>trans</i> )	-
716 (même attribution en conformation <i>gauche</i> )	-

Tableau 6 : bandes observées sur les spectres Raman du LPC en forme massique, solution micellaire et film noir et principales informations découlant de l'observation de ces spectres.

Etant donné que la puuroindoline-a est capable de former des mousses, les films noirs constituent donc un système d'étude intéressant. Quant à la spectroscopie Raman, elle est particulièrement bien adaptée à ce genre de thématique, en permettant d'accéder à des informations sur la conformation de la protéine et des lipides.

La première étape a consisté à préparer et étudier des films noirs de puuroindoline-a pure. Ces films se sont avérés faciles à réaliser, mais une dépression est nécessaire pour induire leur drainage. Les films noirs ainsi obtenus sont très stables. Le spectre Raman « basses fréquences » de ces films est représenté sur la Figure 4. Il montre la présence de la bande amide I à  $1664\text{ cm}^{-1}$ , flanquée de deux épaulements à  $1650$  et  $1675\text{ cm}^{-1}$ , alors que ce mode est observé à  $1657\text{ cm}^{-1}$  avec la forme massique de la protéine (Figure 4). A l'exclusion de la bande à  $1363\text{ cm}^{-1}$ , les bandes attribuées aux résidus tryptophane et présentes dans le spectre de la protéine massique ont disparu. Les intensités relatives des modes à  $510$ ,  $525$  et  $540\text{ cm}^{-1}$ , attribuées aux ponts disulfure, sont modifiées : ces trois bandes ont des intensités similaires, alors que le mode à  $510\text{ cm}^{-1}$  est prépondérant dans le spectre de la forme massique.

Dans le domaine des « hautes fréquences », on observe les vibrations des groupes  $-\text{CH}_2-$  et  $-\text{CH}_3$  présents dans la protéine. La bande large de l'eau permet d'estimer l'épaisseur du cœur aqueux à environ  $9\text{ nm}$ .

Les modifications des spectres Raman entre la forme massique et les films noirs de puuroindoline-a montrent que la protéine subit des changements de conformation importants dans les films. Les modifications de la bande amide I montrent qu'une partie de la protéine bascule en feuillets  $\beta$  ou en structure désordonnée. Les changements d'intensité relative des bandes attribuées aux ponts disulfure montrent que la conformation de ces ponts est également modifiée. Enfin, l'amplification du mode à  $1363\text{ cm}^{-1}$  indique que l'environnement des résidus tryptophane est plus hydrophobe quand la protéine forme des films. Il est probable que tous ces changements sont dus à des interactions protéine/protéine fortes, ainsi qu'à une adsorption de la puuroindoline-a aux interfaces du film, le domaine riche en tryptophane étant impliqué dans l'agrégation.

