



**HAL**  
open science

# Les liposomes biphényles : un nouveau modèle de biomembrane magnétique fluorescent : caractérisation par RMN des solides, microscopies optiques et électroniques et SAXS

Nicole Harmouche

► **To cite this version:**

Nicole Harmouche. Les liposomes biphényles : un nouveau modèle de biomembrane magnétique fluorescent : caractérisation par RMN des solides, microscopies optiques et électroniques et SAXS. Autre. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR15213 . tel-00959353

**HAL Id: tel-00959353**

**<https://theses.hal.science/tel-00959353>**

Submitted on 14 Mar 2014

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

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

N°d'ordre :

# THESE

Présentée à

## L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

PAR **HARMOUCHE Nicole**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

## DOCTEUR

SPECIALITE: PHYSIQUE-CHIMIE

---

**Les Liposomes Biphényles: un nouveau modèle de biomembrane magnétique fluorescent. Caractérisation par RMN des solides, microscopies optiques et électroniques et SAXS**

---

Soutenance le 16 Décembre, 2013

**Après avis de :**

M. BURKHARD Bechinger	Professeur de l'université de Strasbourg I	Rapporteur
M. WARSCHAWSKI Dror	Chargé de Recherche CNRS	Rapporteur

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

M. BECHINGER Burkhard	Professeur de l'Université de Strasbourg I	Rapporteur
M. WARSCHAWSKI Dror	Chargé de Recherche CNRS	Rapporteur
M. BOUTER Anthony	Maître de Conférences de l'Université Bordeaux I	Examineur
M. DOULIEZ Jean Paul	Directeur de Recherche INRA	Examineur
M. DUFOURC Erick Joël	Directeur de Recherche CNRS	Directeur de thèse
Mme. COURREGES Cécile	Ingénieur de Recherche CNRS	Co-directrice de thèse



*Vous êtes bon lorsque vous marchez fermement vers votre but d'un pas intrépide.*

*Pourtant, vous n'êtes pas mauvais lorsque vous y allez en boitant...*

*Même ceux qui boitent ne vont pas en arrière.*

*Vous êtes bons dans d'innombrables chemins, et vous n'êtes pas nécessairement mauvais  
lorsque vous n'êtes pas bons...*

*Gibran Khalil Gibran-Le prophète (Le Bien et le Mal)*

*A mes parents.*



## ***- Remerciements -***

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets, à Pessac (UMR-5248).

Je tiens à adresser mes plus profonds remerciements à Erick J. Dufourc qui a dirigé ce travail de thèse. Un grand merci pour avoir laissé ma curiosité de jeune chercheur s'exprimer très librement tout en me montrant le droit chemin. J'ai réellement apprécié explorer « le monde des liposomes biphényles » notamment par RMN et j'ai beaucoup appris à tes côtés. Merci de m'avoir « remonter les bretelles » de temps en temps, et de me rappeler que faire de la science c'est comme rentrer dans les ordres. Merci pour m'avoir accordé la chance de connaître Bordeaux, merci pour ta considération, tes conseils pertinents, ta patience et ton humeur de fiesta durant les congrès!

Un grand Merci à Cécile la « iron women » pour avoir encadré ma thèse, et qui malgré les congés maternité et la mutation a su concilier entre plusieurs projets à la fois. J'ai beaucoup appris à tes cotés sur tous les niveaux. Finalement, tu m'as transmis la flamme des biphényles, et j'espère l'avoir bien portée et pouvoir la repasser au prochain thésard ! (le pauvre).

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt scientifique qu'ils ont porté à ce travail; M. Bürkhard Bechinger et M. Dror Warschawski pour avoir pris le temps de juger mon manuscrit en tant que rapporteurs, à M. Jean-Paul Douliez pour avoir accepté de présider ce jury, et M. Anthony Bouter pour ses remarques très pertinentes.

Je remercie très sincèrement Anthony Bouter avec qui ce fut un immense plaisir de collaborer pour la microscopie de fluorescence. Merci pour « rendre » mes liposomes fluorescents en un temps record. Avec tes jolis clichés, mon sujet de thèse a pris un nouveau versant, tu as fait des miracles !

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Frederic Nallet et Laurence Navailles du CRPP pour les manips de diffusion des rayons X. Je n'oublierai pas nos transferts RMN-SAXS en un temps record ainsi que les dizaines d'aller retour IECB-CRPP pour une même manip car ce n'est pas évident de faire de la course avec des capillaires en verres fragiles! Fred, merci pour ta grande disponibilité ton enthousiasme si communicatif et ta patience avec les "ce n'est pas grave Nicole reprend"

Un grand merci à Axelle, notre ingénieur RMN, qui m'a été d'une aide précieuse pendant ces trois ans et qui a « supporté » avec le sourire toutes mes péripéties (ouverture multiple de rotors dans le sonde, capillaires cassés dans la sonde et j'en passe !)...

Je remercie très chaleureusement tout le reste de l'équipe RMN: Benoît O. (mon partenaire du « on ne fait qu'à nos têtes » oui je me marierais avec toi pour la nationalité en échange de ce que tu veux du Liban. Merci pour tous les compliments reboostant le moral et tes bons conseils de vins et champagne, tu m'as ruiné par contre!!), Julie G. (ma confidente et psy), Denis (qui a contribué à me déPRINCESSiser), Aurélien (pour m'avoir écouté râler sans cesse, sérieusement comment tu as pu ??), Shypra (finally, there is someone I can speak English with), Benoit F., Vanessa U. (oui je sais Nicole est un prénom ancien !!). Je

n'oublierai pas les anciens Jeannot, Vanessa, Z., Sébastien et Yoann qui ont toujours été de très bons conseils.

Je tiens à remercier plus longuement Marie-Lise, ma partenaire de crime de shopping, désolée je t'ai influencé mais je ne suis pour rien☹. Même si tu as été traître et tu as quitté notre équipe, tu es toujours la bienvenue dans notre clan RMNiste.

Romain C. (oui si tu veux je t'apprends l'arabe, mais je te préviens je ne suis pas du tout patiente, tu ne veux pas plutôt qu'on regarde Breaking Bad ? Jeremy (ciné ce soir ?).

Merci à tous les autres membres du CBMN qui ont contribué à cette unique ambiance de travail: Sarah, Etienne, Guillaume, Nico, Claude, Romain L., Marion, Olivier, Fernando, Alexandre, Sophie, Isabelle A....

Une pensée tout particulière aussi pour les IECBiens: YellaRedy, Niel et Claire un grand merci pour l'aide précieuse dans la synthèse lipidique ! Catarina (ma partenaire des vols British Airways Bordeaux → Londres, les vols sans toi ne sont plus pareils et Simon (vive la bonne bière belge! Merci pour ta joie de vivre et ta bonne humeur même quand tu es énervé), Gilmar, Cameron, Brice, Dursun, Heddy, Juliette, Carolina, Laure, XiaoQuian...

Un grand merci à l'équipe administrative: Patricia, Carine, Claude, Maïté, Emilie, et surtout Julie D., pour sa disponibilité et sa bonne humeur permanente! Merci aussi à Gérald pour sauver ma vie quand mon ordinateur portable a lâché en fin de thèse.

Je tiens enfin à adresser ma plus profonde reconnaissance à toute ma famille, qui m'a toujours soutenue et conseillée tout au long de mon parcours, mes parents, mes soeurs et mon frère, ceux qui se sont déplacés le 16 décembre, Vincent, Arnaud, Xavier, Marwan, Farid, Marc tous ceux qui m'ont accompagnée par la pensée...

Merci aussi à Gas, Nounou, Mandy, Marana, Marc, Chris, Zaza, pour leur amitié et leurs encouragements.

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

# - SOMMAIRE -

Abréviations

Avant propos

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

<b>I.1: Rappel sur les biomembranes</b> .....	p3
I.1.1: Structure et Composition des membranes biologiques	
A) Les lipides membranaires	
B) Les protéines membranaires	
I.1.2: Rôle des membranes biologiques	
<b>I.2: Les membranes modèles</b> .....	p11
I.2.1: Les dispersions aqueuses des phospholipides	
I.2.2: Le modèle membranaire «bicelles»	
I.2.3: Le modèle membranaire «liposome»	
A) Propriétés mécaniques et élastiques	
i. La compressibilité	
ii. Le cisaillement	
iii. La courbure	
a) Cholestérol et fluidité membranaire	
b) Ethanol et fluidité membranaire	
B) Propriétés magnétiques	
<b>I.3: Les protéines membranaires</b> .....	p30
I.3.1: Les biomembranes et la surfactine	
I.3.2: Les biomembranes et $Pf_1$	
<b>I.4: Plan et objectifs de la thèse</b> .....	p36

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

<b>I.1: La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)</b> .....	p41
I.1.1: Présentation générale de la RMN et chimique quantique.	
I.1.2: La RMN des Biomembranes	
I.1.3: Aspects expérimentaux	
<b>I.2: La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)</b> .....	p75
I.2.1 : La loi de Bragg	
I.2.2 Amplitude et intensités diffusés.	

a) Facteur de forme	
b) Facteur de structure	
I.2.3 : Domaines structuraux observés en fonction de la valeur du vecteur d'onde q	
I.2.4: Partie expérimentale	
<b>I.3: Microscopies optiques et électroniques</b>	p84
I.3.1 Microscopie optique.	
I.3.1.1 Microscopie optique à contraste de phase Interférentiel Différentiel	
I.3.1.2 Epifluorescence:	
I.3.1.3 Microscopie confocale de fluorescence.	
I.3.2 Microscopie électronique.	
I.3.2.1 Cryo-microscopie électronique à transmission	
I.3.2.2 Cryo-microscopie électronique de sections vitreuses	

### **Chapitre III. Synthèse des lipides biphényles et formation des modèles membranaires**

<b>I: Synthèse des lipides TBBPC, HBBPC et OBBPC</b>	p105
I.1.1 : Méthodologie des synthèses.	
I.1.1.1: Synthèse du lipide TBBPC	
I.1.1.2: Synthèse du lipide HBBPC	
I.1.1.3: Synthèse du lipide OBBPC	
I.1.2: Résultats et Discussion	
I.1.3: Partie Expérimentale	
<b>II: Formation des modèles membranaires</b>	p117
I.2.1: Préparation des liposomes de type MLVs	
I.2.2 : Préparation des échantillons mixtes : lipide/peptide	
I.2.2.1: Insertion de la Surfactine (SF)- <sup>15</sup> N dans des liposomes de DMPC et HBBPC.	
I.2.2.2: Insertion de la de Pf <sub>1</sub> - <sup>15</sup> N dans des liposomes de DMPC et HBBPC.	

### **Chapitre IV. Déformation des liposomes DMPC et TBBPC dans les champs magnétiques.**

<b>I: Introduction</b>	p123
<b>II: Matériaux et Méthodes</b>	p123
<b>II.1 : Matériaux</b>	p123
<b>II.2 : Méthodes</b>	p124

II.2.1.	Formation de liposomes	
II.2.2:	Les paramètres d'acquisition des expériences RMN	
II.2.3:	Estimation de la longueur de la chaîne aliphatique des lipides	
II.2.4:	Simulation :	
i.	Simulation des spectres RMN des solides- <sup>31</sup> P	
ii.	Simulation des spectres RMN des solides- <sup>2</sup> H.	
iii.	Simulation par Matlab des ellipsoïdes de révolution	
II.2.5:	Analyse par diffusion de la lumière (DLS)	

**III: Résultats.....p128**

III.1.1:	Effet de l'intensité du champ magnétique statique	
III.1.2:	Effet de la variation de la taille des liposomes	
III.1.3:	Effet de la température	
III.1.4:	Effet de l'élasticité membranaire	
III.1.4.1:	Caractérisation par RMN des solides- <sup>31</sup> P	
a)	Effet du cholestérol	
b)	Effet de l'éthanol	
III.1.4.2:	Caractérisation par RMN des solides <sup>2</sup> H	
a)	Spectres de RMN- <sup>2</sup> H en présence de cholestérol et d'éthanol	
b)	Paramètres d'ordre et simulations spectrales.	

**IV: Discussion.....p156**

**Chapitre V. Etude de la rémanence de la déformation en oblate des liposomes TBBPC en dehors du champ magnétique**

<b>I:</b>	<b>Introduction.....p173</b>
<b>II:</b>	<b>Matériaux et Méthodes.....p173</b>
<b>II.1 :</b>	<b>Matériaux.....p173</b>
<b>II.2 :</b>	<b>Méthodes.....p174</b>
II.2.1:	Conditions d'acquisitions pour la RMN des solides- <sup>31</sup> P
II.2.2:	Conditions d'acquisition pour la diffusion des rayons X aux petits angles
II.2.3:	Conditions d'acquisition pour la microscopie à contraste de phase interférentiel différentiel et l'épifluorescence.
II.2.4:	Conditions d'acquisition pour la microscopie électronique (Cryo-TEM)
II.2.5:	Conditions d'acquisition pour la Cryo-microscopie Electronique de Sections Vitreuses (CEMOVIS)
<b>III:</b>	<b>Résultats.....p175</b>
<b>III.1 :</b>	<b>Etude par RMN des solides-<sup>31</sup>P.....p175</b>
<b>III.2 :</b>	<b>Observation par microscopies optiques et électroniques des liposomes TBBPC..... p178</b>
III.2.1:	Microscopie optique à contraste de phase interférentiel différentiel (DIC) et épifluorescence
a)	Liposomes avant passage dans B <sub>0</sub> .

b) Liposomes après passage dans  $B_0$ .

III.2.2: Microscopie confocale de fluorescence

III.2.3: Cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-TEM) et Cryo-microscopie de sections vitreuses (CEMOVIS)

**III.3: Caractérisation de la déformation des liposomes TBBPC par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).....p185**

III.3.1: Clichés de diffusion des rayons X aux petits angles des liposomes TBBPC

**III.4: Relaxation de la déformation des liposomes TBBPC en dehors de  $B_0$  : caractérisation par SAXS.....p187**

V.4.1: Cinétique de relaxation des liposomes TBBPC

**IV: Discussion.....p191**

## **Chapitre VI. Caractérisation physico-chimique des nouveaux lipides HBBPC et OBBPC**

**I: Introduction.....p199**

**II: Matériaux et Méthodes.....p201**

**II.1 : Matériaux.....p201**

**II.2 : Méthodes.....p201**

II.2.1: Formation des liposomes

II.2.2: Conditions d'acquisition des expériences RMN

II.2.3: Détermination de la température de transition de phase ( $T_m$ ).

**III: Résultats.....p201**

**III.1 : Etude par RMN des solides- $^{31}\text{P}$  des lipides HBBPC et OBBPC en fonction de la température.....p203**

**III.2 : Déformation des liposomes HBBPC et OBBPC dans un champ magnétique..... p209**

**III.3: Caractérisation par RMN des solides  $^2\text{H}$  de la dynamique des liposomes TBBPC, HBBPC et OBBPC..... p211**

III.3.1: Profils d'ordre pour une même température d'analyse de  $40^\circ\text{C}$

III.3.2: Profils d'ordre pour une même température réduite de  $40^\circ\text{C}$

**III.4 : Analyse par RMN des solides  $^{31}\text{P}$  des liposomes mixtes TBBPC:HBBPC:OBBPC (1/3:1/3:1/3)..... p216**

**IV: Discussion.....p218**

## **Chapitre VII. Applications des liposomes Biphényles et Saturés à l'étude structurale et orientationnelle de peptides et protéines membranaires par RMN des solides $^{15}\text{N}$ et $^{31}\text{P}$**

<b>I: Introduction.....</b>	<b>p225</b>
<b>II: Matériaux et Méthodes.....</b>	<b>p225</b>
<b>II.1 : Matériaux.....</b>	<b>p225</b>
<b>II.2 : Méthodes.....</b>	<b>p226</b>
II.2.1. Formation des liposomes	
II.2.2. Conditions d'acquisition des expériences RMN	
II.2.3. Détermination de la température de transition de phase ( $T_m$ ).	
<b>III: Résultats.....</b>	<b>p228</b>
<b>III.1 : Etude du lipopeptide uniformément marqué <math>^{15}\text{N}</math>.....</b>	<b>p228</b>
<b>III.2 : Etude du peptide membranaire Pf<sub>1</sub> (protéine de l'enveloppe du bactériophage Pf<sub>1</sub>) uniformément marqué <math>^{15}\text{N}</math>.....</b>	<b>p233</b>
<b>IV: Discussion.....</b>	<b>p224</b>

## **Chapitre VIII. Conclusions et Perspectives**

Annexes

Bibliographie



## **- Abréviations -**

### **A**

Å: Angstroem ( $10^{-10}$  mètres)

### **C**

CEMOVIS: Cryo-Electron Microscopy Of Vitreous Sections

Cryo-TEM: Cryogenic Transmission Electron Microscopy

### **D**

DMPC: 1, 2-diMyristoyl-*sn*-glycero-3-PhosphatidylCholine

DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>: 1, 2-diMyristoyl-D<sub>54</sub>-*sn*-glycero-3-PhosphatidylCholine

DPPC: 1,2-diPalmitoyl-*sn*-glycero-3- PhosphatidylCholine

DPPC-<sup>2</sup>H<sub>62</sub>: 1, 2-DiPalmitoyl-D<sub>62</sub>-*sn*-glycero-3-PhosphatidylCholine

DIC : Microscopie optique à contraste de phase Interférentiel Différentiel

DLS: Dynamic Light Scattering

### **E**

ESI: Electrospray Ionisation

### **F**

FID: Free Induction Decay

### **H**

HBBPC: 1-hexanoyl-2-(4-(4-biphényle) butanoyle)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine

h: constante de planck ( $6,62 * 10^{-34}$  Joules.secondes)

### **L**

LUV : Large Unilamellar Vesicle

### **M**

MET: Microscopie Electronique à Transmission

MLVs : Multi Lamellar Vesicles

### **O**

OBBPC: 1-oleoyl-2-(4-(4-biphényle) butanoyle)-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine

OPPC: 1- oleoyl-2-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (18:1-16:0 PC)

## **P**

PC : PhosphatidylCholine

PE : PhosphatidylEthanolamine

PMs : Protéines Membranaires.

PS : PhosphatidylSerine

## **R**

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

RDC: Residual Dipolar Couplings

## **S**

SAXS: Small Angle X-Ray Scattering

SUV : Small Unilamellar Vesicle

SM : Spectrométrie de Masse.

## **T**

T : Tesla

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

TFE : TriFluoroEthanol

T<sub>m</sub> : Température de transition de phase gel-fluide.

## **U**

UV: Ultra Violet



# ***-Production Scientifique-***

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes:

## **Liste de publications :**

- Advances in Biological NMR; Frances Separovic, Ed.(2013)

**Erick J Dufourc<sup>\*a</sup>, Nicole Harmouche<sup>a</sup>, Cécile Loudet-Courrèges<sup>a</sup>, Reiko Oda<sup>a</sup>, Anna Diller<sup>c</sup>, Benoit Odaert<sup>a</sup>, Axelle Grélard<sup>a</sup>, Sébastien Buchoux<sup>b</sup>**

*<sup>a</sup>Institute of Chemistry & Biology of Membranes & Nanoobjects, UMR 5248, Université Bordeaux, CNRS, Institut Polytechnique Bordeaux, Allée Geoffroy Saint Hilaire, 33600 Pessac France*

*<sup>b</sup>Enzyme & Cell engineering (GEC), UMR 6022, Université Picardie-Jules Verne, CNRS, Amiens, France*

*<sup>c</sup>Institute of Experimental Genetics/Institute of Structural Biology Helmholtz Zentrum, München, Germany*

## **Conferences:**

SFP: Congrès de la Société Française de Physique-Bordeaux, France (Communication par affiche, Juillet 2011)

GEM: Groupe d'Etude des Membranes- Paris, France (Communication par affiche, Mars 2012)

GERLI: Groupe d'Etude et de Recherche en Lipidomique-Paris, France (Communication orale, Octobre 2012)

EBSA: European Biophysical Societies Association- Lisbon, Portugal (Communication par affiche, Juillet 2013)

Workshop Guelph-Bordeaux-Bordeaux, France (Communication orale, Septembre 2013)

Workshop Biosolids III-Paris, France (Communication orale)-Septembre 2013

## ***-Avant Propos-***

La cellule biologique est l'unité structurale de base de tous les êtres vivants, des organismes unicellulaires (bactéries, levures, champignons, plancton...) à ceux supérieurs (comme les eucaryotes...), constitués de groupes cellulaires complexes. Toutes les cellules ou organites (noyau, réticulum endoplasmique...) sont délimités par une membrane protectrice, lieu d'échange et d'activités biologiques intenses. La membrane biologique a donc un rôle majeur dans la vie d'une cellule et il est donc essentiel de comprendre son fonctionnement. Toutefois, les membranes naturelles constituent des systèmes trop complexes pour pouvoir les analyser directement par des techniques biophysiques, telles que la RMN ou la diffusion des rayons X, qui apportent de nombreuses données structurales, dynamiques et morphologiques. Le défi est donc de développer des modèles membranaires à la fois suffisamment simples pour pouvoir les étudier précisément et suffisamment représentatifs pour expliquer au mieux les mécanismes biologiques qui y ont lieu. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse. Nous nous sommes concentrés particulièrement sur le modèle de membrane lipidique de type liposome. Loudet, C. et al ont synthétisé un nouveau lipide, appelé TBBPC, qui possède une unité biphenyle sur sa chaîne  $sn_2$  entraînant une anisotropie de susceptibilité magnétique  $\Delta\chi$  positive de la molécule. Ils ont alors développé un nouveau modèle de biomembrane de type bicelle, constitué de TBBPC et DCPC, qui s'oriente de telle sorte que la normale à la bicouche soit parallèle au champ magnétique  $B_0$ . D'où l'idée de reprendre le lipide TBBPC, mais cette fois formulé seul en liposomes et d'étudier l'influence de son  $\Delta\chi$  positif sur une éventuelle déformation des vésicules TBBPC dans un champ magnétique. Notre objectif consiste à caractériser ces nouveaux liposomes dits « biphenyles » par RMN des Solides, diffusion des rayons X aux petits angles et microscopies optique et électronique, et à étudier leurs applications comme modèle membranaire pour l'analyse de biomolécules. Une comparaison avec les liposomes constitués du lipide saturé DMPC sera effectuée tout au long de ce travail.

# CHAPITRE I

## **Introduction sur les Biomembranes.**



Ce chapitre a pour objectif d'introduire les biomembranes et de situer le sujet de cette thèse dans son contexte. Après quelques généralités sur la constitution et le rôle des membranes biologiques, nous décrirons les différents modèles de membranes actuels, en mettant l'accent sur celui de type «liposome». Nous présenterons alors les nouveaux liposomes biphényles qui font l'objet principal de ce travail et leurs propriétés de déformation dans un champ magnétique. Nous rappellerons les applications biophysiques des modèles membranaires à l'étude structurale et orientationnelle de biomolécules par RMN des solides et nous introduirons les deux peptides marqués  $^{15}\text{N}$  dont on essayera d'étudier l'orientation par RMN- $^{15}\text{N}$  au sein des liposomes: la Surfactine : SF- $^{15}\text{N}$  et la protéine membranaire de l'enveloppe du bactériophage PF<sub>1</sub>.

### **I.1 : Rappel sur les biomembranes :**

#### **I.1.1: Structure et composition des membranes biologiques :**

Toutes les cellules biologiques sont constituées de membranes, que l'on qualifie de membranes plasmiques dans le cas où elles séparent le cytoplasme de l'environnement extérieur et de membranes intracellulaires lorsqu'elles délimitent des organites (mitochondries, noyau, chloroplastes, lysosomes...). Quelque soit sa composition et son emplacement, le rôle principal d'une membrane est de préserver l'intégrité du milieu qu'elle délimite (figure I.1). Les principaux constituants moléculaires de ces membranes sont les lipides et les protéines; ces deux entités s'organisent de manière à former un édifice supramoléculaire, stabilisé par des interactions non covalentes de type hydrophile/hydrophobe et électrostatique.

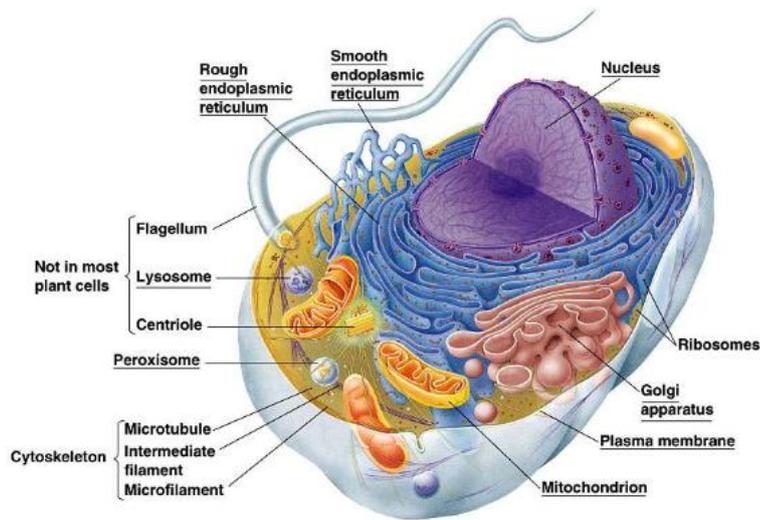
De nombreux modèles qui représentent la dynamique et la structure des membranes naturelles ont été élaborés. Un modèle proposé par Danielli et Davson (Danielli et Davson, 1935) dit de « sandwich » a été développé et celui de « mosaïque fluide » est apparu d'abord avec Borothel et Lussan puis avec Singer et Nicolson (Borothel et Lussan, 1970 ; Singer et Nicolson, 1972). Dans ce modèle, les phospholipides de la bicouche forment une matrice bidimensionnelle, très hétérogène à la fois dans l'espace et dans le temps (ce qui justifie le terme mosaïque), avec des espèces très mobiles qui peuvent diffuser dans le plan membranaire (ce qui traduit le terme «fluide»). Ce concept se base sur les propriétés amphiphiles des constituants membranaires, avec un arrangement des lipides en bicouche, dans laquelle s'insère les protéines. Au cours des ces dernières années, cette vision très simple

s'est compliquée avec la découverte de microdomaines lipidiques dans les membranes plasmiques des mammifères, encore appelés «rafts» (radeaux) (figure I.2) (Simons et Ikonen, 1997). Ces régions riches en cholestérol et sphingopholipides présentent une rigidité plus importante que le reste de la membrane ainsi qu'une composition en protéines bien spécifique (Simons et Ikonen, 1997 ; Edidin, M. 2003, McMullen, T.P.W., *et al.*, 2003 ; Dufourc, E.J. 2008, Pike, L.J., 2009). Aussenac, F. *et al.* ont étudié la rigidité des rafts par RMN des solides (Aussenac, F. *et al.*, 2003). Ils ont plus particulièrement travaillé sur des échantillons de POPC/ Sphingomyéline/ Cholestérol- $^2\text{H}_5$  (1/1/1) et SCRL: Liverphosphatidylcholine / Liverphosphatidylethanolamine / Sphingomyéline / Cerebrosides / Cholestérol- $^2\text{H}_5$  (1/1/1/1/2). Pour les deux compositions, ils ont pu identifier une phase liquide ordonnée,  $L_0$ , par des expériences de RMN du phosphore. Ces régions membranaires pourraient expliquer certains processus biologiques complexes tels que le trafic membranaire ou le transfert d'informations (Jacobson et Dietrich, 1999; London et Brown, 2000; Simon et Ikonen, 1997; Verkade et Simons, 1997).

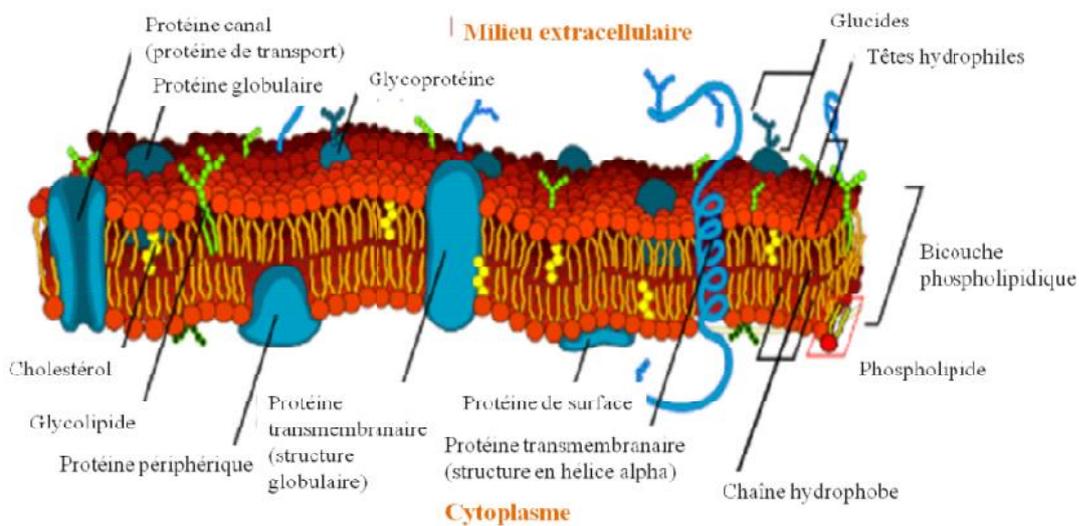
#### A) Les lipides membranaires

Ce sont des molécules amphiphiles, constituées d'une tête hydrophile (glycérophospholipides, sucres, ou groupes hydroxyles) et d'une partie hydrophobe (chaînes d'acides gras ou cycles). Ce caractère amphiphile des lipides leur confère la capacité de s'autoassembler dans l'eau de manière à minimiser les interactions entre les parties hydrophobes ; la structure en bicouche est la plus souvent adoptée avec une partie apolaire, au centre, qui fuit l'eau et une partie polaire de part et d'autre de la bicouche, qui est en contact avec l'eau (Cullis, P.R. *et al.*, 1996).

Les principales classes de lipides membranaires sont les phospholipides (par exemple les diacylphosphatidylcholines), les stéroïdes (comme le cholestérol), les sphingolipides (par exemple la sphingomyéline) et les glycolipides (comme les monoglucosyldiglycérides) (figure I.3). La proportion des différents lipides est variable suivant le type de membrane considéré ; les phospholipides sont néanmoins les composants majeurs; parmi eux, la phosphatidylcholine est l'un des plus abondants dans les membranes lipidiques (tableau I.1). Il existe une grande variabilité de lipides membranaires. La figure I.3 représente un phospholipide type dont la nature change en fonction de la tête X, de la longueur ainsi que du degré d'insaturation des deux chaînes aliphatiques.



**Figure I.1** : Représentation d'une cellule (extraite de Becker, W.M. et al., 2003). Les annotations représentent les organelles de la cellule délimités par une membrane.



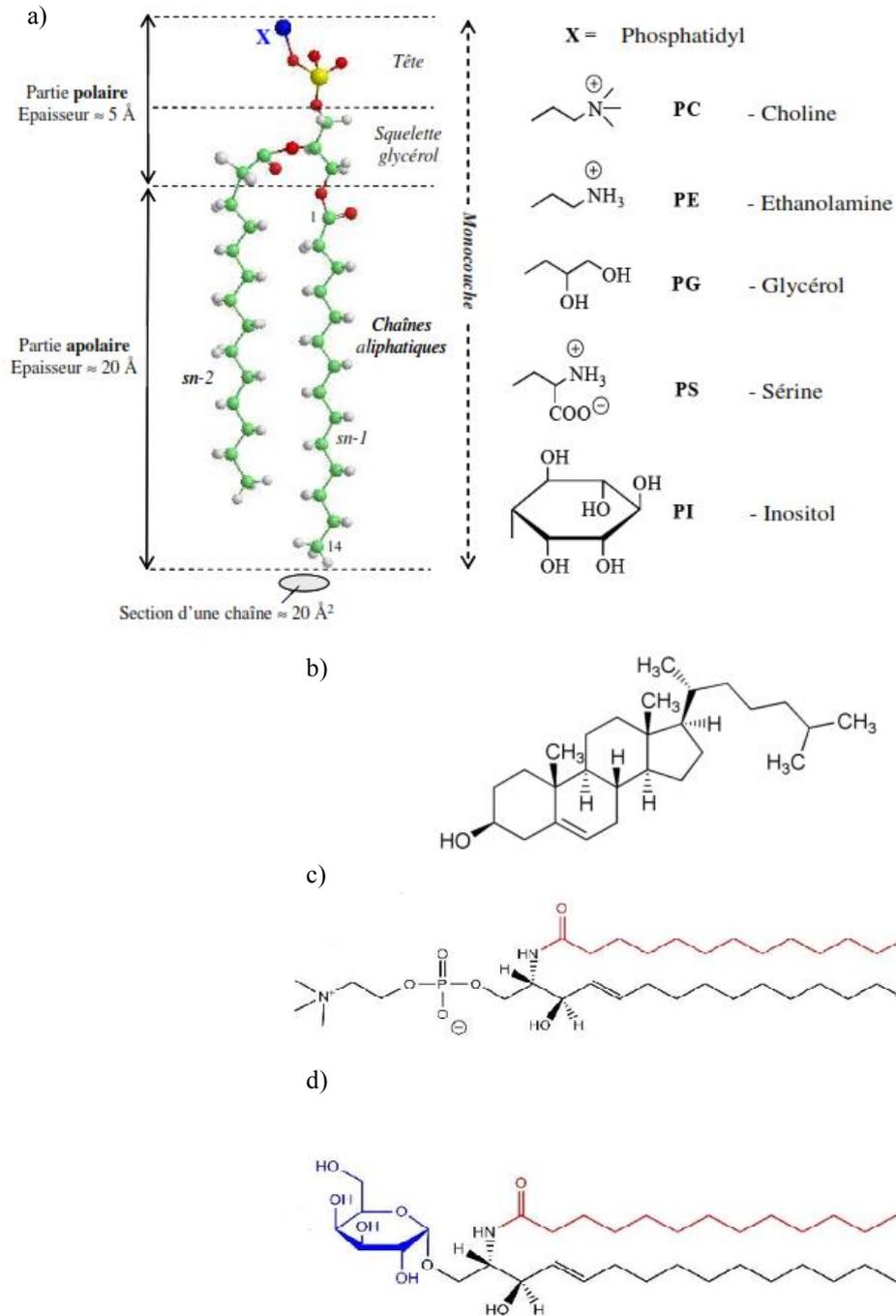
**Figure I.2** : Architecture moléculaire d'une membrane biologique (adaptée de Singer et Nicolson, 1972) selon le modèle de mosaïque fluide)). Les annotations représentent les organelles de la cellule délimités par une membrane

La grande variété des parties polaires et apolaires est à l'origine de la forte diversité des phospholipides et explique leurs différences de propriétés physiques. Chez les procaryotes, le phospholipide majoritaire est le plus souvent la phosphatidyléthanolamine (PE), alors que chez les eucaryotes, nous retrouvons en majorité la phosphatidylcholine (PC). Les stéroïdes, dérivent d'un noyau cyclopentanophénanthrémique (tétracycle saturé) avec un groupement hydroxyle en position C<sub>3</sub> pour les stérols. Le cholestérol est le stérol majoritaire chez les mammifères (figure I.3.b). Il peut en effet représenter près d'un quart de tous les lipides de la membrane (Schechter, E., 1990 ; Cevc, G., 1993). Le cholestérol est bien connu pour être, avec la sphingomyéline, à l'origine de la formation de microdomaines rigides dans les membranes.

Les sphingolipides sont des lipides complexes, dérivés de la molécule de sphingosine. Ils résultent de l'amidification d'un acide gras sur une sphingosine. Sur la fonction alcool primaire de la sphingosine peuvent s'ajouter différents substituants.

	<i>PC</i>	<i>PE+PS</i>	<i>SM</i>	<i>cholestérol</i>
<i>Erythrocyte</i>	21	29	21	26
<i>Myéline</i>	16	37	13	34
<i>E.coli</i>	0	85	0	0
<i>Réticulum endoplasmique</i>	54	26	5	7
<i>Golgi</i>	45	20	13	13
<i>Mitochondrie (membrane interne)</i>	45	45	2	7
<i>Mitochondrie (membrane externe)</i>	34	46	2	11

**Tableau I.1** : Composition lipidique de différentes membranes (en % de la quantité de lipides). PE, PS, PC, PI, PG : phosphatidyl éthanolamine, sérine, choline, inositol, glycérol  
SM : Sphingomyéline (Vance, D.E., 2002).



**Figure I.3** : Structures des différentes classes de lipides membranaires : les phospholipides (a.), le cholestérol (b. stérol), la sphingomyéline (c. sphingolipide) et le galactocérobroside (d. glycolipide). Pour les phospholipides, différents substituants peuvent venir se lier au groupement phosphate: la choline (PC), l'éthanolamine (PE), le glycérol (PG), l'inositol (PI) et la sérine (PS)

En fonction de la nature du substituant, on distingue notamment les céramides, les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides. Si les sphingolipides ont une structure assez proche de celle des phosphatidylcholine puisque la tête polaire est aussi un groupement choline lié à un groupement phosphate, le squelette sur lequel les acides gras viennent se greffer est ici la sphingosine et non le glycérol. De la même façon, l'acide gras variable se lie par une liaison amide à la sphingosine (Figure I-3 c). L'absence de liaison ester chez les sphingolipides les rend moins hydrolysables en milieu aqueux. La sphingomyéline représente un tiers des lipides constitutifs de la myéline, gaine protectrice des nerfs. Cette classe de lipides est très importante chez les vertébrés et absente chez les bactéries.

Enfin, la dernière classe de lipides est celle des glycolipides qui regroupent tous les lipides dont la tête polaire est un sucre (Figure I-3d). On retrouve les galactolipides qui dérivent des glycérolipides (squelette glycérol) et les cérébrosides qui dérivent des sphingolipides (squelette sphingosine). Les cérébrosides, en particulier, les galactocérébrosides sont très présents dans le système nerveux des mammifères.

La répartition des lipides peut être très différente d'une membrane à une autre au sein d'une même cellule (Tableau I-1), ainsi qu'au sein même de celle-ci du fait d'une distribution asymétrique des lipides entre les feuillet externes et internes de la bicouche (Schechter, 1990).

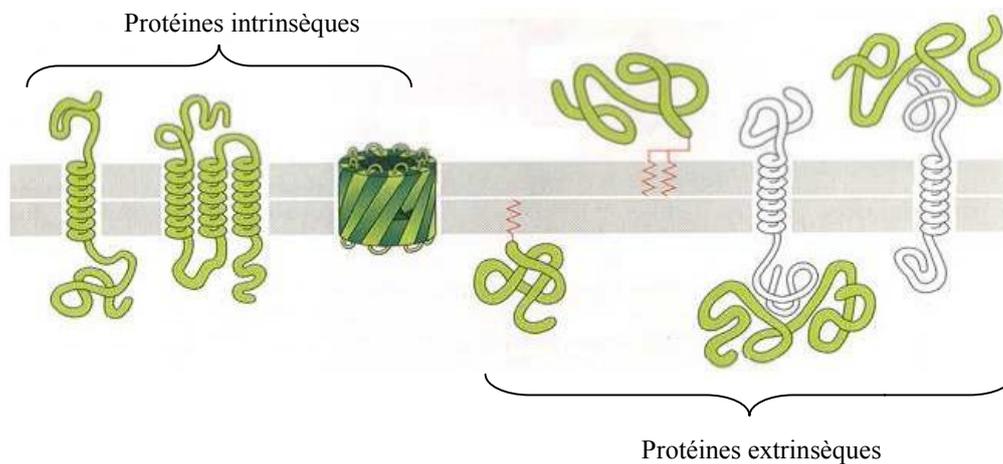
## **B) Les protéines membranaires**

Par définition, une protéine est un polymère constitué d'acides aminés naturels reliés entre eux par des liaisons amides. L'enchaînement de ces résidus forme une séquence bien définie de la protéine qui correspond à sa structure primaire. Certains tronçons de cette séquence peuvent s'agencer et se replier en établissant des liaisons hydrogène intramoléculaires entre les parties CO et NH des fonctions amides avant de former la structure secondaire de la protéine (hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ ). La structure tertiaire de la protéine est établie par l'agencement des structures secondaires et des zones amorphes dans l'espace pour lui donner une forme géométrique particulière. Les interactions entre deux ou plusieurs chaînes de structures tertiaires de protéines sont responsables de la formation de la structure quaternaire.

La proportion des protéines par rapport aux lipides est très variable selon le type de membranes. D'une manière générale, plus le ratio protéines/lipides est élevé, plus la membrane considérée aura une activité biologique importante. Selon la nature de leur

structure et leur mode d'interaction avec la membrane les protéines membranaires sont généralement classées en deux catégories: les protéines extrinsèques et les protéines intrinsèques. Les protéines extrinsèques (ou périphériques) sont associées à la membrane par des interactions électrostatiques avec les parties polaires des lipides ou avec la partie polaire d'autres protéines ancrées dans la membrane. Elles sont donc à caractère hydrosoluble en contact avec le milieu aqueux. Les protéines intrinsèques (ou intégrales ou encore transmembranaires) sont associées à la membrane par des interactions hydrophobes avec les parties apolaires des lipides. Ces protéines peuvent être totalement intégrées dans la membrane ou partiellement (figure I.4)

La grande diversité des protéines et des lipides membranaires, rend très difficile la description de la composition d'une membrane typique. En effet, le type de cellule ainsi que l'emplacement de la membrane ont une grande influence, non seulement sur les protéines et les lipides présents, mais aussi sur leurs proportions. Ainsi, les protéines représentent 25% de la masse de la membrane plasmique d'une fibre myélinisée, contre 75% dans une membrane de mitochondrie. A ceci s'ajoute une certaine asymétrie entre les deux feuillet lipidiques de la membrane, qui résulte des différences de compositions lipidiques et protéiques entre le feuillet externe et le feuillet interne. Cette asymétrie de composition s'associe à une asymétrie de fonction.



**Figure 1-4:** Différents types de protéines membranaires selon leurs structures et associations avec la membrane.

### **I.1.2: Rôle des membranes biologiques.**

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

Il existe plusieurs mécanismes de transport à travers les membranes. Le premier est tout simplement la diffusion passive des molécules à travers la bicouche lipidique. Ce transport qui s'effectue selon un gradient de concentration est assez limité. La réalisation de ce type de transport est limitée à la taille de la molécule (assez petite) et à son degré d'hydrophobicité (fortement hydrophobe pour pouvoir diffuser à travers la bicouche lipidique). La diffusion facilitée, qui se fait également selon un gradient de concentration, concerne les molécules comme les ions et la plupart des molécules polaires qui ne diffusent pas à travers la bicouche lipidique, un certain nombre d'entre elles, comme le glucose, est capable de traverser les membranes grâce à des protéines intrinsèques appelées transporteurs. Ces transporteurs se composent de plusieurs régions transmembranaires qui ménagent un tunnel au sein de la bicouche lipidique, tunnel par où les molécules polaires ou chargées franchissent la membrane. Le transfert d'information est transmis par des récepteurs membranaires qui fixent les messagers extracellulaires, ce qui induit un signal chimique à l'intérieur de la cellule. Lorsque le gradient de concentration rend impossible le transport actif, on parle de transport actif ou la transformation d'énergie pour franchir la bicouche lipidique est réalisée par des complexes protéiques, les ATP synthases, qui sont localisés dans la membrane interne des mitochondries. Il est nécessaire d'hydrolyser une molécule d'ATP afin de libérer l'énergie nécessaire au transport d'un  $H^+$  contre son gradient de concentration. Les membranes biologiques possèdent leurs propres récepteurs et transporteurs ce qui leur donne leurs spécificités biologiques.

Les processus biologiques que nous venons d'énoncer ne sont pas tous parfaitement décrits. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, des modèles de membranes ont été développés. Cette approche biophysique réduit la complexité du système de départ en limitant la membrane biologique à seulement quelques constituants. Ces membranes modèles biomimétiques sont plus simples à paramétrer et sont généralement constituées d'un seul type de lipides, auxquels on ajoute ensuite un autre composant membranaire (protéine, peptide, stérol...), une toxine, ou une substance antibiotique.

## I.2 : Les membranes modèles.

Les différents modèles membranaires développés ont comme intérêt commun d'être à la fois suffisamment simple pour pouvoir les étudier directement par des techniques biophysiques classiques (RMN, diffusion des rayons X...) et suffisamment représentatifs pour expliquer au mieux les mécanismes membranaires naturels.

### I.2.1 : les dispersions aqueuses des phospholipides

#### A) Le polymorphisme lipidique.

Les lipides sont des molécules amphiphiles qui ont la capacité de s'auto-associer (McIntoch et Magid, 1993). Deux paramètres conduisent à l'autoassociation des lipides selon une organisation déterminée: le caractère amphiphile et la géométrie des molécules. Les lipides possèdent une partie polaire et une partie apolaire spatialement distinctes. Or les composés polaires sont solubles dans les solvants polaires et les composés apolaires dans les solvants apolaires. Dans l'eau le rejet des parties hydrophobes du solvant aqueux induit l'auto association des lipides (minimiser les interactions entre leurs chaînes hydrocarbonées et l'eau). En effet, en dessus d'une concentration critique (CMC) les molécules s'agencent de façon à ce que la partie polaire soit en contact avec le milieu polaire et protège les parties hydrophobes qui s'associent pour former un intérieur apolaire. C'est donc l'immiscibilité d'une des parties de la molécule dans le solvant qui est la cause de l'agrégation des lipides mais différents types d'organisation peuvent être constitués selon la géométrie des molécules associées. Plusieurs structures assimilables à des phases cristal-liquides (phase mésomorphe) peuvent satisfaire ces deux conditions. La question est alors de savoir quelles sont les caractéristiques lipidiques qui influencent la nature de cet agencement. Israelaschvili et al ont proposé un modèle d'agrégation lipidique très simple mais qui donne une vue synthétique du polymorphisme lipidique. Cette analyse, basée sur l'importance relative des parties hydrophobes et hydrophiles des lipides, va conditionner les caractéristiques d'organisation lors de l'association lipidique. La forme de ces assemblages est liée aux tailles relatives des parties hydrophobes et hydrophiles des lipides (Cullis, *et al.*, 1979). Israelaschvili a ainsi défini le paramètre de compactage critique  $p$  déterminant la forme des objets (Israelaschvili, *et al.*, 1980) :

$$p = \frac{v}{a_0} l_c, \text{ où } v \text{ est le volume de la partie hydrophobe, } a_0 \text{ la surface optimale de}$$

l'interface entre l'eau et la partie hydrophobe et  $l_c$  définit la longueur maximale effective des chaînes hydrophobes. En fonction de la valeur de  $p$ , différents agrégats seront obtenus (Figure I-6). Il est important de préciser que le paramètre de compactage critique est plus complexe qu'il n'y paraît, et tient compte également de facteurs tels que la charge de la tête polaire ainsi que des liaisons hydrogène éventuellement présentes (McIntosh and Magid, 1993).

Pour  $p < 1/3$ , la tête hydrophile est plus importante que la partie hydrophobe. Le lipide a donc une forme conique (inversée) dont le sommet se trouve au niveau de la partie hydrophobe (Figure I-5a). Afin de minimiser les contacts hydrophobes avec l'eau, cette forme de lipides conduit à la formation de micelles sphériques ou de micelles cylindriques. Cette phase concerne en général les lipides à chaînes courtes, les lysophospholipides (ne contenant qu'une seule chaîne aliphatique) et les tensioactifs purs. Cette phase micellaire n'est retrouvée que très rarement dans les milieux biologiques (Cullis *et al.*, 1996). Pour  $p$  compris entre  $1/3$  et  $1/2$ , le lipide est cette fois-ci schématisé comme un cône inversé tronqué (Figure I-5b). Ceci induit la formation d'une phase hexagonale constituée par l'assemblage de micelles cylindriques. Pour  $p$  compris entre  $1/2$  et  $1$ , le cône représentant le lipide est beaucoup moins évasé (quasi-cylindrique) (Figure I-5c), ce qui conduit à la formation de phases lamellaires. Dans ce cas, les lipides forment spontanément des vésicules multilamellaires («Multilamellar Large Vesicles»-MLV). La plupart des lipides des membranes naturelles forment ce genre de phase : c'est le cas notamment de la PC, de la PS ou encore du PI. Pour  $p$  environ égal à  $1$ , le lipide représente alors un cylindre (Figure I-5d). Ils forment alors un empilement de bicouches lipidiques espacées par des couches aqueuses (rayon de courbure de la membrane infini). Pour  $p > 1$ , la partie hydrophobe devient plus importante que la partie hydrophile. Le lipide peut donc être schématisé par un cône (sommet du cône au niveau de la partie hydrophile).

Dans ce cas-là, les lipides forment des micelles inversées ou encore une phase hexagonale inversée. La PE peut adopter ce genre de phase.

Il est donc possible de passer d'une phase à l'autre en:

- modifiant la surface de la tête polaire ( $a_0$ ) : en l'hydratant ou en modifiant le pH du milieu par exemple.
- accroissant la température: cela conduit à une augmentation des isomérisations gauche/trans des chaînes hydrocarbonées de la molécule, diminuant ainsi  $l_c$ .

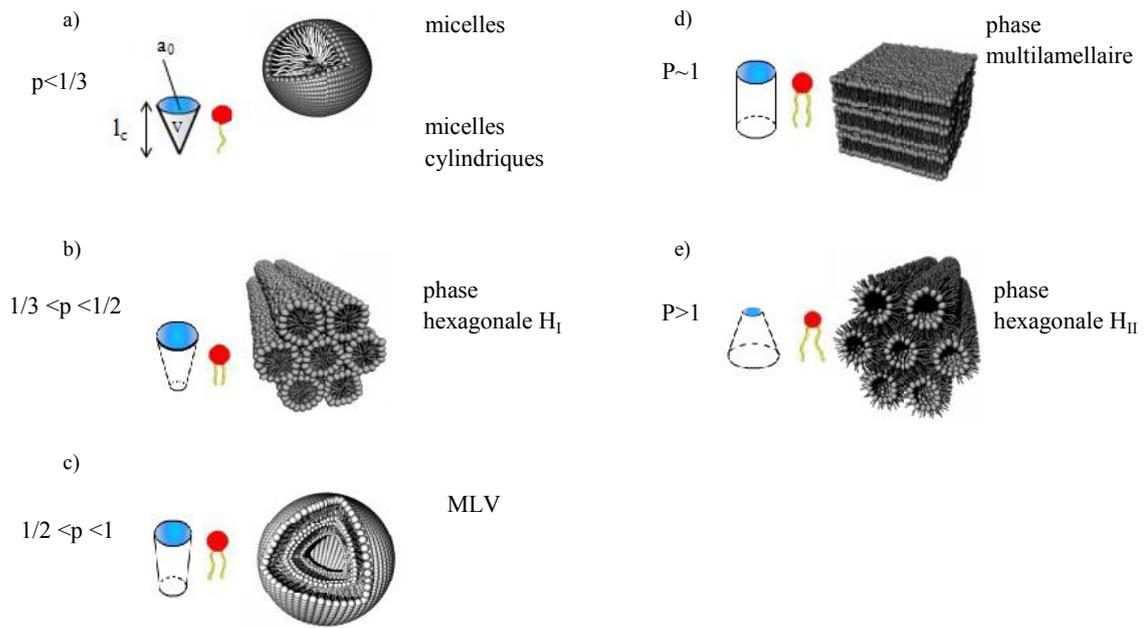


Figure 1.5 : Organisation des lipides en fonction du paramètre de compactage  $p$ .

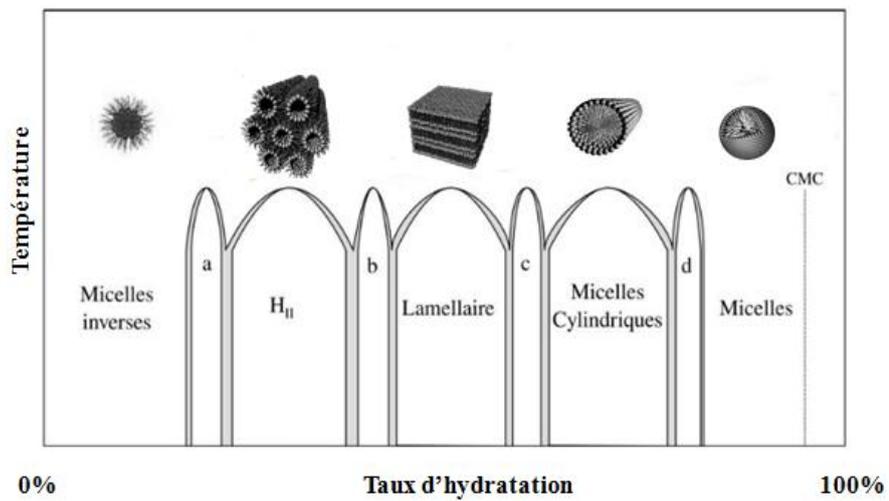


Figure 1.6 : Diagramme de phase hypothétique d'un phospholipide, les phases a, b, c et d sont des phases intermédiaires.

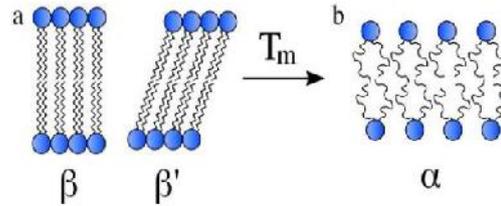
- en rajoutant au système une molécule dont la valeur du paramètre de forme est différente. Le paramètre de forme à considérer est alors la moyenne des paramètres de forme des différents constituants (Carnie *et al.*, 1979 ; Sagar, G.H. *et al.*, 2007).

Dans le cas de mélanges de lipides plus ou moins miscibles entre eux, un mélange de ces différentes phases peut être observé (Israelachvili *et al.*, 1980). De plus, bien que la «forme» du lipide soit un paramètre déterminant, la concentration en lipides présente également une influence importante sur la phase observée (figure I.6).

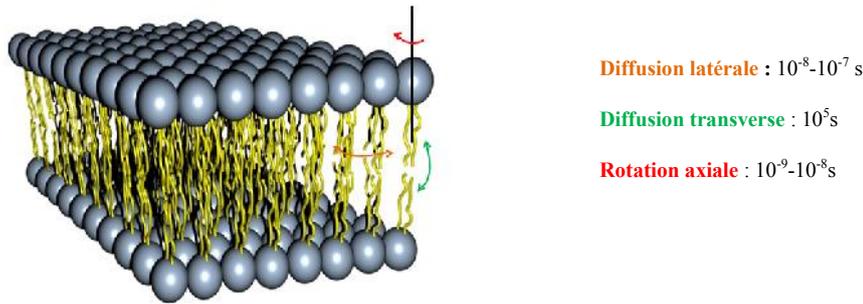
Nous nous contenterons dans ce qui suit de décrire le thermotropisme et lyotropisme dans le cas bien connu des PC.

### **B) Le thermotropisme des phases lipidiques lamellaires**

La phase lamellaire est une phase cristal-liquide de type smectique. Elle est constituée d'un empilement stratifié de bicouches lipidiques séparées par un feuillet d'eau. En augmentant l'agitation thermique, la température a une influence importante sur un système lipidique. Les chaînes aliphatiques des lipides ne se structurent pas de la même façon à basse et à haute température. Lorsqu'on augmente la température d'un système lipidique en phase lamellaire, on observe le passage d'une phase ordonnée ou phase « gel », notée  $L_{\beta}$  ou  $L_{\beta'}$  (le prime «'» signifie que les chaînes lipidiques sont inclinées par rapport à la normale de la bicouche), caractérisée par une conformation tout *trans* des lipides, à une phase «fluide», notée  $L_{\alpha}$ , plus désordonnée comprenant des défauts « gauches » (Figure I-7). Dans le cas de la phase «gel», les chaînes sont alignées entre elles et étendues au maximum (Figure I-7a). Cela se traduit alors par une faible mobilité des lipides, ce qui confère un comportement statique à la membrane. En phase «fluide», les chaînes lipidiques deviennent plus mobiles et sont moins étendues (Figure I-7b). Les lipides acquièrent alors une mobilité accrue au sein de la membrane.



**Figure I.7 :** Différentes conformations des chaînes carbonées dans une bicouche



**Figure I.8 :** Différents mouvements effectués par les lipides.

Lipides		$T_m$ (°C)
12 :0/12 :0	PC	-1
14 :0/14 :0	PC	23
16 :0/16 :0	PC	41
16 :0/18 :1c $\Delta$	PC	-36
18 :0/18 :0	PC	54
18 :1c $\Delta^9$ /18 :1c $\Delta^9$	PC	-20
16 :0/16 :0	PE	63
16 :0/16 :0	PS	55
16 :0/16 :0	PA	67

**Tableau I.2 :** Variation de la température de phase gel/fluide en fonction de la longueur de chaînes, du nombre d'insaturations et de la tête polaire du lipide.  $\Delta$  indique la position de la double liaison et  $c$  signifie cis. PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine; PS, phosphatidylsérine; PG, phosphatidylglycérol ; PA, acide phosphatitique (Cevc, G., 1993 ; Cullis, 1996).

La température de transition entre phase «gel» et phase «fluide» est généralement notée  $T_m$  et dépend de nombreux facteurs tels que, la longueur des chaînes aliphatiques, leur degré d'insaturation, le type de tête polaire (Tableau I-2), mais aussi de la solution dans laquelle les lipides sont dispersés. Par exemple, plus les chaînes d'acides gras sont longues, plus la température de transition de phase augmente. Plus le degré d'insaturation est élevé, plus  $T_m$  diminue. En effet, la présence de doubles liaisons crée des défauts de compactages de chaînes, déstabilisant ainsi la phase «gel». Certains composés présentent également une influence sur la transition de phase gel- fluide. C'est le cas, par exemple, du cholestérol. En effet, pour des concentrations supérieures à 20% molaire, le cholestérol abolit la transition entre les phases  $L_\beta/L_\beta'$  et  $L_\alpha$ . Ceci est expliqué par une augmentation de l'ordre des lipides induite par le cholestérol lorsque les lipides se trouvent en phase « fluide » et par une diminution de compactage lorsque les lipides sont en phase « gel ». On se trouve alors en présence d'une phase « liquide ordonné » ( $l_o$ ) qui semble jouer un rôle dans la formation des radeaux lipidiques. Dans cette phase, les lipides continuent à diffuser latéralement au plan de la membrane, mais les chaînes lipidiques sont fortement ordonnées (Vist et Davis, 1990 ; Aussenac *et al.*, 2003; Beck *et al.*, 2007).

Au sein d'une chaîne hydrocarbonée, il existe une libre rotation autour des liaisons C-C. La conformation potentiellement la plus stable est la conformation trans (t). Dans une situation où les conformations autour de toutes les liaisons sont de type trans, la chaîne est étirée au maximum (conformation «tout-trans»). Le passage d'une conformation trans à une conformation cis autour d'une liaison C-C nécessite de l'énergie (quelques kJ).

L'agitation thermique peut suffire à y parvenir. Une séquence de conformation ...trans-trans-cis-trans- cis-trans-trans...entraîne, au-delà de la conformation cis, un changement de la direction de la chaîne. Dans une bicouche lipidique, ceci rend plus difficile un parallélisme des chaînes. A une température suffisamment basse, dans des conditions où l'agitation thermique est faible, toutes les chaînes des lipides membranaires ont une conformation tout -trans. Dans une organisation en bicouche lipidique, les chaînes sont parallèles les unes aux autres, en contact étroit et étirées au maximum. Cette conformation des chaînes acylées optimisent les attractions de Van der Waals logeant des mouvements moins rotationnels. On parle d'une conformation ordonnée des chaînes ou l'état gel (conformation  $\beta$ )

Une élévation de température entraîne une mobilité accrue autour des liaisons C-C. La probabilité d'une isomérisation trans→cis augmente avec la température. Au-delà d'une température donnée, on observe une transition coopérative: les chaînes passent d'une

conformation ordonnée à une conformation désordonnée (conformation  $\alpha$  ou l'état liquide-cristallin). Les isomérisations autour des liaisons des chaînes résultent en une formation des isomères cis produisant des nœuds. Dans cette conformation, les chaînes oscillent autour d'une rotation moyenne perpendiculaire au plan de la membrane. Les chaînes ne sont plus tirées au maximum ; en conséquence, par rapport à une situation où la conformation est de type  $\beta$ , l'épaisseur de la bicouche lipidique diminue. Le contact entre les chaînes est moins étroit et les lipides sont plus séparés les uns des autres. Au cours de la transition, il y a une expansion latérale des lipides dans la membrane.

Dans la monocouche, les lipides peuvent tourner autour de leur axe (rotation axiale) ou diffuser latéralement. Au sein d'une bicouche, les lipides peuvent passer d'un feuillet à un autre (« flip flop »), Un tel mouvement de basculement est thermodynamiquement défavorisé. Le temps caractéristique de chaque type de mouvement est indiqué dans la figure I.8. A l'échelle moléculaire, d'autres mouvements d'acides gras existent, dont le temps caractéristique est de  $10^{-12}$ s. Les mouvements « collectifs » (mécanismes d'ondulations de la membrane plasmique) concernant l'ensemble de la membrane, incluant la courbure, l'étirement et la compression de la bicouche seront abordés plus tard dans ce chapitre.

### C) Quelques exemples de modèles membranaires :

Parmi ces modèles, nous pouvons citer (figure I.9)

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

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

-les liposomes (ou vésicules) multilamellaires ou unilamellaires (Warschawski, D.E. *et al.*, 2011); ce sont les modèles les plus utilisés actuellement car ils sont très faciles à préparer et ils sont constitués d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides, comparables à celle des membranes naturelles (Léonard *et al.*, 2001; Villar *et al.*, 2001 ; Aussenac *et al.*, 2003).

-les bicelles (Gabriel et Roberts, 1984; Sanders et Prosser, 1998), objets discoïdaux qui présentent une bicouche de phospholipides plane et qui ont la remarquable propriété de

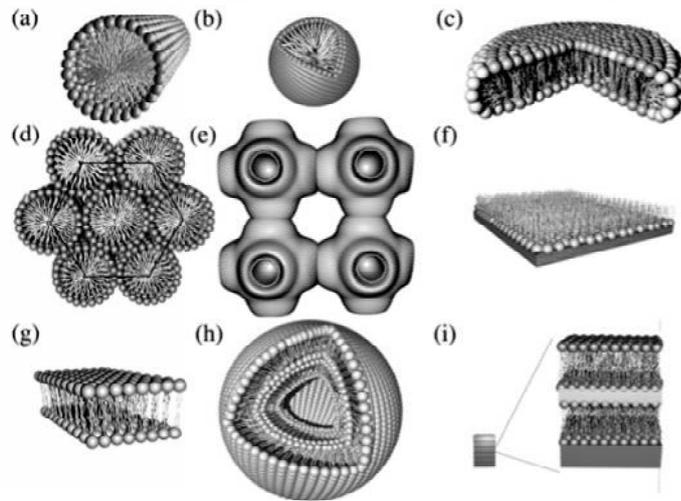
s'orienter spontanément dans un champ magnétique.

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

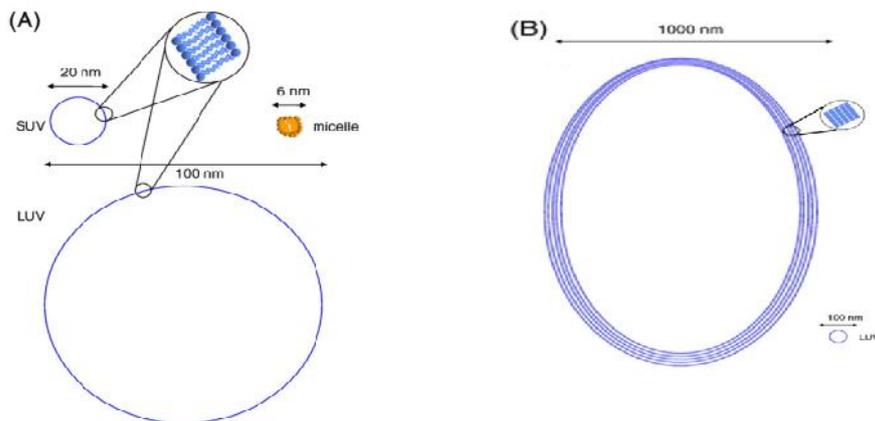
### **I.2.2: Le modèle membranaire : «bicelles»**

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

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



**Figure I.9 :** Différents types d'arrangements lipidiques. Représentation schématique des différentes phases lipidiques obtenues une fois les lipides sont dissous dans l'eau, avec a) tubes micellaires, b) micelles, c) bicelles, d) phase hexagonale, e) phase cubique, f) monocouche langmuir, g) phase lamellaire, h) liposomes MLVs, g) bicouches empilées sur support solide (adapté de Diller, A. et al., 2010).



**Figure I.10 :** Plusieurs exemples de modèles membranaires (adapté de Warschawski, D.E. et al., 2011); MLV: « Multilamellar Vesicle », SUV: « Small Unilamellar Vesicle », LUV: « Large Unilamellar Vesicle

### **I.2.3 : Le modèle membranaire: «liposome»**

La classification des liposomes est basée sur leur taille et leur aspect lamellaire. Ces paramètres dépendent de la composition et de la méthode de préparation des vésicules. Les liposomes sont généralement classés en trois grandes catégories, présentées comme suit (figure I.10) (Warschawski, D.E. *et al.*, 2011) :

- Les MLVs (vésicules multi-lamellaires) présentent une taille comprise entre 100 nm et plusieurs micromètres. Elles sont constituées d'un nombre important de lamelles concentriques.

- Les petites vésicules unilamellaires (SUV) obtenues par sonication des MLVs, sont des vésicules constituées de deux couches uniques et peuvent théoriquement être aussi petites que 20 nm. Elles sont très résistantes aux contraintes mécaniques et osmotiques mais s'agrègent assez rapidement. Leur petit diamètre peut être un inconvénient tout comme la courbure importante qui impose des contraintes d'association des lipides qui sont plus nombreux dans la monocouche externe qu'interne.

- Les larges vésicules unilamellaires (LUV), obtenues par extrusion des MLVs, sont des vésicules de taille bien définie généralement comprise entre 800 et 100nm, constitués d'une seule bicouche .

Les liposomes ont des morphologies différentes selon la phase de leur(s) membrane(s). En phase fluide les vésicules forment des sphères, ce qui implique que les bicouches lipidiques présentent une certaine courbure. En phase gel les membranes sont dans un état très rigide et ne peuvent pas être courbées. Les liposomes forment alors des polyèdres, c'est-à-dire des sphères constituées de nombreuses faces avec des discontinuités à la limite des deux faces

#### **A) Propriétés mécaniques et élastiques :**

De nombreux mécanismes ont été proposés pour la formation des liposomes, et certains d'entre eux sont plus complexes que d'autres. Une des approches envisageant l'auto-association d'une bicouche dans un liposome suggère une compétition entre deux effets, l'énergie de courbure et l'énergie de bord d'une bicouche (Helfrich, W.Z., 1973b). Une bicouche dans un environnement hydrophile, sera soumise à une tension de surface élevée au niveau des bords. L'élasticité de courbure peut réduire cette énergie de bord, toutefois, elle peut impliquer une perte d'énergie due à la courbure induite. Pour réduire davantage l'énergie de bord, une courbure supplémentaire est nécessaire, ce qui va former une sphère, avec une énergie de bord réduite à zéro. L'énergie de courbure, d'autre part, a maintenant atteint son maximum. Sachant

que l'épaisseur membranaire est très faible (3 à 6 nm) par rapport au diamètre de la vésicule (plusieurs microns), la membrane, d'un point de vue mécanique, est considérée comme deux feuillets élastiques extrêmement fins. En considérant la bicouche lipidique comme un matériel isotrope et homogène, elle est donc modulable à une surface élastique (Landau et Lifshitz, 1986). N'importe quelle force exercée sur la surface peut être exprimée comme une combinaison de trois modalités de déformation à savoir la courbure, la compressibilité et le cisaillement (Helfrich, W., 1973 ; Evans, E., 1987 ; Sackmann, 1994) illustrés dans la figure I.11. Ces différentes formes sont régies par les interactions entre différents acteurs : les lipides ou les complexes lipidiques, les protéines... En considérant que la déformation est proportionnelle à la forme de stress appliquée (Loi de Hook), les propriétés mécaniques d'une vésicule sont décrites par les trois paramètres élastiques suivant : la constante de compressibilité ( $\chi$ ), la constante d'étirement ( $\mu$ ) et la constante d'élasticité de courbure (k).

i. La compressibilité

La constante de compressibilité ( $\chi$ ) caractérise la cohésion entre les lipides et la bicouche. L'énergie d'interaction entre les phospholipides présente une valeur minimale pour une distance de 1nm entre deux tête polaires successives; toutefois, toute déviation de cette distance (compression ou dilatation) coûte en énergie. La compressibilité de la bicouche est liée à sa résistance à cette tension isotrope. Cette résistance est caractérisée par une énergie élastique par unité de surface, liée à la tension nécessaire pour maintenir le changement d'aire.

$$dE_{stretching} = \frac{1}{2} \chi \left( \frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 \quad (I.1)$$

Avec  $\Delta A$  : l'augmentation de l'aire de la surface par rapport à un état d'équilibre  $A_0$ .

ii. Le cisaillement

Le cisaillement de la membrane peut être représenté comme l'étirement d'une longueur  $\delta_L$  d'une bicouche et sa compression de même longueur selon la direction perpendiculaire. Ce type de déformation correspond à un changement de forme (dans le plan) de la membrane maintenue à une surface constante. L'énergie élastique de cisaillement par unité de surface  $dE_{shearing}$  est exprimée comme suit:

$$dE_{shearing} = \frac{1}{2} \mu (\lambda^2 + \lambda^{-2} - 2) \quad (I.2)$$

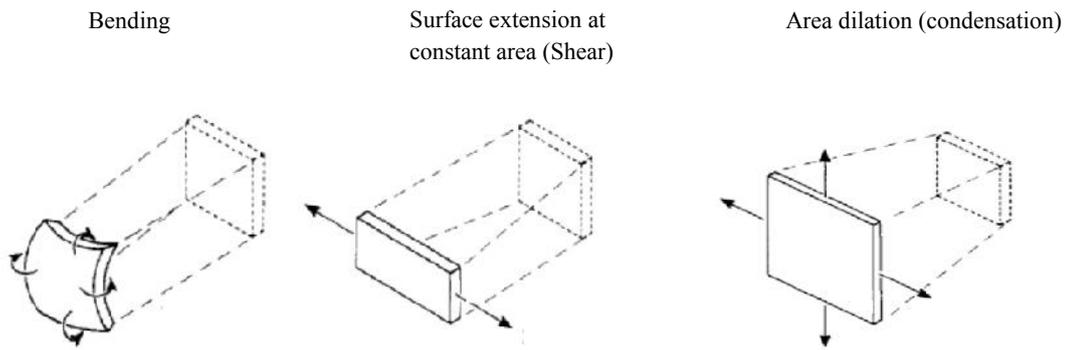
Avec  $\mu$  la constante d'étirement et  $\lambda = \frac{L_0 + \Delta L}{L_0}$  qui correspond au ratio d'extension latérale qui caractérise la transformation d'un élément de surface de forme carrée (de longueur  $L_0$ ) en un rectangle de longueur  $L$ .

### iii. La courbure

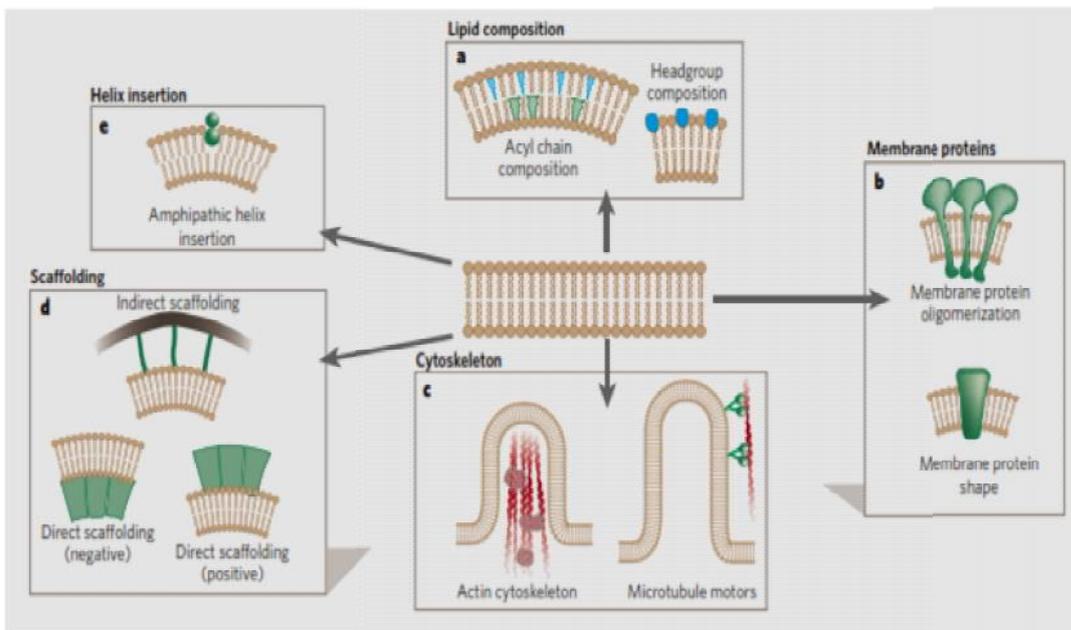
Les propriétés des lipides, favorisent des courbures différentes de la membrane. (Sackmann 1994). La déformation dans un milieu donné introduit une courbure spontanée, d'énergie minimale, impliquant un moment de courbure. Cette énergie associée peut dériver par exemple d'un gradient ou d'interactions entre différentes molécules. Cela peut se passer par exemple par insertion de protéines ou par modification de la densité de charge (comme par exemple la liaison d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Sackmann 1994; Graham et Kozlov 2010; Callan-Jones, Sorre *et al.* 2011).

Les molécules impliquées dans le changement de courbure de la membrane sont nombreuses et dans la plupart des cas très sélectives (Pucadyil et Schmid 2009), mais les mécanismes mis en jeu diffèrent peu. En revanche, les origines de la courbure membranaire (figure I.12) peuvent être classées en cinq catégories (McMahon et Gallop 2005), citées comme suit :

- Le changement de composition lipidique (redistribution latérale, flip-flop, changements de phase) qui, lui même, peut être généré par le changement de température ou l'interaction avec d'autres molécules (Farge et Devaux 1992).
- L'influence des protéines transmembranaires, comme leur agrégation (Eckler, Kuehn *et al.* 2005).
- L'assemblage des réseaux du cytosquelette, comme l'action des filaments d'actine.
- La formation d'un squelette rigide de protéines extrinsèques qui va de son côté soit déformer la membrane soit stabiliser une membrane déjà courbée (Barelli et Antony, 2009).
- L'insertion de parties de molécules amphiphiles (par exemple des domaines de protéines) dans l'un des deux feuilletts de la bicouche lipidique, provoquant la courbure de la membrane en augmentant l'asymétrie de surface entre les deux feuilletts (Barelli et Antony 2009).



**Figure I.11** : Trois modalités de déformation de la membrane plasmique : la courbure, le cisaillement et la compression (adapté de Evans, E., 1987)



**Figure I.12** : Les différents mécanismes provoquant le changement de courbure membranaire (extraite de McMahon, H.T. et Gallop, J.L., 2005)

L'élasticité de courbure peut être décrite par deux type de courbure : la courbure moyenne ( $C_1+C_2$ ) et la courbure gaussienne ( $C_1*C_2$ ), avec  $C_1=1/R_1$  et  $C_2=1/R_2$ . Canham (Canham, 1970) et Helfrich (Helfrich, 1973) ont introduit la densité d'énergie associée à l'élasticité de courbure :

$$d_{E_{bending}} = \frac{1}{2}k(C_1 + C_2 - C_0)^2 + \frac{1}{2}k_{gauss}C_1C_2 \quad (I.3)$$

Avec  $k$ , la constante d'élasticité de courbure, et  $k_{gauss}$ , la constante d'élasticité de courbure gaussienne qui peut être soit positive soit négative en fonction des caractéristiques moléculaires de la membrane.  $C_0$  est considérée comme la courbure spontanée adoptée par la bicouche en absence de forces externes. L'énergie totale de courbure est l'intégrale de  $d_{E_{bending}}$  sur la surface totale de l'objet. Le théorème de Gauss-Bonnet (Darboux, 1972 ; Meleard, P., 1997 ; Marsh, D., 2006) montre que la courbure gaussienne intégrée sur la surface totale de la vésicule ne varie pas ( $\approx 4\pi$ ). Ainsi, la composante gaussien de l'énergie est négligée (Marsh, D., 2006)

Nous venons de voir qu'une bicouche est sujette à trois types de déformation. Dans notre cas, nous nous sommes concentrés sur l'élasticité de courbure qui est la plus significative et qui a été formalisée par Helfrich (Helfrich, 1973).

L'élasticité membranaire peut être modulée de diverses manières (Sackmann, 1994). Beaucoup de travaux ont été réalisés pour mesurer la constante d'élasticité de courbure des membranes modèles (Evans et Rawics, 1990 ; Kummrow et Helfrich, 1991). Fernandez-Puente et al ont proposé une méthode de mesure du module d'élasticité de courbure  $k$  qui est déterminé en mesurant par vidéo-microscopie et analyse d'images, les fluctuations thermiques de vésicules géantes lipidiques obtenues par électroformation (Fernandez-Puente, et al., 1994 ; Méléard, P. et al., 1997)

Ces travaux montrent dans le cas des membranes comportant un seul phospholipide thermotrope (DMPC ou DPPC) que  $k$  varie très fortement a l'approche de la température de transition de phase gel-fluide et, dans le cas d'un système mixte DMPC/cholestérol, que  $k$  est sensible a la température et à la composition de la bicouche. Fernandez Puente et al ainsi que Méléard et al, ont prouvé que la constante d'élasticité de courbure, qui est proportionnelle au carré de l'épaisseur membranaire, augmente avec l'ajout de cholestérol. Ainsi, une relation entre la composition de la membrane et la déformabilité des bicouches a été déterminée.

a) **Cholestérol et fluidité membranaire**

Le cholestérol est connu depuis longtemps pour interagir de manière spécifique avec les phospholipides de la bicouche lipidique. De nombreuses études portent sur l'effet du cholestérol sur les mouvements rotationnel et translationnel des phospholipides, sur la conformation de leurs chaînes acyles (effet d'ordre) et sur la transition de phase gel-fluide. Le cholestérol a largement été décrit dans la littérature comme «régulateur» de la dynamique membranaire : il rigidifie les chaînes en phase fluide et les fluidifie en phase gel (Dufourc *et al.*, 1984 ; Leonard et Dufourc, 1991; Olfeld *et al.*, 1978 ; Seelig, 1977), il diminue la perméabilité et augmente la cohésion membranaire. Pour une concentration supérieure à 20% molaire, le cholestérol supprime la transition entre les phases lamellaires  $L_{\beta}$  et  $L_{\alpha}$ , il a ainsi pour effet de condenser les phospholipides en phase lamellaire fluide (augmentation de l'ordre) et d'espacer ceux en phase gel (augmentation du désordre) (Oradd *et al.*, 2002). Ainsi, pour des températures élevées (au dessus de la  $T_m$ ) l'interaction du cholestérol avec les lipides avoisinants limite leurs mouvements ce qui diminue la fluidité membranaire. Certaines membranes lipidiques fortement enrichies en cholestérol forment une phase fluide aux propriétés physiques particulières: la phase  $l_o$ , pour liquide-ordonnée (Ipsen *et al.* 1987).

De par sa structure, le cholestérol est le stérol qui favorise le plus les conformations ordonnées des chaînes acyles saturées des phospholipides. Cet effet de condensation des chaînes acyles (réduction du désordre) se ferait par la face du tétracycle du cholestérol (McMullen 1996), la chaîne carbonée en position 17 du cholestérol étant probablement trop flexible pour avoir un grand pouvoir de condensation (Yeagle 1985). En phase fluide, l'ordre des chaînes du DMPC, du DPPC et du DSPC (diC18:0-PC) est deux fois plus important quand la bicouche contient 50 mol% de cholestérol (Sankaram et Thompson 1990).

Leonard et Dufourc en 1991, ont montré par des études de diffraction des neutrons que le cholestérol s'oriente perpendiculairement dans le cœur de la bicouche exposant l'hydroxyle OH verticalement au groupement carbonyle de la chaîne aliphatique du lipide DMPC (Leonard et Dufourc, 1991). L'interaction cholestérol/phospholipide dépend aussi très largement des interactions entre le cœur stéroïde et les chaînes acyles, largement défavorisées par les chaînes acyles insaturés. En effet, la présence d'insaturations en configuration *cis* limite l'attraction des forces de van der Waals avec le cholestérol. Il en résulte un effet de condensation par le cholestérol d'autant plus faible que les phospholipides sont insaturés,

comme le montrent les résultats comparatifs en RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de bicouches de DPPC, POPC ( $\text{C}_{16:0};\text{C}_{18:1}\text{-PC}$ ) et DOPC (Warschawski et Devaux 2005). De plus, une des interprétations au phénomène de condensation des chaînes pour températures élevées est que les liaisons de Van der Waals seraient plus intenses entre le cholestérol et les segments méthyléniques qu'entre les chaînes. Ce qui est clair néanmoins, c'est que l'effet rigidificateur du cholestérol au dessus de  $T_m$  est dû à un accroissement de la probabilité d'existence des conformères *trans* et à une diminution des isomérisations *trans-gauche* le long des chaînes.

L'accroissement de l'ordre des chaînes acyles par le cholestérol va de pair avec l'augmentation de l'épaisseur hydrophobe de la membrane (Fernandez-Puente, 1994 ; Meleard, P., 1997).

#### ***b) Ethanol et fluidité membranaire :***

La connaissance des mécanismes moléculaires qui résident derrière l'interaction des alcools à courte chaînes et la portion lipidique des biomembranes présente un intérêt particulier dans la compréhension des effets de l'éthanol sur la fluidité membranaire (Ly, H.V., et al, 2004 ; Gurtovenko, A.A., et al, 2009).

L'éthanol est une petite molécule amphiphile qui peut pénétrer et traverser les membranes. Les alcools aliphatiques provoquent une fluidification des membranes qui se traduit par des mouvements lipidiques (diffusion latérale et rotation) plus fréquents (Ghosh 1988) et par une altération du processus d'insertion de certaines protéines, nécessitant la formation de liaisons hydrogènes (Ingram et Buttke 1984).

Le pouvoir des alcools est corrélé à leur hydrophobicité, qui augmente avec la longueur de leurs chaînes aliphatiques. L'addition d'alcool dans le milieu augmente la liberté de mouvement à l'intérieur de la membrane, diminue la température de transition de phase de membranes modèles et diminue l'ordre moléculaire.

L'éthanol interagit avec la membrane avec une liaison hydrogène entre le groupe hydroxyle et le carbonyle de la chaîne acyle et une liaison de type hydrophobe entre le groupement éthyle et le squelette glycérol, (Kreishman *et al*, 1986 ; Lafleur *et al*, 1989; Barry *et al.*, 1994; Holte, L.L. *et al*, 1997; Patra *et al*, 2006), avec une distribution majoritaire à l'interface eau/lipide et minoritaire à l'intérieur de la bicouche (Rowe, E.S., 1981). En appliquant la méthode de Nagle (1993), Barry a montré qu'il y a une augmentation du volume par lipide ce qui certifie que l'intercalation de l'éthanol s'effectue entre les squelettes glycérol empilés augmentant l'espacement inter-bicouche (Hung, V. et al, 2004) avec un coefficient de partition de 2,64

moles of solvent/mole of DMPC. (Katz, Y et al, 1974, Rowe, E.S. 1981).

L'éthanol remplace l'eau dans l'établissement des liaisons hydrogènes et provoque une diminution de la force des interactions hydrophobes. Quand l'éthanol s'intercale au sein de la partie hydrophobe de la membrane, la polarité de cette zone augmente. Ceci autorise le passage d'autres molécules polaires à travers la barrière semi-perméable que constitue la membrane, ce qui l'affaiblit (Slater et al. 1993). L'éthanol aurait donc pour effet de dissiper la force promotrice, de diminuer les interactions de van der Waals et donc d'augmenter la fluidité membranaire.

Les liaisons hydrogènes formées entre phospholipides et éthanol sont moins fortes qu'avec l'eau. D'autres études menées sur des liposomes *in vitro* confirment que, par sa nature de solvant organique polaire à courte chaîne aliphatique, l'éthanol est capable d'interagir avec les radicaux acyles des phospholipides membranaires (Vanegas, J.M., et al., 2012). Du fait de ces interactions, on assiste à l'émergence de nouveaux états de phase dans la bicouche lipidique sous l'effet de l'éthanol. D'une part, dans les domaines riches en acides gras insaturés, la bicouche atteint un état de phase « liquide interdigitée » dont les chaînes acyle des phospholipides s'interpénètrent. D'autre part, ce phénomène est moins prononcé dans les zones riches en ergostérol et en acides gras insaturés, mais celles-ci subissent par ailleurs une augmentation de l'aire par lipide (Vanegas, JM. et al., 2010 ; Dickey A.N., et al, 2009). Le cholestérol diminue les effets délétères créés par l'éthanol (Tierny et al., 2005). Une étude utilisant la microscopie à force atomique (Vanegas, JM. et al., 2010) permet en outre de visualiser ces transitions en fonction de la concentration en éthanol.

Des expérimentations ont cherché à caractériser les impacts de l'éthanol sur la membrane plasmique *in vivo* (Huffer, S. et al., 2011). L'ensemble des résultats converge vers une augmentation significative de la fluidité membranaire en présence d'éthanol. Les études *in vivo* qui visent à étudier l'effet fluidifiant de l'éthanol sont cependant difficiles à interpréter : il est souvent impossible de savoir si les modifications observées relèvent d'un effet direct de l'éthanol ou d'une réponse adaptative.

## **B) Propriétés magnétiques**

Les champs magnétiques dont l'intensité est de quelques Tesla entraînent peu d'effets d'orientation ou de déformation sur des molécules biologiquement isolées. En général, les petites molécules subissent des mouvements de rotation diffusionnelles rapides entraînant un spectre non-orientation dépendant caractéristique d'une phase isotrope. Toutefois, il existe de

larges protéines en solution qui peuvent légèrement s'aligner dans des champs magnétiques dont l'intensité est supérieure à 20 Tesla. Ceci est relié par exemple à l'anisotropie de susceptibilité magnétique des ions de fer (paramagnétique) de l'hème (Banci, L. *et al.*, 1998). En effet, tout alignement est induit par l'interaction entre un champ magnétique statique  $B_0$  et l'anisotropie de susceptibilité magnétique des molécules. Cependant, les mouvements browniens perturbent cette interaction, ce qui induit une moyennation incomplète des éclatements quadrupolaires détectables en RMN des solides- $^2\text{H}$  ( $<1\text{Hz}$ ) (Lohman, J.A.B., et Maclean, C., 1978, Banci, L. *et al.*, 1998, Lohman, J.A.B., et Maclean, C., 1979). Il existe également des exemples d'orientation macroscopique de protéines promu par des milieux orientant comme les phages par exemple (Park, S.H., *et al.*, 2009). Par contre, peu d'exemples sur l'orientation macroscopique des lipides sont reportés dans la littérature. Toutefois, Seelig et ses collaborateurs ont souligné la déformation de liposomes formulés par des phospholipides (PE : PG) organisés de telle sorte qu'ils soient orientés en majorité avec leur axe moléculaire perpendiculaire au champ magnétique. L'origine de cet alignement dans un champ est dû à l'anisotropie de susceptibilité magnétique  $\chi$  des lipides, dont la symétrie est considérée comme axiale. Dans ce cas,  $\Delta\chi$  est définie par la différence entre la susceptibilité diamagnétique parallèle  $\chi_{//}$  et celle perpendiculaire  $\chi_{\perp}$  à l'axe principal de la molécule (Seelig *et al.*, 1985). Si  $\Delta\chi < 0$ , l'alignement par rapport au champ magnétique est perpendiculaire tandis qu'il sera parallèle pour  $\Delta\chi > 0$ . Dans le cas des phospholipides constitués de chaînes aliphatiques saturées, les chaînes hydrocarbonées ont un terme  $\chi < 0$  et les liaisons esters du squelette glycérol ont un terme  $\chi > 0$ . Or, ces dernières sont orientées perpendiculairement aux chaînes aliphatiques; ainsi les deux fonctions participent à orienter l'axe principal de la molécule à  $90^\circ$  par rapport au champ magnétique. L'anisotropie diamagnétique globale des liposomes constitués de lipides saturés est donc négative et la normale à la bicouche de ces objets s'oriente perpendiculairement au champ magnétique statique.

Des recherches ont donc été effectuées pour obtenir un alignement macroscopique dans le champ magnétique, différent de  $n \perp B_0$ , de manière spontanée et uniforme; l'orientation où la normale à la bicouche est parallèle à  $B_0$  a été particulièrement étudiée. Il sera ainsi intéressant de pouvoir comparer les données structurales et dynamiques de biomolécules obtenues dans deux environnements lipidiques orientés différemment de  $90^\circ$ . Des ions lanthanides paramagnétiques ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ), dont l'anisotropie diamagnétique est largement positive et venant se positionner au niveau du phosphore

$PQ_4$  des têtes lipidiques, peuvent être ajoutés aux liposomes, qui vont alors s'organiser avec la normale à la bicouche parallèle au champ magnétique (basculément de  $90^\circ$ ) (Prosser et al., 1996; Prosser et al., 1998; Prosser et al.). Mais, le paramagnétisme des ions tels que  $Eu^{3+}$  ou  $Yb^{3+}$  perturbe fortement les expériences RMN en élargissant les raies; de plus, ces ions pourraient se lier à une protéine membranaire insérée dans les liposomes, et venir perturber sa conformation et donc sa fonction.

D'autres études ont consisté à insérer dans les bicelles des composés possédant une susceptibilité diamagnétique  $\Delta\chi$  positive, comme certains peptides (Picard *et al.*, 1999) ou des composés aromatiques amphiphiles (Sanders *et al.*, 1993); les cycles phényles ont en effet un  $\Delta\chi$  largement positif (Visscher *et al.*, 2006). Loudet, C. et al en reprenant des études réalisées par le groupe de Cho (Tan, T. *et al.*, 2000), ont développé le lipide TBBPC (Loudet, C. *et al.*, 2010) qui une fois formulé en bicelles avec le lipide DCPC s'orientent de telle sorte que la normale à la bicouche n soit parallèle au champ magnétique statique  $B_0$ .

D'où l'idée de reprendre ce lipide TBBPC mais cette fois d'étudier ses applications dans la formation de modèles membranaires de type liposome et d'étudier l'influence de son  $\Delta\chi$  positif sur une déformation éventuelle des liposomes. Ce nouveau modèle membranaire sera comparé aux liposomes DMPC, ce dernier présentant une anisotropie de susceptibilité magnétique négative d'une valeur de  $-5,8 \cdot 10^{-9}$  (cgs-emu) de signe opposé par rapport à celle du lipide TBBPC (Scholz, F. *et al.*, 1984).

Helfrich (Helfrich, W. 1973) a regroupé les différents paramètres influant sur la déformation des liposomes dans l'équation (I.4) suivante :

$$c - a = \frac{r^3 b B^2}{k} \Delta\chi \quad (I.4)$$

où  $c$  et  $a$  sont les semi-axes mineurs et majeurs de l'ellipsoïde de révolution,  $r$  le rayon de la sphère non déformé,  $B_0$  le champ magnétique statique,  $b$  l'épaisseur de la bicouche lipidique,  $k$  le module d'élasticité de courbure, et  $\Delta\chi$  l'anisotropie de susceptibilité magnétique. Cette relation a été établie en considérant un équilibre entre l'énergie élastique :  $E_c$  (équation I.5) et l'énergie magnétique  $E_B$  (équation I.6)

$$E_c = 2\pi k(2 - rc_0)^2 + \pi k \frac{(c-a)^2}{r^2} \times \left[ \frac{32}{5} + (2 - \frac{1}{5}rc_0)(2 - rc_0) - \frac{1}{5}(2 - rc_0)^2 \right] \quad (I.5)$$

$$E_B = -\frac{2}{3}\pi k(\Delta\chi)bB^2r^2 + \frac{16}{15}\pi(\Delta\chi)bB^2r(c-a) \quad (I.6)$$

Pott et al ont également établi une relation entre le rapport  $c/a$  et la forme des spectres

RMN des solides- $^{31}\text{P}$ . (Pott et Dufourc, 1995). La probabilité de distribution d'intensités d'un ellipsoïde de révolution s'écrit:

$$P(\theta)d\theta \propto \frac{\sin\theta}{[\sin^2\theta + (c/a)^2 \cos^2\theta]^2} d\theta \quad (\text{IV.7})$$

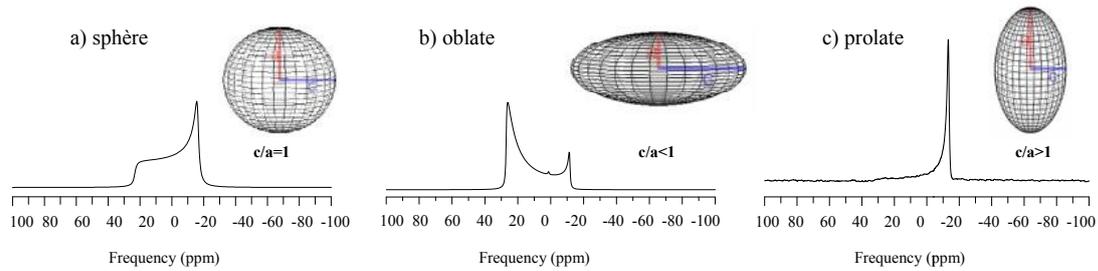
Où  $\theta$  est l'angle entre la normale à la bicouche et le champ magnétique,  $c$  représente l'axe semi mineur et  $a$  l'axe semi majeur.

Pour une distribution sphérique où  $c=a$ , l'équation devient :  $P(\theta)d\theta \approx \sin\theta d\theta$

D'après la figure I.13, on remarque que lorsque les deux semi-axes  $c$  et  $a$  sont quasiment égaux, on retrouve le spectre de poudre caractéristique des liposomes non déformés en phase fluide, c'est à dire présentant une distribution d'intensité à symétrie sphérique. Lorsque le semi-axe vertical de l'ellipsoïde ( $c$ ) est supérieur au semi-axe horizontal  $a$  ( $c/a > 1$ ), les liposomes s'allongent parallèlement au champ magnétique, de telle sorte que la densité de lipides orientés avec leur axe moléculaire perpendiculaire au champ magnétique est plus importante. Le signal correspondant à l'orientation  $\theta=90^\circ$  est alors beaucoup plus intense sur le spectre RMN que celui pour l'orientation  $\theta=0^\circ$ . La déformation des vésicules adoptant cette orientation ellipsoïdale par rapport au champ magnétique est qualifiée de "déformation prolate", c'est le cas des liposomes DMPC (Pott et Dufourc, 1995; Dubinnyi, M.A. *et al.*, 2006) qui présentent un  $\Delta\chi$  négatif.

A l'inverse, lorsque le semi-axe  $c$ , est inférieur à  $a$  ( $c/a < 1$ ) ; un maximum de lipides est orienté avec un axe moléculaire parallèle au champ magnétique, les vésicules ont tendance à s'aplatir (l'orientation  $\theta=0^\circ$  est privilégiée, voire dominante par rapport à celle  $\theta=90^\circ$  qui devient alors quasi- inexistante). Cette déformation ellipsoïdale des vésicules est qualifiée de "déformation oblate", c'est le cas des lipides qui présentent un  $\Delta\chi$  positif.

Comme nous allons le voir dans les chapitres suivants, le lipide TBBPC, de part la présence d'une unité biphényle sur sa chaîne  $sn_2$ , présente un  $\Delta\chi$  positif, qui entraîne une déformation en oblate des liposomes TBBPC, qui est la clé de toute notre étude.



**Figure 1.13:** Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  simulés associés à un liposome de type a) sphérique, b) déformé en oblate; c) déformé en prolate

### I.3 : Les protéines membranaires

Les membranes séparent les cellules et les organites intracellulaires, pour que plusieurs réactions biologiques aient lieu. La communication entre les cellules ou les organites intracellulaires et l'environnement extérieur, est médiatisée par les protéines membranaires. La détermination de la structure et de l'orientation de ces dernières est essentielle pour la compréhension de leurs fonctions.

30% des protéines codées par le génome humain sont des protéines membranaires (PMs). Pour comprendre les activités fonctionnelles des protéines membranaires, leurs structures à résolution atomique sont importantes. Avec le développement de la cristallographie des rayons X automatisée et de la RMN du liquide, le temps nécessaire à la détermination de la structure des protéines a été réduit de manière significative pour les protéines solubles dans l'eau. En plus des contraintes structurales traditionnelles utilisées dans la détermination structurale par RMN, Les RDCs (Contraintes Résiduelles Dipolaires) présentent un autre moyen puissant pour affiner et déterminer la structure des protéines (Prestegard *et al.*, 2004). Jusqu'à présent, la génomique structurale s'est principalement concentrée sur les protéines solubles. Malgré l'importance des PMs dans la fonction des cellules, seules quelques structures sont documentées dans la Protein Data Bank (PDB). En effet, sur les 94336 structures déposées dans la PDB (Octobre, 2013), moins de 1% sont des structures de PMs (<http://www.pdb.org>). Cela représente un énorme déficit d'informations structurales sur les protéines membranaires qui représentent une frontière actuelle en biologie structurale. La cristallographie des rayons X et la RMN représentent deux acteurs majeurs de détermination de la structure 3D de protéines. Bien que la détermination de la structure des protéines membranaires soit très difficile, de plus en plus de laboratoires s'investissent dans ce secteur en pleine expansion. Les deux dernières structures cristallines de PMs sont la forme liée  $\text{Na}^+$

de l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Nyblom, M. *et al.*, 2013) et le récepteur à la chimiokine  $\text{CR}_5$  avec la forme liée de maraviroc (Tan, Q. *et al.*, 2013).

La RMN du solide est un domaine en pleine expansion (Luca *et al.*, 2003). Bien que la diffusion des rayons X donne des informations de structure à l'état cristallin, la RMN reste l'unique méthode qui fournit des données structurales dans un environnement naturel et natif: les lipides membranaires. De plus, les contraintes angulaires et de distance peuvent être obtenus quantitativement afin de fournir des informations structurales exactes.

Un aspect plus avantageux que la RMN du liquide est que la RMN du solide est un outil puissant pour l'étude de la dynamique des protéines.

En comparant par rapport aux protéines solubles, les protéines membranaires exigent beaucoup plus de temps et d'efforts de surexpression, solubilisation, purification, de repliement et de reconstitution parce que les bicouches lipidiques dans lesquelles les PMs sont insérées sont si différentes de l'environnement aqueux.

En RMN du liquide, les micelles sont souvent utilisées pour mimer les bicouches lipidiques à stabiliser les domaines transmembranaires des protéines membranaires (Henry et Sykes, 1994; Opella *et al.*, 1994). Les avantages et inconvénients des micelles, bicelles isotropes, amphipols, des tensioactifs fluorés et les mélanges de solvants organiques ont été bel et bien discutés depuis plusieurs décennies. En effet, le problème principal réside dans le mauvais repliement des protéines et leur capacité de garder leur fonction biologique dans de tels milieux. Outre l'effet délétère des détergents (Chou *et al.*, 2002; Krueger-Koplin *et al.*, 2004), la rotation diffusionnelle lente du grand complexe protéine-micelles se traduit souvent par de larges signaux de RMN en raison de la relaxation transversale rapide.

La topologie des protéines membranaires a été étudiée par le travail de pionnier du groupe Opella (Opella et Marassi, 2004) qui a développé des expériences d'alignement de membrane montrant leur rôle important à la fois pour la RMN en solution et solide dans l'étude de protéines. Ainsi, l'utilisation de cristaux liquides dilués induisant un léger alignement des protéines par rapport au champ magnétique et introduisant, ainsi, une faible anisotropie dans l'espace orientationnel de la molécule étudiée a suscité un vif intérêt.

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

✓ Des poudres lyophilisées ou des monocristaux; dans ce cas l'interaction dipolaire est prédominante en mode statique. Cependant, par rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique (entre 10 et 20 KHz) et en se plaçant à basse température, il est possible de moyenniser ces interactions anisotropes et d'attribuer les résonances de quelques résidus du squelette

peptidique et des chaînes latérales (Egorova-Zachernyuk et al., 2001; McDermott et al., 2000; Lorch et al., 2005).

- ✓ Dans des micelles ou détergents.

- ✓ associé à des modèles membranaires non orientés tels que les liposomes; des études en rotation à l'angle magique (HR-MAS) sont alors envisageables afin de définir la structure ou l'orientation de la molécule par rapport à la membrane. La technique de rotation rapide de l'échantillon à l'angle magique ( $54,7^\circ$ ) (HR-MAS, High Resolution-Magic Angle Spanning) permet de moyennner les interactions anisotropes rencontrées pour ce type d'échantillon et donc d'améliorer cette résolution spectrale (Sizun et al., 2004).

- ✓ associées à des modèles membranaires de type bicelles, constitués d'un mélange de lipides à chaînes courtes et de lipides à chaînes longues.

Lorsque le rapport molaire  $q$  entre ces deux types de lipides est inférieur à 1, des objets bicellaires de très petite taille, non orientés et aux propriétés isotropes sont obtenus. Des protéines membranaires liées à ces bicelles peuvent alors être étudiées par les techniques classiques de RMN structurales liquides. Cette procédure présente des avantages par rapport à l'étude dans des micelles puisque le domaine en bicouche de la bicelle permet d'éviter le changement de structure de la protéine éventuellement induit par la forte courbure de la surface d'une micelle (Lindberg et al., 2003; Matsumori et al., 2006).

Lorsque le rapport molaire  $q$  est supérieur à 1, les bicelles obtenues sont alors anisotropes et elles présentent l'avantage de s'orienter spontanément dans un champ magnétique. Cette spécificité présente un grand intérêt pour l'étude structurale et orientationnelle par RMN des solides  $^{15}\text{N}$  de peptides ou protéines membranaires marquées  $^{15}\text{N}$  insérées dans ces bicelles (Prosser et al., 2006 ; Park et al., 2005; Triba et al., 2006; Park et al., 2006 ). Pour cela, des expériences RMN des solides 2D  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  de type PISEMA (Polarization Inversion with Spin Exchange at the Magic Angle, Wang et al., 2000) sont notamment utilisées.

On peut citer notamment la détermination de la structure et l'orientation de la protéine de l'enveloppe du bactériophage  $\text{Pf}_1$  au sein des bicelles DMPC/DCPC et TBBPC/DCPC (Park, et al., 2009, Dufourc et al., 2013).

- ✓ Une autre technique consiste à empiler des membranes lipidiques entre deux plaques de verre, que l'on oriente ensuite mécaniquement dans le champ magnétique; cette méthode a été appliquée par exemple par le groupe de Tim Cross pour l'étude structurale de la Gramicidine A (Ketchem et al., 1993; Ketchem et al., 1996). En utilisant des bicouches de phospholipides orientées, le groupe d'Opella a également résolu la structure complète d'une protéine membranaire de bactériophage marquée à l'azote 15 (Marassi et al., 1997) et établi

des corrélations structure-fonction au sein de la protéine Vpu du génome HIV-1 (Marassi et al., 1999); ils ont aussi comparé la diffusion rotationnelle de cette même protéine dans des bicelles et des bicouches orientées mécaniquement (Park et al., 2005). On peut aussi citer le travail de Bechinger qui a étudié par cette même technique l'insertion et l'orientation de peptides transmembranaires de type poly-alanine marqués N<sup>15</sup> (Bechinger, 2001). Néanmoins, ce modèle présente un certain nombre d'inconvénients notamment dans la préparation de l'échantillon qui est assez difficile. L'hydratation des bicouches lipidiques est en effet mal contrôlée et souvent très faible, ce qui augmente la rigidité du système et n'est pas représentatif des membranes naturelles. De plus, les impulsions radiofréquences utilisés en RMN des solides sont très intenses, ce qui entraîne une augmentation de la température de l'échantillon, qui est déshydraté et rapidement détérioré et enfin, la résolution n'est pas maximale, ce qui est due à une orientation non optimale (défauts des plaques de verre, mauvaise orientation dans le champ magnétique, Dufourc, et al., 2013).

✓ associés à des protéo-liposomes. En effet, cette méthode consiste à solubiliser une protéine dans un liposome orienté et d'effectuer des études de rotation à l'angle magique (Park, S.H., et al., 2010; Das, B.B, et al., 2012).

### **I.3.1. Les biomembranes et la surfactine**

Les membranes en interaction avec les peptides présentent des rôles cruciaux en biologie cellulaire. Elles pourraient tuer ou aider les cellules en permettant leur adaptation aux contraintes de l'environnement externe. La résistance des bactéries face aux antibiotiques conventionnels a poussé les recherches pour le développement de nouveaux modèles de traitement. Les peptides anti-microbiens (PA) ont été présentés comme solution à ce problème. Tandis que les antibiotiques classiques ciblent spécifiquement les voies de biosynthèse, les peptides antimicrobiens quant à eux peuvent directement déstabiliser les lipides membranaires et donc constituent une stratégie prometteuse pour cibler ces microorganismes. Au-delà de leur action anti-bactérienne, ces peptides sont capables d'agir sur les champignons et les protozoaires, certains sont même actifs sur les cellules cancéreuses (Baker, *et al.*, 1993) ou encore sur les virus enveloppés comme la melittine et la cecropine (Wachinger *et al.*, 1998).