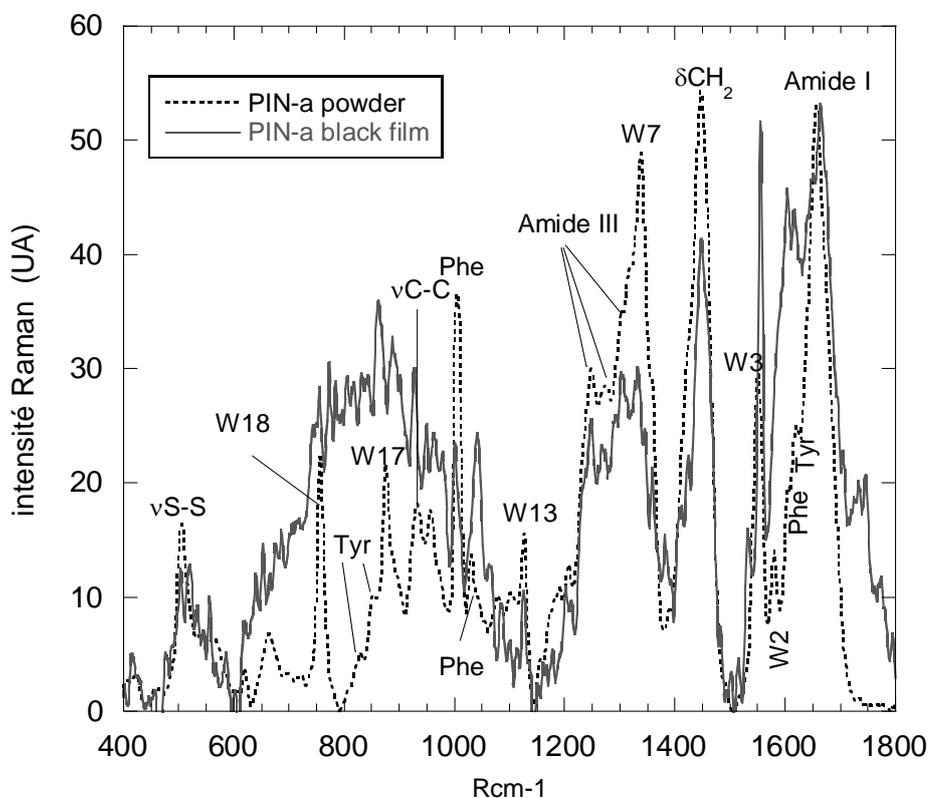


Figure 4 : spectre « basses fréquences » d'un film noir de puroindoline-a et de la forme massique.

Les films noirs mixtes puroindoline-a/LPC ont également été caractérisés par spectroscopie Raman. Leur comportement dépend du rapport molaire  $R_m = [LPC]/[puroindoline-a]$ , comme le montre d'abord leur simple observation. Ainsi, à fort taux de protéine ( $R_m = 2$  ou  $10$ ), les films contiennent de nombreux agrégats comme les films de puroindoline-a pure. Au contraire, les agrégats disparaissent en présence d'un excès de LPC.

Les spectres Raman confirment ces observations. Une augmentation du taux de LPC provoque un déplacement de la bande amide I vers les faibles nombres d'ondes, indiquant la présence d'hélices  $\alpha$  dans la protéine. L'augmentation de l'intensité du mode amide III confirme ce résultat. De même, certains modes attribués aux résidus tryptophane sont visibles, alors qu'ils ne l'étaient pas dans les films de puroindoline-a pure. Le mode à  $510 \text{ cm}^{-1}$

attribué aux ponts disulfure devient majoritaire comme dans le cas de la puoindoline-a massique. Ces modifications suggèrent que le LPC agirait comme un « diluant » empêchant la formation des agrégats de protéine. Ce lipide est également capable d'interagir avec la puoindoline-a, le domaine riche en tryptophane étant probablement impliqué dans l'interaction.

Enfin, si le LPC modifie le comportement de la protéine, l'inverse est également vrai. Nous avons calculé le paramètre  $R$  caractérisant l'ordre latéral du LPC dans les films. Ce paramètre, décroissant en présence de puoindoline-a, montre que la protéine perturbe l'organisation régulière du LPC.

## **V- Conclusion générale de ces études et perspectives**

Les films noirs constituent donc un modèle intéressant pour l'étude du comportement des lipides membranaires, bien que leur structure soit très éloignée de celle d'une membrane biologique. Ils présentent un double intérêt dans le cadre d'études spectroscopiques : le signal des lipides est doublé, puisque deux monocouches sont sondées, et il est inutile de soustraire la contribution de l'eau, le cœur aqueux étant limité à quelques dizaines d'Angströms. Cependant, il est impossible de modifier la cohésion des molécules entre elles comme dans le cas des monocouches de Langmuir.

Les films sont également très utiles pour étudier l'action d'une protéine ou d'un peptide sur l'organisation lipidique. Cependant, il est impossible de déterminer le rapport molaire des deux espèces moléculaires, étant donné que la protéine ou le peptide est ajouté à la solution lipidique avant la formation du film. Seul le rapport molaire en solution est donc connu avec précision.

Enfin, le film noir est le modèle de prédilection quand on souhaite étudier par spectroscopie les modifications de structure de protéines formant des mousses comme la puoindoline-a. J'ai d'ailleurs dernièrement réalisé des expériences préliminaires sur l'ovalbumine, une protéine extraite du blanc d'œuf, que nous a fournie Stéphane Pézenec de l'UMR « Science et technologie du lait et de l'œuf » (INRA, Rennes). Les premiers résultats montrent que la réalisation de films autosupportés d'ovalbumine est plus difficile que dans le cas de la puoindoline-a, bien que cette protéine ait de fortes propriétés tensioactives. De plus, ces films sont très hétérogènes, une partie seulement étant réellement « noire » (Figure 5).