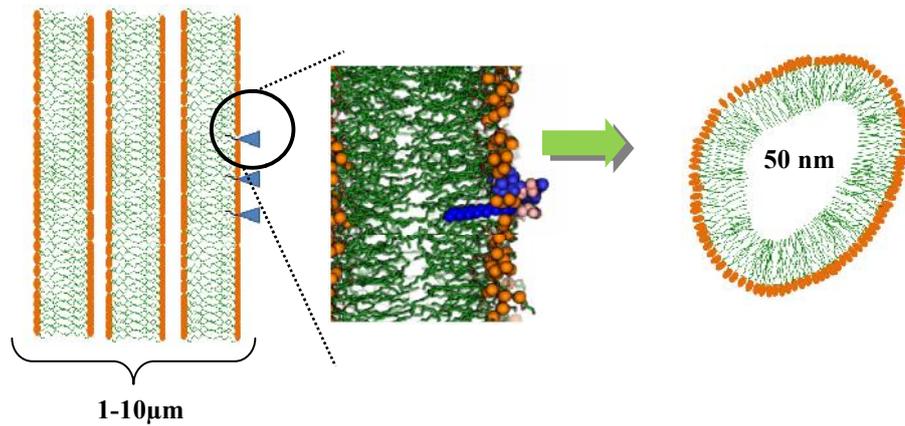
La surfactine, sécrétée par *Bacillus subtilis*, est composée d'une chaîne carbonée fortement lipophile de 12 à 14 carbones, et d'un anneau lactone hydrophile formant un cycle constitué de sept acides aminés (GluLeuLeuValAspLeuLeu) ; elle est chargée négativement. La chaîne

carbonée hydrophobe s'ancre dans la membrane, tandis que l'anneau cyclique se positionne à la surface. Tous les lipopeptides présentent ce caractère amphiphile leur conférant des capacités puissantes de surfactants. C'est d'ailleurs à ses propriétés surfactantes que la surfactine doit son nom. La surfactine présente un champ d'activités très large avec des propriétés à la fois antibactériennes, antivirales, anti-micoplasmiques et antitumorales ; elle agit notamment sur les membranes chargées négativement avec un effet détergent. En effet, la taille des objets obtenus après action de la SF sur des liposomes est très petite (de l'ordre du nanomètre), (figure I.14) (Buchoux, *et al.*, 2008). La structure de SF a été élucidée en Diméthylsulfoxyde (DMSO) et dans des micelles mais peu d'études ont été réalisées dans des bicouches orientées, d'où l'intérêt d'obtenir ce type de résultat afin de déterminer la structure et l'orientation de SF dans les liposomes.

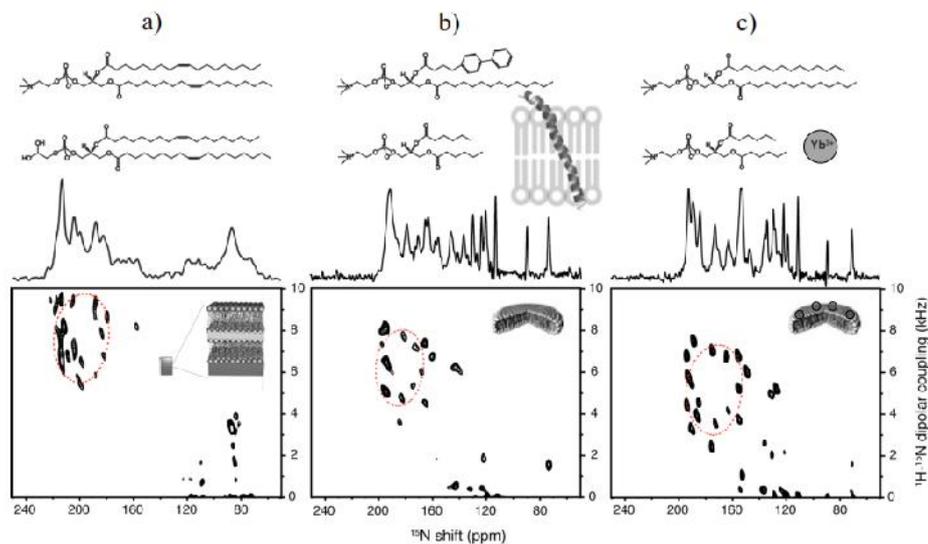
### **I.3.3: Les biomembranes et Pf<sub>1</sub> :**

Pf<sub>1</sub> est un bactériophage filamenteux qui infecte *Pseudomonas aeruginosa* (Kr). Ce virion est constitué d'un ADN génomique simple brin de 7349 nucléotides au sein d'une enveloppe protéique externe: la capsidie cylindrique composée d'environ 7300 sous unités majeurs de protéines possédant une stœchiométrie d'interaction 1:1 avec les nucléotides tout au long du filament. Les phages filamenteux Pf<sub>1</sub> ont un diamètre d'environ 65 Å pour une longueur d'environ 20000 Å et pour un poids moléculaire d'environ 40 MDa, leur surface est chargée négativement. La protéine de l'enveloppe est une protéine transmembranaire structurée en hélice  $\alpha$ , elle présente un intérêt majeur puisque pendant le cycle de vie du virus, elle fonctionne à la fois en tant que protéine membranaire liée à la membrane interne de la bactérie hôte avant que l'assemblage virale ait lieu, et comme une protéine structurale qui forme le capsidie du virus dans la particule virale assemblée.

Des études structurales par RMN des solides <sup>15</sup>N ont été réalisées sur la protéine Pf<sub>1</sub> insérée dans des bicelles TBBPC/DCPC (Park, 2008, Dufourc et al., 2013). Les spectres RMN des solides 1D <sup>15</sup>N et 2D de type PISEMA corrélant le déplacement chimique en <sup>15</sup>N avec le couplage dipolaire <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N, sont présentés figure I.15 pour le spectre 2D, chaque liaison amide conduit à une résonance de corrélation caractérisée par un spot à l'intersection du couplage dipolaire <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N et le déplacement chimique <sup>15</sup>N. En pointillés est représentée la PISA « wheel », qui permet de remonter par simulation au tilt d'orientation de l'axe moléculaire de l'hélice transmembranaire par rapport à la normale à la bicouche lipidique.



**Figure I.14.** Représentation du modèle « coin » : les répulsions électrostatiques entre SF et les têtes chargées des lipides déstabilisent les MLVs (gauche) pour former des vésicules nanoscopiques (droite). Le grossissement correspond à l'image obtenue par dynamique moléculaire (réalisée par S. Buchoux) de la surfactine dans un système de bicouche de phosphatidylcholine (les molécules d'eau ne sont pas représentées dans cette figure pour plus de clarté). Les chaînes lipidiques sont en vert, les groupements phosphate sont en orange. Les acides aminés hydrophobes de la surfactine ainsi que la chaîne acyle  $C_{14}$  sont indiqués en bleu. Les acides aminés négativement chargés sont représentés en rose pale et se localisent à la surface de la membrane alors que la chaîne acyle  $C_{14}$  est bien insérée dans la partie hydrophobe de la bicouche (adapté de Dufourc, E.J et al., 2012 et Dufourc, E.J. et al., 2013)



**Figure I.15 :** Spectres RMN des solides- $^{15}\text{N}$  1D et 2D de type PISEMA de la protéine  $Pf_1$  insérée dans des membranes orientées avec leur normale à la bicouche parallèle au champ magnétique dans des (a) bicouches de DOPC / DOPG alignées mécaniquement entre plaques de verre à  $23^\circ\text{C}$ . (b) bicelles TBBPC / DCPC orientées à  $40^\circ\text{C}$ . (c) bicelles de DMPC/DCPC en présence de  $3\text{ mM YbCl}_3$  à  $40^\circ\text{C}$ . En pointillés sont représentées les « PISA wheel » obtenues par simulation (adapté de Park, et al, 2008 et Dufourc, et al., 2013).

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

L'objectif principal de cette thèse est le développement d'un nouveau modèle de biomembrane de type liposome, constitué de lipides biphényles dont l'anisotropie de susceptibilité magnétique positive entraîne une déformation en oblate des vésicules dans un champ magnétique intense.

Cette étude débutera par la synthèse chimique du lipide original TBBPC (déjà élaboré dans le cadre de la thèse de Cécile Loudet en 2006), ainsi que de deux nouveaux lipides biphényles HBBPC et OBBPC, qui sont à la base de la déformation en oblate. Nous nous attacherons ensuite à caractériser les propriétés physico-chimiques de ces lipides, ainsi que leur dynamique. Une comparaison avec les liposomes saturés DMPC, qui se déforment en prolata, sera effectuée au cours de ce travail. Nous caractériserons ces deux types de déformation en étudiant paramètre par paramètre l'équation d' Helfrich qui formalise cette déformation dans le champ magnétique. Enfin, nous analyserons les implications de ces nouveaux modèles membranaires dans l'étude RMN de biomolécules; nous essayerons, en particulier, de déterminer par RMN  $^{15}\text{N}$ , l'orientation par rapport à la membrane de deux peptides uniformément marqués  $^{15}\text{N}$ , la surfactine  $^{15}\text{N}$  et la protéine membranaire de l'enveloppe du bactériophage, nommée Pf<sub>1</sub>.

Ces différentes études ont été principalement réalisées par des techniques de RMN du solide, de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), de microscopie optique à contraste de phase interférentiel différentiel (DIC), d'épifluorescence et de cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-TEM). Nous développerons dans le chapitre II l'aspect théorique de ces techniques physiques, nécessaire à l'interprétation des résultats.

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

La caractérisation par RMN des solides- $^{31}\text{P}$  et  $^2\text{H}$  de la déformation des liposomes TBBPC et DMPC dans le champ magnétique sera présentée dans le chapitre IV, en se basant sur l'équation d' Helfrich. La RMN des solides- $^{31}\text{P}$  et la diffusion des rayons X seront employées dans le chapitre V pour caractériser la rémanence de la déformation des lipides biphényles en dehors du champ magnétique statique. Les microscopies optiques et électroniques seront utilisées pour visualiser les objets déformés pour la première fois. Le chapitre VI sera consacré à la caractérisation physico-chimique des nouveaux lipides synthétisés : HBBPC et OBBPC et à l'étude de leur dynamique par RMN des Solides  $^{31}\text{P}$  et  $^2\text{H}$ .

Le chapitre VII abordera l'étude par RMN des solides- $^{15}\text{N}$  de l'orientation des peptides et protéines marqués  $^{15}\text{N}$ , SF et PF1, par rapport à la membrane, lorsque ceux-ci sont insérés dans des liposomes biphényles et saturées ; l'objectif est de déterminer si les liposomes biphényles déformés peuvent être considérés comme de bons modèles pour mimer la membrane biologique et déterminer la structure et la topologie de biomolécules insérées au sein de ces membranes.

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

## CHAPITRE II

### **Techniques**

### **Physico-chimiques utilisées**



Le comportement des liposomes dans le champ magnétique est suivi par la technique de RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), ainsi que par d'autres techniques biophysiques comme la diffusion des rayons X aux petits angles et les microscopies optiques (de fluorescence, à contraste de phase et confocale) et électroniques (Cryo-microscopie électronique et Cryo-microscopie électronique de Sections Vitreuses).

## **I.1: La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

### **I.1.1: Présentation générale de la RMN et chimie quantique**

Dans ce paragraphe nous rappellerons dans un premier temps les principes de base de la résonance magnétique nucléaire, puis nous aborderons l'application de la RMN aux systèmes membranaires.

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est fondée sur les propriétés que possèdent les atomes. Il a été déterminé par la physique atomique qu'un noyau est en rotation selon un axe donné et tout noyau possède une charge électrique positive. La charge transportée lors de la rotation du noyau va générer un dipôle magnétique dans la direction de l'axe de rotation. En physique quantique on parlera de spin nucléaire pour décrire la rotation du noyau

Pour un noyau possédant un nombre quantique de spin nucléaire non nul  $I$ , un dipôle est induit et son amplitude est définie par le terme  $\mu$ , ce qui correspond au *moment magnétique nucléaire*. Cette valeur est caractéristique pour chacun des noyaux. Considérons que cette valeur soit un vecteur de la composante de  $\mu$ , orientée selon l'axe  $z$ ,  $\mu_z$ . Il est possible de relier le nombre quantique de spin  $I$  à la valeur  $\mu$  afin de s'approcher des valeurs énergétiques des états possibles. Le nombre de spin  $I$  et le moment magnétique  $\mu$  sont reliés par l'équation:

$$\gamma = \frac{2\pi\mu}{hI} \quad (\text{II.1})$$

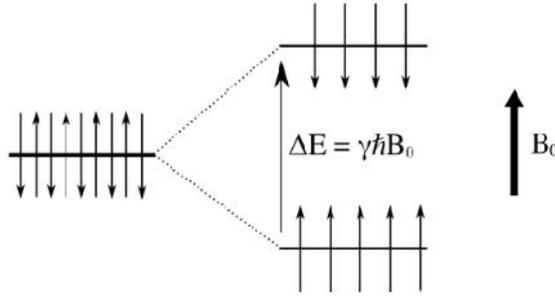
Avec  $h$ : la constante de Plank et  $\gamma$  le rapport gyromagnétique.

Afin de décrire les couplages de spins nucléaires avec leur environnement, le concept d'Hamiltonien de spins nucléaire,  $\hat{H}$ , a été introduit par Abragam (Abragam, 1961). Cet hamiltonien décompose en un hamiltonien relatif aux couplages externes et un hamiltonien correspondant aux couplages internes :

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

**a) Couplage externe: l'effet Zeeman**

Considérons un noyau placé dans le référentiel du laboratoire (x,y,z) dont le nombre de spin I ( $I_x, I_y, I_z$ ) est non nul. En l'absence de champ magnétique, l'aimantation nucléaire est nulle et de ce fait, l'ensemble des niveaux énergétiques ont la même valeur.



**Figure II.1.** Exemple d'éclatement des niveaux d'énergie d'un noyau de spin  $I=1/2$ . En l'absence de champ magnétique, les niveaux sont de même énergie (gauche). En présence de champ magnétique, il y a une levée de dégénérescence (droite).

En présence d'un champ magnétique statique  $B_0$  (parallèle à l'axe z), il y a levée de dégénérescence de l'énergie en  $2I+1$  niveaux dont la valeur se calcule grâce à la relation :

$$E_m = -\gamma m \hbar B_0 \quad (II.3)$$

m étant compris entre  $-I$  et  $+I$  et variant par pas d'une unité, les niveaux d'énergie sont séparés par :

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 = \hbar \omega_0 \quad (II.4)$$

Cette levée de dégénérescence est due à l'effet Zeeman, qui provient du couplage entre le moment magnétique  $\hat{\mu}$  et le champ magnétique  $B_0$ . Ce couplage peut s'écrire sous la forme d'un hamiltonien  $\hat{H}_0$  :

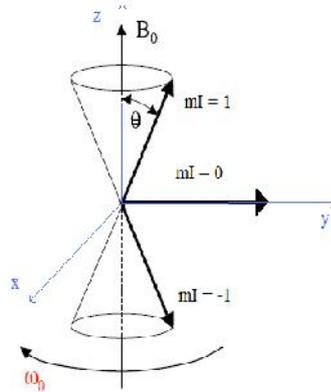
$$\hat{H}_0 = -\hat{\mu} \cdot \hat{B}_0 = -\gamma \hat{I} \cdot \hat{B}_0 \quad (II.5)$$

Quand  $B_0$  est parallèle à l'axe des z, l'hamiltonien peut s'écrire :

$$\hat{H}_0 = -\gamma B_0 \hat{I}_z \quad (II.6)$$

Prenons comme exemple un noyau deutérium. Son rapport gyromagnétique

$\gamma=41,07.10^6\text{s}^{-1}/\text{T}$  et  $I=1$ . Soumis à un champ magnétique intense  $B_0$  (parallèle à l'axe  $z$ ) le moment magnétique d'un noyau de deutérium peut alors s'orienter de trois façons selon la valeur de  $m_I=0, +1$  ou  $-1$  (figure II-2).



**Figure II.2.** Illustration des trois orientations possibles des moments magnétiques,  $\mu$  de noyaux deutérium ( $I=1$ ) placés dans un champ magnétique  $B_0$ . Seul le mouvement de précession des moments magnétiques dans l'état  $m_I=1$  est représenté. A l'équilibre de Boltzmann, la répartition des populations entre les 3 états est telle que l'aimantation résultante  $M_0$  est alignée avec  $B_0$ .

### b) Précession et fréquence de Larmor

Les transitions énergétiques ne peuvent être observées que si le système obéit à la loi de Bohr :

$$\Delta E = h\nu \quad (\text{II.7})$$

Cette relation conduit à une fréquence de résonance appelée fréquence de Larmor  $\nu_0$  correspondant à la fréquence du mouvement de précession du spin autour de l'axe directeur de  $B_0$  et caractéristique de l'effet Zeeman et dépendante du champ magnétique :

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (\text{II.8})$$

Ainsi, on définit la pulsation de Larmor :  $\omega_0 = 2\pi\nu_0$



**Figure II.3.** *Précession d'un spin nucléaire autour de l'axe directeur de  $\vec{B}_0$ . En l'absence de perturbation, les spins nucléaires précessent autour de l'axe du champ magnétique avec une pulsation  $\omega_0$ . Dans un système de spins, l'aimantation  $M$  résultante est colinéaire à l'axe directeur de  $\vec{B}_0$*

### c) Les couplages internes

Lorsque les champs magnétiques sont forts, l'interaction de Zeeman domine les autres couplages (Abragam 1961). L'axe  $B_0$  devient donc l'axe principal utilisé pour quantifier les spins et leurs niveaux d'énergies. Les couplages internes, quant à eux sont traités comme des perturbations des niveaux d'énergie de Zeeman.

Ces couplages internes décrivent les interactions entre les moments magnétiques nucléaires  $\hat{\mu}$  et les champs locaux présents dans l'échantillon (Mehring 1963) ainsi l'hamiltonien  $\hat{H}_{\text{int}}$  regroupe les autres interactions présentes dans l'échantillon :

$$\hat{H}_{\text{int}} = \hat{H}_{\sigma} + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q \quad (\text{II.9})$$

- L'hamiltonien  $\hat{H}_{\sigma}$  : représente le couplage entre le moment magnétique du noyau et le champ magnétique local induit par la circulation des électrons autour du noyau sous l'effet du champ magnétique statique. La densité de distribution des électrons autour du noyau et son anisotropie provoque un déplacement de la fréquence de résonance. C'est pour cette raison que cette interaction est également appelée anisotropie de déplacement chimique.  $\hat{H}_{\sigma}$  est dépendant de  $B_0$  et est sensible à tout ce qui perturbe l'environnement électrique du noyau.
- L'hamiltonien  $\hat{H}_J$  : décrit les interactions spin spin indirectes entre les moments magnétiques des noyaux d'une même molécule, via les électrons de liaisons. Les couplages  $J$ , indépendants de la valeur du champ  $B_0$ , peuvent être homo ou hétéro-nucléaires. Dans le couplage proton-proton, au-delà de trois liaisons les couplages deviennent faibles. Ce couplage est responsable des structures en multiplets observés en

RMN du liquide, il n'est pas utilisé en RMN du solide car il est très faible.

- L'hamiltonien  $\hat{H}_D$  : exprime l'interaction directe entre deux dipôles magnétiques  $\mu_A$  et  $\mu_B$  associés respectivement aux noyaux A et B voisins dans l'espace. Cette interaction indépendante de  $B_0$ , est aussi appelé couplage dipolaire et décroît rapidement ( $1/r^3$ ) avec la distance  $r_{AB}$ . Elle peut se produire entre deux noyaux de même nature (couplage homonucléaire) ou de nature différente (couplage hétéronucléaire).
- L'hamiltonien  $\hat{H}_Q$  : n'intervient que pour les noyaux possédant un moment électrique quadripolaire  $eQ$  ( $e$  est la charge électrique élémentaire et  $Q$  est le moment quadripolaire du noyau). Ce type d'interaction est retrouvé dans les noyaux de spins supérieurs à  $1/2$ , et dépend du moment électrique quadripolaire qui interagit avec le gradient de champ électrique (GCE) local. Ce gradient GCE créé par les charges extérieures au noyau (ions, électrons...); est fortement réduit dans un environnement très dynamique où l'anisotropie du GCE est fortement réduite voire s'annule dans un milieu liquide isotrope.

Ces interactions ne sont pas équivalentes et dépendent du type de noyau étudié et de la nature de l'échantillon. Les ordres de grandeurs des hamiltoniens sont donnés en Hertz dans le tableau II.1 pour des échantillons dits «solides» (interactions internes anisotropes) et pour des échantillons «liquides» (isotropes)

Couplage ( $\lambda$ )		$\mathcal{H}$ (Hz) (solides)	$\mathcal{H}$ (Hz) (liquides)
		typique	typique
<b>Zeeman</b>	$10^6-10^9$	$10^8$	$10^8$
<b>Spin-Spin Direct (D)</b>	$0-10^5$	$10^4$	0
<b>Spin Spin Indirect (J)</b>	$0-10^3$	$10^2$	$10^2$
<b>Blindage électronique (<math>\sigma</math>)</b>	$0-10^5$	$10^4$	$10^4$
<b>Quadrupolaire (Q)</b>	$0-10^9$	$10^6$	0

**Tableau II-1:** Ordre de grandeur des hamiltoniens dans le cas d'échantillons «solides» et «liquide»

Les trois principales interactions en RMN des liquides sont l'interaction Zeeman ( $\hat{H}_z$ ) et le blindage électronique ( $\hat{H}_\sigma$ ) et l'interaction spin-spin indirectes  $\hat{H}_J$ . En RMN des solides s'ajoutent en plus, et l'interaction électrique quadripolaire  $\hat{H}_Q$  et le couplage spin spin direct  $\hat{H}_D$ .

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

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

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

#### d) Principe d'une expérience de RMN :

- **l'équilibre :**

Un spin non nul précesse autour de l'axe z lorsqu'il est placé dans un champ magnétique (colinéaire à  $B_0$ ) à la fréquence de Larmor qui lui correspond. La répartition des spins sur les niveaux d'énergie obéit à la distribution statistique de Boltzmann et est à l'origine d'une aimantation notée,  $M_0$ , aimantation résultant de son alignement suivant l'axe du champ statique  $B_0$  (figure II-4).

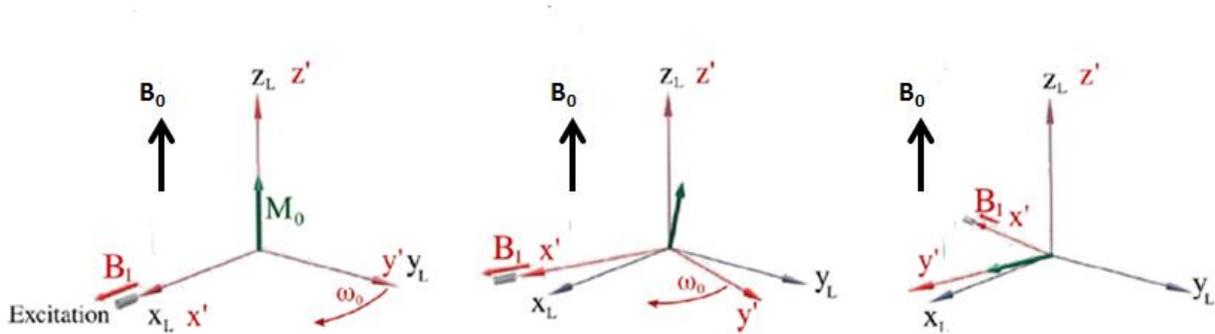
- **la perturbation :**

Le système est perturbé par un champ radiofréquence (RF)  $B_1$  oscillant à une fréquence  $\omega_1$ . Ce champ est produit par une bobine – solénoïde – traversée par un courant électrique. Pour cela la fréquence de ce champ oscillant est la même que la fréquence de précession du noyau grâce à la résonance de deux oscillateurs de la bobine excitatrice permettant le

transfert énergétique. Le champ  $B_1$  va interagir avec les spins et perturber ainsi leur distribution entre les différents niveaux d'énergies. Le champ radiofréquence RF provoque une bascule de l'aimantation résultante du groupe de spins placés dans un champ magnétique. Cette bascule est liée à un transfert d'énergie vers le système de spins. Ainsi, un nouveau référentiel contenant le champ  $B_1$  ( $X', Y', Z'$ ) est défini. Il tourne autour de l'axe  $Z'$ , parallèle à l'axe  $Z$  du référentiel de laboratoire ( $X_L, Y_L, Z_L$ ). Ce champ  $B_1$  est appliqué perpendiculairement à  $B_0$  le long de l'axe  $x'$  (du référentiel tournant) pendant une durée :

$$\tau = \frac{\theta}{\gamma B_1} \quad (\text{II.9})$$

l'aimantation  $M_0$  bascule d'un angle  $\theta$  le long de l'axe  $y'$ .

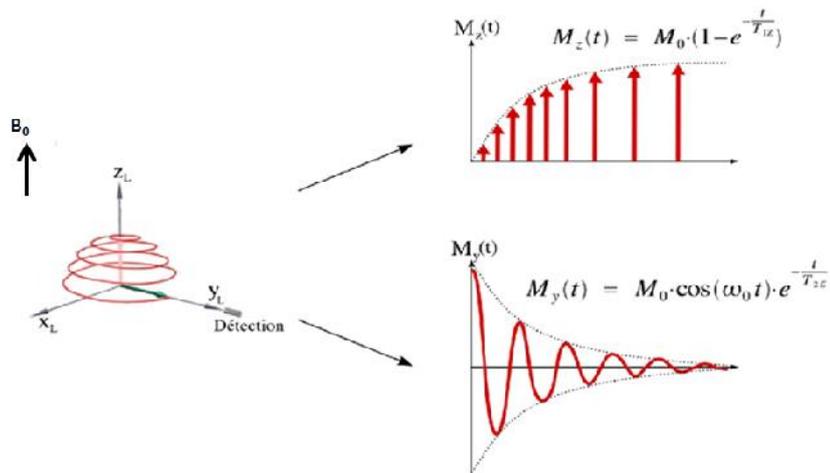


**Figure II-4 :** Schéma de la perturbation de l'aimantation lors de l'application du champ radiofréquence  $B_1$  sur l'axe  $x'$  du référentiel tournant.

- **La relaxation et la détection :**

Après l'arrêt du champ de radiofréquence, on observe le retour à l'équilibre du système, l'aimantation va ainsi précesser dans le plan  $zy$  jusqu'à la position d'équilibre, avec un délai  $\tau$  calculé pour que cette dernière soit maximale à  $\theta = 90^\circ$ . Cette orientation selon l'axe  $Y'$  situé dans le plan ( $X_L, Y_L$ ) est maintenue tout au long de l'application du champ oscillant  $B_1$  (figure II-5). Après cela le système retrouve progressivement vers son état d'énergie initial avec  $M_0$  colinéaire à  $B_0$ , et où l'aimantation réapparaît le long de l'axe  $Z_L$  selon le fonction exponentielle traduit dans l'équation suivante :

$$M_z(t) = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_{1z}}}) \quad (\text{II.10})$$



**Figure II-5 :** Schéma représentant l'acquisition RMN suivant l'axe  $Y_L$  du référentiel du laboratoire (à gauche) et des évolutions de l'aimantation durant la relaxation selon l'axe  $Z_L$  (en haut à droite) et suivant l'axe  $Y$  (en bas à droite). L'acquisition de la FID est réalisée selon l'axe  $Y_L$ .

La relaxation longitudinale correspond au retour au niveau de basse énergie ("parallèle") des spins excités. Le temps caractéristique  $T_{1Z}$  ou temps de relaxation longitudinale existe à cause des échanges d'énergie des spins et des mouvements thermiques du système (réseau) d'où son nom de relaxation « spin-réseau ».  $T_{1Z}$  correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation longitudinale retourne à 63 % de sa valeur finale.

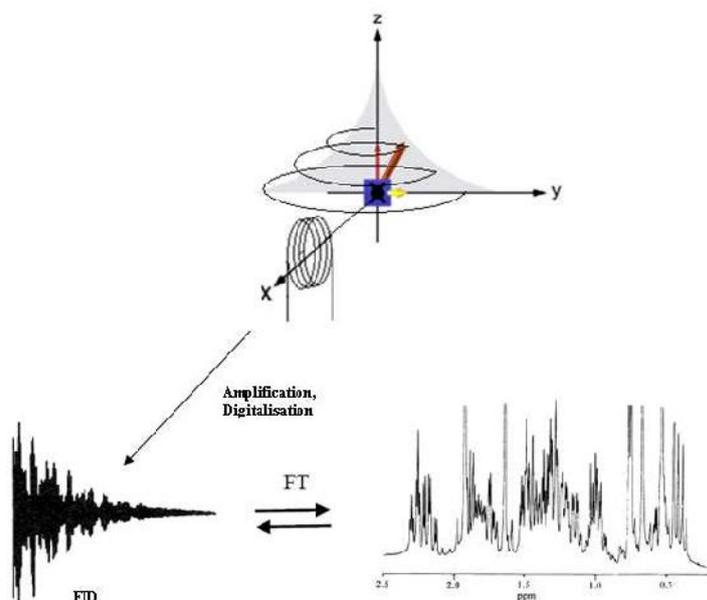
De façon identique dans le plan  $(X_L, Y_L)$ , la perte d'aimantation est modulée par la précession de Larmor selon une cosinusoïde multipliée par une exponentielle décroissante (figure II-5):

$$M_Y(t) = M_0 \cos(\omega_0 t) \cdot e^{-\frac{t}{T_{2E}}} \quad (\text{II.11})$$

La relaxation transversale est due au déphasage des spins: le déphasage est lié aux interactions spins-spins qui créent des hétérogénéités de champ, et donc de fréquence de précession. Les spins n'ayant pas exactement la même fréquence, ils se déphasent rapidement. Cette chute de l'aimantation transversale suit en général une courbe exponentielle décroissante caractérisée par le temps  $T_{2E}$ . Le  $T_{2E}$  correspond au temps mis par l'aimantation transversale pour revenir à 37 % de sa valeur initiale.

La bobine réceptrice permet de détecter ce phénomène de relaxation et induire un courant électrique. Ce signal appelé « signal de précession libre des spins ou FID » (Free Induction Decay) ainsi obtenu est numérisé puis converti analogiquement et numériquement avant

d'être traité et interprété. Grâce une transformée de Fourier de la FID qui effectue le passage des données temporelles dans le domaine fréquentiel (le spectre RMN), le signal est alors constitué de raies lorentziennes dont les fréquences sont celles des cosinusoïdes dont elles sont les transformées (figure II-6).



**Figure II-6** : Utilisation de la transformée de Fourier (FT) pour passer du domaine temporel (gauche) à celui des fréquences (droite). La FID (gauche), constituée de cosinusoïdes est transformée en un spectre constitué de raies Lorentziennes.

En RMN des liquides, en champ très homogène, le temps de relaxation  $T_{2E}$  peut-être estimé à partir de la largeur à mi-hauteur d'une raie de Lorentz obtenue par transformée de Fourier

### **I.1.2: la RMN des biomembranes :**

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

Le phosphore est naturellement présent au niveau des têtes polaires de tous les phospholipides. Son étude ne nécessite donc pas un marquage préalable des molécules. De plus, l'abondance naturelle du  $^{31}\text{P}$  de 100% ainsi que le rapport gyromagnétique élevé, permettent ainsi une bonne détection avec des temps d'acquisition relativement courts (<1heure). Il constitue donc un bon candidat pour sonder la dynamique des membranes.

L'abondance naturelle du deutérium est quant à elle très faible. Cependant, ses propriétés en font un marqueur privilégié de la dynamique des chaînes lipidiques. Son utilisation nécessite néanmoins un marquage isotopique au préalable.

La RMN des solides- $^{31}\text{P}$  permettra d'étudier l'orientation et la dynamique lipidique au niveau de la tête polaire ainsi que la phase lipidique adoptée par le modèle membranaire étudié suivant les conditions expérimentales utilisées. Tandis que la RMN du  $^2\text{H}$  nous informera sur la dynamique au niveau des chaînes aliphatiques par mesure des éclatements quadrupolaires.

Pour étudier l'orientation des peptides par rapport à la membrane, un marquage isotopique  $^{15}\text{N}$  sera effectué. Il sera possible de détecter le couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  par des expériences de RMN des solides- $^{15}\text{N}$  en statique de type CP (Cross Polarisation, voir paragraphe II.1.3)

**a) Le phosphore  $^{31}\text{P}$  et l'azote  $^{15}\text{N}$ : Anisotropie de déplacement chimique.**

Le phosphore  $^{31}\text{P}$  ainsi que l'azote  $^{15}\text{N}$  sont des noyaux de spin  $\frac{1}{2}$ . Les interactions prédominantes sont donc: l'effet Zeeman, l'anisotropie de déplacement chimique et le couplage dipolaire phosphore-proton, ou azote-proton. Cette dernière peut être facilement éliminée à l'aide d'un découplage des protons. Seules les interactions liées à l'effet Zeeman et au blindage électronique sont alors considérées. Les électrons circulant autour du noyau de phosphore ou azote créent un champ magnétique local opposé au champ magnétique  $B_0$ . On parle alors d'effet d'écran qui dépend du mode de liaison du noyau phosphore ou azote avec ses voisins et présente généralement un caractère anisotrope. De ce fait, le champ effectif perçu par les noyaux s'exprime grâce à la relation:

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 - \sigma\vec{B}_0 = B_0(1 - \sigma) \quad (\text{II.12})$$

La fréquence de résonance s'obtient par :

$$\omega = \omega_0(1 - \sigma) \quad (\text{II.13})$$

Avec  $\omega_0$  : la fréquence de Larmor.

Et  $\sigma$  : le tenseur d'anisotropie de déplacement chimique (tenseur d'écran).

L'effet d'écran sera minimal le long de l'axe ayant la plus faible densité électronique et maximal le long de l'axe ayant la plus forte densité électronique.

- Le tenseur d'anisotropie de déplacement chimique ( $\sigma$ )

*i. Cas des cristaux :*

Le tenseur  $\sigma$ , est diagonalisé dans son système d'axe principal:

$$\sigma = \begin{vmatrix} \sigma_{xx} & & \\ & \sigma_{yy} & \\ & & \sigma_{zz} \end{vmatrix} \quad (\text{II.14})$$

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

L'hamiltonien résultant pour les noyaux  $^{31}\text{P}$  et  $^{15}\text{N}$  s'écrit alors (Dufourc, Mayer et al. 1992)

$$\hat{H} = \hat{H}_z + \hat{H}_\sigma = -\gamma\hbar\hat{I}_z\hat{B}_0(1-\sigma) \quad (\text{II.15})$$

Ainsi, dans le référentiel du laboratoire, celui-ci s'exprime par la formule suivante :

$$\hat{H} = -\bar{h}\omega_0\hat{I}_z + \sigma_{iso} + \frac{2}{3}\Delta\sigma\left[\frac{3\cos^2\beta-1}{2} + \frac{\eta}{2}\cos 2\alpha\sin^2\beta\right] \quad (\text{II.16})$$

Cet hamiltonien fait apparaître les angles  $\alpha$  et  $\beta$  qui sont les angles d'Euler permettant le passage des axes principaux du tenseur vers les axes du référentiel du laboratoire.  $\sigma_{iso}$  est la moyenne isotrope du tenseur d'écran

$$\sigma_{iso} = \text{Tr}\{\bar{\sigma}\}/3 \quad (\text{II.17})$$

Quant à  $\Delta\sigma$ , il représente l'anisotropie de déplacement chimique,

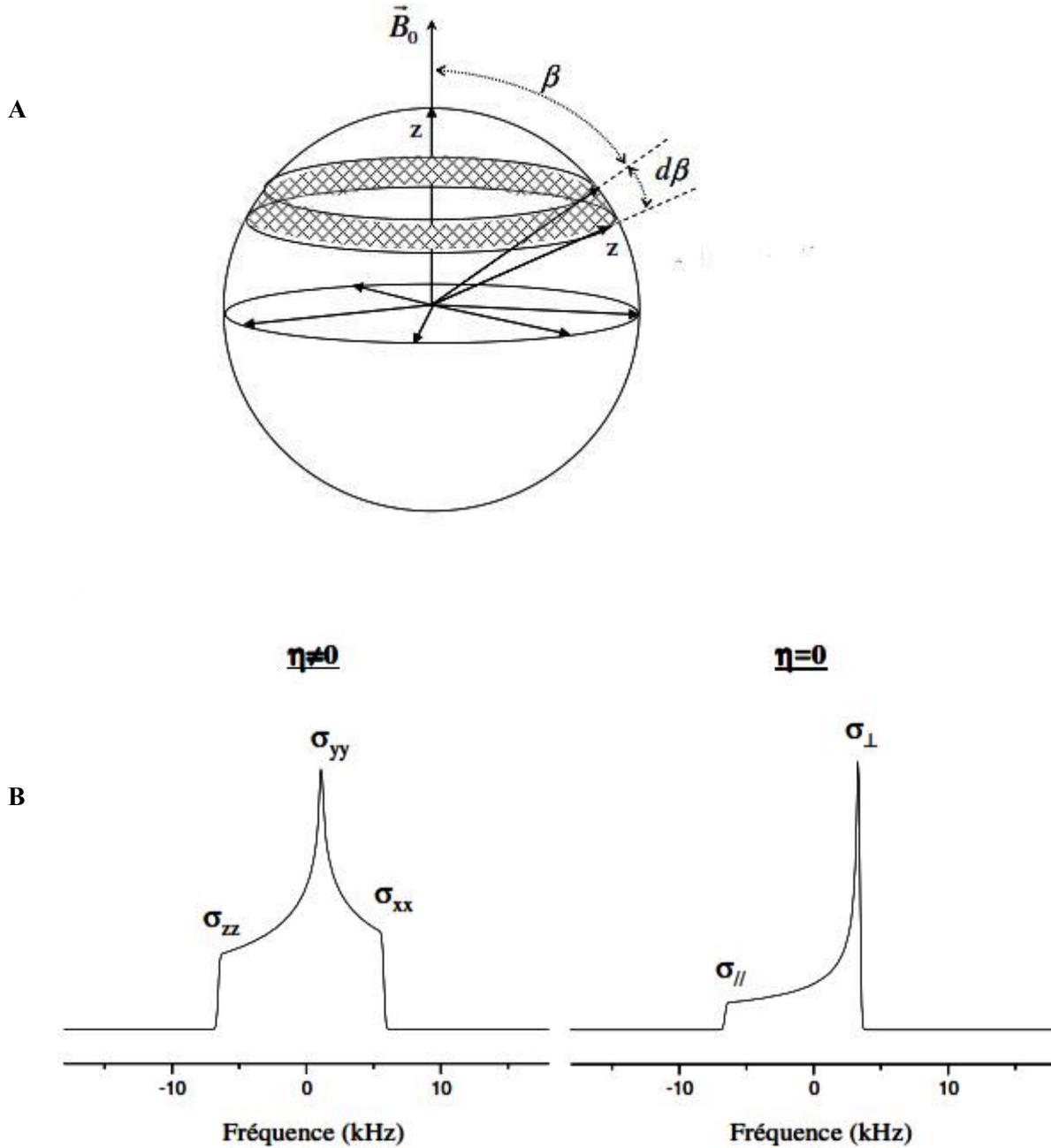
$$\Delta\sigma = \sigma_{zz} - [(\sigma_{xx} + \sigma_{yy})/2] \quad (\text{II.18})$$

Et  $\eta$  représente le paramètre d'asymétrie :

$$\eta = (\sigma_{xx} - \sigma_{yy})/\sigma_{zz} \text{ et } 0 \leq \eta \leq 1 \quad (\text{II.19})$$

Dans une poudre poly-cristalline, les atomes de phosphore sont orientés d'une façon aléatoire par rapport au champ magnétique. Le spectre RMN se compose d'une superposition de fréquences de résonance provenant des diverses orientations des monocristaux par rapport à  $B_0$ , pondérées par leur probabilité d'existence. En d'autres termes, les axes principaux (notés  $z$  dans la figure II.7) de tous les tenseurs de déplacement chimique sont distribués sur la surface d'une sphère. La probabilité d'avoir cet axe  $z$  orienté entre  $\beta$  et  $d\beta$  ( $\beta$  étant l'angle formé entre l'axe principal du nuage électronique du phosphore et le champ magnétique  $\vec{B}_0$ ) est alors égale à :

$$P(\beta) = 1/2 \sin \beta d\beta \quad (\text{II.20})$$



**Figure II.7:** A) Représentation de la distribution sphérique des axes  $z$  associés aux tenseurs de blindage électronique des atomes de phosphore dans le cas d'un échantillon polycristallin. B) Spectres RMN- $^{31}\text{P}$  types, associés à des molécules dont le paramètre d'asymétrie est différent de zéro (spectre de gauche) et égal à zéro (spectre de droite).

La figure II.7 B) représente le type de spectre de phosphore obtenu dans le cas de molécules dont le paramètre d'asymétrie  $\eta$  différent de zéro (spectre de gauche) et égal à zéro (spectre de droite). Le spectre de gauche nous permet d'accéder aux valeurs des composantes principales du tenseur d'écran ( $\sigma_{xx}$ ,  $\sigma_{yy}$ ,  $\sigma_{zz}$ ) en considérant la fréquence des épaules du spectre ainsi que le pic central. Ces valeurs de tenseur ont été déterminées pour des vésicules de DMPC à 168°K, une température pour laquelle tous les mouvements de lipides sont figés,  $\sigma_{xx}=-123$  ppm,  $\sigma_{yy}= -24$  ppm,  $\sigma_{zz}=147$  ppm (Dufourc, Mayer et al. 1992). Par ailleurs, nous constatons dans le spectre à droite que l'orientation la moins favorable correspond à  $\beta=0^\circ$  (parallèle à  $B_0$ ) et celle la plus probable à  $\beta=90^\circ$  (perpendiculaire à  $B_0$ )

ii. Cas des bicouches lipidiques :

Les lipides d'une bicouche lipidique présentent un certain nombre de mouvements moléculaires anisotropes modifiant la forme du spectre de poudre « solide » (II.10 b et c). Les phospholipides tournent rapidement sur eux-mêmes selon un axe principal de rotation, ce mouvement de rotation rapide, colinéaire à la normale  $\vec{n}$  de la bicouche, confère au lipide une symétrie axiale (avec le paramètre de symétrie :  $\eta=0$ ). Ainsi, les composantes du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique  $\sigma_{xx}$  et  $\sigma_{yy}$  (perpendiculaire à l'axe principal de mouvement z) deviennent identiques. L'axe principal x étant parallèle à la normale  $\vec{n}$  de la bicouche, ceci simplifie le tenseur statique en un tenseur résiduel exprimé dans le référentiel lié à la bicouche :

$$\sigma = \begin{pmatrix} \sigma_{\perp} & & \\ & \sigma_{\perp} & \\ & & \sigma_{//} \end{pmatrix} \quad (\text{II.21})$$

Avec  $\sigma_{iso}$  la partie isotrope du tenseur définie comme :

$$\sigma_{iso} = \frac{1}{3}(\sigma_{//} + 2\sigma_{\perp}) \quad (\text{II.22})$$

D'après la relation définie dans l'équation II.18, l'anisotropie de déplacement chimique devient :

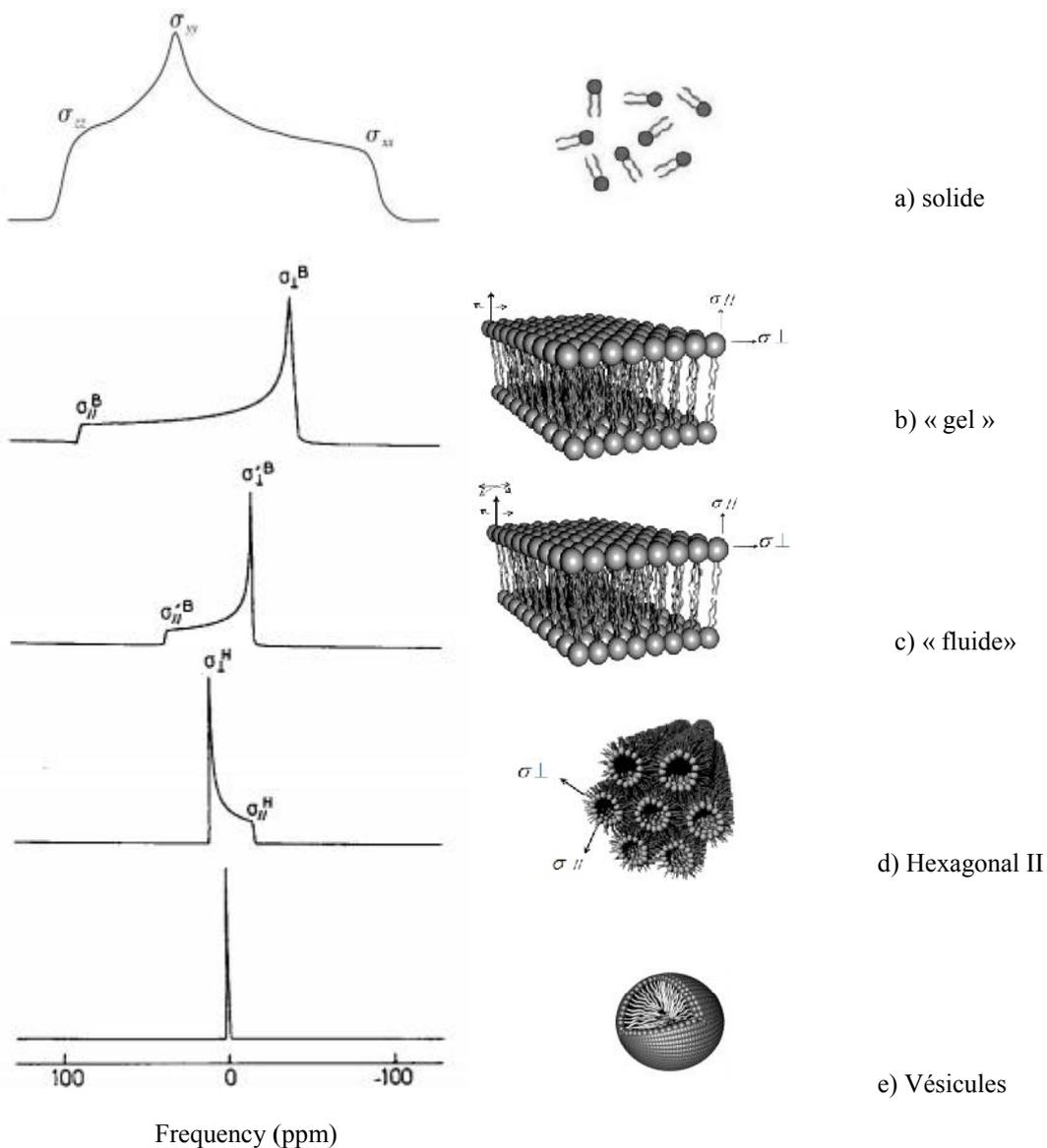
$$\Delta\sigma = \sigma_{//} - \sigma_{\perp} \quad (\text{II.23})$$

Sachant que les lipides dans les bicouches présentent une symétrie axiale, la fréquence de résonance du phosphore dans les vésicules non orientées de phospholipides déjà déterminée dans l'équation II.16, est donnée par :

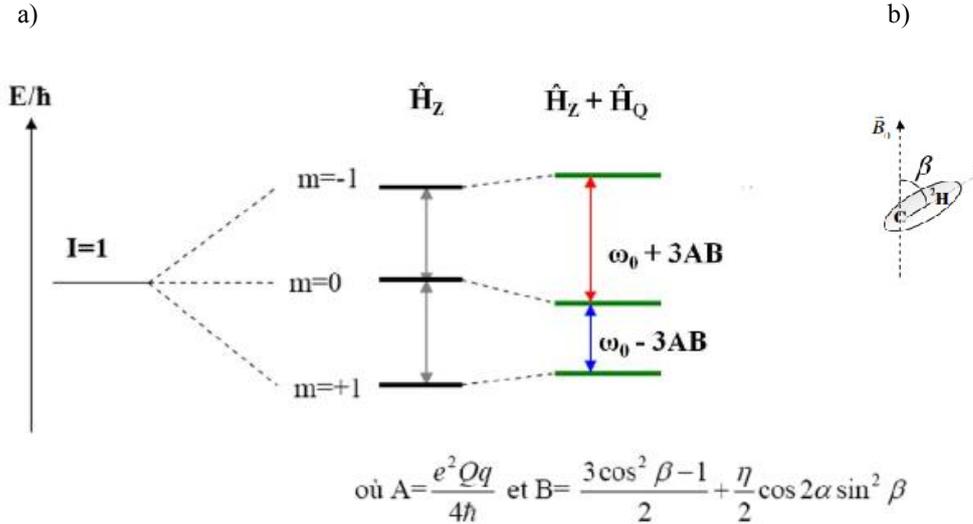
$$\nu(\beta) = \nu_0 \left[ 1 - \sigma_{iso} - \frac{2}{3} \Delta\sigma \left( \frac{3 \cos^2 \beta}{2} \right) \right] \quad (\text{II.24})$$

Les spectres seront alors composés de la superposition des différentes fréquences de résonance pondérées par leur probabilité d'existence. La forme de spectres RMN du phosphore donne par conséquent des informations sur la dynamique et l'orientation des têtes des phospholipides dans les membranes. La figure II.8 représente les formes des spectres RMN  $^{31}\text{P}$  possibles en fonction du type de phase considérée:

- Un échantillon ne possédant aucun mouvement présente le spectre de poudre, avec les valeurs propres du tenseur de blindage électronique :  $\sigma_{xx}$ ,  $\sigma_{yy}$ ,  $\sigma_{zz}$  (figure II.8.a)
- La figure II.8.b. correspond à un spectre de poudre auquel on a introduit un mouvement à symétrie axiale (induite par la rotation du groupement phosphate assez rapide au sein de la bicouche même à l'état gel) et dont les éléments principaux du tenseur d'anisotropie de déplacement chimique sont  $\sigma_{\parallel}$  et  $\sigma_{\perp}$ . Ce spectre est caractéristique d'une phase lamellaire «gel»  $L_{\beta}$ .
- Si en plus de ce mouvement de rotation axiale, il apparaît une oscillation autour du même axe et des mouvements de la tête polaire, l'anisotropie de déplacement chimique va diminuer et la forme spectrale va s'affiner : spectre de poudre caractéristique d'une phase lamellaire fluide  $L_{\alpha}$  (figure II.8.c).
- Dans le cas des phases hexagonales ( $H_{II}$ ), une rotation rapide autour de l'axe des cylindres conduit au spectre II.8.d.
- Pour des petites vésicules de phospholipides isotropes (leur diamètre étant inférieur à 100 nm), le spectre obtenu est constitué d'une seule raie de résonance, centrée sur la fréquence isotrope  $\nu_{iso}$  (figure II.8.e).



**Figure II.8** : Spectre RMN du  $^{31}\text{P}$  correspondant aux différentes phases lipidiques (image adaptée de (Dufourc 1986))



**Figure II.9 :** a) Niveaux d'énergies associés à un spin  $I=1$  soumis aux interactions Zeeman et quadrupolaire. b) Représentation de l'angle  $\beta$  entre les liaisons  $C-^2H$  et le champ magnétique  $\vec{B}_0$ . Les parties ovales grisées correspondent au CGE du deutérium, dont l'axe principal est colinéaire aux liaisons  $C-^2H$ .

### b. Le deutérium : interaction quadrupolaire.

L'abondance naturelle du deutérium est très faible. Cependant, ses propriétés en font un marqueur privilégié des lipides. Son utilisation nécessite néanmoins un marquage préalable.

L'atome de deutérium possède un spin nucléaire  $I=1$ , ceci implique qu'il présente un moment électrique quadrupolaire, noté  $eQ$ , avec  $e$  : la charge élémentaire de l'électron et  $Q$  le moment quadrupolaire du noyau. Avec ce type de noyau, l'interaction interne qui prédomine est l'interaction quadrupolaire, qui traduit le couplage entre le moment quadrupolaire du noyau et GCE. Dans le référentiel du laboratoire, l'hamiltonien total s'écrit (Davis 1983):

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_Q = -\hbar \omega_0 \hat{I}_Z + \frac{e^2 q Q}{4I(2I-1)} (3\hat{I}_Z^2 - \hat{I}^2) \left[ \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} + \frac{\eta \sin^2 \beta \cos 2\alpha}{2} \right] \quad (\text{II.25})$$

Avec  $\alpha$  et  $\beta$  étant les angles d'Euler de la transformation des coordonnées permettant de passer du système GCE à celui associé au référentiel du laboratoire (figure II.9.b) Le terme  $e^2 q Q / 4I(2I-1)$  est le gradient de champ électrique au noyau ;  $\eta$  le paramètre d'asymétrie du GCE ( $0 \leq \eta \leq 1$ ) et  $\hat{I}$  l'opérateur de spin ( $\hat{I}^2 = \hat{I}_x^2 + \hat{I}_y^2 + \hat{I}_z^2$ ).

Comme nous l'avons mentionné pour le noyau phosphore, il est donc possible de déterminer les niveaux d'énergie associés à cet Hamiltonien (figure II.9.a). Il existe donc deux transitions possibles entre les trois niveaux d'énergie déterminés ( $I=1$ ). Ceci conduit à deux raies

(doublet) de résonance sur le spectre, centrées sur la fréquence de Larmor. L'écart entre les deux raies est appelé éclatement quadrupolaire et correspond à :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \frac{e^2 q Q}{h} \left[ \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} + \frac{\eta}{2} \sin^2 \beta \cos 2\alpha \right] \quad (\text{II.26})$$

Le terme  $\frac{e^2 q Q}{h}$  représente la constante de couplage quadrupolaire statique et est généralement noté  $A_Q$ . Dans le cas des liaisons méthylènes carbone-deutérium C-<sup>2</sup>H, que l'on retrouve sur les chaînes deutérées des lipides,  $A_Q=167$  KHz (Burnett 1971). L'équation II.26 se simplifie :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \left[ \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} + \frac{\eta}{2} \sin^2 \beta \cos 2\alpha \right] \quad (\text{II.27})$$

Ou l'angle  $\beta$  définit l'orientation des liaisons C-<sup>2</sup>H par rapport à l'axe z du référentiel du laboratoire, parallèle au champ magnétique  $\vec{B}_0$  (figure II.9.b).

*i. Cas des cristaux :*

Par analogie avec ce qui a été vu précédemment pour le noyau phosphore pour des poudres de phospholipides, les liaisons C-<sup>2</sup>H sont orientées selon une distribution sphérique par rapport au champ magnétique. Les spectres RMN du deutérium correspondent alors à la superposition des raies de résonance pondérées par leur probabilité d'existence  $P(\beta)$ . De même pour les molécules à symétrie axiale ( $\eta=0$ , figure II.10.e), l'orientation la plus probable  $\beta=90^\circ$  correspond aux raies les plus intenses dont l'éclatement quadrupolaire est égal à :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{4} A_Q \quad (\text{II.28})$$

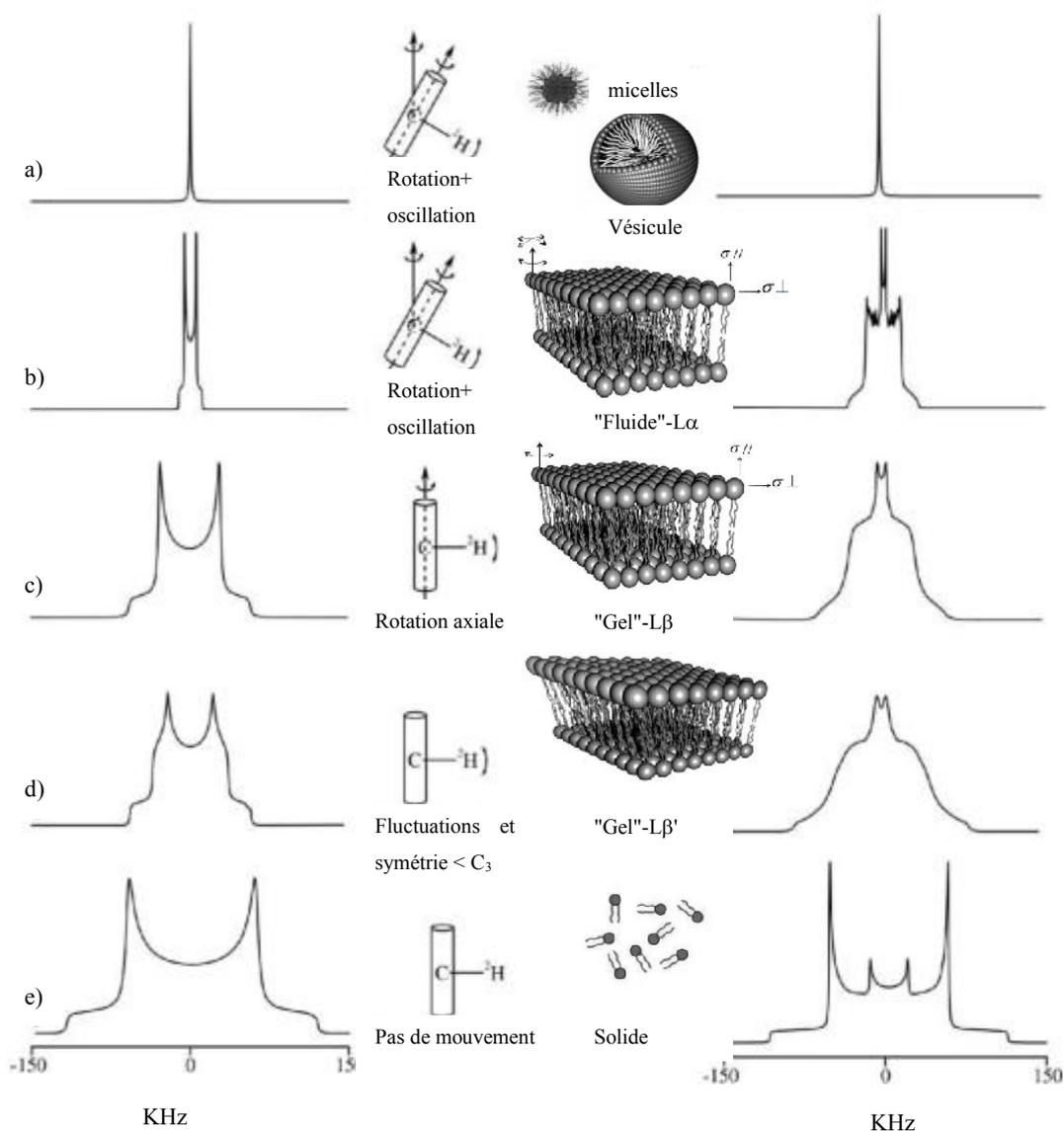
*ii. Cas des bicouches lipidiques :*

Lorsque les lipides sont engagés dans une bicouche en phase fluide, ceux-ci tournent rapidement sur eux-mêmes induisant ainsi une symétrie axiale. Ainsi, le paramètre d'asymétrie  $\eta$  vaut zéro. L'équation de l'éclatement quadrupolaire (II.27) se simplifie alors :

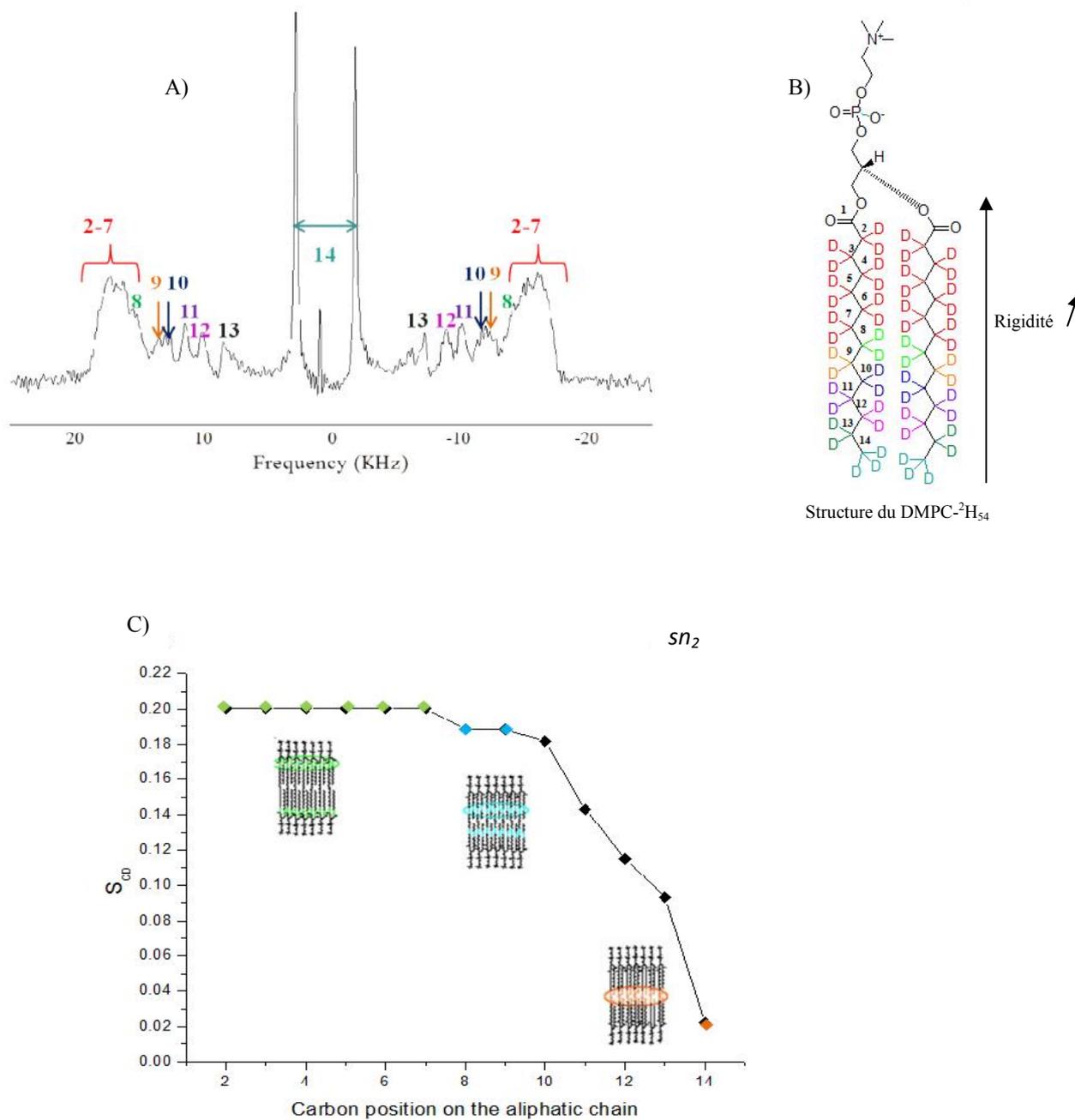
$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} A_Q \left[ \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right] \quad (\text{II.39})$$

Comme pour la RMN du phosphore, ces mouvements vont moduler la forme des spectres RMN du deutérium. Plus le désordre du système augmente (fluctuations, rotation axiale, oscillation...), plus l'interaction quadrupolaire est moyennée et les éclatements quadrupolaires deviennent plus petits (figure II.10.b, c et d). Dans le cas de petites vésicules, dont les mouvements de réorientation sont considérés isotropes (temps de corrélation courts), une seule raie isotrope est observée en RMN, à la fréquence de déplacement chimique isotrope des liaisons C-<sup>2</sup>H (figure II.10.a).

Dans le cas des échantillons qui se déforment dans le champ magnétique, comme les liposomes biphényles ou DMPC., les spectres obtenus présentent des raies mieux résolues par rapport à un spectre de poudre classique puisque certaines orientations par rapport au champ magnétique sont privilégiées. La figure II.11.a présente le spectre RMN-<sup>2</sup>H obtenu pour des liposomes DMPC : DMPC-D54 (95 :5), où les chaînes aliphatiques des lipides DMPC sont totalement deutérées et où la majorité des lipides s'orientent perpendiculairement à B<sub>0</sub>.



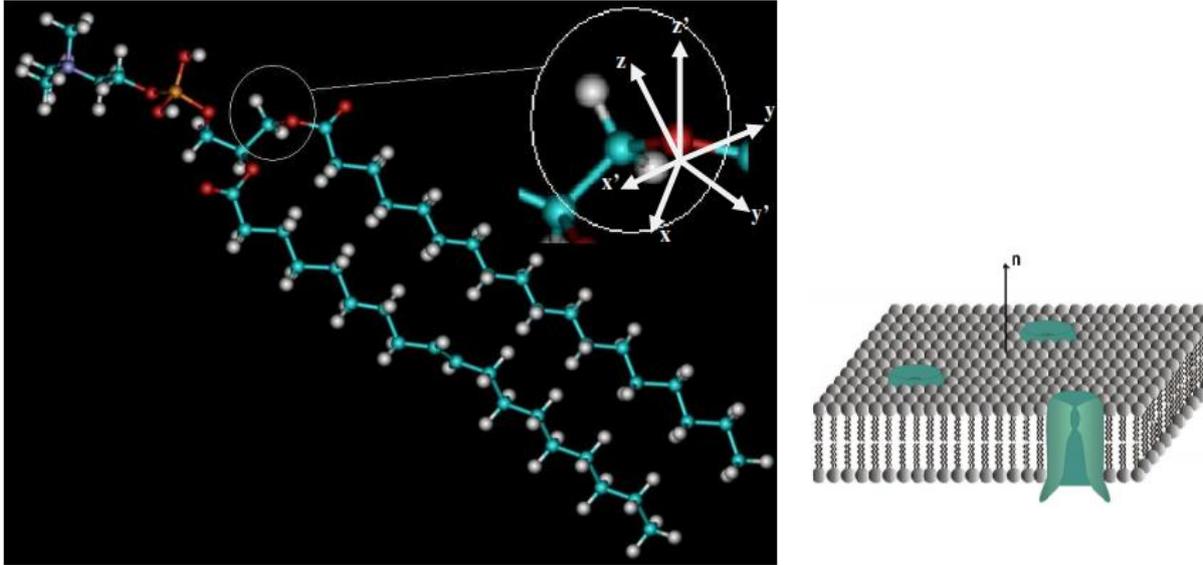
**Figure II.10 :** Influence des mouvements moléculaires et de la phase considérée sur la forme des spectres RMN du deutérium (adaptée de(Dufourc 1986)). A droite : spectres simulés pour un lipide de type DMPC- $^2H_{54}$ , A gauche : spectres simulés pour un seul noyau deutérium.



**Figure II.11** : Exemple d'un profil d'ordre de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  dans des liposomes DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$ . A) Spectre RMN- $^1\text{H}$  correspondant aux liposomes DMPC : DMPC- $d_{54}$  se déformant en prolata. B) Structure moléculaire du DMPC- $^2\text{H}_{54}$ . C) Etude du profil d'ordre présentant l'évolution du paramètre d'ordre  $S_{CD}$  en fonction de la position des atomes de deutérium sur la chaîne lipidique  $sn_2$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$ .

Afin de décrire l'amplitude des mouvements moléculaires membranaires, Seelig précédé par de Gennes, P.G en 1968 ont introduit la notion de paramètre d'ordre permettant de quantifier l'état d'organisation d'un système (Seelig, 1977; De Gennes, 1974)

Pour cela, considérons une bicouche membranaire dont les molécules sont animées uniquement de mouvements à symétrie axiale ( $\eta = 0$ ). Attachons un système d'axes P(x, y, z) à un site particulier d'une molécule (par exemple une liaison C-<sup>2</sup>H, l'axe z étant colinéaire à cette liaison) et un autre système d'axes B (x', y', z') associé à la normale  $\vec{n}$  de la bicouche



**Figure II.12 :** Structure de la diméthylphosphatidylcholine et représentation des axes P(x, y, z) et B (x', y', z')

Les fluctuations dans l'espace et dans le temps des axes de P par rapport à  $\vec{n}$  peuvent alors être estimées par les paramètres d'ordre, noté  $S_{ii}$ , qui s'expriment :

$$S_{ii} = \frac{3\langle \cos^2 \theta_i \rangle - 1}{2} \quad (\text{II.30})$$

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

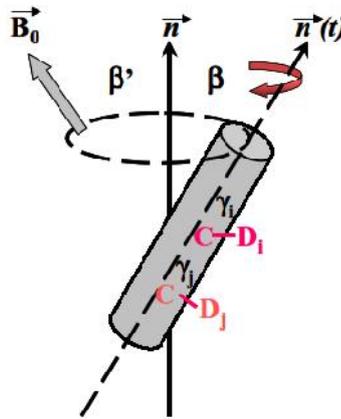
$$\eta = \frac{(S_{xx} - S_{yy})}{S_{zz}} = 0, \text{ on obtient :}$$

$$S_{zz} = -2S_{xx} = -2S_{yy} \quad (\text{II.31})$$

Ainsi, grâce à la rotation du lipide sur lui-même, le paramètre d'ordre  $S_{zz}$  est suffisant pour rendre compte des fluctuations de la molécule dans la phase lamellaire. L'équation II.29 peut alors s'écrire :

$$\Delta\nu_Q(\beta') = \frac{3}{2}A_Q \left[ \frac{3\cos^2\beta' - 1}{2} \right] S_{zz} \quad (\text{II.32})$$

Avec  $\beta'$  l'angle entre la normale à la bicouche  $\vec{n}$  et le champ magnétique  $B_0$ .



**Figure II.13:** Modèle de réorientation anisotrope pour une molécule rigide dans un environnement membranaire. La normale à la bicouche est définie par l'axe  $\vec{n}$ . La position de l'axe principal du mouvement est définie par l'angle  $\beta$ , par rapport à la normale à la bicouche. L'angle  $\beta'$  indique l'orientation de la bicouche par rapport au champ magnétique  $B_0$ .

Sauf dans le cas des molécules rigides ne présentant pas de fluctuations intramoléculaires (Aussenac 2002), les paramètres d'ordre sont difficiles à différencier, c'est pour cela, qu'on définit le paramètre d'ordre orientationnel de la liaison C-D qui donne une mesure globale de l'ordre résiduel dans la membrane par rapport à la bicouche.

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

$$S_{CD} = \prod_{j=1}^n S_{zz}^j \quad (\text{II.33})$$

Où  $j$  dénombre les mouvements anisotropes à symétrie axiale distincts présents dans le système. L'éclatement quadrupolaire est mesuré entre les pics les plus intenses ( $\beta' = 90^\circ$ ) et l'équation II.32 se simplifie en :

$$\Delta\nu_Q(90^\circ) = \frac{3}{4} A_Q S_{CD} \quad (\text{II.34})$$

Il est en est de même pour les liposomes de DMPC qui se déforment de telle sorte que la majorité des lipides s'orientent d'une manière perpendiculaire à  $\vec{B}_0$ . La figure II.11.A présente le spectre RMN- $^2\text{H}$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (deutéié sur ses deux chaînes sn<sub>1</sub> et sn<sub>2</sub>, des positions 2 à 14), constitutif des liposomes DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$ . L'orientation privilégiée  $n \perp B_0$ , entraîne une amélioration de la résolution du spectre, permettant de mesurer facilement les éclatements quadrupolaires correspondants aux différents groupes C- $^2\text{H}$  sur les chaînes du lipide. Ces groupements aliphatiques n'ont pas la même dynamique suivant leur emplacement sur la chaîne lipidique, ce qui se traduit par des éclatements quadrupolaires plus ou moins grands. La mesure des ces derniers permet de calculer les paramètres d'ordre  $S_{CD}$  d'après l'équation II.35 ; il est ensuite possible d'établir le profil d'ordre reportant les  $S_{CD}$  par rapport à la position des atomes de deutérium sur la chaîne aliphatique des lipides (figure II.11.C). On constate que plus on remonte sur la chaîne d'acide gras vers le squelette glycérol, plus l'éclatement quadrupolaire et donc le paramètre d'ordre est grand, ce qui est synonyme d'une rigidité du système plus importante. La position 2 sur la chaîne aliphatique présente deux valeurs de  $S_{CD}$ , Ceci est dû à la proximité du carbonyle et du glycérol qui rend les deutériums non équivalents. Nous constatons également que les  $S_{CD}$  obtenus pour les deutériums situés dans la région supérieure des chaînes sont relativement constants. On parle d'ailleurs couramment de la région « plateau ». Ceci provient de l'arrangement des têtes hydrophiles qui imposent des contraintes stériques et donc un mouvement restreint dans cette zone. Au-delà de la région « plateau », les  $S_{CD}$  diminuent. Le groupement méthyle terminal possède un plus faible  $S_{CD}$  que le reste de la chaîne en raison d'un degré de liberté supplémentaire (rotation autour de l'axe  $C_3$ ).

Il est important de mentionner que la RMN du deutérium permet également une estimation de la vitesse des mouvements moléculaires cités précédemment. Ceci se fait en mesurant les temps de relaxation magnétiques nucléaires

Il est intéressant de préciser que le paramètre d'ordre  $S_{CD}$  peut être décomposé en trois contributions :  $S_{\text{coll}}$ ,  $S_{\text{intra}}$ ,  $S_{\text{mol}}$  (Aussenac 2003).

- $S_{\text{coll}}$  décrit les mouvements collectifs et déformation des membranes (ondulation des bicouches)

- $S_{intra}$  est associé aux mouvements intramoléculaires, comme des changements conformationnels de la chaîne lipidique induits par des isomérisations gauche-trans des liaisons C-C.
- $S_{mol}$  tient compte des mouvements moléculaires, comme la rotation du lipide autour de son axe principal, la diffusion latéral du lipide, la réorientation de l'axe de rotation de la molécule autour de la normale à la bicouche dans un cône de précession (wobbling cone)

Dans le cas général,  $S_{CD} = \langle S_{coll} \rangle * \langle S_{intra} \rangle * \langle S_{mol} \rangle$

Dans le cas particulier d'une molécule rigide (comme le cholestérol ou le squelette glycérol des lipides) oscillant dans un cône (pas de désordre conformationnel),  $S_{coll}$  est égale à 1. Plus encore, les liaisons C-D sont toutes fixées les unes par rapport aux autres, ainsi,  $S_{intra}$  peut être assimilée à un terme géométrique en  $(3 \cos^2 \gamma_i - 1) / 2$ , avec  $\gamma_i$  l'angle entre les liaisons C-D et l'axe principal de mouvement de la molécule (figure II.15). Ainsi, le paramètre d'ordre devient directement proportionnel à  $S_{mol}$ , identique pour toutes les liaisons C-D :

$$S_{CD} = S_{mol} \left( \frac{3 \cos^2 \gamma_i - 1}{2} \right) \quad (II.35)$$

### c) L'azote $^{15}\text{N}$ et le proton $^1\text{H}$ : le couplage dipolaire.

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

$$\hat{H}_D = \frac{\mu_H - \mu_N}{r_{NH}^3} - 3 \frac{(\mu_H r_{NH})(\mu_N r_{NH})}{r_{NH}^5} \quad (II.36)$$

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

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

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_D = -\bar{h} \omega_0 \hat{I}_z - \frac{\bar{h}^2 \gamma_H \gamma_N}{r_{NH}^3} \left( \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) (3 \hat{I}_z S_z - \hat{I} \hat{S}) \quad (II.37)$$

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

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_D = -\bar{h} \omega_0 \hat{S}_z - \frac{\bar{h}^2 \gamma_H \gamma_N}{r_{NH}^3} \left( \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) (3 \hat{I}_z \hat{S}_z - \hat{I} \hat{S}) \quad (\text{II.38})$$

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

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

D'après l'expression de ces hamiltoniens, la dépendance angulaire en  $\alpha$  et  $\beta$  des spectres RMN est clairement mise en évidence. Ainsi, le couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , comme le déplacement chimique du phosphore et les éclatements quadrupolaires des spectres  $^2\text{H}$  qui dépendent respectivement de l'orientation du nuage électronique par rapport au champ magnétique et de l'orientation de la liaison C- $^2\text{H}$  par rapport à  $\vec{B}_0$ , dépend de l'orientation de la liaison  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  par rapport à  $\vec{B}_0$ .

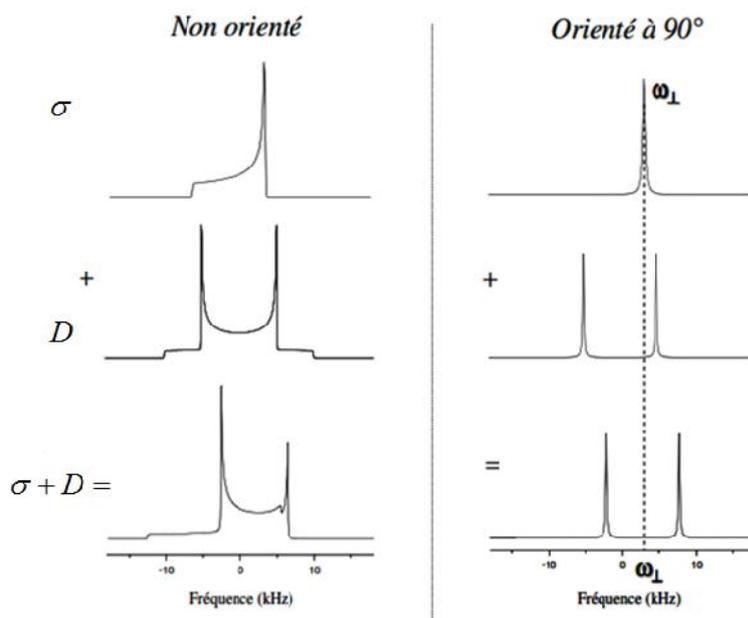
L'interaction dipolaire entre deux noyaux  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  se traduit sur le spectre RMN par un doublement des raies, centré sur le déplacement chimique spécifique de l'environnement électronique du noyau considéré. L'écart en fréquence entre ces deux raies est l'éclatement dipolaire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

$$\Delta\nu_D(\beta) = \frac{\bar{h} \gamma_{^{15}\text{N}} \gamma_{^1\text{H}}}{r_{^{15}\text{N}-^1\text{H}}^3} \left( \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{2} \right) S^{\text{NH}} \quad (\text{II.39})$$

$r_{^{15}\text{N}-^1\text{H}}^3$  est la distance entre les noyaux  $^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}$ ,  $\beta$  est l'angle entre le vecteur reliant les atomes  $^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}$  et le champ magnétique statique  $\vec{B}_0$ , et  $S^{\text{NH}}$  est le paramètre d'ordre (équivalent à  $S_{\text{CD}}$ ) associé à la liaison  $^{15}\text{N}$ -H.

Deux interactions sont donc présentes pour le noyau  $^{15}\text{N}$  : l'anisotropie de déplacement chimique ( $\sigma$ ) et le couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (D). Le type de spectre RMN obtenu va donc être une combinaison entre les deux types d'interaction.

Pour un système orienté par exemple à  $90^\circ$ , le spectre  $^{15}\text{N}$  sera constitué d'un doublet de raies centré sur la fréquence  $\omega_\perp$  (figure II.14).



**Figure II.14 :** Spectres  $^{15}\text{N}$  types associés à l'interaction d'anisotropie de déplacement chimique ( $\sigma$ ), au couplage dipolaire ( $D$ ) et à la combinaison des deux ( $\sigma+D$ ) à contribution égale, pour des échantillons non orientés (spectres de gauche) et orientés à  $90^\circ$  (spectres de droite).

### I.1.3 : Aspects expérimentaux.

#### I.1.3.1: Acquisition des données et traitement du signal.

Les expériences de  $^{31}\text{P}$ -RMN ont été réalisées sur les spectromètres Bruker Biospin Avance 300 MHz (sonde CP MAS-WVT Triple, WB), 400MHz (sonde QNP- Quadruple Nuclei Probe), 500MHz (sonde CP MAS- DVT Triple, WB), 700MHz (sonde CP MAS 4mm-Efree, DVT) et 800MHz (sonde CP MAS Dual, Broad Band). Quant aux expériences  $^2\text{H}$ -RMN, elles ont été réalisées sur le spectromètre Bruker Biospin Avance 800MHz. Tous ces spectromètres sont pilotés par le logiciel Bruker Topspin 2.1 ou 3.0.

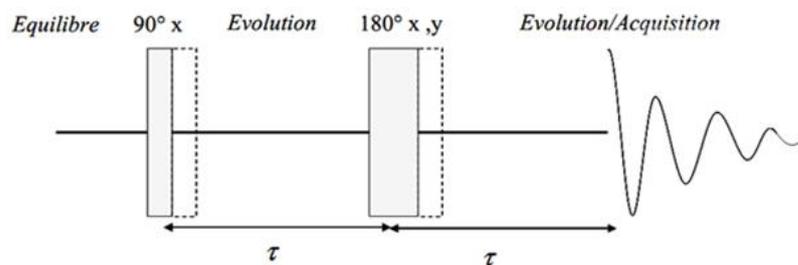
Comme cela a déjà été évoqué, les interactions solides (en particulier l'interaction quadrupolaire) ont une signature spectrale très large (de l'ordre de la centaine de KHz pour le quadrupolaire dans le cas de  $^2\text{H}$ ) ; il est donc nécessaire que la fenêtre d'excitation soit au minimum de la taille de l'interaction la plus large. En première approximation, la fenêtre d'excitation correspondant à la transformée de Fourier du champ de radiofréquence (RF) d'excitation, est de l'ordre de  $2/\tau$ ,  $\tau$  étant la durée d'application du champ de radiofréquence. Ainsi, plus  $\tau$  est petit, plus la couverture

spectrale est grande. Généralement,  $\tau_{90^\circ}$  vaut quelques microsecondes en RMN des solides. Pour obtenir malgré tout un basculement de spins de  $90^\circ$  d'un échantillon solide en un temps aussi bref, il faut utiliser des puissances importantes pour générer les champs de radiofréquence RF. Cependant, ces hautes puissances induisent après l'impulsion RF, un temps mort machine de quelques microsecondes pendant lequel il est impossible de faire une acquisition. En RMN du liquide, les temps de relaxation sont suffisamment lents pour que la perte d'information pendant ce temps soit négligeable. En RMN des solides, par contre, les temps de relaxation peuvent être très courts et devenir discriminant pour l'acquisition du signal.

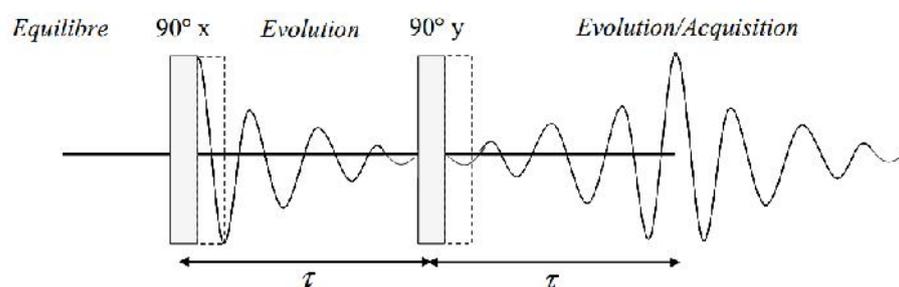
Pour s'affranchir des pertes d'information liées à ce temps, des séquences d'impulsions d'écho ont été développées. Elles sont basées sur une refocalisation des interactions: une première impulsion d'excitation, fait basculer les spins de  $90^\circ$ , après un temps  $\tau$ , une deuxième impulsion est appliquée dans le but de refocaliser l'interaction à étudier. Cette refocalisation ne se fait pas directement après la première impulsion mais après un temps égal à  $\tau$ , le maximum des cosinusides consécutives du signal est donc "décalé" d'un temps égal à  $2\tau$  par rapport à l'impulsion de lecture. L'impulsion peut être décalée de la même manière sans perte d'information, on s'affranchit ainsi du temps mort machine.

Dans le cas des noyaux de spin  $I=1/2$ , ( $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ...), la séquence d'écho de Hahn (Rance et Byrd, 1983) (figure II.15) est utilisée pour refocaliser les interactions de déplacement chimique et spin-spin indirecte. Elle est constituée de deux impulsions RF, la première à  $90^\circ$  et la deuxième à  $180^\circ$ , séparées par un temps  $\tau$ , conduisant à déplacer l'origine des temps du signal RMN au delà du temps mort du récepteur. Le délai  $\tau$  doit être plus grand que la durée du temps mort mais suffisamment court pour éviter de perdre en rapport signal sur bruit sous l'effet de relaxation. L'acquisition du signal se fait au sommet de l'écho après un délai de  $2\tau$ . Quant aux spins  $I>1/2$  (cas du  $^2\text{H}$  et  $^{14}\text{N}$ ), la séquence d'écho quadrupolaire, constituée de deux impulsions à  $90^\circ$  séparées par un temps  $\tau$ , est utilisée (Davis et al, 1973).

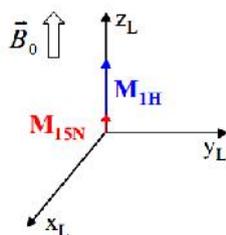
a) **Echo de Hahn:** refocalise les interactions  $\sigma$  et  $J$



b) **Echo Solide:** refocalise les interactions  $D$  et  $Q$



**Figure II.15:** Séquences d'impulsion d'écho a) de Hahn et b) quadrupolaire, utilisées pour l'analyse d'échantillons anisotropes. Les traits en pointillés représentent le délai du temps mort.



**Figure II.16:** Schéma des aimantations  $M_{15N}$  et  $M_{1H}$  dans le référentiel du laboratoire.

### La séquence d'Hartmann-Hahn

Cette séquence a pour objectif d'améliorer la sensibilité de détection d'un noyau peu abondant (comme le noyau  $^{15}\text{N}$ ), en présence d'un noyau très abondant (comme le noyau  $^1\text{H}$ ). L'idée étant d'établir un transfert de polarisation entre ces deux types de noyaux qui interagissent via un couplage dipolaire important. Ce transfert peut être décrit de la manière suivante: à température ambiante, l'aimantation

$M_{^{15}\text{N}}$  est très faible par rapport à celle des protons  $M_{^1\text{H}}$ , en effet, d'après la loi Curie, l'aimantation  $M$  est proportionnelle à la susceptibilité magnétique  $\chi$  qui elle même est reliée au rapport gyromagnétique  $\gamma$  du noyau étudié ( $\gamma_{^{15}\text{N}} = -2,7 \cdot 10^7 \text{ rad.T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $\gamma_{^1\text{H}} = 26,7 \cdot 10^7 \text{ rad.T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )

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

$T_L$  est la température du laboratoire, et:

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

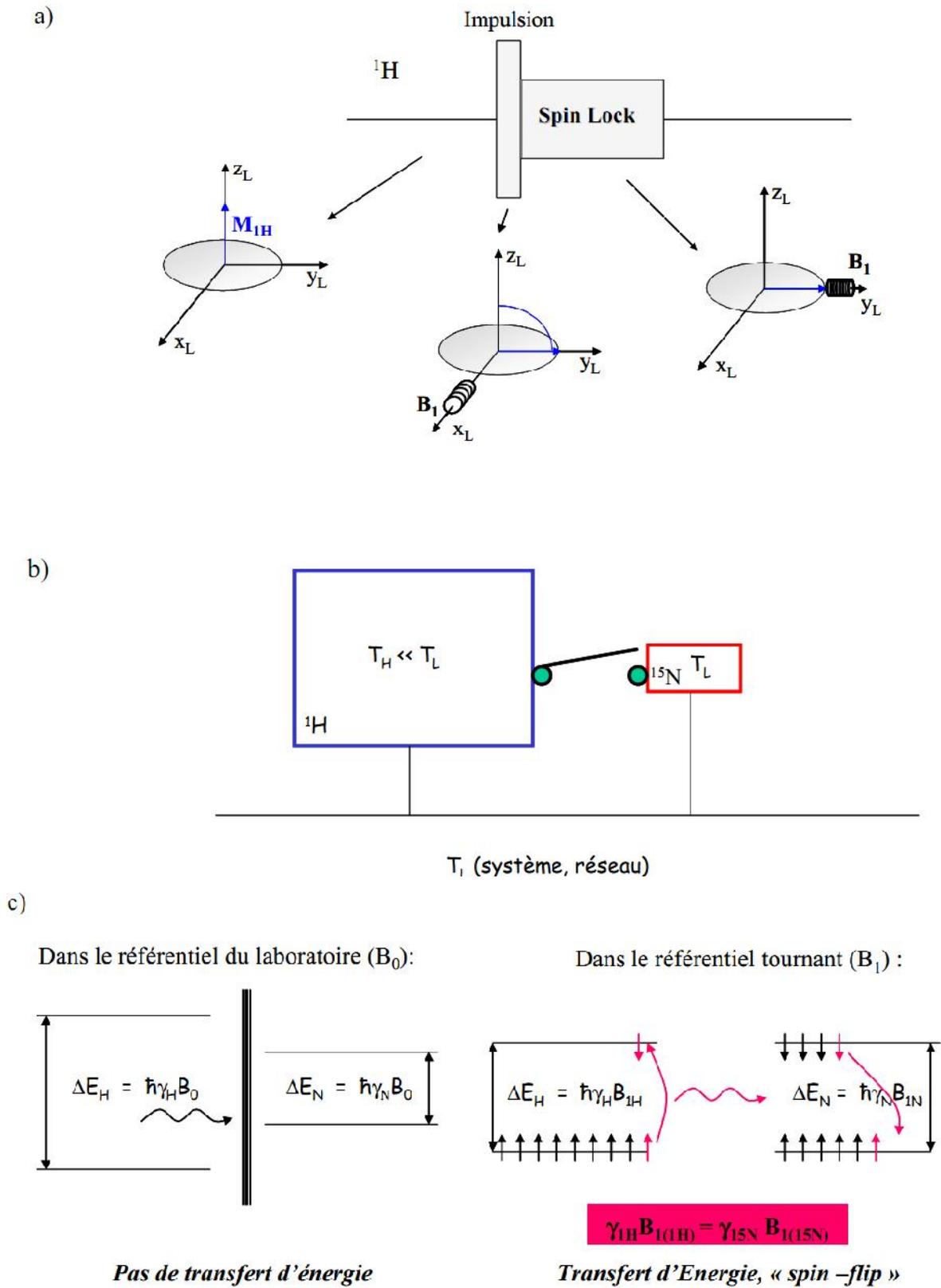
Avec  $N$  la population de noyaux considérés,  $\hbar$  la constante de planck,  $I$  le nombre de spin et  $k_B$  la constante de Boltzman.

Le principe de la séquence d'Hartmann-Hahn repose sur l'utilisation du réservoir des protons pour obtenir une aimantation  $M_{^{15}\text{N}}$  plus importante. Cela consiste en deux étapes, il s'agit d'une étape de refroidissement des protons suivie par une étape d'échange d'énergie entre les deux réservoirs  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  (contact thermique).

La première étape consiste à appliquer aux noyaux protons un champ de radiofréquence  $B_1$  de telle sorte que l'aimantation  $M_{^1\text{H}}$  reste polarisé sur l'axe  $y_L$  (figure 17.a). On parle ainsi de "spin lock". L'aimantation  $M_{^1\text{H}}$  s'exprime alors:

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

Comme  $B_1 \ll B_0$ , la température  $T_{^1\text{H}} \ll T_L$  pour garder l'aimantation  $M_{^1\text{H}}$  constante, ce qui justifie l'expression de "refroidissement des protons".



**Figure 17:** Représentation a) du phénomène spin lock pour les protons, b) des deux reservoirs  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  et c) du transfert de polarisation des noyaux  $^1\text{H}$  vers  $^{15}\text{N}$  après le spin lock des protons (adaptée du Cours de Master 1 (Dufourc, E.J, 2011))

Un transfert d'énergie entre les réservoirs  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$  est alors possible (figure II.17.b et c). Ainsi, d'après de référentiel tournant (associé à  $B_1$ ), nous avons :

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

La séquence d'Hartmann-Hahn (également appelé CP pour Cross Polarization), est schématisée si dessous ; un découplage large bande des protons est réalisé afin d'améliorer le rapport signal sur bruit.

### I.1.3.1: Traitement du signal.

Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, la FID est convoluée par une exponentielle décroissante de type  $e^{-\text{LB}t}$  (opération de filtrage). Le terme LB (Line Broadening), exprimé en Hz, peut varier de quelques Hz en RMN des liquides à plusieurs centaines d'Hz en RMN des solides. Cette différence s'explique par le fait qu'en RMN des solides, la FID s'amortit très rapidement et seuls les premiers points de la FID correspondent au signal.

#### a) Mesure de l'anisotropie de déplacement chimique et des éclatements quadrupolaires

A partir des spectres de RMN des solides  $^{31}\text{P}$ , nous pouvons déterminer l'anisotropie de déplacement chimique  $\Delta\sigma$ . Ce paramètre, nous fournit des informations sur la dynamique ainsi que sur l'orientation des phosphores dans la membrane. Nous avons vu précédemment que ce paramètre pouvait être mesuré directement sur les spectres par la relation :

$$\Delta\sigma = \Delta\nu_{90^\circ} - \Delta\nu_{0^\circ} = \Delta\nu_{\perp} - \Delta\nu_{\parallel}$$

Afin de quantifier la déformation ainsi que de valider nos attributions des anisotropies de déplacement chimique, nous avons également eu recours à la simulation de spectres RMN du phosphore. Pour cela, nous avons utilisé un programme codé en FORTRAN dans lequel nous avons introduit les données telles que les anisotropies de déplacement chimique (estimées à partir des spectres expérimentaux), les largeurs de raies, le poids ( $w$ ) qui correspond au nombre de phosphore par lipide, le déplacement chimique isotrope, et le rapport  $c/a$  tenant compte de la déformation des liposomes par le champ magnétique ( $c$  et  $a$  correspondent aux semi grand et petit axes d'une ellipsoïde de révolution) (Pott 1995). Ce programme calcule ensuite la FID correspondante et effectue sa transformée

de Fourier (Dufourc, non publié). Par comparaison entre les spectres expérimentaux et les spectres simulés, nous pouvons alors valider ou affiner nos différentes prédictions.

Le même programme Fortran a été utilisé pour la simulation des spectres RMN du deutérium des liposomes TBBPC et DMPC dopés avec 5% (en moles) de DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> afin de rapporter la dynamique des chaînes aliphatiques deutérées. Les paramètres pris en compte sont : les éclatements quadrupolaires  $\Delta\nu_Q$  à 0° (estimés à partir des spectres expérimentaux pour chaque position marquée le long des deux chaînes aliphatiques  $sn_1$  et  $sn_2$ ), la largeur à mi-hauteur ( $RT_2$ ), le poids ( $w$ ) traduisant le nombre de deutérons par position marquée (54 pour le DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub>) et enfin le rapport  $c/a$  relatif à la déformation du système.

### b) Calcul du moment d'ordre 1 ( $M_1$ )

Nous avons vu précédemment que la mesure de l'éclatement quadrupolaire est un moyen d'estimer le paramètre d'ordre  $S^{CD}$  à un endroit déterminé de la molécule. Cependant, il est difficile de mesurer les éclatements quadrupolaires individuels sur les spectres de poudres d'échantillons non orientés. En effet, la dépendance orientationnelle en fréquence par rapport au champ magnétique ainsi que le recouvrement des signaux entraînent des largeurs spectrales importantes. Davis et Bloom ont développé des méthodes d'analyse permettant d'étudier la dynamique de ces systèmes non orientés.

Un moment est une grandeur spectrale calculée à partir de l'intensité du spectre  $f(\omega)$  par rapport à une fréquence  $\omega_0$  (fréquence de Larmor en RMN des solides). Les moments d'ordre  $n$  d'un spectre de poudre s'expliquent selon Davis (Davis 1979), par :

$$M_n = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} (\omega - \omega_0)^n f(\omega) d\omega}{\int_{-\infty}^{\infty} f(\omega) d\omega} \quad (\text{II.44})$$

Dans le cas des spectres symétriques obtenus en RMN <sup>2</sup>H, les moments d'ordre impair sont nuls. On redéfinit alors les moments comme :

$$M_n = \frac{\int_0^{\infty} (\omega - \omega_0)^n f(\omega) d\omega}{\int_0^{\infty} f(\omega) d\omega} = \frac{1}{A} \int_0^{\infty} (\omega - \omega_0)^n f(\omega) d\omega \quad (\text{II.45})$$

Dans le cas des bicouches, du fait de la symétrie axiale, les moments peuvent être reliés à la distribution des éclatements quadrupolaires (moyennée sur l'ensemble des mouvements) par

la relation :

$$M_n = A_n (2\pi)^n \langle (\Delta\nu_Q)^n \rangle \quad (\text{II.46})$$

$A_n$  étant une constante dépendante de  $n$

On définit ainsi :

$$M_1 = \frac{4\pi}{3\sqrt{3}} \langle \Delta\nu_Q \rangle \quad (\text{II.47})$$

$$M_2 = \frac{16\pi^2}{45} \langle \Delta\sigma^2 \rangle \quad (\text{II.48})$$

Le moment  $M_1$  d'une chaîne deutérée est relié à la mesure globale du paramètre d'ordre  $\langle S^{CD} \rangle_{chaîne}$  (en combinant avec l'équation II.29).

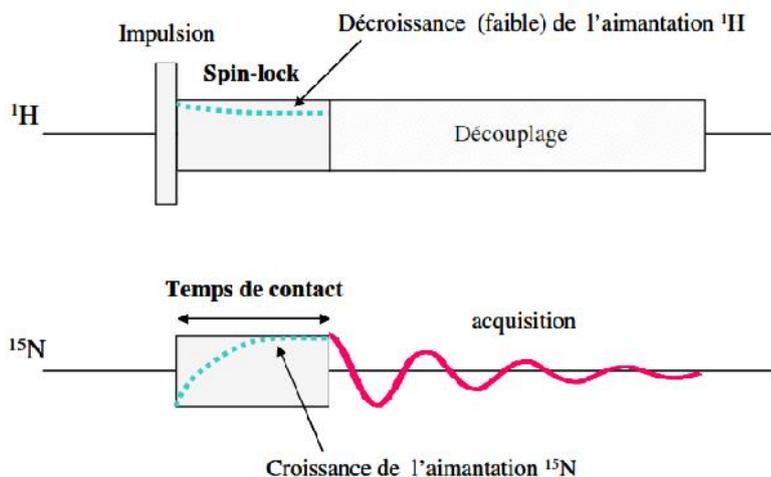
Cette relation est donnée par :

$$M_1 = \frac{\pi}{\sqrt{3}} A_Q \langle S^{CD} \rangle_{chaîne} \quad (\text{II.49})$$

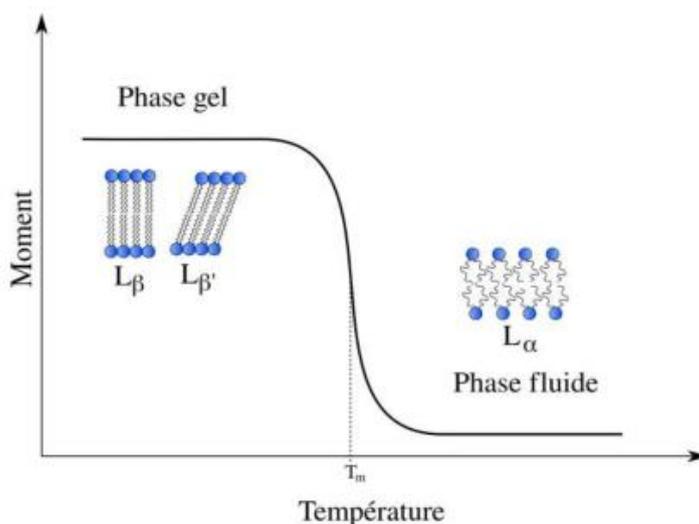
$A_Q$  étant la constante quadrupolaire.

Le calcul de  $M_1$  en RMN des solides  $^2\text{H}$  permet de suivre la dynamique globale d'une chaîne deutérée. Tandis que le moment  $M_2$  est relié à l'étude de la dynamique de la tête phosphate. Les moments  $M_1$  et  $M_2$  sont calculés en utilisant un programme développé par Sébastien Buchoux (NMR-friendly) dans lequel les données RMN sont exportées.

Dans notre étude, le calcul des moments spectraux sera utilisé pour caractériser les modifications de la forme et de la largeur des spectres correspondants à des liposomes biphényles. On pourra ainsi connaître la température de transition de phase (gel-fluide) :  $T_m$  de ces lipides, qui est caractérisée par une diminution importante des moments  $M_1$  et  $M_2$ . Le point d'inflexion de la courbe reportant les moments  $M_1$  et  $M_2$  en fonction de la température ( $^{\circ}\text{C}$ ) permet de déterminer directement la  $T_m$ .



**Figure II.18** : Représentation de la séquence Hartmann-Hahn



**Figure II.19** : Profil type des moments  $M_1$  (KHz) et  $M_2$  (KHz<sup>2</sup>) d'un spectre de bicouche lipidique en fonction de la température (°C). Le point d'inflexion permet de déterminer la température de transition de phase gel-fluide,  $T_m$

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

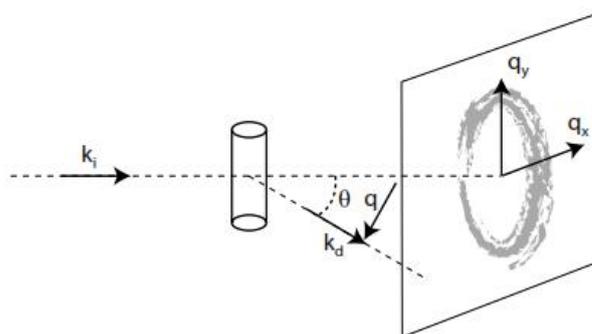
Pour la réalisation des expériences de diffusion des rayons X aux petits angles, nous avons collaboré avec le CRPP (Centre de Recherche Paul Pascal, Pessac), en particulier avec Laurence Navailles, Ahmed Ben Taleb et Frederic Nallet.

Cette méthode nous aidera à confirmer la structure et la déformation spécifique dans  $B_0$  des liposomes TBBPC et nous donnera des indications sur les distances de répétition en solution ainsi que sur l'épaisseur hydrophobe des vésicules de TBBPC.

La diffusion de la radiation a pour origine les hétérogénéités de l'échantillon. Pour la diffusion de la lumière, ce sont les variations de propriétés diélectriques (d'indice de réfraction) du milieu, pour les rayons X ce sont les variations de densité électronique et pour les neutrons, il s'agit des hétérogénéités de longueur de diffusion des noyaux atomiques.

La diffusion statique mesure la dépendance de l'intensité moyenne diffusée en  $q$ . La figure II.20 représente le principe d'une telle expérience. Ce type d'expérience renseigne sur l'homogénéité de l'échantillon (séparation de phases), la nature des phases lipidiques (lamellaires, cristallines...) et les caractéristiques spatiales (période de répétition du motif lamellaire, épaisseur de l'objet...). L'étude de systèmes dilués permet d'avoir des informations sur la forme individuelle des objets (facteur de forme) et l'étude de systèmes concentrés permet d'accéder à leur arrangement spatial dans l'échantillon (facteur de structure).

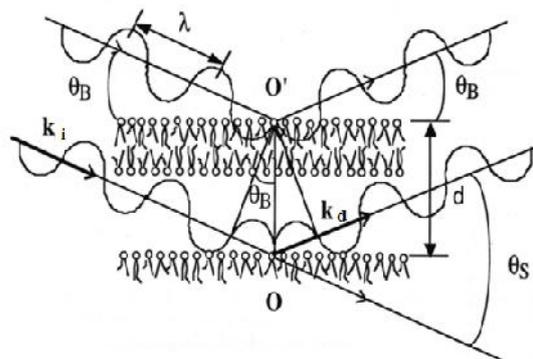
Cette partie rappelle les bases de la diffusion des rayons X aux petits angles que nous appliquerons à l'étude des modèles membranaires de type liposomes.



**Figure II.20** : Principe général d'une expérience de diffusion de rayonnement. La radiation incidente de longueur d'onde  $\lambda$  a un vecteur d'onde  $k$  de norme  $2\pi n/\lambda$  (dans le cas des rayons X  $n=1$ ) et la radiation diffusée à l'angle  $\theta$  a un vecteur d'onde  $k_d$  de même norme. On définit le vecteur de diffusion  $q = k_d - k_i$ . L'intensité diffusée dans les directions  $x$  et  $y$  est mesurée par un détecteur. L'intensité  $I(\theta)$  est ensuite obtenue par regroupement angulaire.

### I.2.1: La loi de Bragg

Comme son nom l'indique, pour la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), la radiation utilisée est un faisceau monochromatique de rayons X et le détecteur est positionné à des petits angles par rapport au faisceau incident ( $\theta$  faible). L'interaction onde-matière s'effectue entre les photons du faisceau incident et les électrons de l'échantillon; les fluctuations de densité électronique de nos modèles membranaires vont donc moduler l'intensité diffusée. La diffusion d'une structure possédant un motif de répétition, comme les bicouches lipidiques, peut être définie en terme de réflexions par des plans d'égale densité de diffusion (figure II.21). La diffusion de rayonnement est une technique classique pour sonder la matière de l'échelle nanométrique à l'échelle micrométrique. L'expérience typique de diffusion consiste à éclairer un échantillon avec une radiation monochromatique de rayons X (RX), de lumière visible ou de neutrons, de vecteur d'onde  $k_i$  comme représenté sur la figure II.20. Une partie de la radiation de longueur d'onde  $\lambda$  traverse l'échantillon sans être modifiée, une partie est absorbée et une autre partie de la radiation de vecteur d'onde  $k_d$  interagit avec la matière et est diffusée de manière élastique ( $\|K_d\| = \|K_i\|$ ) (c'est-à-dire s'effectue sans transfert d'énergie). D'après la théorie des interférences, ces ondes réfléchies ne sont en phase et donc en interférences constructives que pour certains angles; ceux pour lesquels la différence de marche, notée  $\delta$ , entre le faisceau diffusé et le faisceau incident, est un multiple de la longueur d'onde du faisceau  $\lambda$ .