L'ovalbumine a également tendance à gélifier sous l'effet de la chaleur dégagée par le laser. Nous avons cependant mis en évidence un changement de structure de l'ovalbumine entre la solution à pH 7 et le film, caractérisé par une augmentation du taux d'hélices  $\alpha$  aux dépens des feuillets  $\beta$ . Ces expériences préliminaires mériteraient d'être poursuivies, compte tenu de ces premiers résultats.

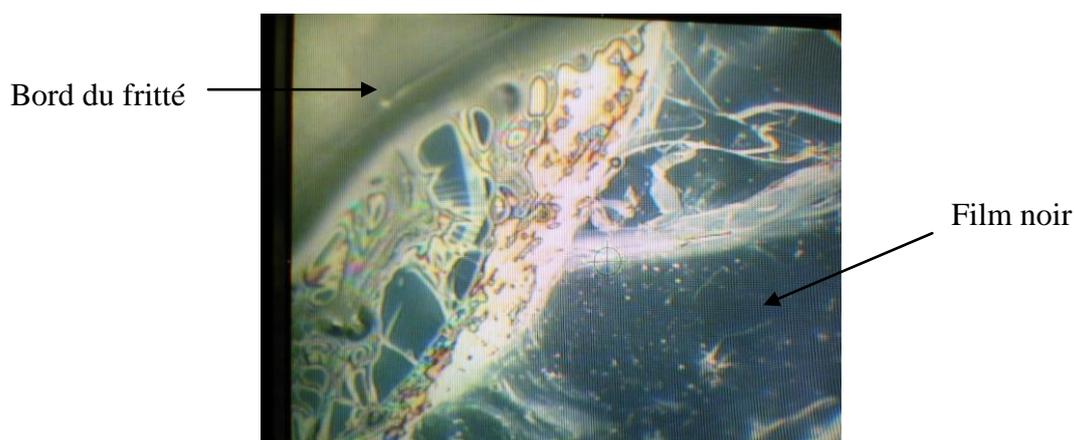


Figure 5 : photographie d'un film d'ovalbumine (dimensions de l'image : 400  $\mu\text{m}$  x 600  $\mu\text{m}$ ).

## VI- Publications

Ces études ont donné lieu à trois publications , une quatrième étant en cours de rédaction :

F. Lhert, F. Capelle, D. Blaudez, **C. Heywang**, J.-M. Turlet. *Raman spectroscopy of phospholipid black films*. J. Phys. Chem. B 104 (2000) 11704-11707.

F. Lhert, D. Blaudez, **C. Heywang**, J.-M. Turlet. *Free-standing blackfilms : an alternative to Langmuir monolayers for the study by Raman spectroscopy of peptide-phospholipid interaction in ultrathin films*. Langmuir 18 (2002) 512-518.

F. Sandras, **C. Grauby-Heywang**, J.-M. Turlet. *Spectroscopic study of lysopalmitoylphosphatidylcholine Newton black films*. J. Phys. Chem. B 109 (2005) 21167-21171.

F. Sandras, M. Pézolet, D. Marion, **C. Grauby-Heywang**. *Raman study of the puroindoline-*a*/lysopalmitoylphosphatidylcholine interaction in free standing black films*. En cours de rédaction.