**Figure II.21** : Schéma illustrant la loi de Bragg,  $\lambda$  est la longueur d'onde du faisceau,  $k_i$  le vecteur d'onde incident de l'onde incidente,  $k_d$  celui de l'onde réfléchi,  $\theta_B$  est l'angle entre le plan des bicouches et l'angle incident (l'équivalent de la moitié de  $\theta_S$  entre l'angle incident et l'angle réfléchi et  $d$  est le motif de répétition de la structure lamellaire.

Cette différence de marche s'exprime:

$$\delta = \lambda \vec{r} \cdot \vec{S} \quad (\text{II.50})$$

Où  $\vec{r} = OO'$  et  $\vec{s} = \vec{k}_d - \vec{k}_i$ , les vecteurs  $\vec{k}_d$  et  $\vec{k}_i$  ont donc même module  $1/\lambda$  ( $\vec{k} = 2\pi/\lambda$ )

D'après l'équation II.50 et la figure II.21, nous pouvons établir la loi de Bragg :

$$\delta = \lambda d \vec{k}_i (\sin 2\theta_B) = 2d \sin(\theta_B) = h\lambda \quad (\text{II 51})$$

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

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

Par convention, les spectres de diffusion des rayons X expriment l'intensité diffusée  $I$  en fonction du vecteur d'onde de diffusion  $\vec{q}$  relié au vecteur  $\vec{S}$  par :

$$\vec{q} = 2\pi\vec{S} \quad (\text{II.52})$$

D'après les formules II.50, II.51 et II.52, le module du vecteur  $\vec{q}$  s'exprime :

$$\vec{q} = \frac{4\pi \sin \theta_B}{\lambda} = \frac{2\pi h}{d} \quad (\text{II.53})$$

L'unité de  $q$  étant le  $\text{\AA}^{-1}$ .

Ainsi, dans le cas d'une phase lamellaire, le vecteur d'onde de diffusion devient donc proportionnel à l'inverse de la distance de répétition  $d$ , de la structure lamellaire étudiée. Un spectre de diffusion de la phase lamellaire se présente donc sous la forme de pics régulièrement espacés par la distance  $\frac{2\pi}{d}$ . Le nombre de pics de Bragg dans le graphe  $I=f(q)$  renseigne sur l'organisation d'un échantillon. En effet, plus ce dernier est structuré, plus l'ordre de la diffusion est important et plus le nombre de pics de Bragg présents dans le graphe est important. La position en  $q$  des pics permet de calculer la distance  $d$  de répétition entre les bicouches.

### I.2.2: Amplitude et intensités diffusés.

L'amplitude de diffusion  $A(\vec{q})$  est la transformée de Fourier de la densité

électronique. En réalité, les électrons sont délocalisés autour des noyaux atomiques. On considère donc la densité électronique de l'objet irradié  $\rho(\vec{r})$ , égale au nombre d'électrons par unité de volume à la position  $\vec{r}$ . Un élément de volume  $dV$  à la position  $\vec{r}$  contient donc  $\rho(\vec{r}) dV$  électrons.

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

$$A(\vec{q}) = A_e \int_V \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\vec{r}} d^3\vec{r} \quad (\text{II.54})$$

$A_e$  étant l'amplitude de diffusion d'un seul électron.

L'intensité de diffusion  $I(\vec{q})$  par unité de volume est donnée par le produit de l'amplitude de diffusion  $A(\vec{q})$  et de son amplitude conjuguée  $A(\vec{q})^*$ .

$$I(\vec{q}) = \frac{1}{V} A(\vec{q}) \cdot A(\vec{q})^* = \frac{1}{V} I_e \int_V \int_V \rho(\vec{r}) \rho(\vec{r}') e^{-i\vec{q}(\vec{r}-\vec{r}')} d^3\vec{r} d^3\vec{r}' \quad (\text{II.55})$$

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

En posant la fonction de corrélation spatiale de la densité de longueur de diffusion  $\gamma(\vec{r})$  :

$$\gamma(\vec{r}) = \frac{1}{V} \int_V \rho(\vec{r}) \rho(\vec{r} + \vec{r}') d^3\vec{r}' \quad (\text{II.56})$$

Il advient :

$$I(\vec{q}) = \int_V \gamma(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\vec{r}} d^3\vec{r} \quad (\text{II.57})$$

L'intensité diffusée est donc la transformée de Fourier de la fonction de corrélation spatiale de la densité de diffusion, c'est-à-dire de la densité électronique.

Cette intensité diffusée peut être décomposée en un produit de deux termes ; l'un relié au facteur de forme, noté  $F(\vec{q})$ , et l'autre au facteur de structure noté  $S(\vec{q})$ .

$$I(\vec{q}) = \sum_{i=1}^k \frac{N_i}{V} \Delta n_i^2 F(\vec{q}) S(\vec{q}) \quad (\text{II.58})$$

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

**a) Facteur de forme :**

Quand une suspension est diluée, les particules sont éloignées et leurs positions ne sont généralement pas corrélées. Ainsi, on peut additionner leurs intensités.

Si l'on considère une particule de forme quelconque, de volume  $V_p$  et de densité électronique  $\rho(\vec{r})$ , l'amplitude diffusée normalisée par cette particule est donnée par :

$$a(\vec{q}) = \int_{V_p} \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\vec{r}} d^3\vec{r} \quad (\text{II.59})$$

Ce qui donne l'intensité diffusée par la particule :

$$I_p(\vec{q}) = a(\vec{q}) \cdot a(\vec{q})^* = V_p^2 F(\vec{q}) \quad (\text{II.60})$$

En posant  $F(\vec{q})$  le facteur de forme de la particule :

$$F(\vec{q}) = \frac{1}{V_p^2} \iint_{V_p} \rho(\vec{u}) \rho(\vec{v}) e^{-i\vec{q}(\vec{u}-\vec{v})} d^3\vec{u} d^3\vec{v} \quad (\text{II.61})$$

L'intensité par unité de volume d'une suspension contenant  $N$  particules identiques dans un volume  $V$  est donc de la forme :

$$I(\vec{q}) = \frac{N}{V} V_p^2 F(\vec{q}) = \phi V_p F(\vec{q}) \quad (\text{II.62})$$

Avec  $\phi$  la fraction volumique en particules définie par  $\phi = NV_p/V$

Le facteur de forme d'une particule contient les informations de taille, de structure et dépend de l'orientation de la particule.

Le facteur de forme peut également s'exprimer à l'aide de la fonction de corrélation spatiale de la densité  $\gamma_p(\vec{r})$  :

$$F(\vec{q}) = \frac{1}{V_p} \int_{V_p} \gamma_p(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\vec{r}} d^3\vec{r} \quad (\text{II.63})$$

Si l'on pose  $D$  comme distance maximale entre deux points dans la particule, on peut écrire :

$$F(\vec{q}) = \frac{1}{V_p} \int_0^D 4\pi r^2 \gamma_p(\vec{r}) \frac{\sin \vec{q}\vec{r}}{\vec{q}\vec{r}} d^3\vec{r} \quad (\text{II.64})$$

Il est donc possible de calculer le facteur de forme d'un objet en calculant sa fonction de corrélation spatiale puis sa transformée de Fourier.

**b) Facteur de structure :**

Considérons maintenant l'intensité diffusée par une assemblée de particules identiques corrélées dans l'espace. Quand les particules sont browniennes, l'intensité change pour chaque configuration et l'intensité mesurée est une moyenne dans le temps. L'intensité est de la forme:

$$I(\vec{q}) = \left\langle \frac{A(\vec{q}) \cdot A(\vec{q})^*}{V} \right\rangle = \frac{1}{V} \left\langle \left[ \int \rho(\vec{r}) e^{-i\vec{q}\vec{r}} d^3\vec{r} \right] \left[ \int \rho(\vec{r}') e^{+i\vec{q}\vec{r}'} d^3\vec{r}' \right] \right\rangle \quad (\text{II.65})$$

Ou la moyenne statistique est calculée sur toutes les positions et orientations disponibles pour les particules. Quand le système est statique (non brownien), la moyenne est effectuée sur un volume  $V$  assez grand pour inclure toutes les configurations possibles. En introduisant le vecteur position  $\vec{r}_i$  du centre de la particule  $i$ , on obtient  $r = \vec{r}_i + \vec{u}$ , l'intensité s'écrit après calculs:

$$I(\vec{q}) = \frac{N}{V} \left\langle \left[ \iint_{V_p} \rho(\vec{u}) \rho(\vec{v}) e^{-i\vec{q}(\vec{u}-\vec{v})} d^3\vec{u} \cdot d^3\vec{v} \right] \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N e^{-i\vec{q}(\vec{r}_i-\vec{r}_j)} \right] \right\rangle \quad (\text{II.66})$$

Si les particules sont identiques et sphériques, la moyenne de ce produit est égal au produit des moyennes. En l'écrivant ainsi, deux termes apparaissent, le premier correspond au facteur de forme et le deuxième au facteur de structure  $S(\vec{q})$  de formule:

$$S(\vec{q}) = 1 + \frac{1}{N} \left\langle \sum_{i=1}^N \sum_{j \neq i}^N e^{-i\vec{q}(\vec{r}_i-\vec{r}_j)} \right\rangle \quad (\text{II.67})$$

L'intensité peut ensuite s'écrire sous une forme plus simple:

$$I(\vec{q}) = \phi V_p F(\vec{q}) S(\vec{q}) \quad (\text{II.68})$$

Le facteur de structure  $S(\vec{q})$  contient l'information des corrélations entre les centres de masse des particules. Il va donc correspondre aux interactions. En régime dilué, les interactions entre les particules sont faibles et le facteur de structure tend vers 1. Ainsi, dans le cas particulier d'objets isolés sans interaction, le facteur de structure est constant et égal à 1, l'amplitude diffusée permet alors de déterminer le facteur de forme de l'objet.  $S(\vec{q})$  est égal à  $N$  quand il y a  $N$  interférences constructives entre les particules diffusantes et zéro quand il n'y a que des interférences destructives.

### **I.2.3: Domaines structuraux observés en fonction de la valeur du vecteur d'onde**

Nous avons vu que le vecteur d'onde de diffusion ( $\vec{q}$ ) est inversement proportionnel à la distance  $d$  (Equation II.53), ainsi, plus  $q$  est petit plus la distance inter-bicouche observée dans l'échantillon est grande.

On distingue généralement trois domaines structuraux sur les graphes  $I=f(q)$ , suivant l'échelle des vecteurs  $q$  considérée (figure II.23):

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

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

- Pour des  $q$  petits ( $q < 1/R$ ), des informations sur des corrélations inter-particules peuvent être obtenues (comme pour le cas des domaines de  $q$  précédents); la diffusion étant dominée par le facteur de structure  $S(\vec{q})$ , représenté par des pics de Bragg, dont la position en  $q$  permet de calculer la distance de répétition  $d$  d'une structure lamellaire.

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

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

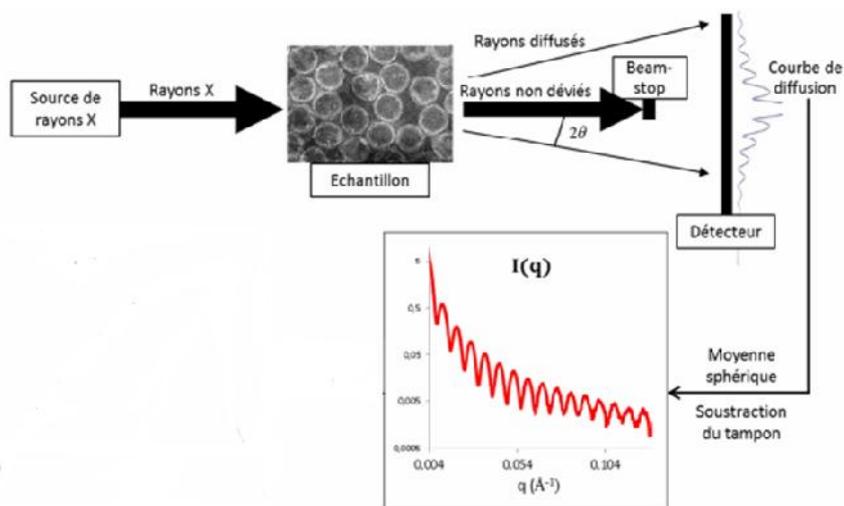


Figure II.22: Vue d'ensemble d'une expérience de SAXS et du traitement des résultats.

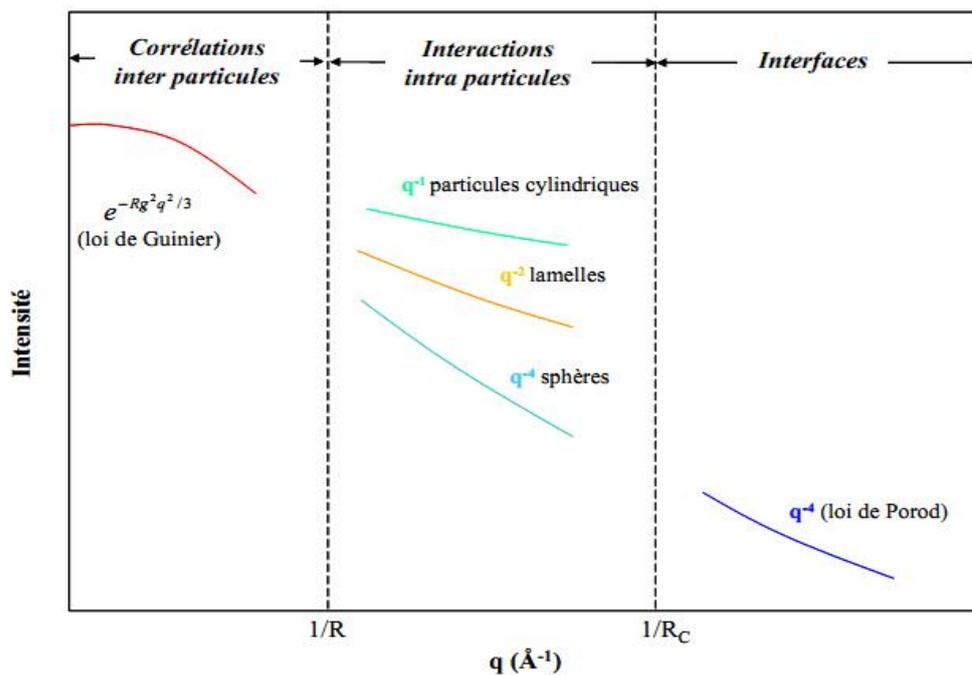


Figure II.23: Domaines structuraux en fonction de la valeur du vecteur d'onde diffusion  $q$ ,  $R$  représente la taille de l'objet observé et  $R_C=10\text{\AA}$ .

#### **I.2.4: Partie expérimentale:**

Le montage est une machine NanoStar de Bruker avec une source à anode de cuivre utilisée sous 40kV de tension d'alimentation et 35mA de courant de filament. Le flux de rayons X émis est rendu monochromatique et, simultanément, collimaté en un faisceau (approximativement) parallèle par réflexions sur un miroir dit "de Göbel" qui sélectionne la longueur d'onde de la raie K $\alpha$  du cuivre, soit 0,154nm. De la sortie du miroir de Göbel au détecteur, toute l'installation est maintenue sous vide (pression 2e-4 bar, typiquement). La Collimation du faisceau en amont de l'échantillon se fait par un système de 3 ouvertures circulaires, de diamètres (en allant de l'amont vers l'aval) 750, 400 et 1000  $\mu$ m, situées à 90cm l'une de l'autre pour la paire amont et 50cm pour la paire aval. Le détecteur est un HiStar de Bruker, à mélange de gaz xénon/méthane à 4 bar, utilisé avec une résolution de 1024x1024 pixels (taille des pixels équivaut à 105 $\mu$ m). Le détecteur peut être placé à 25cm ; 65cm ou 105cm en aval de l'échantillon. Compte tenu du diamètre du piège à faisceau, de l'ordre de 5mm, la gamme de vecteur d'onde de transfert est, typiquement, de 0,1 à 2,2 par nanomètre pour la distance échantillon-détecteur de 105cm, de 0,15 à 3,6/nm à 65cm et de 0,4 à 8/nm à 25cm.

Les images fournies par le détecteur sont réduites sous la forme de diffractogrammes (intensité en fonction, par exemple, du vecteur d'onde de transfert) à l'aide du logiciel SAXS de Bruker. Les paramètres géométriques de regroupement (coordonnées du centre du faisceau, distance réelle échantillon-détecteur) sont déterminés par calibration à l'aide d'un échantillon standard de b $\beta$ -néphthylène d'argent dont la raie du 1er ordre est à 1,0776/nm. Nous n'avons pas d'échantillon standard pour la calibration de l'intensité: elle est donc exprimée en "coups" sur le détecteur.

Les expériences sur les échantillons de TBBPC sont faites avec la distance échantillon-détecteur de 105cm, les échantillons étant placés dans des capillaires de 1,5 de diamètre et pour des durées d'acquisition de deux heures.

### **I.3: Microscopie optique et électronique**

Au cours de ce travail, nous avons également eu recours à la microscopie optique et à la cryomicroscopie électronique à transmission. Ces méthodes nous ont permis d'obtenir pour la première fois des images des liposomes biphényles après leur déformation par le champ magnétique. Ce travail s'est fait en collaboration avec deux autres équipes du CBMN, l'équipe d'Imagerie Moléculaire et Nanobiotechnologie dirigée par Alain Brisson (Anthony Bouter) et l'équipe d'Architecture de Complexes Membranaires et Processus Cellulaires dirigée par Olivier Lambert (Pierre Bonnafous, Marion Decossas, Olivier Le Bihan)

#### **I.3.1: Microscopie optique.**

Un microscope photonique utilise la lumière dont la propagation est déviée, focalisée par des lentilles de verre. Un rayon lumineux se déplace de façon rectiligne dans un milieu homogène et isotrope qui peut changer de direction lorsqu'il franchit un milieu qui présente deux milieux d'indice de réfraction différents.

En revanche, ce principe ne tient pas compte de la nature particulière de la lumière. Ainsi, la lumière est une onde électromagnétique caractérisée par une longueur d'onde  $\lambda$  comprise entre 400 et 700 nm. Ceci a un impact direct sur la résolution maximale théorique que peut atteindre un microscope optique. Cette limite est due au phénomène de diffraction de la lumière que Airy, Rayleigh et Abbe ont contribué à mettre en évidence. Selon Airy, l'image d'un point donnée par une lentille parfaite et un rayonnement monochromatique n'est pas un point mais une tache. (Figure II.24) (Borne 1980)

La lumière émanant de ce point est en réalité diffractée par le pourtour de la lentille et la tache est alors une figure de diffraction de ce point dont le diamètre dépend de la longueur d'onde  $\lambda$  de la lumière incidente et de l'ouverture angulaire  $\alpha$  de la lentille correspondant au demi-angle du cône de lumière que la lentille est capable d'accepter de l'objet. La résolution d'une lentille correspond à la distance minimale entre deux points dont les taches d'Airy peuvent être séparées. En appliquant le critère de

Rayleigh on définit cette distance comme étant :  $R = \frac{0.61\lambda}{ON} = \frac{0.61\lambda}{n \sin \alpha}$

Avec R la résolution,  $\lambda$  la longueur d'onde d'excitation, ON l'ouverture numérique, n l'indice de réfraction du milieu et  $\alpha$  le demi-angle du cône de lumière maximum.

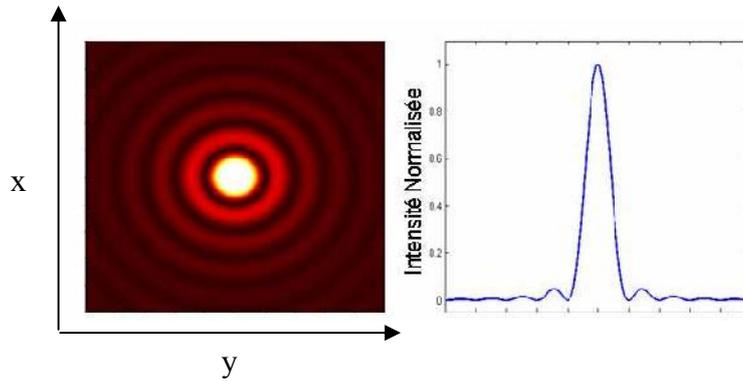
Cette reformulation qui est équivalente au critère de Rayleigh-Abbe, est illustrée sur la Figure II.25. Sur les figures a&a', la distance séparant les deux points sources est supérieure à la

distance définie par le critère de Rayleigh-Abbe. On différencie clairement les deux points sources. Sur les figures b&b', les deux points sources sont séparés par la distance minimale permettant de distinguer chacun des points sources. Enfin, les figures c&c', présentent deux points sources qui ne peuvent pas être distingués en microscopie champ lointain.

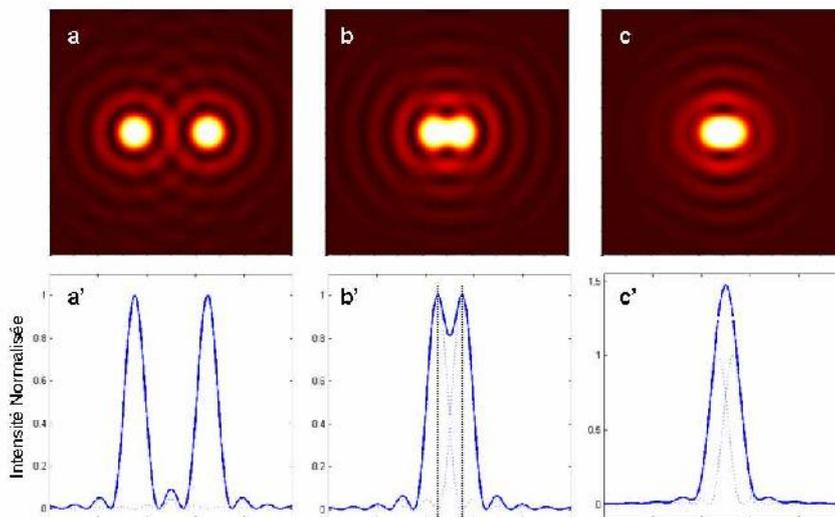
La limite de résolution dépend de la longueur d'onde d'excitation ( $\lambda$ ) et de l'ouverture numérique (ON), celle-ci dépendant de l'indice de réfraction du milieu ( $n$ ) à la sortie de l'objectif et du demi-angle du cône de lumière maximum  $\alpha$  (Hell, 2007). On cherche par exemple, à diminuer la longueur d'onde de travail  $\lambda$  dans le cas des microscopies UV, X ou électronique. On peut également utiliser des objectifs limitant l'ouverture angulaire  $\theta$  du microscope, ou bien encore utiliser des objectifs à immersion pour augmenter l'indice  $n$  du milieu dans lequel on observe l'objet. On diminue ainsi la valeur absolue de cette limite. En effet, celui-ci est inhérent au principe même de la microscopie champ lointain, basée sur l'observation des ondes diffractées par l'objet étudié, puis propagées dans la direction de l'observateur.

Ainsi, une propriété clef du microscope est son pouvoir de résolution ou pouvoir de séparation. Il s'agit de sa capacité à distinguer deux points voisins.

Le phénomène de diffraction imposé par la nature ondulatoire de la lumière limite donc la résolution d'un microscope optique à environ 200 nm.



**Figure II.24:** Image (figure d'Airy) et profil d'intensité selon l'axe des  $y$  d'un point source unique au travers d'un microscope à symétrie circulaire



**Figure II.25:** Images (a, b et c) et coupes transversales (a',b' et c') de deux points sources ;résolus (a&a'), séparés de la distance définie par le critère de Rayleigh-Abbe (b&b'), non résolus (c&c').

### I.3.1.1: Microscopie optique à contraste de phase interférentiel différentiel (DIC)

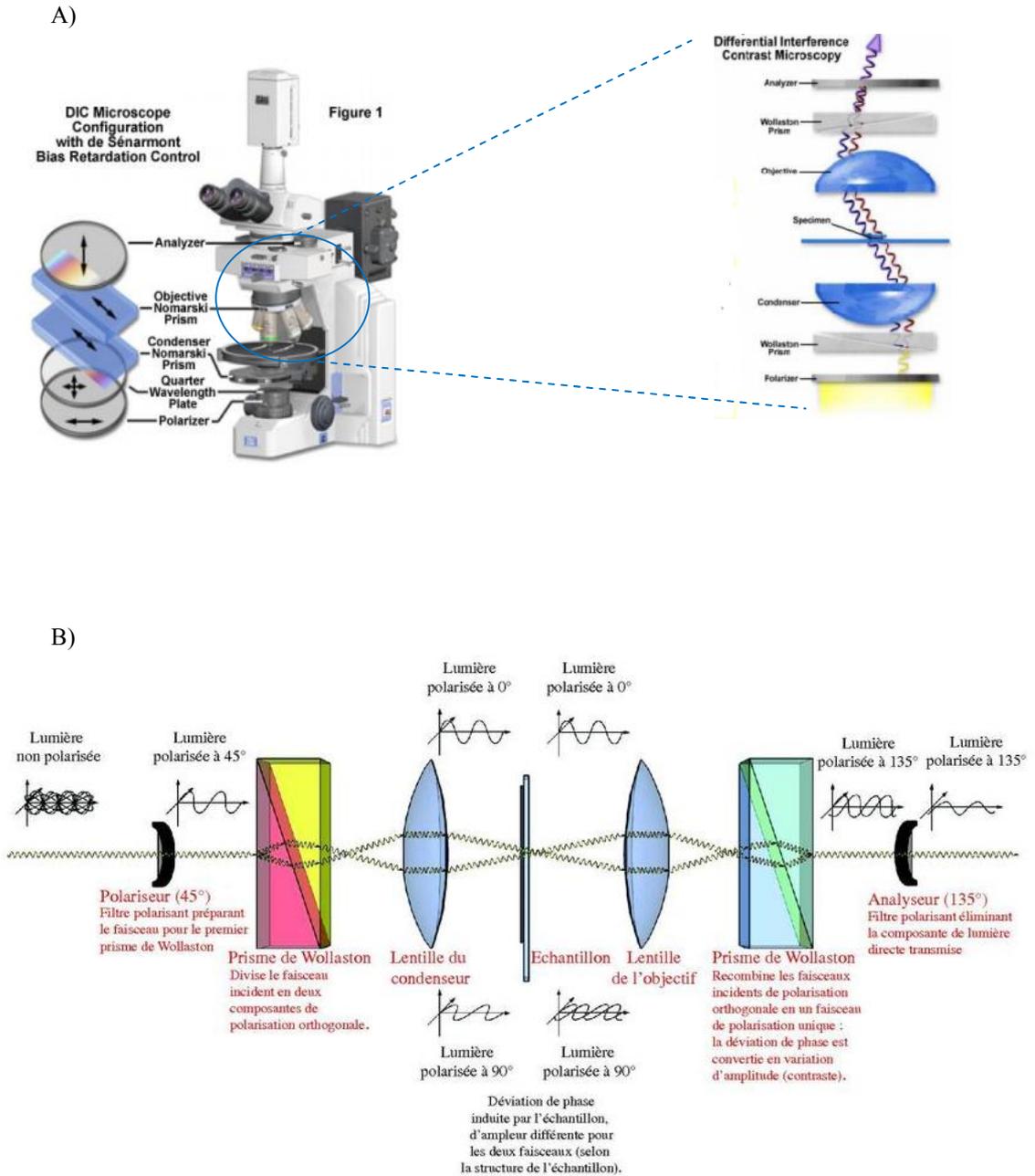
Le principe de la microscopie à contraste de phase Interférentiel Différentiel repose sur l'utilisation d'un polariseur et une lame quart d'onde sont combinées pour produire une lumière polarisée linéairement, elliptique ou circulaire. Le principe repose sur la division d'un rayon lumineux polarisé, qui a rencontré un prisme de Nomarski ou de Wollaston (cristal biréfringent) qui produit deux rayons de même longueur d'onde, mais polarisés orthogonalement et séparés spatialement. Le condenseur focalise ces deux ondes sur l'échantillon. La lumière sortant de l'échantillon est focalisée par l'objectif sur un second prisme qui recombine les deux faisceaux (figure II.26). Cette technique est sensible au gradient

de phases induit par l'échantillon. Cette recombinaison conduit à l'obtention d'interférences constructives, si les deux ondes présentent des phases identiques, ou destructives, en cas de déphasage des ondes. Ce dernier cas de figure se rencontre lorsque les deux ondes ont traversé des milieux d'indice différents. L'image retranscrite par l'analyseur est le résultat de l'ensemble des interférences du champ observé dépendant du déphasage.

#### I.3.1.2: Epifluorescence:

##### **a) Principe:**

L'émission de lumière peut révéler des propriétés des molécules biologiques très différentes de celles révélées par l'absorption de lumière. Le processus d'émission se réalise sur une échelle de temps beaucoup plus longue ( $10^{-9}$  à  $10^{-8}$  vs  $10^{-15}$  sec), ce qui permet à un plus grand nombre d'interactions et de perturbations de se produire et de venir influencer le spectre. Au total, la fluorescence est beaucoup plus sensible que le Dichroïsme Circulaire par exemple à l'environnement d'un chromophore et est très efficace pour suivre la liaison de ligands aux macromolécules ainsi que les changements conformationnels. Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission) (Valeur 2001). Par définition, une molécule à l'état fondamental est dite stable et les molécules susceptibles de fluorescer possèdent un système d'électrons appariés dans un état stable. L'absorption d'un photon d'énergie suffisante entraîne le passage d'un des deux électrons qui se trouvait sur une orbitale de plus faible énergie à une orbitale d'énergie plus élevée, la molécule se trouvant alors dans un état dit "excité" et instable. La durée de vie d'un électron sur une orbitale de niveau d'énergie élevée est de l'ordre de quelques nanosecondes. Le diagramme de Jablonsky schématise l'ensemble du processus d'excitation et de désactivation (Figure II.27).



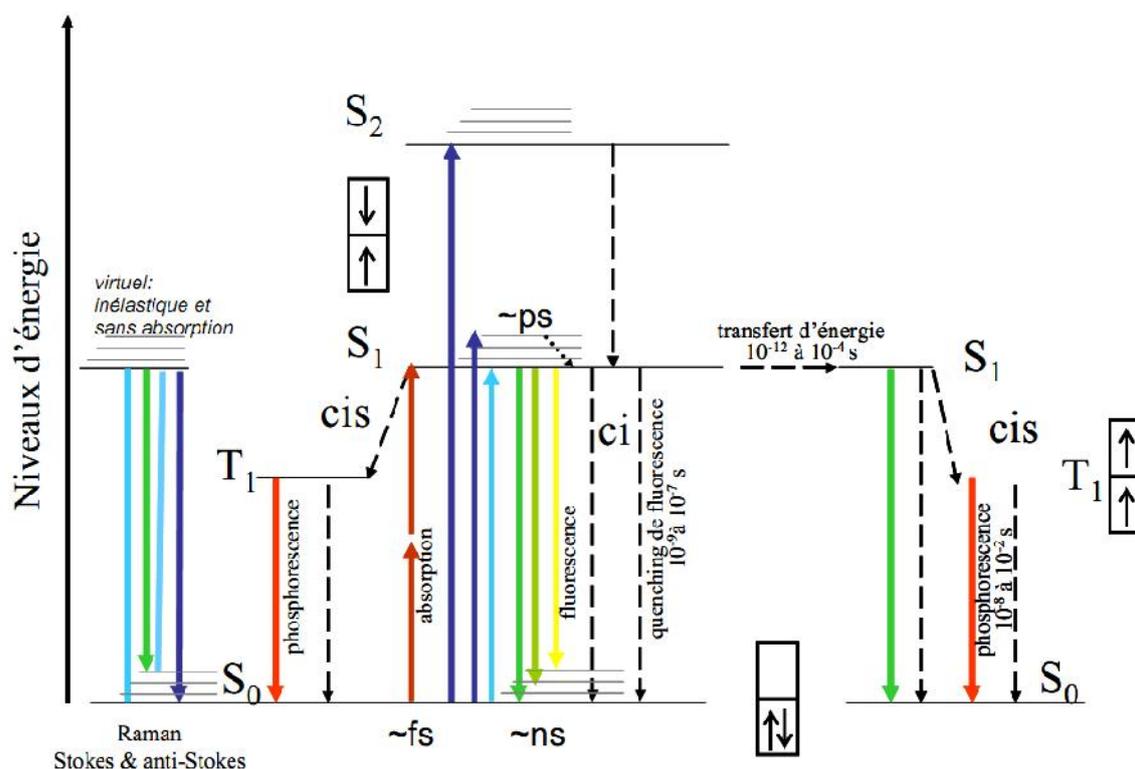
**Figure II.26:** A) Schéma montrant les différentes parties d'un microscope optique servant pour la microscopie à contraste de phase interférentiel différentiel (DIC)

B) Trajet des rayons dans un microscope DIC

Lorsqu'une quantité appropriée d'énergie électromagnétique est fournie à une molécule, cette molécule peut passer de l'état stable  $S_0$  à un état excité supérieur  $S_n$ , chacun de ces états ayant encore divers niveaux d'énergie vibrationnelles, rotationnelles, etc. Le passage de  $S_0$  vers  $S_n$  se fait par absorption d'un photon. Les collisions avec les autres molécules induisent une perte d'énergie vibrationnelle pour la molécule excitée, jusqu'à atteindre le niveau vibrationnel le plus bas de l'état électronique excité.

Après un certain temps, avec d'abord des réorganisations concernant les faibles énergies vibrationnelles etc., la molécule se relaxe ensuite dans un des états vibrationnels de l'état fondamental en émettant un photon. Lors de ce processus, les photons acquièrent différentes énergies, et par conséquent différentes fréquences. Par analyse de ces fréquences en spectroscopie de fluorescence, la structure des différents niveaux de vibration peut être déterminée. La désactivation des molécules excitées s'effectue suivant 3 grands processus:

- La molécule en passant du premier niveau excité  $S_1$  au niveau  $S_0$  (état fondamental) émet un photon de fluorescence:  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ .
- Soit ce retour se fait par étapes successives avec passage pendant un certain intervalle de temps à des niveaux d'énergie intermédiaires. Ainsi une molécule excitée à un niveau élevé (état  $S_2$  ou supérieur) est rapidement désexcitée en suivant un processus non radiatif (conversion interne) et atteint l'état excité  $S_1$ . Une conversion interne  $S_1 \rightarrow S_0$  peut se produire rapidement, cependant, dans le cas des molécules fluorescentes, cette vitesse est suffisamment lente pour que la désexcitation par émission de lumière puisse avoir lieu. La fluorescence est aussi en compétition avec le passage inter-système: état singulet  $S_1 \rightarrow$  état triplet  $T_1$ , l'émission de lumière qui accompagne le passage  $T_1 \rightarrow S_0$  est appelée phosphorescence. Signalons que la probabilité de passage de  $S_1$  vers  $T_1$  est au moins un ordre plus faible que la désexcitation radiative  $S_1$  vers  $S_0$ . Les photons émis par fluorescence ont une énergie plus faible que celle des photons absorbés.
- soit la molécule revient dans son état fondamental sans émission de photons. Ces transitions non radiatives sont plus ou moins fréquentes en fonction de divers paramètres liés à l'environnement direct de la molécule. C'est la désactivation non radiative; l'énergie étant dissipée par les chocs moléculaires ou à la suite de la collision avec les particules de solvant. Ainsi, d'après la loi de Stokes, la longueur d'onde de la lumière d'émission sera plus élevée que celle de la lumière d'excitation. Le spectre d'émission de fluorescence sera donc décalé vers des longueurs d'ondes plus grandes que la longueur d'onde d'excitation. C'est ce qu'on appelle le déplacement de Stokes (Valeur 2004).



**Figure II.27:** Diagramme de Jablonsky indiquant les chemins permettant la production et la désexcitation d'un état excité ( $S$  = état Singulet ;  $T$  = état Triplet ; CIS = Conversion Inter Système).

Du fait de la compétition entre les processus radiatifs et non radiatifs, toutes les molécules excitées n'émettent pas des photons de fluorescence. Le rendement quantique de fluorescence est défini par le rapport de  $n_F$ : nombre de photons émis, à  $n_A$ : nombre de photons absorbés:  $\Phi = n_F / n_A$ . L'intensité de fluorescence,  $I_F$  étant proportionnelle au nombre total  $n_F$  de photons émis sur l'ensemble du spectre:

$\Sigma hv_i$ , le rendement quantique de fluorescence est directement corrélé à l'intensité de fluorescence, il caractérise l'efficacité du processus de fluorescence, et sa valeur varie à la suite de la fixation au ligand.

Le rendement quantique est essentiellement indépendant de la longueur d'onde d'excitation, et sa valeur dépend de la "balance" entre le processus de fluorescence proprement dit (émission d'un photon) et l'ensemble de processus non radiatifs (sans émission d'un photon) comme la conversion interne (retour non radiatif à l'état fondamental) la conversion vers l'état triplet, éventuellement la décomposition de la molécule à l'état

excité. Selon les molécules considérées, il peut varier de 1 pour les molécules les plus fluorescentes à 0 pour les non fluorescentes. D'autres phénomènes peuvent contribuer à la diminution du rendement quantique :

- les collisions avec les molécules environnantes, en particulier avec les molécules de solvants, peuvent inhiber la fluorescence. On parle alors d'inhibition de fluorescence ("quenching");

- certains corps peu fluorescents en milieu polaire (dans l'eau), peuvent le devenir en milieu non polaire. Ce type de molécules trouve son utilité pour évaluer les variations de polarité de l'environnement ;

- des phénomènes de transfert d'énergie peuvent survenir entre les molécules voisines ; un chromophore absorbe un quantum de lumière puis le transfère (par un phénomène de résonance) à une molécule voisine qui va le réémettre. Le chromophore qui absorbe verra donc son rendement quantique de fluorescence diminuer. Ce processus de transfert dépendra de la distance entre les partenaires et de leur orientation réciproque. Il s'agit du transfert d'énergie de fluorescence.

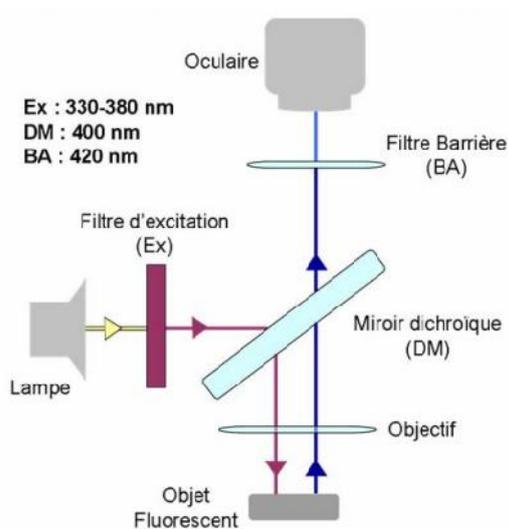
Toutefois, l'efficacité avec laquelle la lumière est absorbée à la longueur d'onde  $\lambda$  par un milieu absorbant est caractérisée par l'absorbance, qui suit la loi de Beer Lambert :

$$I_{\text{emission}} = 2,3 \cdot I_{\text{excitation}} \cdot \phi \cdot \varepsilon \cdot c \quad (\text{II.69})$$

Avec  $\phi$  le rendement quantique,  $\varepsilon$  : le coefficient d'extinction molaire,  $l$  : le trajet optique en cm et  $c$  : la concentration de la molécule absorbante.

La microscopie de fluorescence repose sur l'utilisation d'une radiation lumineuse pour éclairer un objet à une longueur d'onde « excitatrice », induisant ainsi l'émission de lumière à une longueur d'onde différente (Valeur, 2004). Plusieurs types de microscopes peuvent être utilisés pour visualiser des échantillons fluorescents selon la résolution souhaitée ou pour observer des structures en 2D.

Pour l'observation en 2D, on utilise des microscopes à fluorescence ou des microscopes à épifluorescence, le suffixe «épi » désignant les microscopes pour lesquels la lumière incidente (ou d'excitation) arrive sur le dessus de l'échantillon, tandis que pour les microscopes à fluorescence, la lumière incidente arrive en dessous de l'échantillon et traverse donc l'échantillon (Lichtman and Conchello 2005).



**Figure II.28:** Trajet lumineux observé pour un microscope à épifluorescence.

Le principe de base du microscope à fluorescence ou épifluorescence est d'envoyer une lumière excitatrice (visible ou UV), en partie filtrée, sur l'échantillon puis de séparer la lumière de fluorescence émise du reste de la lumière excitatrice grâce à des filtres et un miroir dichroïque afin que seule la fluorescence correspondant en théorie seulement à l'objet fluorescent d'intérêt puisse être captée par une caméra ou l'observateur. Les objets non-fluorescents n'émettent pas de lumière et ainsi restent noirs, comme le fond. La combinaison de trois éléments permet la séparation de la lumière d'excitation et la lumière d'émission, à savoir:

- un filtre d'excitation qui permet une première sélection des longueurs d'ondes d'excitation
- un filtre d'émission qui ne laisse passer qu'une gamme de longueur d'ondes qui correspondent aux longueurs d'ondes émises par le fluorophore.
- un miroir dichroïque qui reflète les plus petites longueurs d'ondes (celles correspondant à l'excitation) et ne laisse passer que les plus grandes longueurs d'ondes (celles correspondant à l'émission) en fonction des spectres d'excitation et d'émission du fluorochrome pour lequel il a été conçu, comme illustré dans la figure II.28)

Beaucoup de microscopes à fluorescence ou à épifluorescence fonctionnent avec des petits blocs-filtres, composés chacun d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission, correspondant aux principaux fluorochromes utilisés.

Néanmoins, dans l'application à l'étude d'échantillons plus épais, comme les agrégats, les images peuvent manquer de netteté à cause de la visualisation de la fluorescence émise hors

focus, c'est-à-dire venant de plans supérieurs ou inférieurs (Emptage 2001). Pour remédier à ce problème, il est possible de déconvoluer les images. Ce traitement permet grâce à un calcul, d'éliminer le flou dû à la fluorescence émise hors du plan focal. Néanmoins, une autre solution est d'utiliser des microscopes adaptés à l'étude de structures épaisses, permettant d'éliminer la fluorescence « hors focus ».

### **b) Partie expérimentale:**

Les liposomes biphényles dilués à 5mg/ml ont été déposés dans des chambres de culture à 8 puits (Lab-Tek™, Nalc Nunc International). Ces chambres sont constituées d'une lamelle de verre de 0.17μm d'épaisseur, adaptée pour l'observation en microscopie photonique à fort grossissement. Un dispositif en polystyrène est monté sur la lamelle constituant ainsi 8 compartiments indépendants. Des observations ont été réalisées en microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC en anglais pour Differential Interference Contrast) et en épifluorescence à l'aide du microscope IX81 (Olympus) équipé d'un objectif à immersion UplanFLN 60X à huile et de la caméra ColorviewIII (Olympus).. Les images obtenues en microscopie à épifluorescence ont nécessité l'utilisation du cube de fluorescence U-MWU2 (Olympus), équipé d'un filtre d'excitation passe-bande (330-385 nm), d'un miroir dichroïque (400 nm) et d'un filtre d'émission passe-haut (420 nm). Les images (2576 x 1932 pixels) ont été traitées par le logiciel ImageJ : optimisation de la luminosité et du contraste et optimisation de la résolution numérique.

#### I.3.1.3: Microscopie confocale de fluorescence.

### **a) Principe:**

La microscopie confocale est une technique de microscopie par balayage laser de fluorescence qui permettent une visualisation de l'échantillon en 3 dimensions, en réalisant des coupes virtuelles de l'objet. Nous présenterons ci dessous, la technique utilisée, ses limites et applications: la microscopie confocale à balayage laser (CSLM) qui vise à améliorer la microscopie de fluorescence conventionnelle dont un des inconvénients majeurs est la perte de résolution due à l'émission de fluorescence des plans inférieurs et supérieurs qui se superposent à l'image du plan focal. La microscopie confocale permet de pallier ce problème en utilisant un diaphragme (pinhole confocal) qui ne laisse passer que le rayonnement issu du plan focal.

Dans ces microscopes, un deuxième diaphragme (pinhole d'illumination) permet un éclairage focalisé en un point et un système de balayage spatial de l'échantillon est possible grâce à deux miroirs galvanométriques permettant ainsi l'obtention d'une image 2D d'un plan focal en faisant varier le champ parcouru en x et en y.

Le microscope confocal est relié à un système informatique qui permet à la fois de régler les paramètres de l'acquisition et de stocker les données récupérées de l'échantillon. Des photomultiplicateurs (PMT) permettent la conversion du signal lumineux (photons) en signal électronique (électrons) au niveau d'une photocathode, les électrons étant ensuite multipliés grâce à plusieurs électrodes (dynodes) dans un tube multiplicateur. Une des limites du microscope confocal pour l'étude de phénomènes dynamiques est le temps d'acquisition qui peut être élevé (Conchello and Lichtman, 2005) et qui dépend de plusieurs paramètres:

- la vitesse du balayage laser: qui est réglable, mais si on augmente la vitesse du laser (ou la fréquence de balayage), on perd de l'information et l'image risque d'apparaître plus «bruitée».
- l'épaisseur de l'échantillon à analyser: plus l'échantillon est épais et plus la durée d'acquisition sera importante.
- le « moyennage » réalisé sur un plan focal: plusieurs acquisitions du même plan focal peuvent être réalisées et une moyenne de ces acquisitions est ensuite effectuée par l'ordinateur. Cette méthode est couramment utilisée pour éliminer du bruit de fond et améliorer la qualité des images.

Deux phénomènes affectant l'intensité de fluorescence peuvent être observés: le photoblanchiment ("photobleaching") et le déclin de fluorescence ("quenching").

### **b) Partie expérimentale:**

Des observations ont été réalisées en microscopie confocale à l'aide du microscope LSM510 (Zeiss) équipé d'un objectif à immersion Plan-Apochromat 63X à huile. Les images ont été obtenues suite à une excitation à 405nm par une diode laser, l'utilisation d'un « beam splitter » 405nm et d'un filtre d'émission passe-haut (420nm). Le « pinhole » a été ajusté automatiquement à 1 airy, soit l'ouverture optimale pour une résolution optique maximale. Les images (1024 x 1024 pixels) ont été traitées par le logiciel ImageJ : optimisation de la luminosité et du contraste et optimisation de la résolution numérique.

### **I.3.2: Microscopie électronique.**

#### I.3.2.1: Cryo-microscopie électronique à transmission

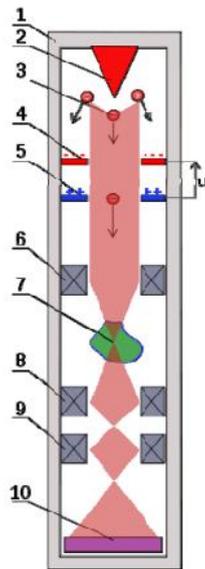
##### **a) Principe:**

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique en transmission est très similaire à celui d'un microscope photonique. Dans un MET, les électrons sont fournis par un canon à électrons. Ce canon est composé d'une source d'électrons ainsi que d'un système d'accélération des ces derniers par l'établissement d'une tension élevée (100 à 300 kV) entre la cathode (source d'électrons) et l'anode qui consiste en une plaque percée d'un trou laissant passer les électrons.

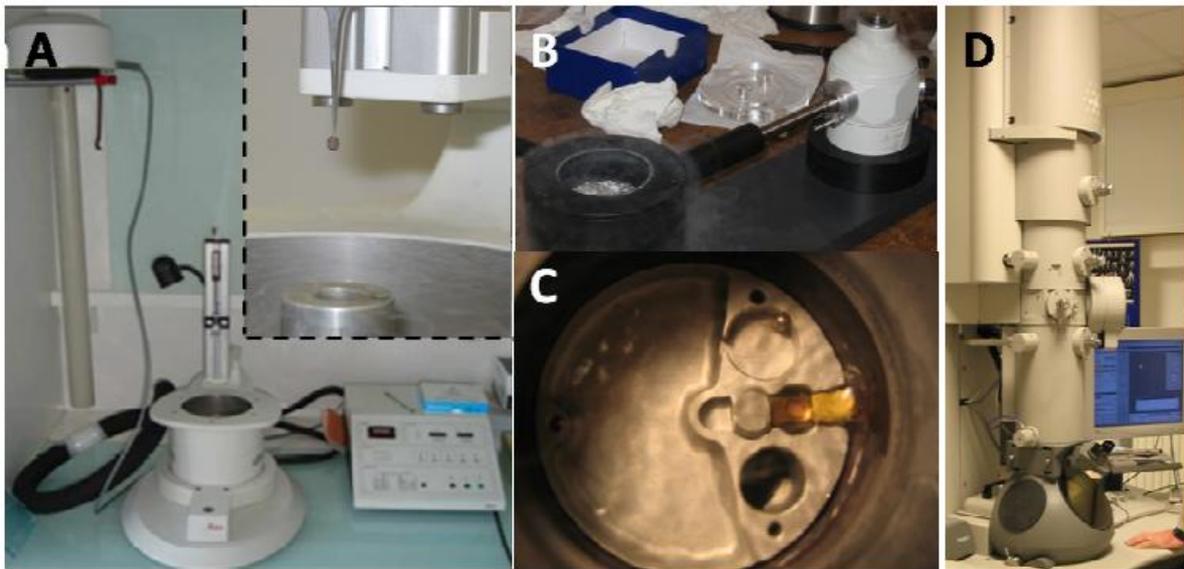
Le faisceau d'électrons émergent du canon est ensuite focalisé sur l'échantillon par le biais d'un jeu de lentilles magnétiques (figure II.29). Une lentille magnétique consiste en une bobine parcourue par un courant. Le mouvement des électrons dans les lentilles est alors régi par la force de Lorentz. Cet ensemble de lentilles présente l'avantage de pouvoir changer la focalisation simplement en changeant le courant passant dans les bobines. La colonne contenant les lentilles et l'échantillon doit être sous vide afin d'obtenir une image nette.

Ceci empêche une déviation des électrons par collision avec des molécules d'air. Le faisceau d'électrons transmis à travers l'échantillon est ensuite pris en charge par des lentilles objectives qui forme la première image agrandie de la zone de l'échantillon illuminée. La qualité des images obtenues dépend en grande partie de la qualité de ce jeu de lentilles. Par la suite, des lentilles projecteurs permettent d'obtenir un agrandissement supplémentaire de l'image et projettent l'image finale sur un détecteur qui est un écran fluorescent sensible aux électrons, un film photographique ou encore une caméra.

L'image finale est composée de niveaux de gris. Le contraste de l'image (variations de niveaux de gris au sein de l'image) dépend des différences de diffusion des électrons en différents points de l'échantillon. L'angle de déviation d'un électron diffusé dépend du numéro atomique de l'atome diffuseur. C'est la raison pour laquelle on contraste souvent les échantillons biologiques, dont les numéros atomiques des éléments qui les composent (C, N, O, H) sont faibles, à l'aide de métaux lourds. Ainsi, une zone de l'échantillon diffusant fortement les électrons se traduira sur l'image finale par une zone sombre. La présence d'un diaphragme dans le plan focal image de la lentille objectif permet d'éliminer les électrons fortement déviés et donc d'augmenter le contraste de l'image qu'on peut appeler le contraste d'amplitude.



**Figure II.29:** Schéma du faisceau d'électrons dans un microscope électronique à transmission. 1: colonne, 2: source d'électrons, 3: électrons, 4: cathode, 5: anode, 6: lentilles condenseur, 7: échantillon, 8: lentilles de diffraction, 9: lentilles projection, 10: détecteur.



**Figure II-30:** Matériel utilisé pour la cryo-microscopie électronique. A) Guillotine pour la congélation des grilles (EM CPC, Leica). Encadré: grossissement sur l'appareil en fonctionnement. La grille est maintenue par une pince fixée au bras de l'appareil, elle est placée juste au-dessus du bain d'éthane liquide B) Porte objet cryo (Gatan 626) dans sa station de transfert. C) Extrémité du porte objet sur laquelle est fixée la grille maintenue dans l'azote liquide. D) Microscope électronique en transmission (Tecnai FEG F20, FEI).

Dans la pratique, la contribution du contraste d'amplitude est faible pour les échantillons congelés hydratés. Leur observation nécessite donc de sous focaliser l'échantillon afin de créer du contraste de phase. Les conditions d'observation en microscopie électronique à transmission imposent certaines contraintes quand à la nature des échantillons pouvant être analysés. La première contrainte est la nécessité d'observer des échantillons peu épais afin d'éviter les phénomènes de diffraction multiples au sein même de l'échantillon. Une deuxième contrainte est liée au vide poussé régnant dans la colonne du microscope qui impose d'observer des échantillons dépourvus d'eau sous forme liquide. Cette deuxième contrainte est particulièrement gênante dans le cadre d'échantillons biologiques fortement hydratés par nature.

La technique de cryo-TEM permet de contrecarrer ce problème. Elle consiste à observer un échantillon à une température très basse, en utilisant un porte-objet «cryo», qui permet de maintenir l'échantillon à une température très basse, proche de celle de l'azote liquide (-196°C). L'échantillon est congelé dans de l'éthane liquide (-190°C), couramment utilisé car il est un bien meilleur fluide cryogénique que l'azote liquide (Bruggeller 1980, Dubochet 1981). L'échantillon est à l'état congelé-hydraté. La cryo-microscopie permet donc d'étudier les échantillons biologiques non marqués et hydratés. En effet, la température très basse empêche l'eau de s'évaporer, même sous vide ce qui permet l'observation de l'échantillon en détail dans son état natif hydraté.

### **b) Partie expérimentale:**

Une goutte de l'échantillon en solution (dispersion de lipides diluée à 1 mM) est déposée sur une grille de microscopie en cuivre recouverte d'un film de carbone à trous (Lacey/Formvar/Carbon, Ted Pella). Cette grille est préalablement rendue hydrophile par un traitement à l'UV-ozone. La méthode de congélation se fait par la technique de la « guillotine ». La grille est maintenue par une pince fixée au bras de la « guillotine » (EM CPC, Leica) (Figure II-30). L'excès de solution est éliminé par absorption à l'aide d'un papier filtre. De ce fait, seul un mince film de solution subsiste, suspendu dans les trous du carbone. La grille est ensuite rapidement plongée dans l'azote liquide à -173°C, transformant l'eau liquide en glace amorphe. La grille est disposée dans un porte-grille préalablement refroidi et maintenu dans les vapeurs d'azote. La grille est ensuite montée sur un porte objet cryo (Gatan 626) à l'aide de sa station de transfert qui permet de maintenir la grille ainsi que l'extrémité du porte objet à température de l'azote liquide pendant toute l'opération de chargement de la grille.

L'observation des échantillons est réalisée sur un microscope électronique en transmission Tecnai-F20 opérant à 200 kV et doté d'une source à émission de champ (FEG). Les images sont acquises en mode low-dose à un grandissement maximal de 50000x avec une caméra CCD 2k x 2k pixels (Gatan, CA, USA).

### I.3.2.2: CEMOVIS (Cryo-microscopie électronique de Sections Vitreuses).

#### a) Principe:

La cryo-microscopie consiste à observer un échantillon à une température très basse en utilisant un porte-objet "cryo" qui permet de maintenir l'échantillon à une température très basse, proche de celle de l'azote liquide (-196°C). Elle s'applique aussi bien à l'observation de films minces vitrifiés qu'à l'observation de sections vitreuses obtenues selon la technique de cryo-ultra microtomie. L'observation en MET nécessite que l'objet soit peu épais (quelques centaines de nm), or les liposomes présentent des tailles de l'ordre du  $\mu\text{m}$ . Pour les observer, il est nécessaire de les sectionner en fines tranches compatibles avec l'observation en TEM. De plus, les liposomes sont principalement constitués d'eau, qui sous forme liquide, est incompatible avec le vide régnant dans la colonne du microscope. Toutes les techniques de préparation pour l'observation en MET passe par une déshydratation réalisée en remplaçant l'eau généralement par un solvant organique, seule la technique de CEMOVIS qui sera présentée permet de s'affranchir de cette étape.

Bien que permettant l'observation de l'ultra-structure de la cellule dans un état proche de son état natif, et donc en l'absence des artéfacts liés à l'agrégation et la coloration induites par les techniques classiques, la méthode de CEMOVIS n'est pas dépourvue d'artéfacts, essentiellement liés au processus de coupe. Ces artéfacts sont bien documentés, et sont également rencontrés, mais dans une moindre mesure avec les méthodes de coupe conventionnelles (Hayat 1970). Ces défauts se regroupent en quatre catégories: la compression, les crevasses, le « chatter », les marques de couteau (Dubochet, Adrian et al. 1988, Dubochet, Zuber et al. 2007) (Figure II.32).

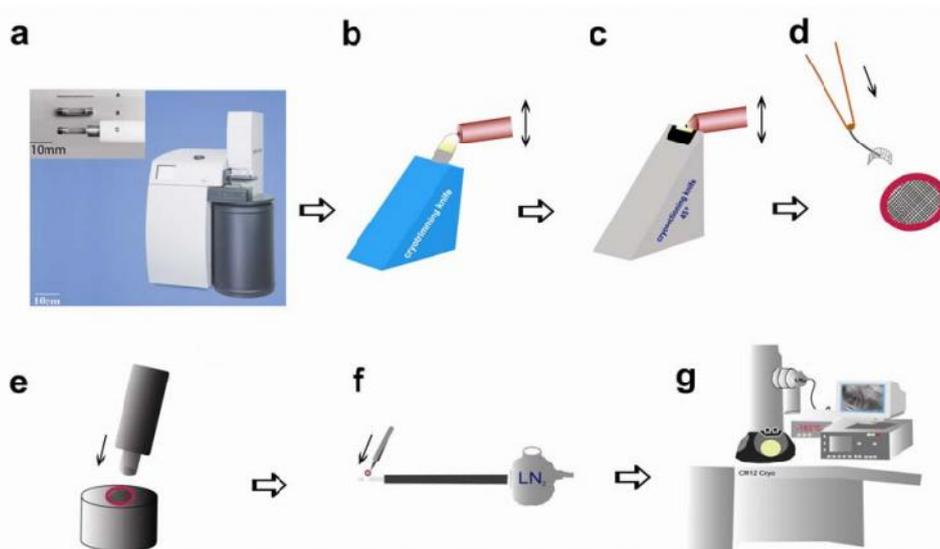
-La compression est liée à la déformabilité de l'eau amorphe au passage du couteau et affecte toutes les cryo-sections. Les dimensions sont réduites de 30 à 60% le long de la direction de coupe alors qu'elles sont maintenues dans la direction perpendiculaire. Cette compression s'accompagne d'une augmentation de l'épaisseur de la coupe par rapport à la valeur nominale choisie par l'expérimentateur. Elle dépend de la nature du matériau et peut donc varier d'un échantillon à l'autre, mais elle dépend aussi d'autres paramètres, tels l'angle du couteau et l'épaisseur de coupe (Han 2008, Han, Zuber et al. 2008). Plus celle-ci est importante, moins la compression est sévère.

- Les crevasses apparaissent comme des sillons parallèles au tranchant du couteau. Elles correspondent à des fractures en profondeur de l'échantillon. Elles ne sont pas systématiquement présentes sur les coupes. Elles apparaissent d'autant plus facilement que le matériau coupé est rigide et non déformable. Certains matériaux sont plus enclins à former ce type de défauts comme les gouttelettes lipidiques. Elles sont généralement absentes des coupes ultraminces (< 50 nm) et plus fréquentes quand l'épaisseur de la coupe augmente.
- Le « chatter » est une variation périodique de l'épaisseur de la coupe due à une vibration du spécimen par rapport au couteau. Cette peut être liée à une mauvaise fixation de l'échantillon ou à une vitesse de coupe correspondant à une fréquence de résonance de l'ensemble échantillon- couteau. Ce phénomène est généralement facilement évitable en modifiant la vitesse de coupe par exemple.
- Les marques de couteau apparaissent comme des striations, parallèles à la direction de coupe. Elles correspondent à des sillons superficiels provenant des défauts du tranchant du couteau de diamant.

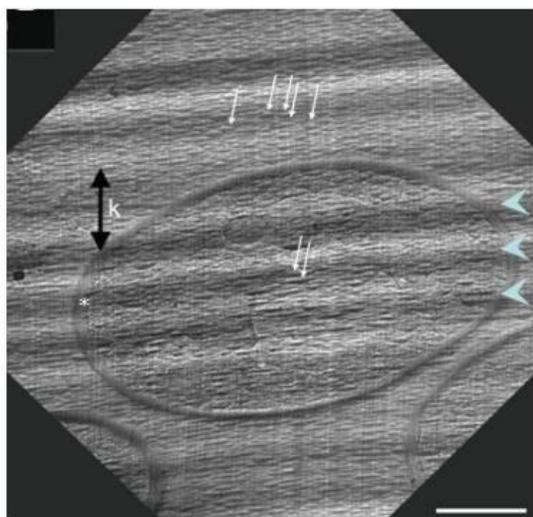
#### **b) Procédé expérimental:**

Ces expériences ont été menées en collaboration avec Etienne Gontier (Bordeaux Imaging Center-Bordeaux II).

Des liposomes de DMPC et TBBPC (h=80% H<sub>2</sub>O + 20% glycérol), aspirés dans un tube de cuivre de diamètre 250µm à l'aide d'un fil de platine. Les tubes de cuivre, placés dans leur dispositif de congélation, sont suite immergés dans la même solution de liposomes et tout le dispositif est introduit pendant une heure dans un champ magnétique de 18,8T. Le glycérol 20% (v/v) joue ici le rôle de cryoprotectant. En effet, il s'est avéré nécessaire d'en utiliser un pour obtenir des résultats satisfaisants au niveau de la préservation de l'ultrastructure cellulaire. Le glycérol présente peu d'effets osmotiques et a donné de bons résultats en RMN dans la mesure où il y a conservation de la déformation en oblate des liposomes de biphényles (spectres non présentés) et présente l'avantage de ne pas diffuser à l'intérieur des cellules de par sa taille, ce qui limite les perturbations des cellules. Les dispositifs sont introduits dans l'appareil de congélation à haute pression EMPACT (Leica-Microsystems, Vienna, Austria) immédiatement après application du champ magnétique. La vitrification repose sur l'application d'une pression d'air comprimé de 2000 bars sur l'échantillon, synchronisée avec la projection d'azote liquide appliquée des deux cotés du tube de cuivre simultanément (vitesse de congélation de 10000°C/secondes).



**Figure II.31.** Déroulement de l'expérience de Cémovis. a) la congélation (EMPACT (Leica-Microsystems, Vienna, Austria); b) et c) la cryo-section, d) la collection des sections, e) le cryo--transfert vers le microscopie pour la visualisation par cryo-microscopie.



**Figure II.32.** Principaux artefacts de cryosections (d'après Al-Amoudi, thèse de doctorat, Lausanne, 2004). Cryo-section de levure présentant les principaux artefacts liés à la coupe des échantillons hydratés congelés. Les marques de couteaux sont visibles comme des stries orientées parallèlement à la direction de coupe ( $k$ ). Les crevasses (flèches blanches), sont des fractures de l'échantillon, présentes sur toute l'image, à l'exception de la région de la paroi cellulaire (\*). La compression à grande distance est particulièrement importante et se traduit par un aplatissement global de la cellule et des compartiments subcellulaires dans la direction de coupe. Le « chatter » perpendiculaire à la direction de coupe se traduit par une modulation périodique de l'épaisseur de la coupe (têtes de flèches). Echelle  $1\ \mu\text{m}$ .

Plus de détails concernant le principe et le fonctionnement de cet appareil sont disponibles dans l'article (Studer, Graber et al. 2001). Les échantillons une fois congelés sont directement conservés dans un diwar d'azote liquide jusqu'à ce qu'ils soient cryo-sectionnés (figure II.31).

Les échantillons sont transférés dans un ultra-microtome (Leica FC6/UC6) et coupés à  $-170^{\circ}\text{C}$  à l'aide d'un couteau diamant  $25^{\circ}$  (Diatome) à une épaisseur de 50nm. Les coupes sont récupérées sur des grilles Quantifoil S7/2. L'orientation de la coupe peut être déterminée sur les photos à l'aide des marques de couteau laissées par les irrégularités du tranchant. Afin de s'affranchir de la compression due à la coupe, les échantillons sont coupés dans deux orientations perpendiculaires. Les grilles sont introduites dans un porte-objet cryo (Gatan, CA, USA) maintenu autour de  $-170^{\circ}\text{C}$  et observées à l'aide d'un microscope électronique FEI Tecnai F20 utilisant une tension de 200KV. Des images sont acquises à l'aide d'une camera  $2\text{k} \times 2\text{k}$  USC 1000 slow-scan CCD (Gatan).



## CHAPITRE III

### **Synthèses des lipides et préparation des modèles membranaires**



Dans notre approche, une biomembrane simplifiée est constituée principalement de deux éléments : les lipides et les protéines. Parmi les espèces membranaires considérées pour notre étude certaines n'existent pas dans le milieu naturel, nous avons donc synthétisé séparément ces différents composés pour ensuite les assembler et les analyser. Ce sont ces étapes de synthèses qui sont développées dans ce chapitre : nous présenterons tout d'abord celle des lipides constitutifs des liposomes se déformant dans le champ magnétique, pour finir par la préparation de nos modèles membranaires dans lesquels ont été insérés le peptide surfactine SF et la protéine Pf<sub>1</sub>, les deux étant uniformément marqués <sup>15</sup>N.

### **I: Synthèse des lipides TBBPC, HBBPC et OBBPC.**

Toute notre étude est donc basée sur la synthèse de ces phospholipides innovants, qui a été effectuée par synthèse organique afin de préparer des structures bien définies et avec une bonne pureté. Dans le but de se rapprocher de la diversité lipidique présente dans les membranes biologiques, les différents lipides synthétisés ont des longueurs de chaînes aliphatiques et des degrés d'insaturation différents (lipides avec des chaînes aliphatiques en C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub> et C<sub>18:1</sub>).

#### **I.1.1 : Méthodologie des synthèses.**

##### I.1.1.1: Synthèse du lipide TBBPC

Le lipide 1-tétradecanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (TBBPC) a été synthétisé en suivant majoritairement le protocole utilisé par Tan et al. (Eggers 2001, Tan 2002) et repris par Loudet et al (Loudet 2005).

Les différentes étapes de cette synthèse sont détaillées dans la figure III.1 : une acylation de type Friedel et Crafts, en présence du catalyseur AlCl<sub>3</sub>, entre l'anhydride succinique **1** et l'unité biphényle **2**, permet de former l'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque **3**; ce dernier est ensuite réduit (réaction de Clemenson) en présence de zinc et HgCl<sub>2</sub>, afin d'obtenir l'acide 4-(4-biphényle)butanoïque **4**. Le lyso lipide **5** (1-Myristoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphocholine (lyso-MPC)), est ensuite couplé par une réaction d'esterification à l'acide **4** en présence du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et d'acide 4- (diméthylamino)pyridine (DMAP) pour former le composé final **8**, le lipide 1-tétradecanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (TBBPC) avec un rendement de

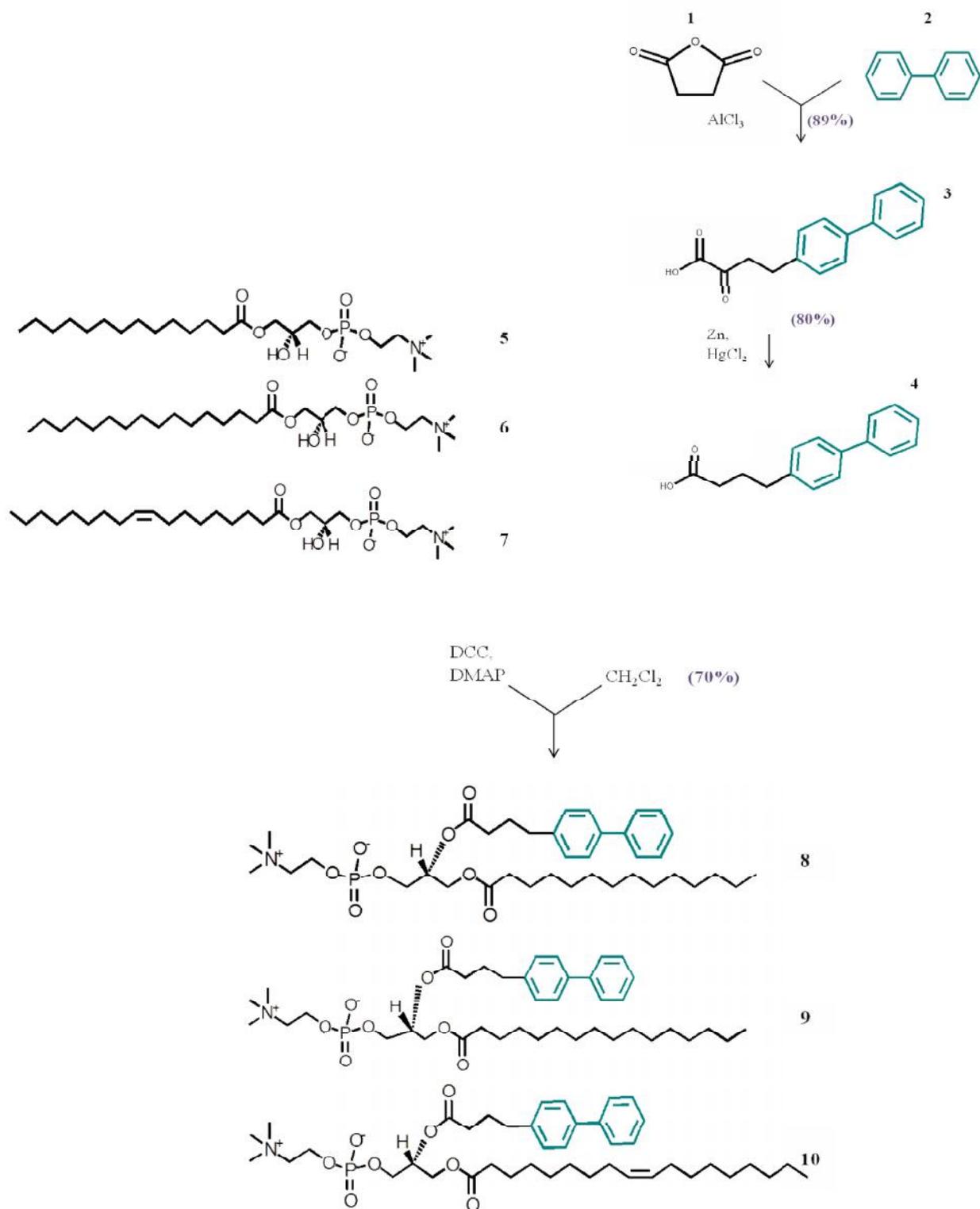
70% obtenu après les deux purifications.

#### I.1.1.2: Synthèse du lipide HBBPC

Le lipide: 1-hexanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (HBBPC) a été synthétisé en suivant les mêmes étapes que pour le lipide TBBPC. La réaction d'estérification a été effectuée entre le lyso lipide **6** (1-Hexadecanoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphocholine (lyso-HPC) et l'acide **4** pour former le composé final **9**, 1-hexanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (HBBPC) avec un rendement de 77%.

#### I.1.1.3: Synthèse du lipide OBBPC

Le lipide : oleoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (OBBPC), a été synthétisé selon la même procédure que pour les lipides TBBPC et HBBPC. L'acide 4-(4-biphényle)butanoïque **4** dont la synthèse a été détaillée dans le paragraphe a) est couplé cette fois avec le lyso lipide **7** (1-oleoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphocholine en présence du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et d'acide 4- (diméthylamino)pyridine (DMAP) pour obtenir le composé final **10** 1-oleoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (OBBPC) avec un rendement de 70%.



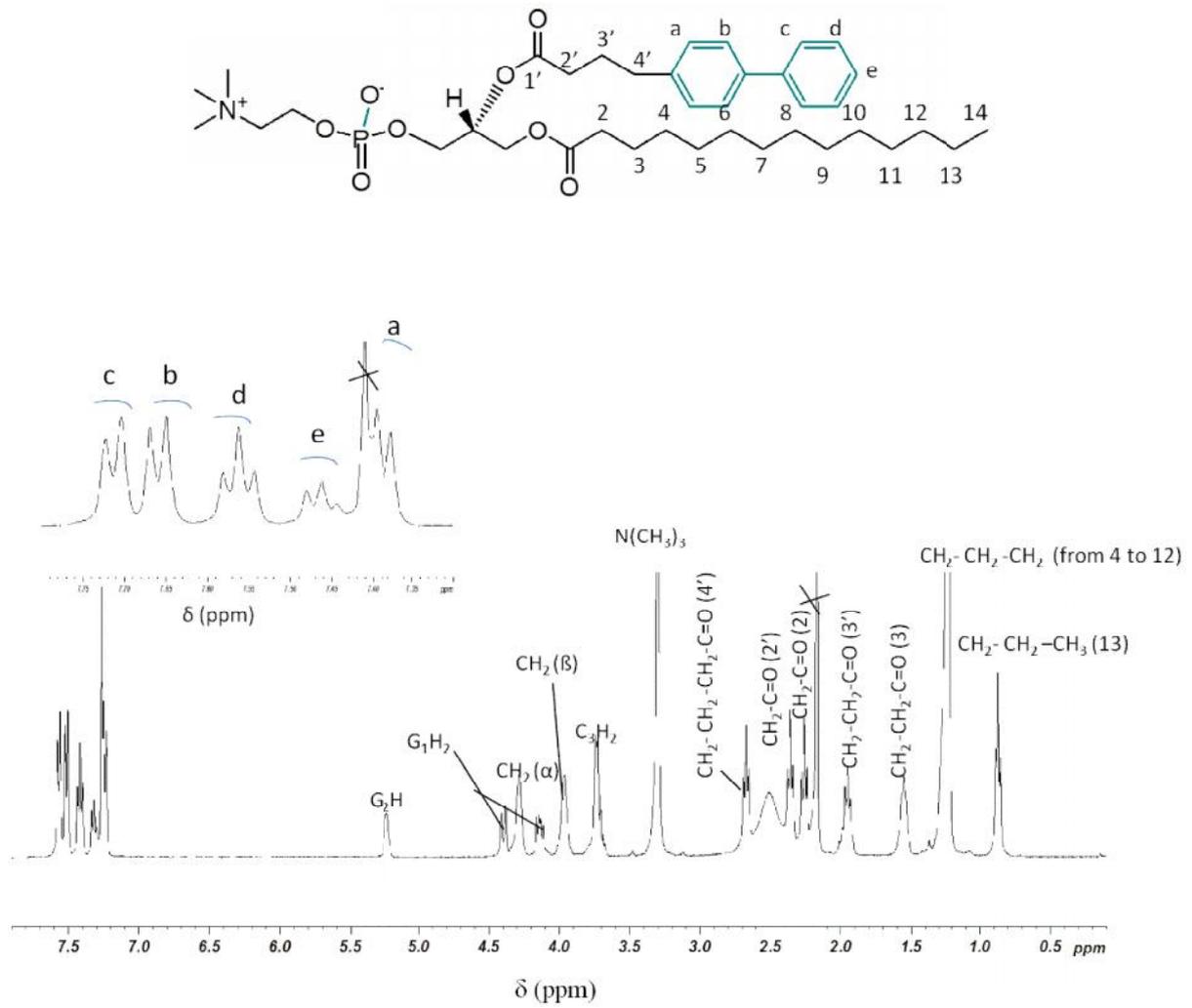
**Figure III.1 :** Schéma de synthèse des 3 lipides TBBPC (**8**), HBBPC (**9**) et OBBPC (**10**). Le rendement de chaque étape de réaction est indiqué en violet entre parenthèses.

**I.1.2: Résultats et Discussion:**

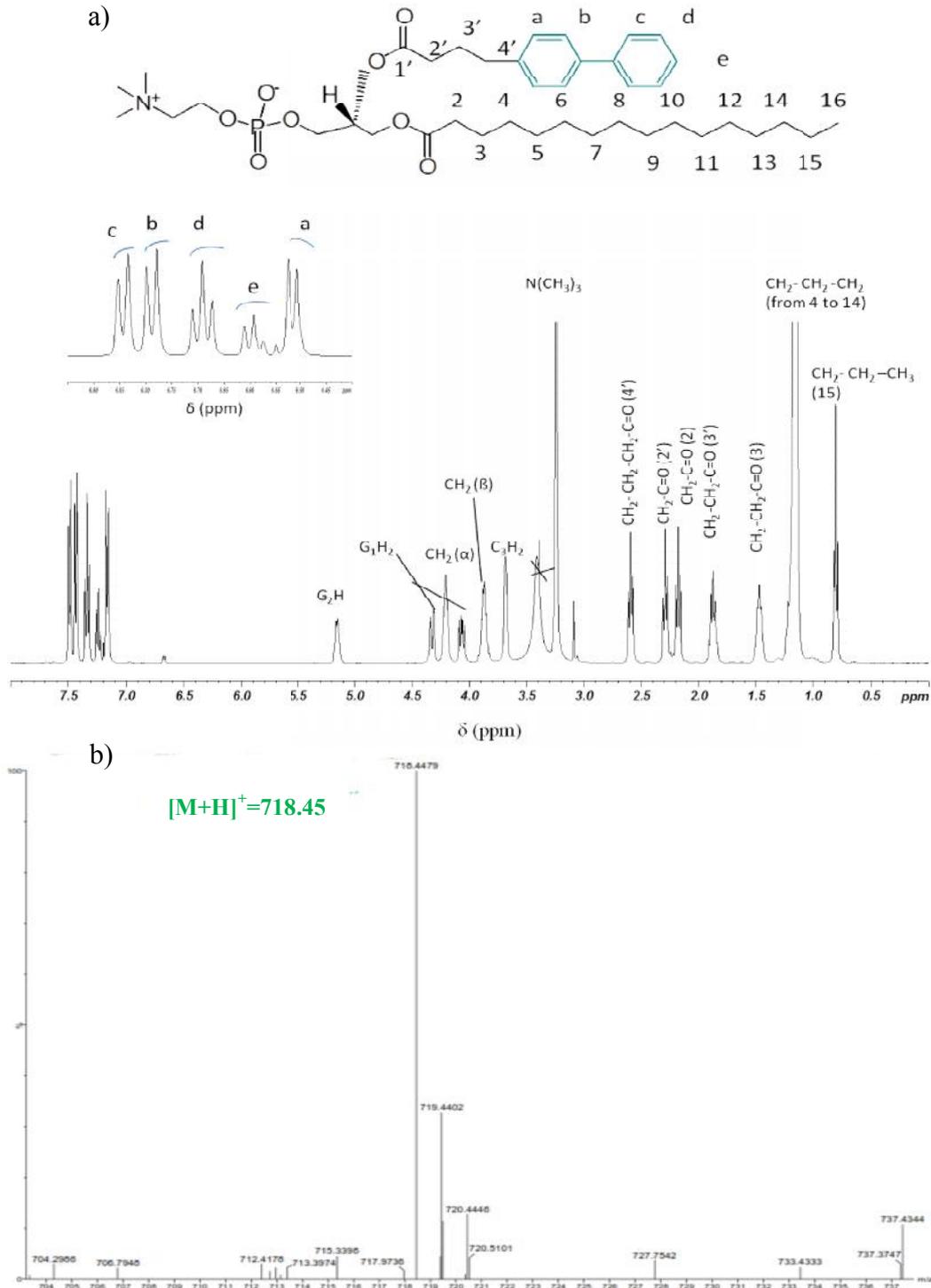
Chaque étape de synthèse des précurseurs (détaillée dans la section III.1.3) a été optimisée afin d'améliorer leurs rendements. Ainsi, le rendement de la synthèse de l'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque a été augmenté de 24% (de 65% à 89%) et celui de l'acide gras : 4-(4-biphényle)-4-butanoïque de 21% (de 59% à 80%). L'origine de ces améliorations de rendements est probablement due au fait que les précurseurs, hautement hygroscopiques étaient fraîchement préparés et qu'ils n'ont pas été stockés au préalable au congélateur avant l'étape d'estérification.

Ainsi nous montrons que la réaction d'estérification entre l'acide 4-(4-biphényle)-4-butanoïque et le lyso lauroylphosphatidylcholine (chaîne aliphatique en C<sub>12:0</sub>) développée à l'origine par Tan et al, et reprise par Loudet et al. avec le lyso-myristoylphosphatidylcholine (chaîne aliphatique en C<sub>14:0</sub>) (Loudet 2005), peut-être facilement appliquée sur le lyso-hexadecanoylphosphatidylcholine (chaîne aliphatique en C<sub>16:0</sub>) et le lyso-oleoylphosphatidylcholine (chaîne aliphatique en C<sub>18:1</sub>). Les spectres RMN-<sup>1</sup>H attribués du TBBPC, HBBPC et OBBPC sont présentés dans les figures III.2, III.3 et III.4. Les pics barrés par une croix correspondent à des traces de solvant organique (chloroforme ≈ 7,2 ppm, méthanol ≈ 3,6 ppm...) ou à des impuretés. On retrouve les signaux caractéristiques des chaînes aliphatiques à 0,8ppm et 1.2ppm, celui de la tête choline à ≈ 3,2 ppm, et ceux correspondants aux cycles phényles entre 7,2ppm et 7,6ppm. La figure III.6 montre l'emplacement de l'insaturation au niveau de la chaîne aliphatique *sn*<sub>1</sub> de OBBPC.

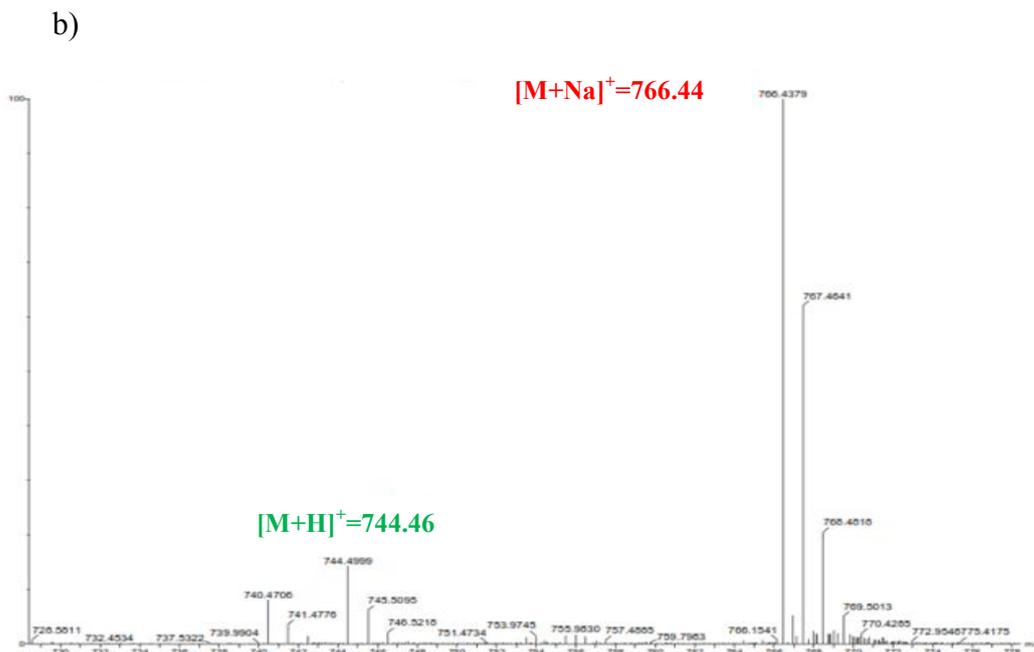
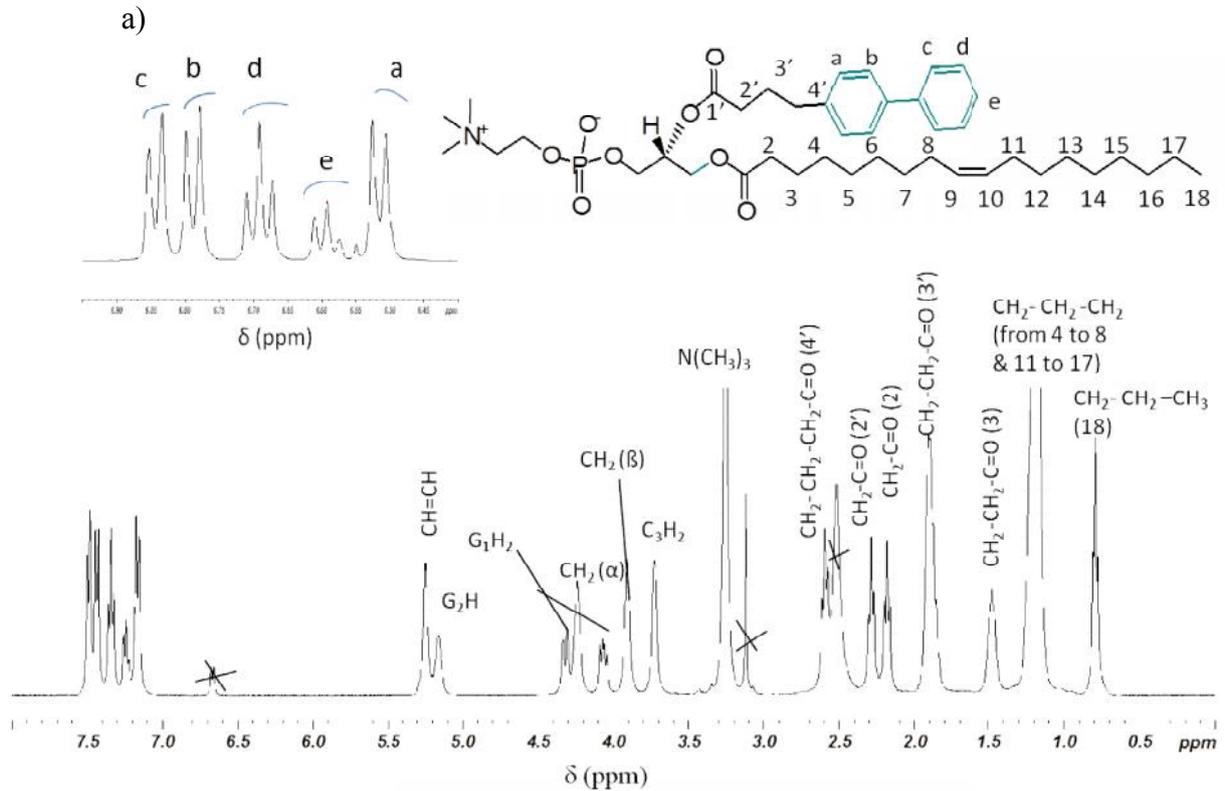
Nous avons également caractérisé les composés finaux HBBPC et OBBPC par spectrométrie de masse en mode ESI (Electro Spray Ionisation), (figures III.2 et III.3). On retrouve les pics majoritaires à  $m/z=718,5$ ,  $m/z=744,5$  et  $m/z=766,4$  caractéristiques respectivement des ions moléculaires [HBBPC+H]<sup>+</sup> et [OBBPC+H]<sup>+</sup> et [OBBPC+Na]<sup>+</sup>, ce qui permet de confirmer la bonne pureté des produits synthétisés. Le marquage isotopique au deutérium s'avère également être très utile pour sonder par RMN-<sup>2</sup>H la dynamique de ces derniers au sein des modèles membranaires. Il aurait été intéressant d'effectuer la synthèse des lipides TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub>, HBBPC-<sup>2</sup>H<sub>31</sub> et OBBPC-<sup>2</sup>H<sub>33</sub> deutérés sur leur chaîne aliphatique *sn*<sub>1</sub>.



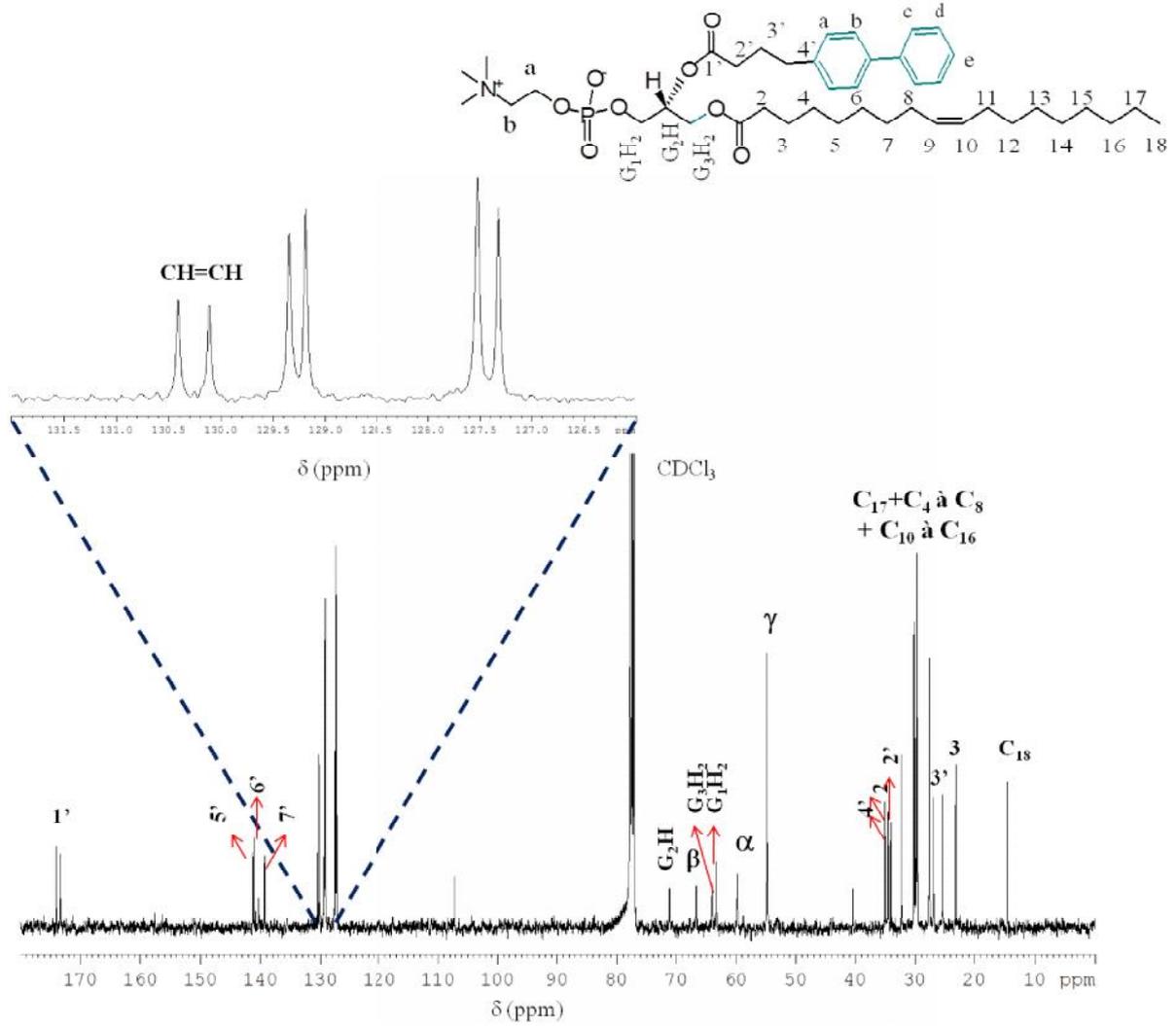
**Figure III.2:** Structure numérotée du lipide TBBPC et son spectre RMN- $^1\text{H}$  dans le chloroforme deutéré  $\text{CDCl}_3$ . Les pics barrés par une croix correspondent à des traces de solvants organiques (chloroforme à 7,4 ppm).



**Figure III.3:** a) Structure numérotée du lipide HBBPC et son spectre RMN-<sup>1</sup>H dans le dichlorométhane deutéré CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les pics barrés par une croix correspondent à des traces de solvants organiques b) Spectre de masse (mode ESI, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2 :1) du produit final obtenu pour la synthèse du lipide HBBPC



**Figure III.4:** a) Structure numérotée du lipide OBBPC et son spectre RMN-<sup>1</sup>H dans le dichlorométhane deutéré CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Les pics barrés par une croix correspondent à des traces de solvants organiques et d'impuretés. B) Spectre de masse (mode ESI, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2 :1)) du produit final obtenu pour la synthèse du lipide OBBPC.



**Figure III.6:** Structure numérotée du lipide OBBPC et son spectre RMN- $^{13}\text{C}$  dans le chloroforme deutéré  $\text{CDCl}_3$ . Un agrandissement des pics entre 126ppm et 132ppm, correspondant notamment à l'insaturation en position  $\text{C}_9=\text{C}_{10}$ , est présenté.

### **I.1.3: Partie expérimentale**

Tous les réactifs utilisés proviennent de Sigma Aldrich sauf les lyso-lipides qui ont été fournis par Avanti Polar Lipids. La majorité des solvants est fournie par VWR et Eurisotop. Tous les réactifs sont préalablement séchés sous vide et le dichlorométhane est doublement distillé sur  $\text{CaH}_2$ . Les pesées sont réalisées avec une balance de précision Mettler-Toledo (à 0.01 mg).

#### III.1.3.1: Synthèse de l'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque (Eggers 2001)

Un mélange d'anhydride succinique (78,74 mmol, 1eq, 7,88g) et de biphényle (86,6 mmol, 1,1 eq., 13,34 g) est chauffé à reflux dans 80 ml de nitrobenzène ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ ) jusqu'à dissolution complète (le condenseur est relié à un piège pour HCl), puis refroidi à température ambiante. 21 g (157,6 mmol, 2 eq) de chlorure d'aluminium sont ajoutés au mélange. Cette étape étant fortement exothermique, le ballon est plongé dans un bain de glace. Le mélange est maintenu sous argon, à température ambiante sous agitation magnétique pendant 24 heures. 80 ml d'eau et 10 ml d'acide chlorhydrique sont ensuite ajoutés lentement. Le précipité de couleur jaune est filtré sur fritté (porosité 4) et lavé avec 25 ml d'eau et 25 ml d'éther. Le produit est ensuite séché sous vide. 17,8 g (78,74 mmol) d'un produit blanc d'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque sont ainsi obtenus. Cette étape de synthèse n'a pas nécessité de purification.

Rendement de la réaction=89%.

#### III.3.1.2: Synthèse de l'acide 4-(4-biphényle)-4-butanoïque (Furnis 1989)

7,76 g (12 mmol, 2 eq) de zinc en poudre amalgamé ( $\leq 10\mu\text{m}$ ) et 0,60 g de chlorure de mercure (2,2 mmol, 0,4 eq.) sont introduits dans un ballon bicol de 100 ml. 9 ml d'eau et 0,5 ml d'acide chlorhydrique (37%) sont ensuite ajoutés. Le mélange est maintenu sous agitation magnétique et sous argon à  $0^\circ\text{C}$  pendant 5 min. Après décantation et élimination du surplus de liquide dans la mesure du possible, 1,50 g d'acide 4-(4-biphényl)-4-oxobutanoïque (5,9 mmol, 1,0 eq.), 4,7 ml d'eau et 12 ml de toluène sont ajoutés au ballon. 12 ml d'acide chlorhydrique sont ensuite additionnés lentement. Le mélange est chauffé à reflux pendant 30 heures avec un ajout de 2,35 ml d'HCl toutes les 6 heures. Après retour à température ambiante, et décantation du mélange, 10 ml d'eau sont ajoutés. Le produit est ensuite extrait à l'éther. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium. Après élimination du solvant,

le produit est séché sous la rampe à vide et 1,2g d'un produit blanc d'acide 4-(4-biphényle)-butanoïque sont ainsi obtenus.

Rendement de la réaction=80% Cette étape de synthèse n'a pas nécessité de purification.

### III.3.1.3: Synthèse des 3 lipides biphényles (TBBPC, HBBPC et OBBPC)

#### i. Synthèse du lipide TBBPC

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

Rendement de la réaction=70%.

#### Caractérisation physico-chimique du TBBPC:

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 7.49 (d, 2H, Ar), 7.44 (d,2H, Ar), 7.34 (m,2H, Ar), 7.24 (m, 2H, Ar), 7.17 (d, 2H, Ar), 5.15 (m, 1H, CH), 4.40 (d, 1H, CH), 4.30 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.14 (d, 1H, CH), 3.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OCO), 3.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.3(s, 9H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.6 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.29 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.17 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.88 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.24 (s, 20H, fatty CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, 3H, CH<sub>3</sub>);

RMN-<sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 174, 173.26, 141.31, 140.88, 139.35, 129.36, 129.2, 127.53, 127.33, 77.75, 77.44, 77.13, 71.19, 71.12, 66.85, 63.92, 63.36, 59.70, 58.84, 54.88, 35.07, 34.56, 34.12, 32.37, 31.37, 30.13, 29.94, 29.75, 29.58, 29.53, 26.95, 25.32, 22.91, 14.35;

Spectre de masse (ESI, full ms, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2 :1)):  $m/z$  689,5 (689 calculé).

ii. Synthèse du lipide HBBPC

Le lyso-lipide: 1- Hexadecanoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphocholine (lyso-HPC) (2,27 mmol, 1 eq., 1 g précédemment lyophilisé), l'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque (3,21 mmol, 1,5 eq., 0,77 g), le dicyclohexylcarbodiimide (6,42 mmol, 3 eq., 1,33 g) et l'acide dimyristoyl phosphatidique (2,14 mmol, 1 eq., 0,26 g) sont dissous dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec, à température ambiante et sous argon. La solution est agitée dans ces conditions pendant deux jours. Un précipité blanc de sels d'urée, formé au cours de la réaction, est éliminé par filtration. Le produit brut est ensuite purifié deux fois sur colonne chromatographique ouverte (diamètre 2,5 cm, 80 mg de silice dans CHCl<sub>3</sub>) en utilisant le système d'élution CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:35:4) (v:v). Le suivi de la colonne se fait par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant le même système de solvants précédent et en révélant sous lampe-UV et par du bleu de molybdène (révélateur spécifique aux lipides phosphatidylcholines PC). Les fractions contenant le lipide sont regroupées et le solvant est évaporé sous vide ; après lyophilisation, 1,1 g de HBBPC (poudre blanche) sont alors obtenus.

Rendement de la réaction=77%.

Caractérisation physico-chimique du HBBPC:

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.49 (d, 2H, Ar), 7.44 (d, 2H, Ar), 7.34 (m, 2H, Ar), 7.24 (m, 2H, Ar), 7.16 (d, 2H, Ar), 5.15 (m, 1H, CH), 4.33 (d, 1H, CH), 4.17 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.90 (d, 1H, CH), 3.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OCO), 3.40 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.24 (s, 9H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.6 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.29 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.17 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.88 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.24 (s, 20H, fatty CH<sub>2</sub>), 0.80 (t, 3H, CH<sub>3</sub>).

RMN-<sup>13</sup>C (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>),  $\delta$  (ppm): 174, 173.3, 141.28, 140.88, 139.32, 129.34, 129.17, 127.52, 127.33, 77.76, 77.44, 77.13, 71.16, 71, 66.74, 66.7, 63.96, 63.91, 63.39, 59.78, 59.73, 54.77, 35.04, 34.54, 34.1, 32.34, 30.14, 30.09, 29.98, 29.79, 29.76, 29.61, 26.94, 25.31, 23.11, 14.58.

Spectre de masse (ESI, full ms, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2 :1)):  $m/z$  718,5 (717 calculé) (figure III.4).

iii. Synthèse du lipide OBBPC

Le lyso-lipide 1-oleoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphocholine (2,39 mmol, 1 eq., 1 g précédemment lyophilisé), l'acide 4-(4-biphényle)-4-oxobutanoïque (3,21 mmol, 1,5 eq., 0,77g), le dicyclohexylcarbodiimide (6,42 mmol, 3 eq., 1,33 g) et l'acide dimyristoyl phosphatidique (2,14 mmol, 1 eq., 0,26 g) sont dissous dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sec, à température ambiante et sous argon. La solution est agitée dans ces conditions pendant deux jours. Un précipité blanc de sels d'urée, formé au cours de la réaction, est éliminé par filtration. Le produit brut est ensuite purifié deux fois sur colonne chromatographique ouverte (diamètre 2,5 cm, 80 mg de silice dans CHCl<sub>3</sub> en utilisant le système d'élution CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (65:35:4) (v:v). Le suivi de la colonne se fait par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant le même système de solvants précédent et en révélant sous lampe-UV et par du bleu de molybdène (révélateur spécifique aux lipides phosphatidylcholines PC). Les fractions contenant le lipide sont regroupées et le solvant est évaporé sous vide ; après lyophilisation, 1 g de OBBPC (poudre blanche) sont alors obtenus.

Rendement de la réaction=70%.

Caractérisation physico-chimique du OBBPC:

RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), δ (ppm): 7.49 (d, 2H, Ar), 7.43 (d,2H, Ar), 7.33 (m,2H, Ar), 7.24 (m, 2H, Ar), 7.16 (d, 2H, Ar), 5.32 (m, éthylène), 5.17 (m, 1H, CH), 4.33 (m, 1H, CH), 4.24 (m, 2H, POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 4.07 (d, 1H, CH), 3.9 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OCO), 3.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.26 (s, 9H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.6 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.3 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.18 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.9 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.5 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.2 (s, 24H, fatty CH<sub>2</sub>), 0.80 (t, 3H, CH<sub>3</sub>);

RMN-<sup>13</sup>C (400 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), δ (ppm): 174, 173.35, 141.31, 140.91, 139.35, 130.43, 130.15, 129.35, 129.19, 127.52, 127.32, 77.77, 77.43, 77.14, 71.16, 71.10, 66.73, 66.7, 64, 63.91, 63.37, 59.78, 59.73, 54.84, 35.03, 34.52, 34.1, 32.32, 30.18, 29.95, 29.74, 29.68, 29.61, 29.57, 27.63, 26.95, 25.30, 23.10, 14.56.

Spectre de masse (ESI, full ms, solvant MeOH/CHCl<sub>3</sub> (2 :1)):m/z 744,5 (744 calculé) (figure III.6).

**I.2: Formation des modèles membranaires.****I.2.1: Préparation des liposomes (MLVs):**

Dans le cadre de cette étude, nous avons préparé des liposomes de type vésicules multilamellaires (MLVs) comme modèles membranaires. Ces modèles sont constitués de bicouches lipidiques, structure de base des membranes naturelles, et présentent l'avantage d'une formulation relativement simple et rapide. La quantité de lipides et d'eau nécessaires dépend du taux d'hydratation souhaité, défini par:

$$h(\%) = \frac{m_{H_2O}}{m_{H_2O} + m_{lipides}}$$

Sauf précision contraire, tous les échantillons préparés présentent un taux d'hydratation  $h$  de 90%, ce qui revient à peser 11,11 mg de lipides puis à les disperser dans 100  $\mu$ l d'eau ultra pure. Les échantillons sont RMN- $^{13}C$  homogénéisés par agitation à l'aide d'un vibreur de type « vortex ». Ils sont ensuite soumis à plusieurs cycles chaud-froid : cycles de congélation à  $-80^{\circ}C$  dans l'azote liquide (environ 30s) puis réchauffement au bain marie à une température supérieure à la température de transition de phase du lipide considéré (environ 10 minutes). A la fin de chaque cycle, les échantillons sont de nouveau homogénéisés par agitation « vortex ». Le nombre de cycles dépend de la faculté du lipide à se disperser dans l'eau et sont répétés (entre une et trois fois) jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

Par ailleurs, le nombre de cycle chaud froid s'avère être important pour réguler la taille des liposomes. Traika et al, (Traika 2000) ont montré par microscopie électronique et par RMN des solides- $^{31}P$  que pour un mélange lipidique DOPC/DOPA (dioleoylphosphatidylcholine /dioleoylphosphatidylglycérol), 10 cycles chaud froid sont suffisants pour former des vésicules unilamellaires de 100 nm de diamètre.

Dans le cas des liposomes comprenant plusieurs constituants membranaires (phospholipides, stérols), ceux-ci sont d'abord co-solubilisés dans un même solvant organique (généralement chloroforme/méthanol (2 :1)). Après évaporation du solvant sous flux d'azote, le film lipidique est repris avec un large excès d'eau puis lyophilisé; l'opération peut être effectuée une nouvelle fois afin d'éliminer toute trace de solvant organique. Les poudres sont ensuite hydratées et des liposomes sont formés suivant la procédure décrite précédemment.

### **I.2.2: Préparation des échantillons mixtes : lipide/peptide**

La synthèse de SF-<sup>15</sup>N (7 résidus) a été réalisée par Benoit Odaert et le peptide PF1-<sup>15</sup>N (46 résidus) provient du laboratoire du Professeur Stanley Opella, UCSD, CA.