## VII- Références citées dans le chapitre 3

- S. Akyüz , J.E.D. Davies, *Vibr. Spectrosc.* 4 (1993) 199.
- C. Berger, B. Desbat, H. Kellay, J.-M. Turllet, D. Blaudez, *Langmuir* 19 (2003) 1.
- V. Bergeron, *J. Phys. : Condens. Matter* 11 (1999) R215.
- F. Capelle, F. Lhert, D. Blaudez, H. Kellay, J.-M. Turllet, *Colloids Surf. A* 171 (2000) 199.
- D.C. Clark, P.J. Wilde, D. Marion, *J. Int. Brew.* 100 (1994) 23.
- L. Dubreil, J.-P. Compoint, D. Marion, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 108.
- L. Dubreil, V. Vié, S. beaufils, D. marion, A. Renault, *Biophys. J.* 85 (2003) 2650.
- C.R. Flach, F.G. Prendergast, R. Mendelsohn, *Biophys. J.* 70 (1996) 539.
- S. Frey, L.K. Tamm, *Biophys. J.* 60 (1991) 922.
- B. P. Gaber, W.L. Peticolas, *Biochim. Biophys. Acta* 465 (1977) 260.
- M. Kooijman, R. Orsel, M. Hessing, R.J. Hamer, A.C.A.P.A. Bekkers, *J. Cereal Science* 26 (1997) 145.
- M. Kooijman, R. Orsel, R.J. Hamer, A.C.A.P.A. Bekkers, *J. Cereal Science* 28 (1998) 43.
- O.P. Lamba, D. Borchman, S.K. Sinha, S. Lal, M.C. Yappert, M.F. Lou, *J. Mol. Struct.* 248 (1991) 1.
- E.E. Lawson, A.N.C. Anigbogu, A.C. Williams, B.W. Barry, H.G.M. Edwards, *Spectrochim. Acta A* 54 (1998) 543.
- T. Le Bihan, J.E. Blochet, A. Désormaux, D. Marion, M. Pézolet, *Biochem.* 35 (1996) 12712.
- C. Lee, C. Bain, *Biochim. Biophys. Acta* 1711 (2005) 59.
- X.-M. Li, B. Zhao, D.-Q. Zhao, J.-Z. Ni, Y. Wu, W.-Q. Xu, *Thin Solid Films* 284-285 (1996) 762.

**CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES :**  
**MEMBRANES ARTIFICIELLES POUR LE**  
**TRANSFERT D'ENERGIE ET LA RECONNAISSANCE**  
**MOLECULAIRE**



Les expériences décrites dans ce manuscrit montrent que les monocouches de Langmuir constituent toujours un modèle membranaire simplifié particulièrement intéressant pour plusieurs raisons, comme leur facilité de préparation, le contrôle simple des rapports molaires dans le cas de mélanges ou la possibilité de contrôler la densité moléculaire. Cependant les mesures de pression de surface ne donnent que des informations moyennées sur l'ensemble de la monocouche, et d'autres méthodes complémentaires, telles que la microscopie de fluorescence ou le BAM, sont particulièrement utiles pour observer directement la monocouche.

Ces méthodes appliquées à l'étude du ganglioside GM<sub>3</sub> ont permis de dégager certaines conclusions. En particulier ce ganglioside ne présente pas d'affinité spécifique ni pour la sphingomyéline ni pour le cholestérol, lipides pourtant présents dans les *rafts*. Nous avons proposé plusieurs raisons possibles à cette faible affinité, comme la nature des chaînes hydrophobes du GM<sub>3</sub>, ou sa forme moléculaire incompatible avec une organisation régulière en présence de cholestérol.

Les mêmes méthodes ont été également appliquées à deux études annexes qui découlaient des travaux précédents : la comparaison des interactions du cholestérol et d'un de ses analogues, le dihydrocholestérol, avec la sphingomyéline ou le POPC, et la désorption éventuelle de phospholipides par la  $\beta$ -CD. La première a montré que le remplacement du cholestérol par le dihydrocholestérol n'est pas anodin dans le cas où des interactions spécifiques existent (cas de la sphingomyéline). La seconde a permis de montrer que sous certaines conditions la  $\beta$ -CD est capable de désorber la sphingomyéline ou le POPC.

D'autres études auraient sans doute été intéressantes dans ces différents domaines, comme celle de mélanges ternaires GM<sub>3</sub>/sphingomyéline/cholestérol ou d'autres glycolipides membranaires. En ce qui concerne les expériences de désorption avec la  $\beta$ -CD, on peut penser à une étude plus systématique se focalisant par exemple sur le nombre et la localisation de doubles liaisons dans les chaînes, ou la charge des lipides (étude de la phosphatidylinositol ou de la phosphatidylsérine par exemple). J'ai malheureusement dû suspendre ces études par manque de temps, de moyens humains et suite à la restructuration du CPMOH.