#### I.2.2.1: Insertion de la Surfactine (SF)-<sup>15</sup>N dans des liposomes de DMPC et HBBPC.

Pour la formation des liposomes DMPC et HBBPC contenant le lipopeptide surfactine uniformément marqué <sup>15</sup>N, une solution mère de SF dans du chloroforme de concentration définie en peptide est tout d'abord préparée. Le volume nécessaire de cette solution mère est ensuite ajouté à 30 mg de lipide (DMPC ou HBBPC) en respectant un rapport molaire peptide/lipides  $R_i=1/50$ . Le solvant est évaporé sous flux d'azote gaz, l'échantillon est ensuite hydraté dans de l'eau distillé puis lyophilisé pour éliminer toutes traces de solvants organiques. Les poudres de SF-<sup>15</sup>N et de lipides, parfaitement mélangés et débarrassés de solvant organique, sont ensuite hydratés en respectant une hydratation finale de 80% dans du tampon tris (50mM à pH=6,5). Trois cycles chaud/froid de formation des liposomes, sont ensuite réalisés.

#### I.2.2.1: Insertion du peptide Pf<sub>1</sub>-<sup>15</sup>N dans des liposomes de DMPC et HBBPC :

Une solution mère du peptide Pf<sub>1</sub> uniformément marqué <sup>15</sup>N dans du TFE (trifluoroéthanol) de concentration définie est préparée. Le volume nécessaire est ajouté à 30 mg de lipides (DMPC ou HBBPC), en respectant un rapport molaire peptide/lipide  $R_i= 1/140$ . Après évaporation du solvant organique sous flux d'azote gaz, hydratation de l'échantillon dans de l'eau distillée et lyophilisation, les poudres obtenues sont hydratées avec du tampon Tris (50mM, pH= 6,5) et des liposomes sont formés après trois cycles chaud froid suivant la procédure décrite précédemment.

*Conclusion :*

Les synthèses des lipides biphényles TBBPC, HBBPC et OBBPC que nous venons de voir sont des étapes clés dans notre étude, car elles conditionnent toutes les analyses ultérieures. Les rendements obtenus sont satisfaisants, et la pureté des lipides a été vérifiée par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et par spectrométrie de masse (SM).



## CHAPITRE IV

### **Déformation des liposomes TBBPC et DMPC dans les champs magnétiques**



## I- Introduction

Peu d'exemples sur l'orientation macroscopique des lipides sont reportés dans la littérature. Seelig et ses collaborateurs ont souligné la déformation de liposomes formulés par des phospholipides (PE : PG) dans un champ magnétique. L'origine de cet alignement est dû à l'anisotropie de susceptibilité magnétique  $\Delta\chi$  des lipides négative (Seelig et *al.*, 1985). Ainsi, si  $\Delta\chi < 0$ , l'alignement par rapport au champ magnétique est perpendiculaire tandis que si  $\Delta\chi > 0$ , la majorité des lipides s'organisent avec leur axe moléculaire parallèle au champ magnétique statique (voir chapitre I). Le lipide TBBPC présente une chaîne aliphatique  $sn_2$  sur laquelle est greffée une unité biphényle qui confère au lipide un  $\Delta\chi > 0$ . D'où l'idée de reprendre ce lipide TBBPC, formulé en liposomes, et d'étudier l'influence de son  $\Delta\chi$  positif sur la déformation des vésicules TBBPC dans un champ magnétique.

Helfrich (Helfrich, W. 1973) a formalisé la déformation des liposomes dans l'équation (IV.1) suivante :

$$c - a = \frac{r^3 b B^2}{k} \Delta\chi \quad (\text{IV.1})$$

Cette équation relie les semi-axes mineurs et majeurs  $a$  et  $c$  de l'ellipsoïde de révolution avec le rayon de la sphère non déformée ( $r$ ), le champ magnétique ( $B_0$ ), l'épaisseur de la bicouche ( $b$ ), le module d'élasticité de courbure ( $k$ ) ainsi que l'anisotropie de susceptibilité magnétique ( $\Delta\chi$ ). Nous allons étudier dans ce qui suit chacun de ses paramètres afin de vérifier l'adéquation entre la théorie et l'expérience pour expliquer la déformation des liposomes biphényles dans le champ magnétique. Une comparaison avec la déformation des liposomes DMPC dans  $B_0$  sera effectuée tout au long de ce chapitre.

## II- Matériaux et Méthodes

### II.1: Matériaux

Le lipide TBBPC a été synthétisé selon le mode opératoire détaillé dans le chapitre III et le lipide DMPC provient d'Avanti Polar Lipids. Les solvants utilisés (chloroforme, méthanol et éthanol) sont fournis par Sigma Aldrich. Les liposomes formulés à partir des lipides TBBPC et DMPC sont hydratés dans de l'eau ultrapure (pureté de 99,8%).

Les systèmes binaires suivants ont été considérés pour les expériences RMN des

solides- $^2\text{H}$ : TBBPC: DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95:5; 0,16M/8mM) et DMPC: DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95:5; 0,16M/8mM) dans de l'eau dédeutérée (Eurisotop), avec le lipide DMPC- $^2\text{H}_{54}$  fournit par Avanti Polar Lipids.

## **II.2: Méthodes**

### **II.2.1: Formation de liposomes**

Les échantillons de TBBPC et DMPC ont été préparés avec un taux d'hydratation (h) de 90%, ce qui revient à peser 11,11 mg de lipides puis à les suspendre dans 100  $\mu\text{l}$  d'eau ultra pure en présence de 100mM de NaCl.

Dans le cas des liposomes comprenant plusieurs constituants membranaires (phospholipides, stérols), ceux-ci sont d'abord co-solubilisés dans un même solvant organique (généralement chloroforme/méthanol (2:1)). Après évaporation du solvant sous flux d'azote, le film lipidique est repris avec un large excès d'eau puis lyophilisé; l'opération peut être effectuée une nouvelle fois afin d'éliminer toute trace de solvant organique. Les poudres sont ensuite hydratées et des liposomes sont formés en effectuant trois cycles chaud-froid-agitation (voir chapitre III).

Dans le cas des liposomes formulés avec un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ , les poudres de lipide ont été directement suspendues dans de l'eau contenant de l'éthanol selon la concentration et le pourcentage en éthanol souhaités. Les liposomes sont ensuite formés en effectuant trois cycles chaud-froid-agitation. Les échantillons sont mélangés à l'aide d'un agitateur type vortex pendant environ 30 secondes, ils sont ensuite plongés dans de l'azote liquide pendant 30 secondes afin de les congeler. La dernière étape du cycle consiste à réchauffer les échantillons pendant 10 minutes à l'aide d'un bain marie dont la température est fixée au dessus de la température de transition de phase (gel-fluide):  $40^\circ\text{C}$ .

### **II.2.2: Les paramètres d'acquisition des expériences RMN**

#### *i. Conditions d'acquisitions pour la RMN des solides- $^{31}\text{P}$*

Les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  découplés  $^1\text{H}$  ont été enregistrés aux fréquences de 324 MHz (18,8T), 283,42 MHz (16,4T), 202,46 MHz (11,7T), 162 MHz (9,4T) et 121,51 MHz (7,1T). La séquence d'écho de Hahn (voir chapitre II; (Rance 1983)) a été utilisée avec un pulse  $90^\circ$  de 6,5  $\mu\text{s}$  (18,8T), 4  $\mu\text{s}$  (16,4T) 6,5  $\mu\text{s}$  (11,7T), 11,50  $\mu\text{s}$  (9,4T) et 3,10  $\mu\text{s}$  (7,1T) selon la fréquence utilisée. Le délai de l'écho est de 40 $\mu\text{s}$  et le délai du recyclage est de

5s. L'enregistrement de chaque spectre a nécessité 1024 acquisitions. Un spectre  $^{31}\text{P}$  de référence du  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%) a été préalablement calibré à 0 ppm. Les expériences ont été réalisées de 30 à 50°C puis de 50°C à 30°C et la température a été stabilisée pendant 30 min avant chaque acquisition. Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, la FID a été convoluée avec une exponentielle décroissante de type  $e^{(-LBt)}$  (opération de filtrage) avec un terme LB égal à 150Hz..

ii. Conditions d'acquisitions pour la RMN des solides- $^2\text{H}$

Les spectres RMN des solides- $^2\text{H}$  ont été enregistrés à la fréquence 122,8 MHz sur un spectromètre RMN de 18,8T. La séquence d'écho quadrupolaire avec cyclage de phase (voir chapitre II, Davis, 1976) a été utilisée avec un pulse  $90^\circ$  de 4 $\mu\text{s}$ . Le délai de l'écho et du recyclage sont respectivement 40 $\mu\text{s}$  et 1,5s. L'enregistrement de chaque spectre a nécessité 5000 acquisitions. La température a été réglée à 37°C et stabilisée pendant 30 min avant l'acquisition. Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, la FID a été convoluée avec une exponentielle décroissante de type  $e^{(-LBt)}$  (opération de filtrage) avec un terme LB égal à 200Hz.

**II.2.3: Estimation de la longueur de la chaîne aliphatique des lipides**

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

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

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

Où  $S_{\text{mol}}$  est le paramètre d'ordre moléculaire que nous prenons égal à 1;  $\langle l_{\text{C}_n\text{-D}} \rangle$  représente la contribution de la liaison  $\text{C}_n\text{-}^2\text{H}$  du  $\text{CH}_3$  terminal estimée à  $1,09\cos(35,25^\circ)$  Å. Le paramètre d'ordre  $S_n^{\text{CC}}$  peut être calculé en considérant que le groupe méthyl terminal  $\text{C}_n\text{-}^2\text{H}_3$  est animé d'un mouvement de rotation à symétrie axiale autour de la liaison  $\text{C}_{n-1}\text{-C}_n$ ; une transformation

des coordonnées de la liaison  $C_n-^2H$  à  $C_{n-1}-C_n$  conduit alors à:

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

#### **II.2.4: Simulation :**

##### *i. Simulation des spectres RMN des solides- $^{31}P$*

Les formes des spectres associés à des distributions de symétrie oblate ou prolata sont calculables à l'aide d'outils de simulation spectrale. Comme indiqué dans le chapitre II, la simulation est effectuée à l'aide d'un programme Fortran (non publié), écrit par Dufourc, E.J., qui calcule la FID en fonction du rapport (c/a), de l'anisotropie de blindage électronique résiduel ( $\Delta\sigma$ ) ou de l'éclatement quadrupolaire résiduel ( $\Delta\nu_Q$ ) (estimée à partir des spectres expérimentaux), des largeurs intrinsèques des raies à mi-hauteur ( $RT_2$ ), du poids moléculaire des espèces considérées (w) correspondant au nombre de phosphore par lipide et du déplacement chimique isotrope.

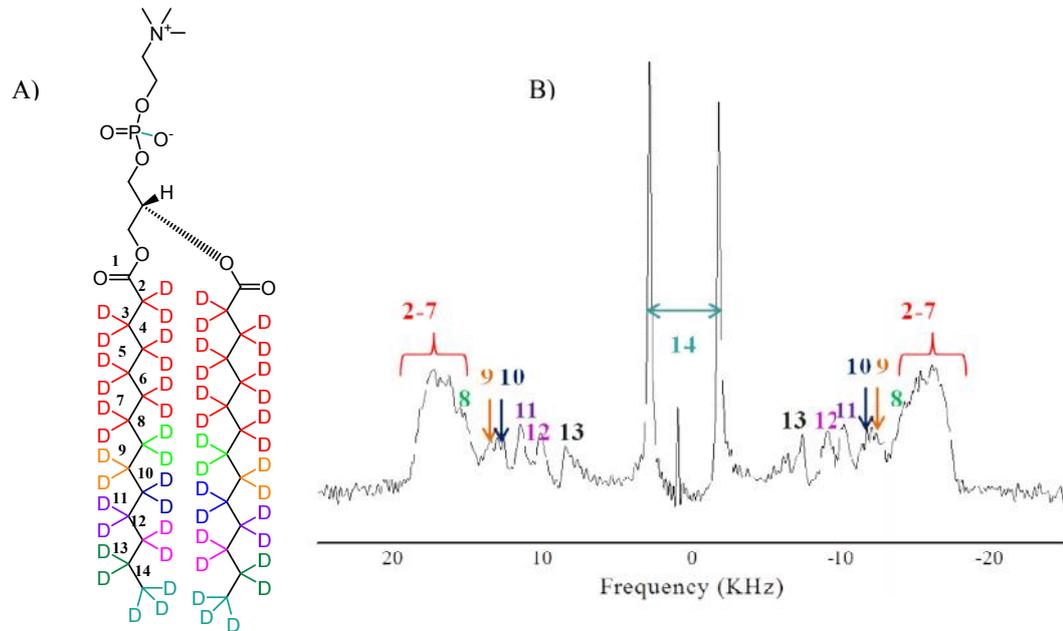
##### *ii. Simulation des spectres RMN des solides- $^2H$*

Le même programme Fortran a été utilisé pour la simulation des spectres RMN du deutérium des liposomes TBBPC et DMPC dopés avec 5% (en moles) de DMPC- $^2H_{54}$  afin de rapporter la dynamique des chaînes aliphatiques deutérées. Les paramètres pris en compte sont : les éclatements quadrupolaires  $\Delta\nu_Q$  à  $0^\circ$  (estimés à partir des spectres expérimentaux pour chaque position marquée le long des deux chaînes aliphatiques  $sn_1$  et  $sn_2$ ), la largeur à mi-hauteur ( $RT_2$ ), le poids (w) traduisant le nombre de deutérons par position marquée (54 pour le DMPC- $^2H_{54}$ ) et enfin le rapport c/a relatif à la déformation du système. La figure IV.1 illustre les attributions de pics associés aux positions  $C-^2H_2$  sur les chaînes lipidiques. On constate qu'il est possible de distinguer les éclatements quadrupolaires individuels de toutes les positions de 8 à 14 ; celles de 2 à 7 sont regroupées sous un même pic (sauf ceux en position  $C_2$  de la chaîne  $sn_2$ , ou 2S et 2R sont inéquivalents et difficilement discernables sur les spectres (Douliez, J.P. *et al.*, 1995).

##### *iii Simulation par Matlab des ellipsoïdes de révolution*

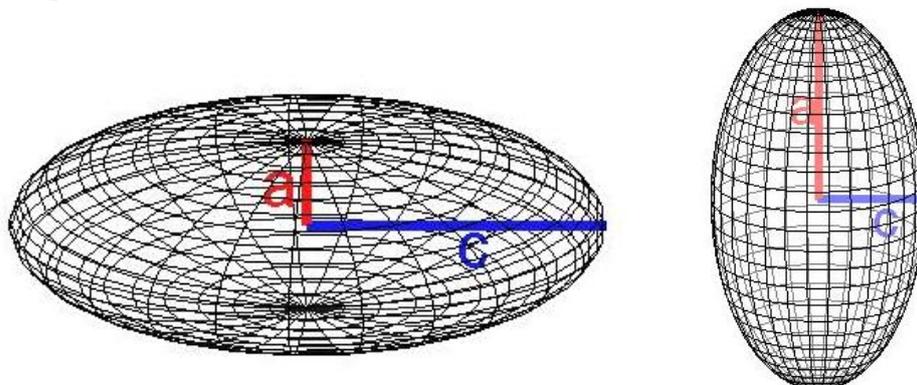
Nous avons utilisé le programme de calcul matriciel Matlab 7.12 pour imager la déformation et obtenir un ellipsoïde de révolution relatif à chaque c/a obtenu par simulation

des spectres phosphore. Les différentes variables utilisées reposent sur la mesure des deux axes semi-mineurs (a) et semi-majeur (c) de l'ellipsoïde en fonction du ratio c/a. La figure IV.2 illustre deux ellipsoïdes de révolutions correspondant à la déformation en oblate (gauche) et en prolate (droite) des liposomes par rapport au champ magnétique  $B_0$ .



**Figure IV.1:** A) Structure du DMPC- $^2H_{54}$

B) Spectre RMN des solides- $^2H$  (séquence écho solide) de liposomes DMPC : DMPC- $^2H_{54}$  (95:5) Les attributions de pics associés aux positions C- $^2H_2$  sur les chaînes lipidiques sont indiquées sur les spectres.



**Figure IV.2:** Exemples d'ellipsoïdes de révolution obtenues par simulation via le logiciel Matlab correspondant à la déformation en oblate (gauche) et en prolate (droite) pour des valeurs c/a obtenues par simulation des spectres RMN des solides- $^{31}P$ .

### **II.2.5: Analyse par diffusion de la lumière (DLS)**

Les échantillons dilués jusqu'à 0,5mg/ml sont placés dans des tubes en pyrex de 4mm de diamètre. Le rayon hydrodynamique des liposomes saturés et biphényles formulés avec un, deux ou trois cycles chaud-froid-agitation a été déterminé en mesurant la fonction d'autocorrélation à un angle de  $90^\circ$  sur un appareil de type ALV/LSE-5003, thermostaté couplé à un goniomètre ALV/CGS-3 (Compact Goniometer, ALV-GmbH, Allemagne) et à une source laser He/Ne ( $\lambda = 633$  nm). Le rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) moyen basé sur une distribution en nombre, a été calculé grâce à la fonction d'autocorrélation en utilisant l'analyse des cumulants. La technique de DLS mesure les mouvements Brownien des particules et les corrèlent au  $R_h$  qui est obtenu grâce à l'équation de Stokes-Einstein, à partir de leurs coefficients de diffusion :

$$R_h = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

Avec D le coefficient de diffusion ( $m^2/s$ ), k la constante de Boltzman, T la température en  $^\circ K$ , et  $\eta$  le coefficient de viscosité (Pa.s).

Le traitement des données a été fait grâce au logiciel ALV-5000.

## **III- Résultats**

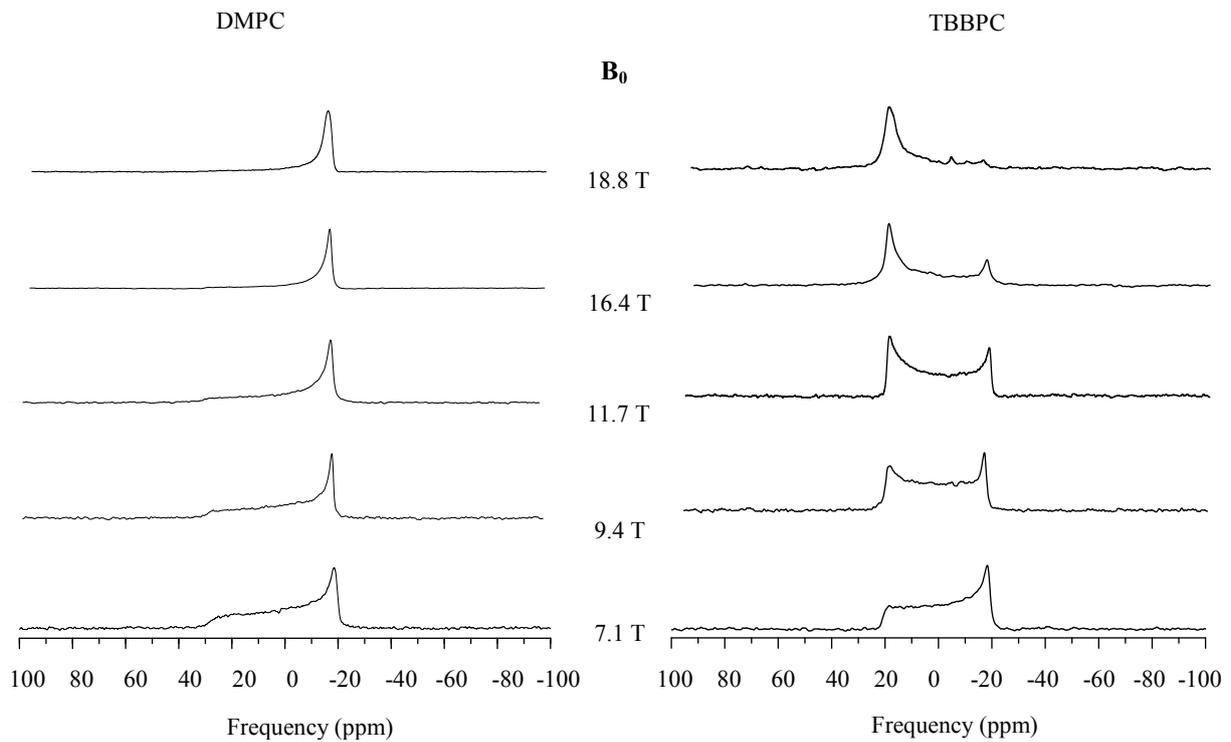
### **III.1.1: Effet de l'intensité du champ magnétique statique**

#### **a) RMN des solides- $^{31}P$**

Des liposomes de DMPC et TBBPC ont été préparés et des expériences de RMN des solides- $^{31}P$  ont été réalisées sur cinq spectromètres, dont l'intensité du champ magnétique statique varie de 7,1T à 18,8T, à une température de  $40^\circ C$ .

Les spectres de RMN des solides- $^{31}P$  obtenus sont présentés dans la figure IV.3. Pour  $\omega_0^{31P} = 121,4$  MHz ( $B_0 = 7,1T$ ), le spectre observé pour DMPC est caractéristique d'un système à symétrie axiale, avec les lipides en phase lamellaire. La distribution d'intensité est de type poudre et caractérise un système sphérique. L'épaulement le plus intense (à droite: -15 ppm) correspond à l'orientation  $\theta$  la plus probable où l'axe principal des tenseurs de blindage électronique résiduel du noyau  $^{31}P$  est perpendiculaire au champ magnétique  $B_0$  ( $\theta = 90^\circ$ ) et l'épaulement le plus faible à gauche correspond à  $\theta = 0^\circ$ . Le rapport des intensités à  $\theta = 90^\circ$  et  $\theta$

$=0^\circ : \frac{I_{90}}{I_0}$ , est de 5,4. Ces rapports sont reportés dans le tableau IV.1 pour tous les spectres de la figure IV.3. Dans le cas de TBBPC, à ce même champ magnétique, on observe un spectre semblable à celui de DMPC. On note cependant que l'épaule pour  $\theta=0^\circ$  est plus intense avec  $\frac{I_{90}}{I_0} = 2,5$ . La forme des spectres évolue différemment en augmentant le champ selon que les liposomes sont constitués de DMPC ou de TBBPC. Dans le cas des liposomes de TBBPC, on observe que pour  $\omega_b^{31P}=161,9$  MHz ( $B_0=9,4$ T) et 202,3 MHz ( $B_0=11,7$ T), le signal relatif à  $\theta=0^\circ$  devient plus intense et celui associé à  $\theta=90^\circ$  diminue progressivement. Cet effet devient encore plus important lorsque les vésicules sont placées dans un champ magnétique où  $\omega_b^{31P}=283,4$  MHz ( $B_0=16,4$ T) et pour  $\omega_b^{31P}=323,9$  MHz ( $B_0=18,8$ T), le signal correspondant à  $\theta=90^\circ$  est très faible.



**Figure IV.3:** Spectres RMN des solides  $^{31}P$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons), de liposomes DMPC (gauche) et TBBPC (droite) obtenus avec un cycle chaud-froid-agitation, pour une hydratation  $h=90\%$  dans  $H_2O+0,1M$  NaCl en fonction de l'intensité du champ magnétique allant de 7,1 T jusqu'à 18,8 T à  $40^\circ C$ .

On a une distribution d'intensité quasi-inversée en comparaison avec le spectre obtenu à 7,1T. Ainsi, à partir d'un champ magnétique de 9,4T, plus l'intensité du champ magnétique augmente, plus le spectre RMN- $^{31}\text{P}$  évolue vers une situation où l'intensité du signal  $\theta=0^\circ$  l'emporte sur celle à  $\theta=90^\circ$ . Les rapports des intensités à  $\theta=90^\circ$  et  $\theta=0^\circ$  reportés dans le tableau IV.1 diminuent d'une manière très importante, en passant de 2,5 à 7,1T jusqu'à 0,2 à 18,8T. Ce phénomène est attribué à une déformation ellipsoïdale de type oblate des vésicules TBBPC dans un champ magnétique.

Dans le cas des liposomes constitués de DMPC, l'effet inverse se produit, le signal correspondant à l'orientation à  $\theta=0^\circ$  diminue avec l'augmentation de l'intensité du champ magnétique et le pic correspondant à l'orientation à  $\theta=90^\circ$  prédomine largement.

Ce dernier phénomène est attribué à une déformation ellipsoïdale de type prolata des vésicules sous champ magnétique comme l'ont montré Seelig et collaborateurs (Seelig 1985) pour les liposomes POPE : POPG (80 :20), Pott et Dufourc, et Reinl et al, dans le cas de vésicules de DPPC : cholestérol contenant 20% de mélittine ((Reinl, Brumm et al. 1992, Pott 1995)).

$B_0$ (T)	DMPC/40°C			TBBPC/40°C		
	c/a ( $\pm 0.01$ )	$I_{90}/I_0$	$\Delta\sigma$ (ppm) ( $\pm 1$ )	c/a ( $\pm 0.01$ )	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 0.1$ )	$\Delta\sigma$ (ppm) ( $\pm 1$ )
7.05	0.92	5.4 ( $\pm 0.1$ )	46	0.95	2.5	39
9.40	1.19	11.8 ( $\pm 0.1$ )	46	0.65	1.3	39
11.75	1.37	19.0 ( $\pm 0.1$ )	46	0.49	0.7	39
16.44	1.70	34.9 ( $\pm 0.1$ )	45	0.42	0.5	40
18.8	1.80	83.3 ( $\pm 5$ )	45	0.33	0.2	39

**Tableau IV.1 :** Tableau comparatif montrant l'effet de la variation du champ magnétique sur la déformation des liposomes DMPC et TBBPC à 40°C. Cette déformation est suivie par le rapport des intensités mesurées à  $\theta=90^\circ$  et  $\theta=0^\circ$ ,  $I_{90}/I_0$ , par le rapport du semi petit axe c de l'ellipsoïde de révolution sur le semi grand axe a ( $c/a \pm 0,01$ ) obtenus à partir des simulations spectrales et par l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  ( $\Delta\sigma = \sigma_{//} - \sigma_{\perp} = \sigma_{0^\circ} - \sigma_{90^\circ}$ ) à 40°C.

### b) Simulations des spectres RMN des solides $^{31}\text{P}$

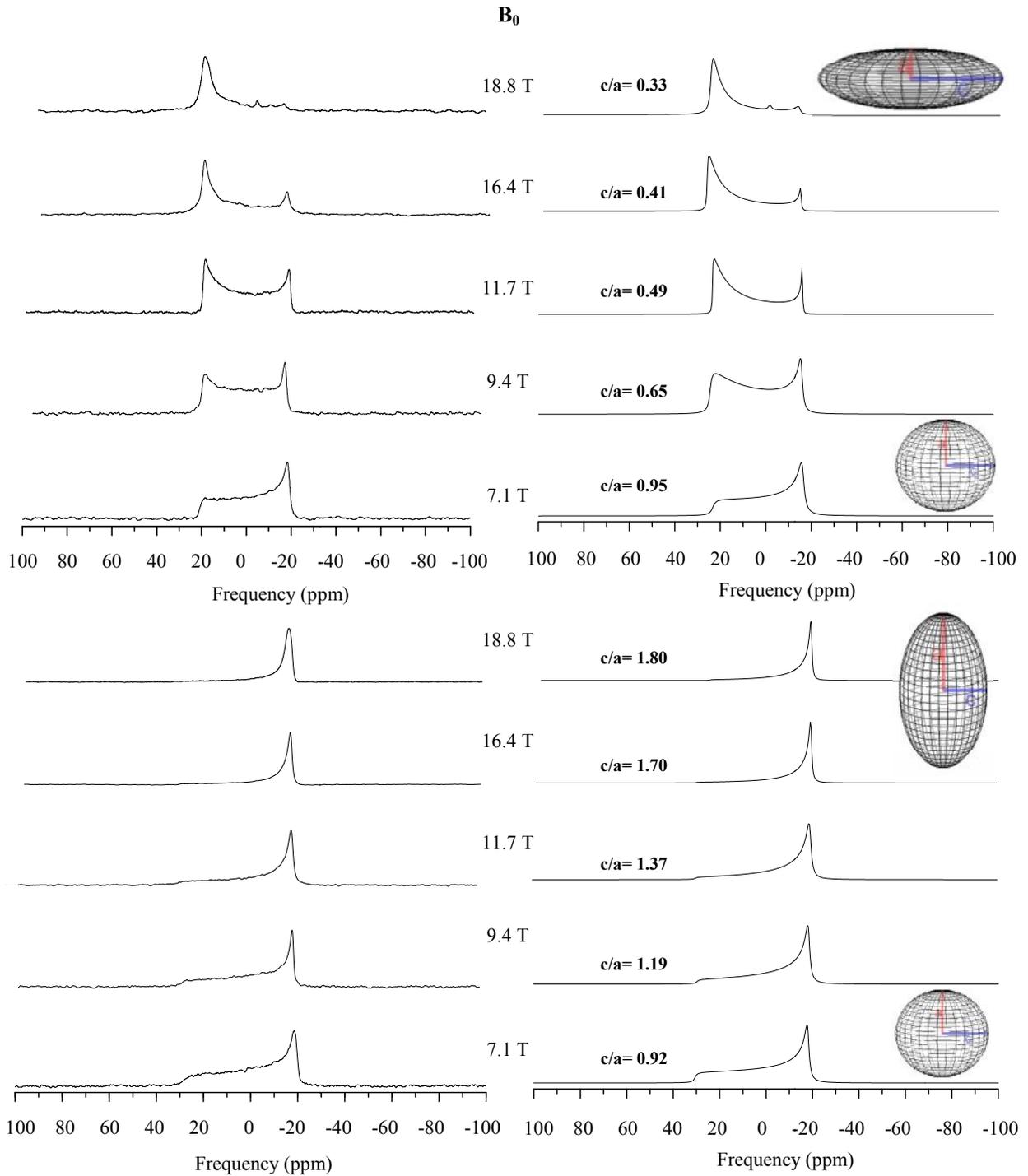
Les spectres simulés, obtenus à l'aide d'un programme FORTRAN (non publié), écrit par E.J. Dufourc, sont montrés dans la figure IV.4, et disposés à droite des spectres expérimentaux de RMN des solides- $^{31}\text{P}$  de la figure IV.1. Une bonne superposition du spectre simulé sur le spectre expérimental donne une indication sur la précision du fit.

Les rapports  $c/a$ , permettant de quantifier la déformation, sont obtenus par simulation spectrale et reportés dans le tableau IV.1. On constate que pour les liposomes TBBPC, le rapport d'intensité  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$  diminue jusqu'à 0,15 à 18,8T, ce qui se traduit par un ratio  $c/a$  qui passe de 1,00 (7,5 T) à 0,33 (18,8T). Quant aux vésicules DMPC, l'augmentation du rapport d'intensités  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$  va de pair avec un rapport  $c/a$  qui augmente en passant de 0,92 à 1,80 ( $\pm 0,01$ ). La déformation des vésicules comme illustrée par les spectres de la figure IV.4 s'accroît avec l'intensité du champ magnétique de façon oblate pour les liposomes TBBPC et prolata pour ceux de DMPC. Des vésicules de TBBPC et DMPC se déforment donc de manière spontanée et constante en oblate et prolata respectivement dans un champ magnétique dont l'intensité est supérieure ou égale à 9,4T.

Les valeurs de l'anisotropie de blindage électronique ( $\Delta\sigma$ ) sont également reportées dans le tableau IV.1. On constate, qu'à l'erreur expérimentale,  $\Delta\sigma$  reste constante pour les deux systèmes de liposomes saturés et biphényles, et donc ne varie pas avec l'augmentation de l'intensité du champ magnétique  $B_0$ .

Une image de l'ellipsoïde déformée, obtenue à l'aide du logiciel Matlab, est présentée à droite de certains spectres simulés. Nous remarquons que pour un champ magnétique inférieur à 9,4T, l'image des liposomes générée par Matlab correspondant au rapport  $c/a=0,92$  est une sphère, alors que pour  $B_0$  supérieur à 9,4T, des ellipsoïdes de révolution déformés en oblate pour TBBPC et en prolata pour DMPC sont obtenus. Ces images traduisent une organisation des lipides TBBPC et DMPC de telle sorte qu'ils soient orientés en majorité avec leur axe moléculaire respectivement parallèle et perpendiculaire au champ magnétique.

Ainsi lorsque les deux semi-axes  $c$  et  $a$  sont quasiment égaux, on retrouve le spectre de poudre caractéristique des liposomes non déformés en phase fluide, c'est à dire présentant une distribution d'intensité à symétrie sphérique.



**Figures IV.4 :** Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  expérimentaux (gauche) et simulés (droite), de liposomes TBBPC (en haut), DMPC (en bas) obtenus avec un cycle chaud-froid-agitation,  $h=90\% \text{H}_2\text{O}+0,1\text{M NaCl}$  avec un champ magnétique allant de 7,1 T jusqu'à 18,8T à  $40^\circ\text{C}$ . Chaque spectre est le résultat de 1024 scans. La valeur du rapport  $c/a$  obtenue par simulation spectrale est indiquée à gauche de chaque spectre. Un ellipsoïde de révolution, obtenu avec MatLab, est associé à certains spectres simulés pour le  $c/a$  correspondant.

Lorsque le semi-axe vertical de l'ellipsoïde ( $c$ ) est supérieur au semi-axe horizontal  $a$  ( $c/a > 1$ ), les liposomes s'allongent parallèlement au champ magnétique, de telle sorte que la densité de lipides orientés avec leur axe moléculaire perpendiculaire au champ magnétique est plus importante. La déformation des vésicules adoptant cette orientation ellipsoïdale par rapport au champ magnétique est qualifiée de "prolate", c'est le cas des liposomes DMPC (Pott 1995, Dubinnyi 2006).

A l'inverse, lorsque le semi-axe  $c$ , est inférieur à  $a$  ( $c/a < 1$ ) ; un maximum de lipides est orienté avec l'axe moléculaire parallèle au champ magnétique, les vésicules ont tendance à s'aplatir. Cette déformation ellipsoïdale des vésicules est qualifiée 'd'oblate', c'est le cas des liposomes TBBPC.

### **III.1.2: Effet de la variation de la taille des liposomes**

Le second paramètre, mis en jeu dans l'équation d'Helfrich, est le rayon hydrodynamique des liposomes non déformés noté  $\langle r \rangle$ . Traika et al (Traika 2000), ont montré que la taille des liposomes formulés à partir de lipides insaturés diminue avec l'augmentation du nombre de cycles chaud-froid-agitation. Chaque cycle consiste en une congélation dans l'azote liquide à  $-180^\circ\text{C}$  pendant une trentaine de seconde suivie par une décongélation (réchauffement) pendant 10 minutes à une température supérieure à la température de transition de phase du lipide, par exemple à  $40^\circ\text{C}$  pour les liposomes DMPC. Nous avons décidé d'étudier l'influence de la variation de la taille sur la déformation des vésicules TBBPC et DMPC, à  $B=18,8\text{T}$ .

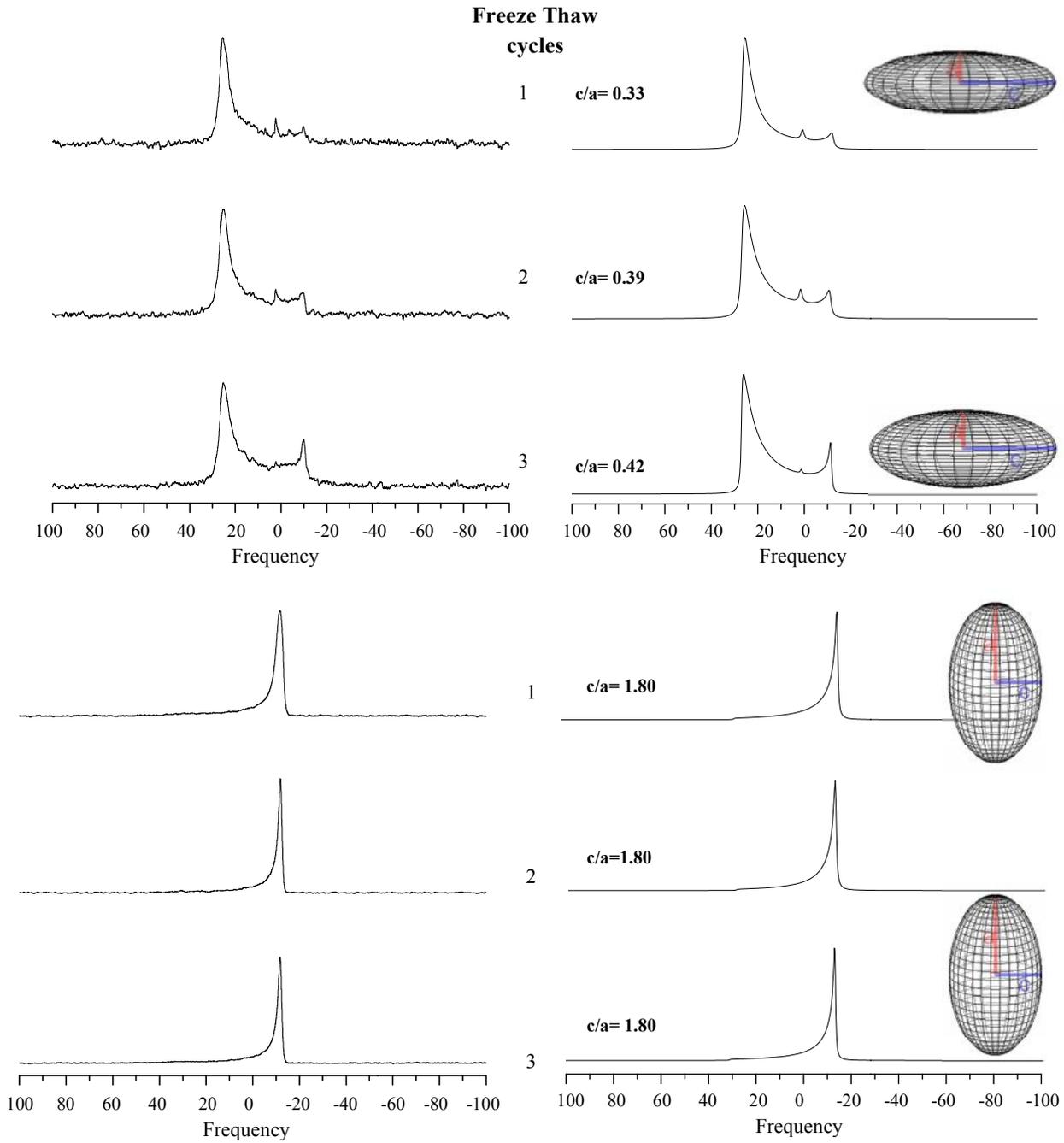
Des liposomes DMPC et TBBPC ont été préparés dans  $\text{H}_2\text{O}$  en présence de  $100\text{mM}$  de  $\text{NaCl}$  pour une hydratation  $h=90\%$  avec un, deux ou trois cycles chaud-froid-agitation. D'après la figure IV.5, pour les liposomes de TBBPC, plus le nombre de cycle chaud-froid-agitation augmente, plus le signal correspondant à l'orientation  $\theta=90^\circ$  augmente (le rapport des intensités  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$  augmente). De même, la simulation des spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  des liposomes TBBPC, quantifiant la déformation, donne des rapports  $c/a$  plus importants quand le nombre de cycles chaud-froid-agitation augmente. Ainsi, pour un cycle chaud-froid-agitation le rapport  $c/a$  est de  $0,33$ , alors que pour trois cycles chaud-froid-agitation, le rapport  $c/a$  équivaut à  $0,42$  (figure IV.5), ce qui traduit une diminution de la déformation en oblate des liposomes TBBPC.

Pour les liposomes DMPC, on n'observe pas de changement de forme des spectres phosphores, les rapports d'intensités  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$  demeurent constant à l'erreur expérimentale, et le

rapport  $c/a$ , obtenu par simulation, est égal à 1,80 que cela soit pour un, deux ou trois cycles chaud-froid-agitation. Il n'y a donc pas d'influence de la taille des vésicules sur la déformation en prolate. Nous avons tenté de mesurer la taille des liposomes TBBPC et DMPC par DLS (Dynamic Light Scattering). Nous avons obtenu une taille de  $\approx 3 \mu\text{m}$ ,  $2 \mu\text{m}$  et  $1 \mu\text{m}$  pour des liposomes biphényles formulés respectivement avec un, deux et trois cycle chaud-froid-agitation. Il semblerait que la taille des vésicules TBBPC diminue avec l'augmentation du nombre de cycles chaud-froid-agitation. Quant aux liposomes DMPC, les mesures par DLS donnent une valeur de  $r=2,2\pm 2 \mu\text{m}$  quelque soit le nombre de cycles chaud-froid-agitation appliqué. Il faut cependant noter que la diffusion de la lumière atteint ses limites pour des tailles de l'ordre du  $\mu\text{m}$ , les valeurs obtenues ne sont donc qu'indicatives.

Freeze-thaw cycles	DMPC/40°C			TBBPC/40°C		
	$c/a (\pm 0.01)$	$I_{90}/I_0 (\pm 5)$	$\Delta\sigma$ (ppm) ( $\pm 1$ )	$c/a (\pm 0.01)$	$I_{90}/I_0 (\pm 0.1)$	$\Delta\sigma$ (ppm)( $\pm 1$ )
1	1.80	75.3	45	0.33	0.2	39
2	1.80	80.1	44	0.39	0.3	38
3	1.80	78.8	45	0.42	0.4	38

**Tableau IV.2:** Tableau comparatif montrant l'effet de la variation de la taille des liposomes sur la déformation qui est suivie par le rapport des intensités mesurées à  $\theta=90^\circ$  et  $\theta=0^\circ$   $I_{90}/I_0$ , par le rapport du semi petit axe  $c$  de l'ellipsoïde de révolution sur le semi grand axe  $a$  ( $c/a \pm 0,01$ ), obtenu à partir des simulations spectrales, et par l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  ( $\Delta\sigma = \sigma_{||} - \sigma_{\perp} = \sigma_{0^\circ} - \sigma_{90^\circ}$ ), des liposomes TBBPC et DMPC préparés avec 1, 2 ou 3 cycles chaud-froid-agitation, avec une hydratation,  $h=90\% + 0,1M$  NaCl dans un champ magnétique  $B_0=18,8T$  à  $40^\circ C$ .



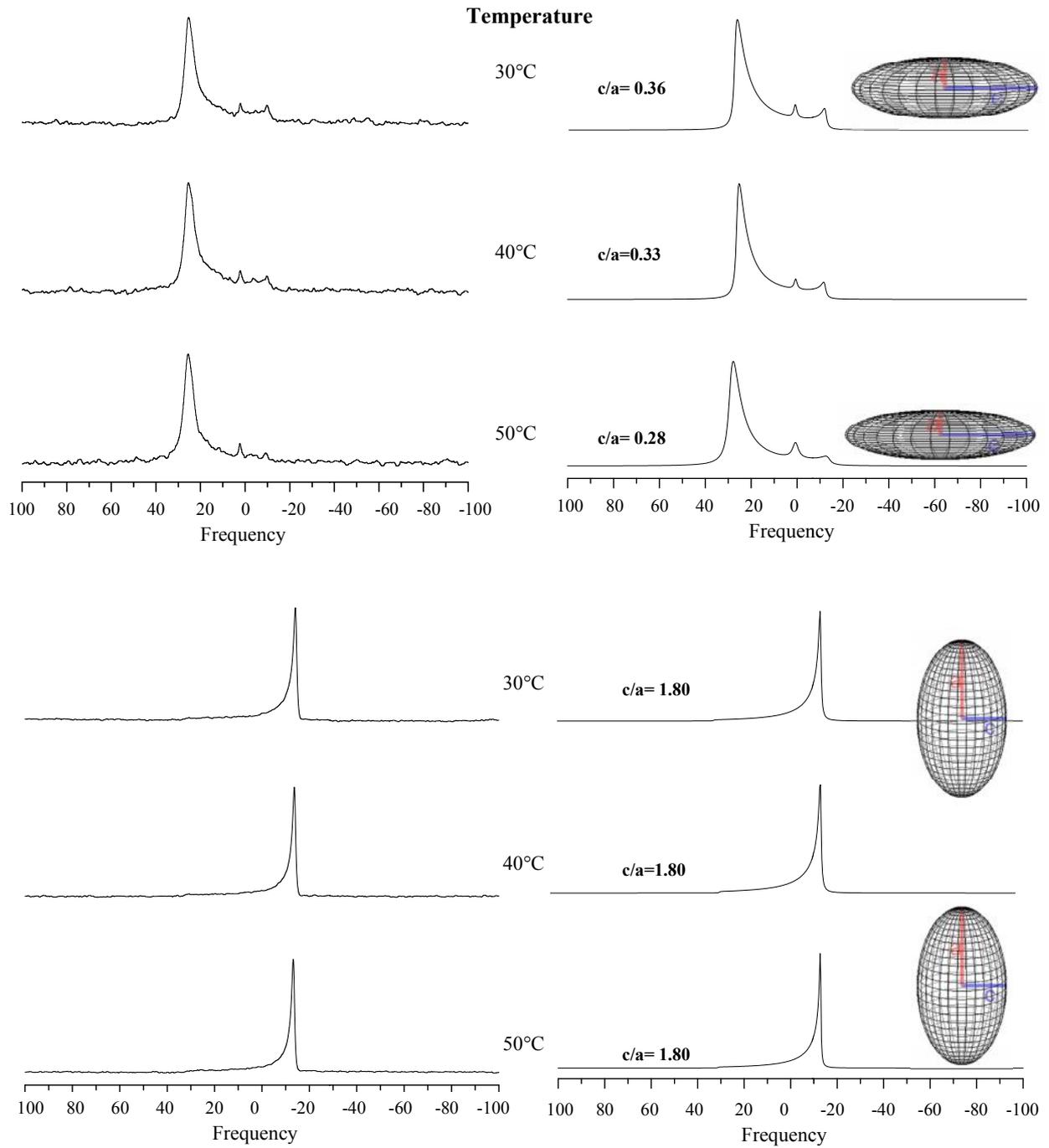
**Figure IV.5:** Spectres de RMN des solides- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) expérimentaux (gauche) et simulés (droite), de liposomes TBBPC (en haut), et DMPC (en bas) obtenus avec 1, 2 et 3 cycles chaud-froid-agitation,  $h=90\% \text{H}_2\text{O}+0,1\text{M NaCl}$  dans un champ magnétique de  $18,8\text{T}$  à  $40^\circ\text{C}$ . Chaque spectre est le résultat de 1024 scans. La valeur du rapport  $c/a$  obtenue par simulation spectrale est indiquée à gauche de chaque spectre. Un ellipsoïde de révolution, obtenu avec MatLab, est associé à certains spectres simulés pour le  $c/a$  correspondant.

### III.1.3: Effet de la température

L'effet de la variation de température sur nos systèmes de lipides saturés et biphényles a ensuite été étudié. Les températures de transition de phase respectives pour les liposomes de DMPC et TBBPC étant de 24°C et de -4°C, nous avons réalisé une série d'expériences en variant les températures de 30°C à 50°C pour être en phase fluide pour les deux systèmes. La figure IV.6 présente les différents spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  obtenus pour les liposomes DMPC et TBBPC à 30°C, 40°C et 50°C et le tableau IV.3 rassemble les données obtenues par simulation spectrale. Pour les liposomes TBBPC, on constate que plus la température augmente, plus la déformation en oblate est prononcée; ainsi, le rapport c/a de 0,36 à 30°C est égal à 0,28 à 50°C;  $\Delta\sigma$ , quant à lui, reste inchangé. Pour les liposomes DMPC, le même spectre phosphore avec le même rapport c/a=1,8 et  $\Delta\sigma=39\text{ppm}$ , est obtenu pour les trois températures considérées. Ainsi, la température ne présente pas d'effet mesurable par RMN des solides  $^{31}\text{P}$  sur la déformation en prolata des liposomes DMPC.

T	DMPC			TBBPC		
	c/a ( $\pm 0.01$ )	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 5$ )	$\Delta\sigma$ (ppm) ( $\pm 0.5$ )	c/a ( $\pm 0.01$ )	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 0.1$ )	$\Delta\sigma$ (ppm) ( $\pm 0.5$ )
30°C	1.77	45	45	0.36	0.2	39
40°C	1.80	53	45	0.33	0.1	39
50°C	1.80	60.0	44	0.28	0.1	39

**Tableau IV.3:** Tableau comparatif montrant l'effet de la température sur la déformation des liposomes TBBPC et DMPC préparés avec un cycle chaud-froid-agitation, une hydratation  $h=90\% + 0,1\text{M NaCl}$  dans un champ magnétique  $B_0=18,8\text{T}$  à 40°C. La déformation est suivie par le rapport des intensités mesurées à  $\theta=90^\circ$  et  $\theta=0^\circ$   $I_{90}/I_0$ , par le rapport du semi petit axe c de l'ellipsoïde de révolution sur le semi grand axe a ( $c/a \pm 0,01$ ) obtenus à partir des simulations spectrales et par l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  ( $\Delta\sigma = \sigma_{//} - \sigma_{\perp} = \sigma_{0^\circ} - \sigma_{90^\circ}$ ).



**Figures IV.6 :** Spectres RMN des solides- $^{31}P$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) expérimentaux (gauche) et simulés (droite), de liposomes TBBPC (en haut), et DMPC (en bas) obtenus avec un cycle chaud-froid-agitation,  $h=90\%$   $H_2O+0,1M$  NaCl avec un champ magnétique de  $18,8T$  pour des températures allant de  $30^\circ C$  à  $50^\circ C$ . Chaque spectre est le résultat de 1024 scans. La valeur du rapport  $c/a$  obtenue par simulation spectrale est indiquée à gauche de chaque spectre. Un ellipsoïde de révolution, obtenu avec MatLab, est associé à certains spectres simulés pour le  $c/a$  correspondant.

### **III.1.4: Effet de l'élasticité membranaire**

Les mécanismes spécifiques d'action de l'éthanol et du cholestérol sur les liposomes biphényles demeurent cependant inexplorés. Dans ce qui suit l'effet du cholestérol et de l'éthanol sur l'élasticité membranaire, et donc sur la déformabilité des liposomes DMPC et TBBPC, est étudié. La RMN des solides- $^2\text{H}$  est considérée comme une méthode non invasive, permettant de mesurer quantitativement la dynamique moléculaire des chaînes lipidiques deutérées et sera donc employée pour suivre l'élasticité membranaire en complément de la RMN des solides- $^{31}\text{P}$  qui permet de sonder l'orientation et la dynamique des têtes polaires des phospholipides.

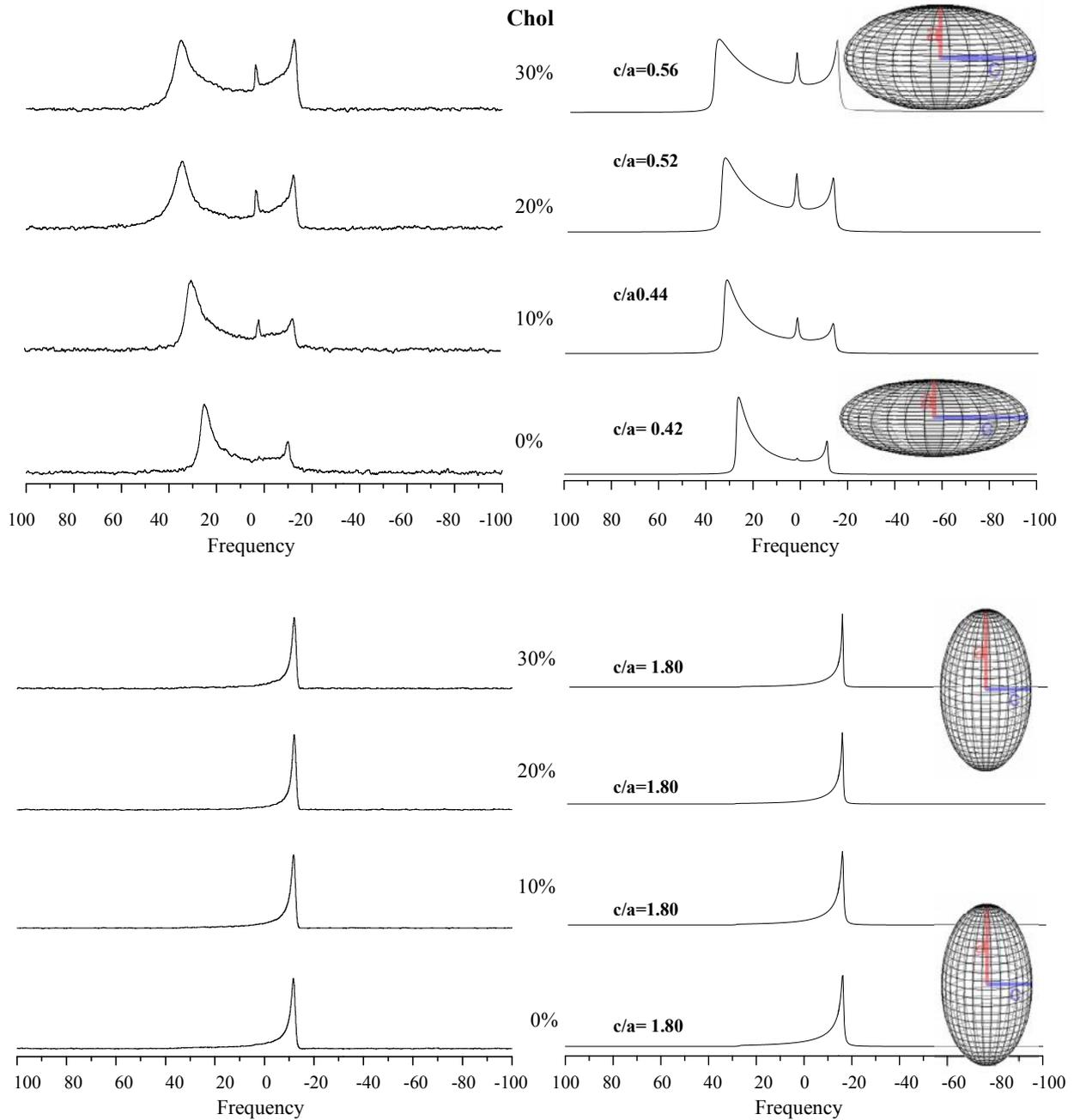
#### III.1.4.1 Caractérisation par RMN des solides $^{31}\text{P}$

##### **a) Effet du cholestérol**

Des liposomes de DMPC et TBBPC ont été préparés dans  $\text{H}_2\text{O}$  en présence de 100mM de NaCl avec  $h=90\%$ , dans lesquels ont été incorporées des quantités croissantes de cholestérol allant de 0% à 30% (en moles). La figure IV.7 présente les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  enregistrés sous  $B_0=18,8\text{T}$  à  $40^\circ\text{C}$ , pour les liposomes TBBPC (en haut) et DMPC (en bas).

Pour les liposomes biphényles, on constate que plus la quantité de cholestérol augmente, plus le signal correspondant à l'orientation  $\theta=90^\circ$  augmente, ce qui se traduit par une diminution de la déformation en oblate. Ceci va de pair avec un rapport  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$  qui augmente avec l'augmentation de la quantité de stérol ajoutée. La simulation spectrale confirme ce résultat et les rapports  $c/a$  obtenus augmentent avec la proportion de cholestérol ajoutée (figure IV.7 et tableau IV.4). Ainsi, pour des liposomes non dopés par du cholestérol, le rapport  $c/a$  est de 0,41 alors qu'il est égal à 0,52 après ajout de 30% de cholestérol. Pour les liposomes DMPC, le même spectre RMN des solides- $^{31}\text{P}$ , avec des rapports  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}=80\pm 5$  et  $c/a=1,80 \pm 0,01$ , est obtenu quelle que soit la quantité de cholestérol ajoutée.

Il est également intéressant de considérer la variation de l'anisotropie de blindage électronique pour ces deux types de vésicules en fonction de la concentration en cholestérol dans la membrane.



**Figures IV.7 :** Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) expérimentaux (gauche) et simulés (droite), de liposomes TBBPC (en haut), et DMPC (en bas) obtenus avec 1 chaud-froid-agitation,  $h=90\%$   $\text{H}_2\text{O}+0,1\text{M}$   $\text{NaCl}$  avec un champ magnétique de  $18,8\text{T}$  à  $T=40^\circ\text{C}$ , dopés avec 0%, 10%, 20% et 30% de cholestérol (en moles). Chaque spectre est le résultat de 1024 scans. La valeur du rapport  $c/a$  obtenue par simulation spectrale est indiquée à gauche de chaque spectre. Un ellipsoïde de révolution, obtenu avec MatLab, est associé à certains spectres simulés pour le  $c/a$  correspondant.

Le tableau IV.4 indique que pour les liposomes DMPC, les valeurs de l'anisotropie de blindage électronique diminuent légèrement avec l'augmentation de la quantité de cholestérol alors que pour les liposomes de TBBPC, les valeurs augmentent de manière significative, passant de 38,5 ( $\pm 1$ ) ppm pour le système non dopé jusqu'à 58,6 ( $\pm 1$ ) ppm pour celui avec 30% de cholestérol. Les ellipsoïdes de révolution, permettant d'imager la déformation et illustrées à droite des spectres simulés, montrent clairement que la déformation s'atténue avec l'ajout du cholestérol. Ces ellipsoïdes sont moins aplatis pour les liposomes TBBPC dopés comparé à ceux purs.

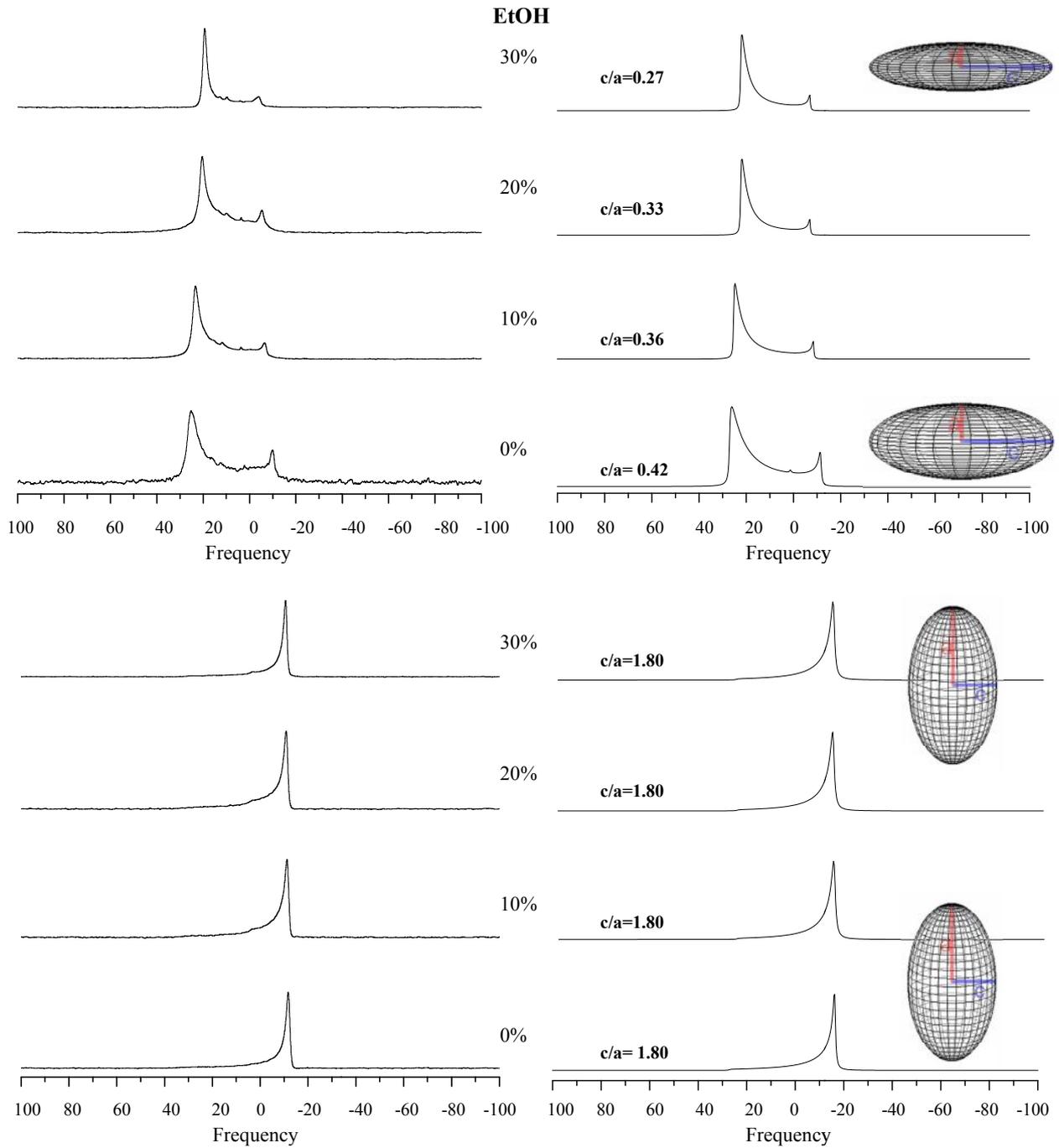
	DMPC/40°C			TBBPC/40°C		
<b>chol</b>	$c/a \pm 0.01$	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 5$ )	$\Delta\sigma$ (ppm) ( $\pm 1$ )	$c/a \pm 0.01$	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 0.1$ )	$\Delta\sigma$ (ppm) ( $\pm 1$ )
<b>0%</b>	1.82	79	45	0.42	0.4	39
<b>10%</b>	1.82	80	44	0.44	0.5	47
<b>20%</b>	1.82	82	43	0.52	0.8	54
<b>30%</b>	1.82	81	41	0.56	0.9	56
<hr/>						
<b>EtOH</b>	$c/a \pm 0.01$	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 5$ )	$\Delta\sigma$ (ppm) ( $\pm 1$ )	$c/a \pm 0.01$	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 0.1$ )	$\Delta\sigma$ (ppm) ( $\pm 1$ )
<b>0%</b>	1.80	79	45	0.42	0.4	39
<b>5%</b>	1.80	83	39	0.36	0.3	30
<b>10%</b>	1.80	85	36	0.33	0.2	26
<b>15%</b>	1.80	81	33	0.27	0.14	24

**Tableau IV.4:** Tableau comparatif montrant l'effet de l'ajout de cholestérol et d'éthanol sur la déformation qui est suivie par le rapport des intensités mesurées à  $\theta=90^\circ$  et  $\theta=0^\circ$   $I_{90}/I_0$ , par le rapport du semi petit axe  $c$  de l'ellipsoïde de révolution sur le semi grand axe  $a$  ( $c/a \pm 0,01$ ) obtenus à partir des simulations spectrales et par l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  ( $\Delta\sigma = \sigma_{||} - \sigma_{\perp} = \sigma_{0^\circ} - \sigma_{90^\circ}$ ), des liposomes TBBPC et DMPC préparés avec 3 cycles chaud-froid-agitation, une hydratation,  $h=90\% + 0,1M$  NaCl dans un champ magnétique  $B_0=18,8T$  à  $40^\circ C$ .

### b) Effet de l'éthanol

Des liposomes de DMPC et TBBPC ont été préparés dans  $H_2O$  en présence de 100mM de NaCl pour une hydratation  $h=90\%$  auxquels sont ajoutés différents pourcentages volumiques de l'éthanol dans de l'eau allant de 0% à 15%. La figure IV.8 présente les spectres- $^{31}P$  obtenus pour les liposomes DMPC et TBBPC enregistrés sous  $B_0=18,8T$  à  $40^\circ C$ . Pour les liposomes TBBPC, nous remarquons que plus la quantité d'éthanol ajoutée augmente, plus le pic correspondant à  $\theta = 0^\circ$  est prédominant. En effet, le rapport  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$  diminue avec l'augmentation du taux d'éthanol ajouté, ce qui se traduit par une diminution du rapport  $c/a$  qui passe de  $0,42 \pm 0,01$  sans la présence d'éthanol à  $0,27 \pm 0,01$  avec 15% d'éthanol (voir tableau IV.4). Ainsi, les liposomes biphényles se déforment davantage en oblate en présence d'éthanol.

Pour les liposomes de DMPC, les spectres RMN des solides  $^{31}P$  présentent la même allure quelle que soit la quantité d'éthanol ajoutée, avec un rapport  $c/a$  qui équivaut à  $1,80 \pm 0,01$ . La présence d'éthanol ne perturbe donc pas la déformation en prolata des vésicules de DMPC. La variation de l'anisotropie de blindage électronique a été également étudiée. Le tableau IV.4 illustre les valeurs de l'anisotropie de blindage électronique qui diminuent pour les deux modèles membranaires TBBPC et DMPC avec l'augmentation du taux d'éthanol ajouté. Cette diminution peut s'interpréter soit par un changement conformationnel au niveau de la tête polaire des lipides soit par une augmentation de la fluidité membranaire, d'où la nécessité d'effectuer des expériences de RMN des solides- $^2H$  qui mesurent spécifiquement la fluidité au niveau des membranes.



**Figures IV.8** : Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$ (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) expérimentaux (gauche) et simulés (droite), de liposomes TBBPC (en haut), et DMPC (en bas) obtenus avec un chaud-froid-agitation,  $h=90\% \text{H}_2\text{O}+0,1\text{M NaCl}$  avec un champ magnétique de  $18,8\text{T}$  à  $T=40^\circ\text{C}$ , dopés avec 0%, 10%, 20% et 30% de cholestérol (en volume). Chaque spectre est le résultat de 1024 scans. La valeur du rapport  $c/a$  obtenue par simulation spectrale est indiquée à gauche de chaque spectre. Un ellipsoïde de révolution, obtenu avec MatLab, est associé à certains spectres simulés pour le  $c/a$  correspondant.

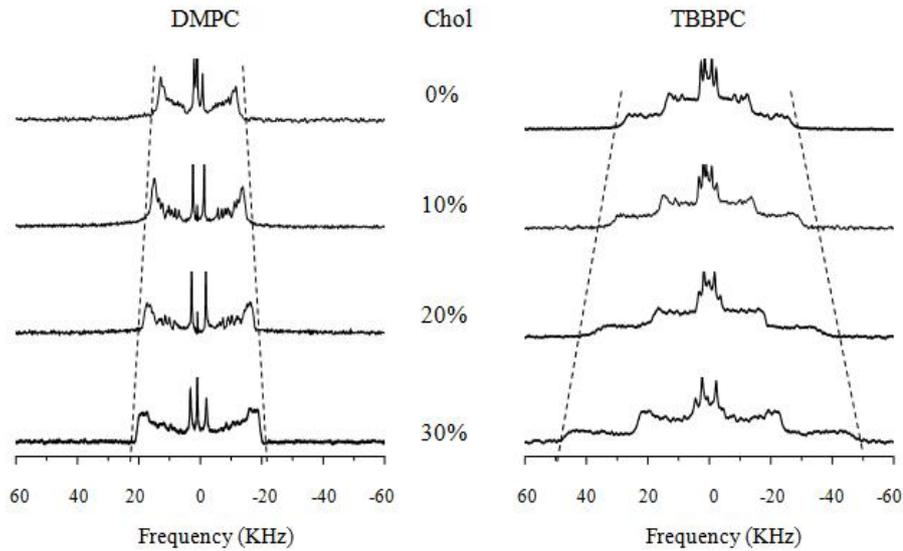
III.1.4.2: Caractérisation par RMN des solides  $^2\text{H}$

a) Spectres de RMN- $^2\text{H}$  en présence de cholestérol et d'éthanol

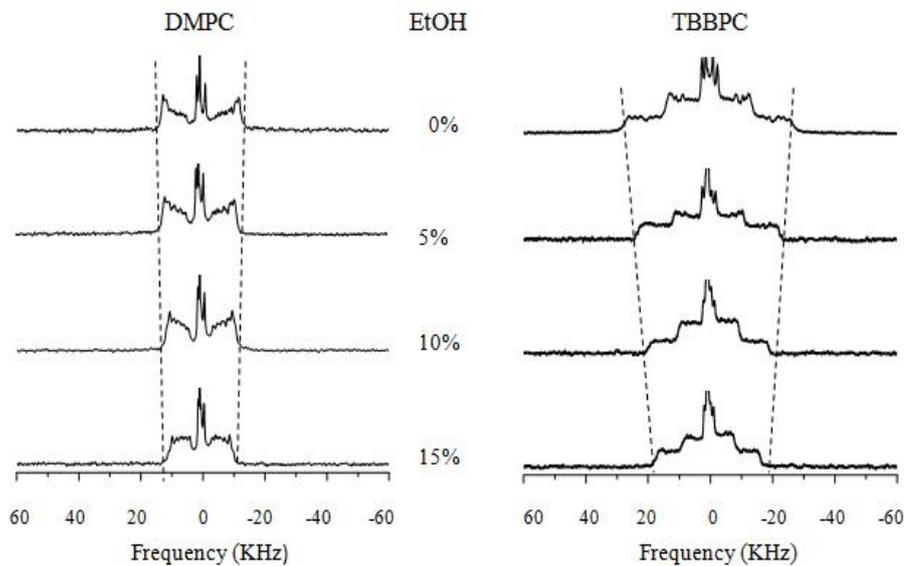
Dans cette partie nous allons étudier la dynamique des liposomes DMPC et TBBPC au niveau des chaînes aliphatiques. L'étude n'est menée que dans la phase fluide. En effet, les mouvements en phase gel ne possèdent pas la symétrie axiale et il est alors très difficile de calculer les paramètres d'ordre orientationnels (Davis, 1983).

Les liposomes de TBBPC et DMPC ont été dopés avec 5% (en moles) de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  afin de rapporter par RMN des solides- $^2\text{H}$  les mouvements des chaînes lipidiques de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  au sein des liposomes. A l'aide de la RMN des solides- $^{31}\text{P}$  on peut montrer que cette faible quantité de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  perturbe peu voire pas la déformation en oblate des liposomes TBBPC (Figure S<sub>1</sub> en annexe). Ainsi, les systèmes binaires suivants ont été considérés, TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) et DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) avec une hydratation de 90% dans de l'eau dédeutérée (contenant 100mM de NaCl). Les spectres RMN des solides- $^2\text{H}$ , associés à ces liposomes auxquels sont ajoutés des doses croissantes de cholestérol allant de 0% à 30%, sont présentés en figure IV.9. En effet, nous retrouvons en RMN des solides- $^2\text{H}$ , ce que l'on a vu en RMN des solides- $^{31}\text{P}$ . On constate que plus la quantité de cholestérol incorporée augmente, plus la largeur des spectres associés aux liposomes DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  augmente ; ce qui est associé à une augmentation des éclatements quadrupolaires au fur et à mesure de l'ajout de cholestérol (voir Tableau IV.5 et IV.6 en annexe). On retrouve ici, l'effet bien connu de rigidification des membranes produit par le cholestérol (Leonard 1991). Comme on l'a vu au p, cet effet de rigidification observé sur les lipides à chaînes saturées et sur les lipides biphényles entraîne une diminution de la déformation des vésicules en prolata et oblate respectivement.

Nous avons décidé de réaliser le même type d'expériences en rajoutant cette fois des quantités croissantes d'éthanol afin d'étudier son effet sur la dynamique des chaînes du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  au sein des liposomes TBBPC et du DMPC. La figure IV.10 présente les spectres RMN- $^2\text{H}$  des liposomes de DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) (gauche) et TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) (droite) auxquels sont ajoutés différents pourcentages volumique d'éthanol: 0%, 5%, 10% et 15% avec une hydratation de 90% dans de l'eau dédeutérée (avec 100mM de NaCl). Nous remarquons qu'à l'opposé du cholestérol, plus la quantité d'éthanol augmente, plus la largeur spectrale des spectres RMN- $^2\text{H}$  diminue pour les liposomes DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$ . Ainsi, l'éthanol module aussi l'élasticité membranaire en fluidifiant les chaînes aliphatiques, ce qui se traduit par une augmentation de la déformation des vésicules.



**Figure IV.9:** Spectres RMN des solides  $^2H$  (séquence écho solide) de liposomes DMPC : DMPC- $^2H_{54}$  (95:5) à gauche et TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$  (95:5) à droite, auxquels sont ajoutés respectivement 10%, 20% et 30% de cholestérol (en moles) pour une hydratation de 90% dans  $H_2O$  dédeutérée +0,1M NaCl, avec 3 cycles chaud-froid-agitation. Chaque spectre est le résultat de 2500 scans et est enregistré sous un champ magnétique de 18,8T à 40°C. Les lignes en pointillées délimitent les bornes supérieures des spectres.



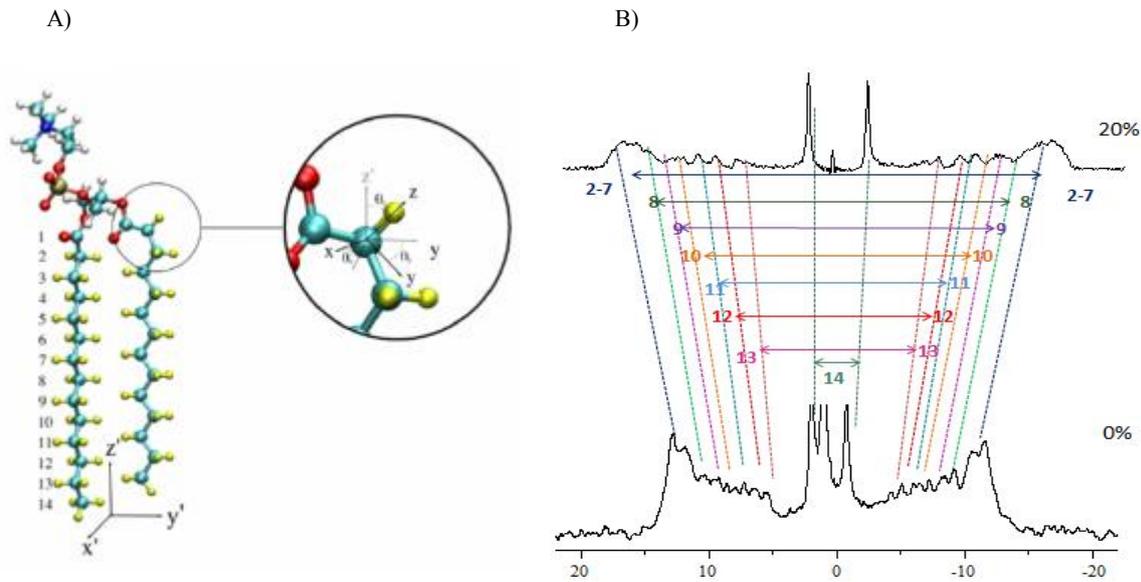
**Figure IV.10:** Spectres RMN des solides  $^2H$  (séquence écho solide) de liposomes DMPC : DMPC- $^2H_{54}$  (95:5) à gauche et TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$  (95:5) à droite, auxquels sont ajoutés respectivement 5%, 10% et 15% (en volume) d'éthanol pour une hydratation de 90% dans  $H_2O$  dédeutérée + 0,1M NaCl, avec 3 cycles chaud-froid-agitation. Chaque spectre est le résultat de 2500 de scans et est enregistré sous un champ magnétique de 18,8T à 40°C. Les lignes en pointillées délimitent les bornes supérieures des spectres.

**b) Paramètres d'ordre et simulations spectrales.**

La procédure de simulation des spectres du deutérium est décrite ci-dessous. Dans notre cas, nous n'avons pas utilisé la méthode de déconvolution dite «depaking» mise au point par Bloom et al (Bloom 1981). En se basant sur la dépendance orientationnelle des systèmes à symétrie axiale, ces derniers ont en effet montré qu'il était possible de construire un spectre orienté à partir du spectre de poudre. Pour cela, une seule orientation du système, celle où la normale à la bicouche est perpendiculaire au champ magnétique, est considérée. Il est alors possible de mesurer les éclatements quadrupolaires directement sur le spectre RMN des solides- $^2\text{H}$  et de les associer à chaque site moléculaire afin de déterminer leur dynamique. Cette méthode de déconvolution ne considère pas l'orientation où la normale à la bicouche est parallèle au champ magnétique. Ainsi, cette méthode est inapplicable pour analyser la dynamique des liposomes biphényles.

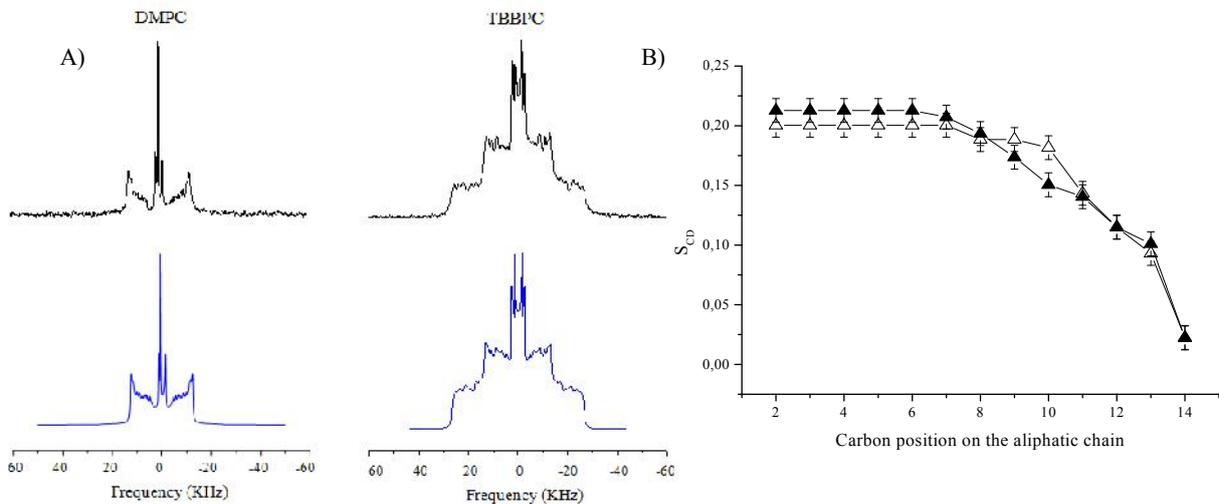
Notre méthode consiste à mesurer autant que possible les éclatements quadrupolaires sur les spectres RMN- $^2\text{H}$  (figure IV.11) et par la suite, nous utilisons la simulation pour affiner les attributions.

Les paramètres ajustables de la simulation sont les éclatements quadrupolaires  $\Delta\nu_Q$ , la largeur à mi-hauteur de chacune des raies et le paramètre  $c/a$ . Les paramètres fixes sont le nombre de deutérons par éclatement quadrupolaire attribué (trois pour le  $\text{CD}_3$  terminal, deux pour les  $\text{CD}_2$  équivalents et un deutéron pour les CD non équivalents du groupement  $\text{CD}_2$  en position  $\alpha$  de la chaîne  $\text{sn}_2$ ). L'ajustement est réalisé en tenant compte des attributions connues dans la littérature (Douliez 1995, Douliez 1996) et de la bonne superposition des spectres expérimentaux avec les spectres calculés. La figure IV.12 présente les spectres expérimentaux ainsi que leurs spectres simulés correspondants pour les systèmes binaires DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$ . Les éclatements quadrupolaires associés aux groupements aliphatiques des positions 8 à 14 sont distinguables individuellement alors que ceux des positions 7 à 2 sont regroupés sous un même pic. A partir des éclatements quadrupolaires, il est possible de calculer les paramètres d'ordre  $S_{\text{CD}}$  et de tracer les profils d'ordre  $S_{\text{CD}}=f(\text{position du carbone sur la chaîne aliphatique})$ .



**Figure IV.11:** A) Structure du DMPC- $^2\text{H}_{54}$

B) Comparaison des spectres RMN des solides  $^2\text{H}$  (séquence écho solide) de liposomes DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95:5) avec 0% et 20% de cholestérol. Les attributions de pics associés aux positions C- $^2\text{H}_2$  sur les chaînes lipidiques sont indiquées sur les spectres.



**Figure IV.12:** A) comparaison entre les spectres RMN des solides  $^2\text{H}$  expérimentaux (noir) et simulés (bleu) de liposomes DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) à gauche et TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) à droite (à  $B_0=18,8\text{T}$  et  $T=40^\circ\text{C}$ ). B) superposition des profils d'ordre reportant les paramètres d'ordre  $S_{CD}$  en fonction de la position des carbones sur la chaîne aliphatique deutérée  $sn_2$  pour les liposomes DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) ( $\Delta$ ) et les liposomes de TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) ( $\blacktriangle$ ) à  $T=40^\circ\text{C}$ .

		DMPC : DMPC- $^2H_{54}$				TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$			
Carbon position	Number $^2H$	$sn_2$		$sn_1$		$sn_2$		$sn_1$	
		$\Delta v_Q$ (m) (KHz)	$\Delta v_Q$ (s) (KHz)	$\Delta v_Q$ (m) (KHz)	$\Delta v_Q$ (s) (KHz)	$\Delta v_Q$ (m) (KHz)	$\Delta v_Q$ (s) (KHz)	$\Delta v_Q$ (m) (KHz)	$\Delta v_Q$ (s) (KHz)
2	2	24.50	25.10	24.50	25.10	24.50	25.50	24.50	25.50
3	2	24.50	25.10	24.50	25.10	24.50	25.50	24.50	25.50
4	2	24.50	25.10	24.50	25.10	24.50	25.50	24.50	25.50
5	2	24.50	25.10	24.50	25.10	24.50	25.50	24.50	25.50
6	2	24.50	25.10	24.50	25.10	24.50	25.50	24.50	25.50
7	2	24.50	25.10	24.50	25.10	24.50	22.73	24.50	22.73
8	2	22.72	23.6	22.70	23.63	22.72	22.73	22.73	20.75
9	2	22.72	23.6	22.70	23.63	22.72	20.75	22.73	17.60
10	2	21.12	22.75	19.10	20.10	21.12	17.60	19.10	16.96
11	2	17.45	17.95	15.80	15.80	17.45	16.96	15.80	15.80
12	2	14.42	14.45	13.20	13.45	14.45	14.45	13.22	13.45
13	2	11.52	11.65	9.80	9.70	11.59	12.65	9.80	9.70
14	3	2.52	2.83	2.50	2.83	2.5	2.58	2.50	2.58
$c/a$ ( $^2H$ )		1.80		1.80		0.54		0.54	
$c/a$ ( $^31P$ )		1.80		1.80		0.45		0.45	
$c/a^*$ ( $^31P$ )		1.80		1.80		0.42		0.42	

**Tableau IV.5** : Tableau comparatif regroupant les éclatements quadrupolaires mesurés (m) et simulés (s) ( $\pm 50$ Hz) pour les chaînes aliphatiques  $sn_1$  et  $sn_2$  du DMPC- $^2H_{54}$  inséré dans les liposomes DMPC:DMPC- $^2H_{54}$  et TBBPC:DMPC- $^2H_{54}$  préparés avec trois cycles chaud-froid-agitation ( $B_0=18,8T$ ,  $T=40^\circ C$ ). Les valeurs de  $c/a$  ( $\pm 0,01$ ) reportées sont celles obtenues après simulation des spectres  $^2H$  et  $^31P$  des systèmes mixtes deutérés. L'astérisque correspond aux valeurs de  $c/a$  pour les systèmes purs.

b.1) Paramètres d'ordre de DMPC et TBBPC.

La mesure directe des éclatements quadrupolaires sur les spectres RMN- $^2\text{H}$  et le calcul par simulation permettent de calculer les paramètres d'ordre  $S_{\text{CD}}$  pour chaque système, puisque  $S_{\text{CD}}$  est relié à  $\Delta\nu_Q$  par l'équation :  $S_{\text{CD}}=4 \Delta\nu_Q/3 A_Q$  (voir chapitre II). Il est ensuite possible de tracer le profil d'ordre associé aux deux chaînes aliphatiques  $sn_1$  et  $sn_2$  pour  $T=40^\circ\text{C}$ . On obtient ainsi une description du gradient d'ordre lorsque l'on se déplace du glycérol ( $\text{C}_2$ ) jusqu'au méthyl terminal ( $\text{C}_{14}$ ) (Douliez 1996)

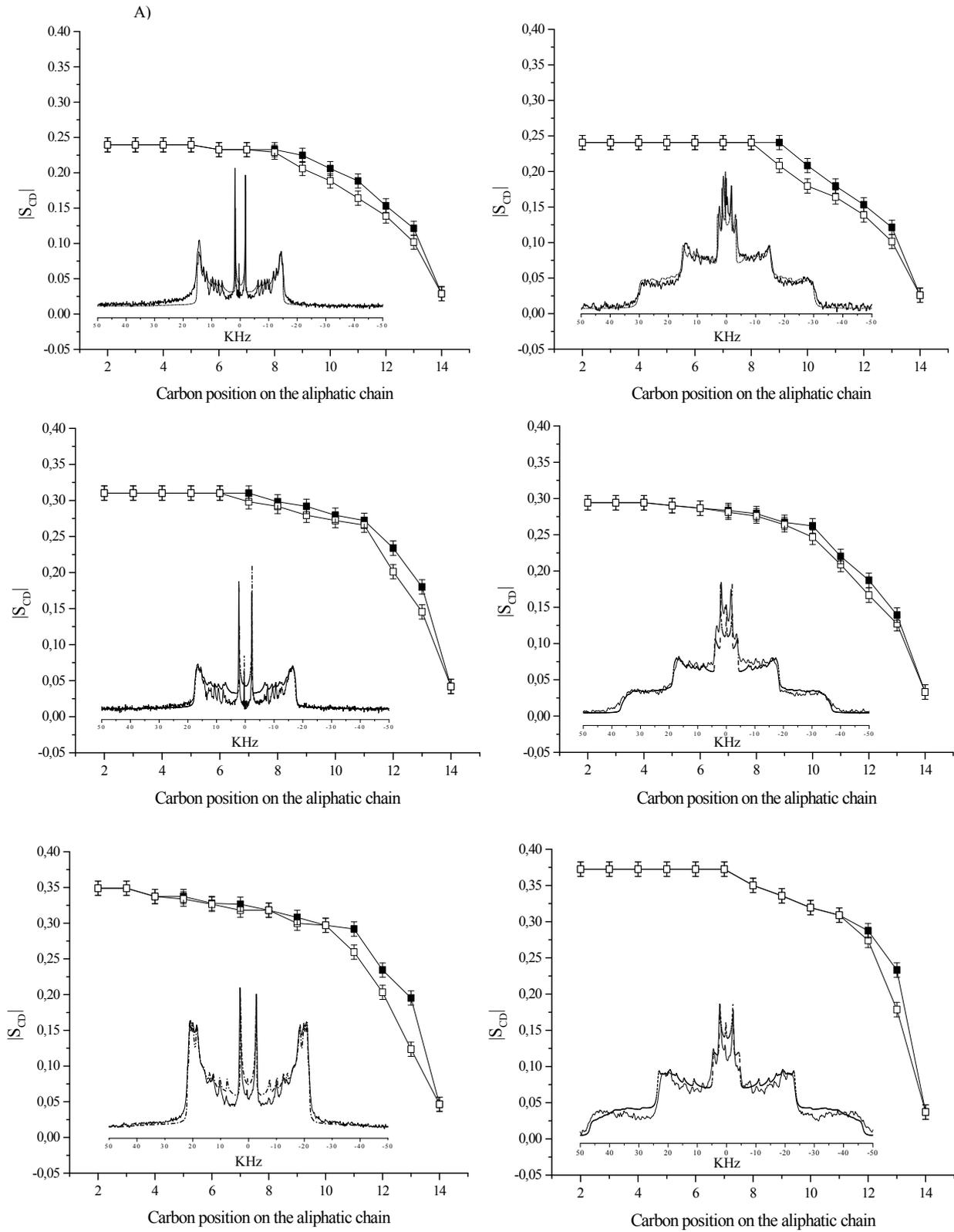
Le profil d'ordre  $S_{\text{CD}}$  caractéristique de la dynamique du système ( $S_{\text{CD}}$  en fonction de la position le long de la chaîne) est analogue pour tous les systèmes envisagés. En effet, les positions en début de chaîne ( $\text{C}_3$  à  $\text{C}_8$ ) ont un paramètre d'ordre sensiblement égal, c'est la région du «plateau», qui décroît nettement lorsqu'on se dirige vers le centre de la bicouche. Le groupement aliphatique  $\text{CD}_3$  en fin de chaîne aliphatique est associé au paramètre d'ordre le plus faible donc présentant le plus de mobilité, tandis que la région plateau à laquelle correspond les  $S_{\text{CD}}$  les plus grands, est la plus rigide. Ainsi, plus on remonte des groupements aliphatiques terminaux vers ceux proches du squelette glycérol, plus le paramètre d'ordre  $S_{\text{CD}}$  augmente plus la mobilité des  $\text{C}-^2\text{H}_2$  est restreinte.

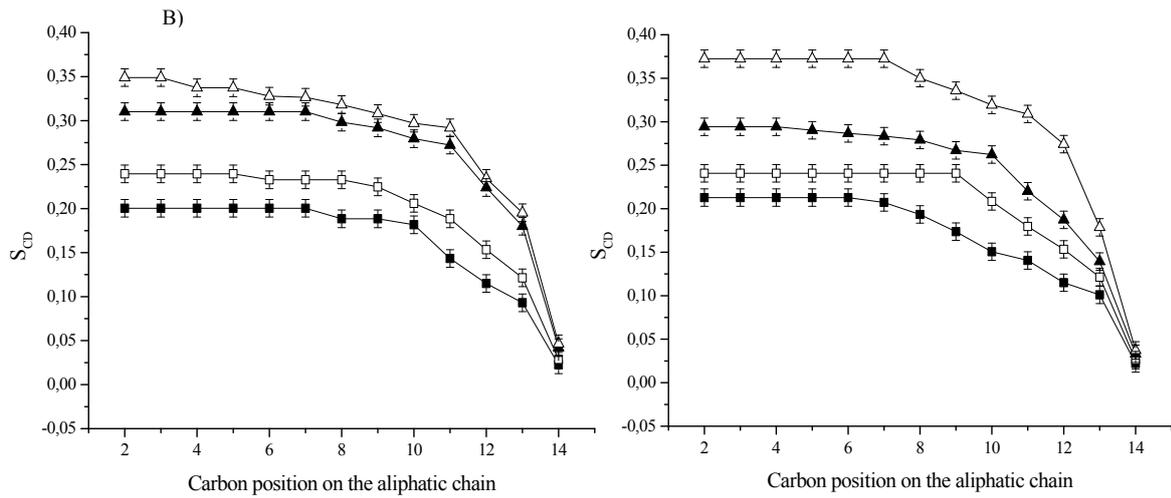
La figure IV.12 B) compare les spectres RMN des solides- $^2\text{H}$  des deux systèmes DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5) et le tableau IV.5 présente une comparaison des profils d'ordre des deux systèmes (DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$ ). Les graphes  $S_{\text{CD}}=(\text{position du carbone sur la chaîne aliphatique})$  sont similaires pour les deux systèmes, ce qui justifie une même dynamique des chaînes aliphatiques  $sn_1$  et  $sn_2$  à  $T=40^\circ\text{C}$ . Il est intéressant de comparer les rapports  $c/a$  obtenus par simulation des spectres RMN  $^2\text{H}$  des systèmes dopés à ceux obtenus pour les spectres RMN  $^{31}\text{P}$  des systèmes dopés et non dopés. Ces valeurs sont reportées dans le tableau IV.5. On obtient des valeurs  $c/a$  identiques pour les liposomes saturés que cela soit par simulation des spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  ou  $^2\text{H}$  ( $c/a=1,80\pm 0,01$ ). Par contre, les rapports  $c/a$  de 0,42 obtenus par simulation des spectres RMN en phosphore pour les systèmes non dopés sont différents de ceux pour les liposomes biphényles dopés ( $c/a=0,45$  et  $0,54$ ). Ainsi, l'insertion de 5% de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  dans les liposomes TBBPC n'est pas négligeable mais affecte légèrement leur déformation.

b.2) Profils d'ordre en présence de cholestérol

Il est intéressant maintenant d'étudier l'effet du cholestérol sur la dynamique des chaînes aliphatiques des liposomes saturés biphényles. La présence de cholestérol, dans les membranes de DMPC conduit à une très nette augmentation des  $S_{CD}$  pour toutes les positions (tableau S1:annexe), ces résultats sont accords avec ceux de la littérature (Seelig 1977, Oldfield 1978, Davis 1983, Leonard 1991, Douliez 1996)

Les figures IV.13. A) présentent les graphes reportant les paramètres d'ordre en fonction de la position du carbone sur les chaînes aliphatiques  $sn_1$  ( $\square$ ) et  $sn_2$  ( $\blacksquare$ ) du lipide deutéré DMPC- $^2H_{54}$  inséré dans les liposomes DMPC : DMPC- $^2H_{54}$  et TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$  avec 10% (en haut); 20% (au milieu) et 30% (en bas) de cholestérol ajoutés, pour une hydratation de 90% dans  $H_2O$  dédeutérée avec 0,1M NaCl, ainsi que les spectres RMN des solides- $^2H$  expérimentaux et simulés correspondants. Nous constatons que le comportement des deux systèmes binaires face à l'ajout de cholestérol est similaire. En effet, pour le système non dopé par du cholestérol, le paramètre d'ordre  $S_{CD}$  de la « région plateau » correspondant est de  $\approx 0,200$  pour TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$  et DMPC : DMPC- $^2H_{54}$ , il passe à  $\approx 0,240$  et  $0,290$  après ajout de 10% et 20% de cholestérol respectivement. Après l'ajout de 30% de stérol, le  $S_{CD}$  de la « région plateau » pour DMPC est de  $0,350$  et celui du système biphényle est de  $0,370$ . La région proche du centre de la bicouche (près du méthyle terminale) est également affectée par l'ajout de cholestérol, puisque les paramètres d'ordre augmentent en fonction de la quantité de stérol ajoutée. Ainsi, l'ajout de cholestérol induit une rigidification du système depuis la région plateau jusqu'au méthyl terminal, ce qui se traduit par une augmentation des valeurs des paramètres d'ordre pour toutes les positions sur la chaîne aliphatique. Les valeurs  $S_{CD}$  montrent qu'en présence de 30% de stérol, ces derniers sont environ deux fois supérieurs à ceux observés pour le système sans cholestérol. Les valeurs des rapports  $c/a$ , reportées dans le tableau IV.6 et obtenues par simulation des spectres RMN des solides- $^2H$  pour les liposomes saturés, sont identiques à celles obtenues après simulation des spectres en RMN des solides- $^{31}P$  ( $c/a=1,80\pm 0,01$ ). Par contre, les liposomes biphényles présentent des rapports  $c/a$  de  $0,54$ ,  $0,59$ ,  $0,64$  et  $0,69$  ( $\pm 0,01$ ) respectivement pour 0%, 10%, 20% et 30% de cholestérol ajouté. Ces valeurs augmentent, ce qui est caractéristique d'une diminution de la déformation mais elles sont différentes par rapport à celles obtenues en RMN du phosphore des systèmes purs (tableau IV.4). Ceci peut s'expliquer par le fait que les liposomes TBBPC ont été dopés avec 5% de lipide DMPC- $^2H_{54}$  qui diminue la déformation en oblate par rapport à celle des liposomes biphényles purs.





**Figure IV.13** :A) Graphes reportant les paramètres d'ordre (proportionnels aux éclatements quadrupolaires) en fonction de la position du carbone sur les chaînes aliphatiques  $sn_1$  ( $\square$ ) et  $sn_2$  ( $\blacksquare$ ) du lipide deutéré  $DMPC\text{-}^2H_{54}$  inséré dans les liposomes  $DMPC : DMPC\text{-}^2H_{54}$  et  $TBBPC : DMPC\text{-}^2H_{54}$  avec 10% (en haut); 20% (au milieu) et 30% (en bas) en moles de cholestérol ajoutés, pour une hydratation de 90% dans  $H_2O$  dédeutérée avec 0.1M NaCl à  $40^\circ$ . A chaque graphe de profil d'ordre est associée les spectres  $RMN^2H$  expérimentaux (—) et simulés (.....) correspondants.

B) Superposition des graphes reportant les paramètres d'ordre  $S^{CD}$  en fonction de la position des carbones sur la chaîne aliphatique deutérée ( $sn_2$ ) du lipide  $DMPC\text{-}^2H_{54}$  pour les liposomes  $DMPC : DMPC\text{-}^2H_{54}$  (95 :5) (gauche) et  $MLVs TBBPC : DMPC\text{-}^2H_{54}$  (95 :5) (droite) pour 0% ( $\blacksquare$ ), 10% ( $\square$ ), 20% ( $\blacktriangle$ ) et 30% ( $\triangle$ ) de cholestérol ajoutés.

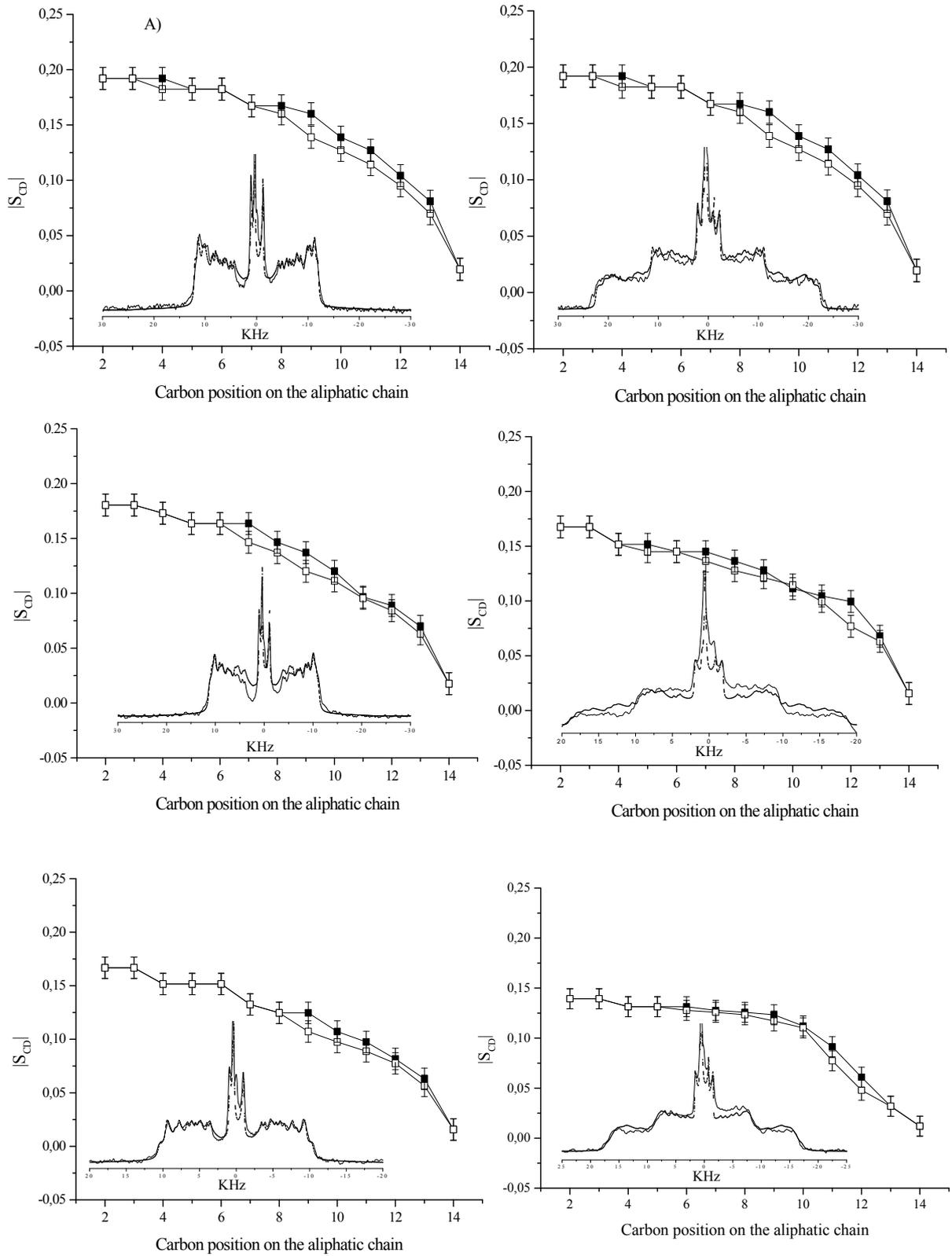
% Chol	0%	10%	20%	30%
c/a* ( $^{31}P$ ) $\pm 0,01$	0.42	0.44	0.52	0.56
c/a ( $^{31}P$ dopés) $\pm 0,01$	0.45	n.d	n.d	n.d
c/a ( $^2H$ dopés) $\pm 0,01$	0.54	0.59	0.64	0.69

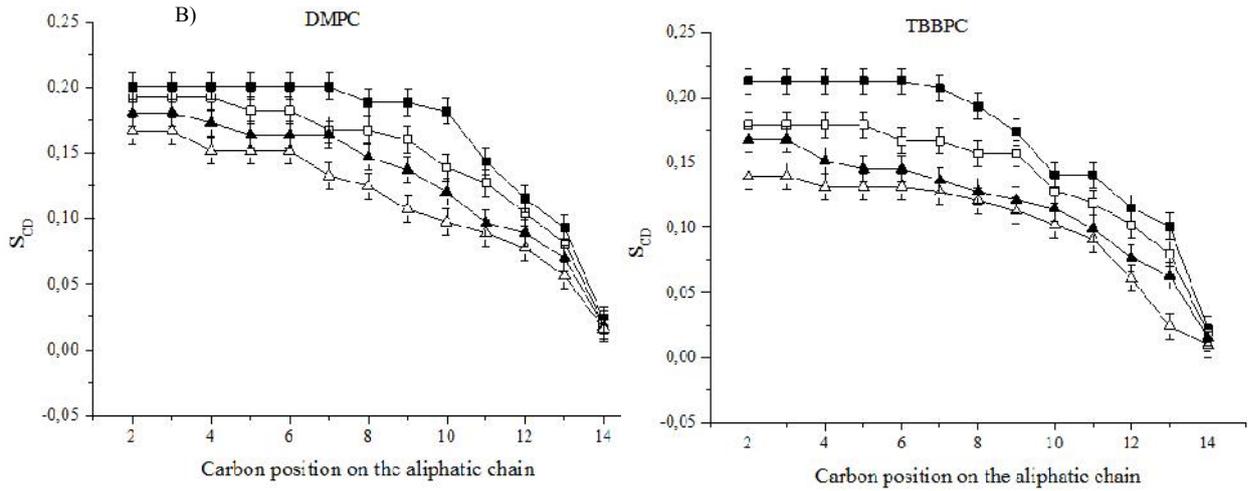
**Tableau IV.6** : Tableau comparatif montrant les rapports c/a ( $\pm 0,01$ ) obtenus après simulation des spectres  $^2H$  et  $^{31}P$  des liposomes  $TBBPC : DMPC\text{-}^2H_{54}$  (95 :5) préparés avec trois cycles chaud-froid-agitation ( $B_0=18,8T$ ,  $T=40^\circ C$ ) auxquels sont ajoutés 0%, 10%, 20% et 30% (en moles) de cholestérol. L'astérisque correspond aux valeurs de c/a pour les systèmes purs (non dopés avec du  $DMPC\text{-}^2H_{54}$ ).

b.3) Profils d'ordre en présence d'éthanol

Nous avons analysé les spectres RMN des solides- $^2\text{H}$  en présence de différents pourcentages volumiques d'éthanol, de la même manière que pour les systèmes dopés avec du cholestérol. Nous avons étudié l'ordre des chaînes obtenu par le tracé des profils d'ordre qui consiste à porter le paramètre d'ordre  $S_{\text{CD}}$  des méthylènes  $\text{CD}_2$  en fonction de leur position. Les profils d'ordre relatifs aux chaînes aliphatiques  $sn_1$  et  $sn_2$  du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  obtenus à  $40^\circ\text{C}$  des systèmes DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  auxquels sont ajoutés 0%, 5%, 10% et 15% (en volume) d'éthanol sont présentés en figure IV.14. La figure IV.14, de par la bonne superposition des spectres expérimentaux avec les spectres calculés souligne l'effet de fluidification engendré par l'éthanol dans la mesure où nous observons une diminution importante des éclatements quadrupolaires pour toutes les positions sur les chaînes aliphatiques, ce qui traduit un effet de fluidification des chaînes lipidiques. Le tableau S2 en annexe ainsi que la superposition des profils d'ordre représenté dans la figure IV.14 montrent que l'éthanol module l'élasticité membranaire. En effet, les paramètres d'ordre pour les systèmes purs au niveau de la région "plateau" passent de 0,20 à environ  $\approx 0,16$  et 0,13 pour les liposomes de DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  respectivement en présence de 15% d'éthanol. Cet effet est non seulement perçu près du squelette glycérol mais également au niveau du centre de la bicouche à savoir que l'ordre décroît du système pur au système contenant de l'éthanol.

Les valeurs des rapports  $c/a$ , reportés dans le tableau IV.7 et obtenus par simulation des spectres RMN des solides- $^2\text{H}$  pour les liposomes saturés sont identiques à celles obtenues après simulation des spectres en RMN des solides- $^{31}\text{P}$  ( $c/a=1,80\pm 0,01$ ). Par contre, les liposomes biphényles présentent des rapports  $c/a$  de 0,54, 0,50, 0,49 et 0,46 respectivement pour 0%, 5%, 10% et 15% d'éthanol ajouté. Ces valeurs diminuent, ce qui est caractéristique d'une augmentation de la déformation mais elles sont différentes par rapport à celles obtenues en RMN du phosphore pour les systèmes non dopés par du DMPC- $^2\text{H}_{54}$ . Là encore, la présence de 5% de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  fait diminuer la déformation en oblate des liposomes biphényles dopés par rapport à celle des liposomes biphényles purs.





**Figure IV.14 :** A) Graphes reportant les paramètres d'ordre (proportionnels aux éclatements quadrupolaires) en fonction de la position du carbone sur les chaînes aliphatiques  $sn_1$  ( $\square$