En effet, comme je l'indiquais au début de ce manuscrit, l'équipe que nous formions Daniel Blaudez, Jean-Marie Turllet et moi-même, a fusionné avec une autre équipe du CPMOH pour former le groupe GPSM. Mes activités de recherche ont évolué suite à cette restructuration. J'ai suspendu l'étude de molécules à intérêt biologique pour celle

d'hémicyanines à longues chaînes destinées à former des membranes artificielles pour la reconnaissance moléculaire et le transfert d'énergie. Ce travail est mené en collaboration avec Emmanuel Abraham et Gediminas Jonusauskas, qui s'intéressaient déjà avant la création de GPSM aux propriétés photophysiques de ces chromophores. Ils étudient en particulier des processus comme le transfert de charge intramoléculaire ou le transfert d'énergie par des méthodes de fluorescence résolue en temps à l'échelle femtoseconde. Cependant leurs études antérieures concernaient des chromophores solubilisés dans des solvants organiques. Nous avons donc souhaité étudier ces molécules organisées dans des films, l'interaction lumière-matière étant fortement dépendante de l'organisation de cette dernière.

Les applications de tels films organisés sont multiples dans des domaines variés comme la chimie, la médecine et l'environnement. Ces applications sont basées sur l'utilisation de molécules combinant un fluorophore et un groupe reconnaissant sélectivement une espèce moléculaire donnée (couronne étherique reconnaissant un ion ou un polluant par exemple). La fixation de cette espèce moléculaire modifie les propriétés d'absorption et d'émission du fluorophore, ce qui permet la détection. Cette détection peut être par ailleurs amplifiée par la forte densité des fluorophores dans le film, combinée à un phénomène de transfert d'énergie. D'autres applications potentielles concernent la collecte, le transfert et la transformation de l'énergie lumineuse. Dans ce cas, il s'agit de mimer les systèmes photosynthétiques où des antennes collectrices et des centres réactionnels sont agencés précisément dans des membranes lipidiques. Les systèmes artificiels présentent l'avantage d'être plus robustes que les systèmes naturels, mais ils sont souvent assemblés sous forme de super-molécules ou super-agrégats solubilisés à faible concentration dans des solvants organiques, ce qui limite fortement leur application. Le fait d'organiser ces complexes moléculaires dans des membranes est donc un atout très important pour de futures applications. Nous avons choisi de nous focaliser dans un premier temps sur des films de type Langmuir-Blodgett (LB).

Souhaitant nous familiariser avec le comportement des hémicyanines à l'interface air-eau et en films LB, nous avons d'abord étudié une hémicyanine commerciale. Les mesures de pression de surface couplées à des mesures d'absorption, de spectroscopie de fluorescence résolue en temps et de microscopie de fluorescence ont révélé le comportement particulièrement complexe de cette molécule. L'étalement et la compression sont des étapes critiques, induisant des effets difficiles à contrôler de réorientation et d'agrégation. Nous avons bénéficié dans cette étude du soutien de Sophia Selector, professeur Russe invitée pour

six mois dans notre équipe en 2006-2007. Ces travaux se sont traduits par la parution d'un article, un second étant actuellement en cours de rédaction.

Ayant maintenant acquis une certaine expérience sur ce type de molécules, nous avons depuis entamé une collaboration avec Nathan McClenaghan, un collègue chimiste de l'ISM (Institut des Sciences Moléculaires, université Bordeaux 1), qui synthétise des dérivés d'hémicyanine comportant par exemple des couronnes étheriques susceptibles de fixer des cations métalliques. Les premières expériences sur ces nouveaux dérivés ont eu lieu au printemps 2007 et s'avèrent prometteuses. L'étude actuellement en cours a permis en particulier de mettre en évidence selon les molécules un phénomène de transfert d'énergie qui pourrait s'avérer très utile dans les applications consistant à détecter des molécules en quantités infimes, ainsi que des interactions spécifiques de la couronne avec certains cations.

Enfin, je souhaite revenir également dès que possible à des systèmes d'intérêt biologique, protéiques et/ou lipidiques.

## **Publication**

E. Abraham, **C. Grauby-Heywang**, S. Selector, G. Jonusauskas. *Characterization of hemicyanine Langmuir-Blodgett films by picosecond time-resolved fluorescence*. J. Photochem. Photobiol. B. 93 (2008) 44-52.

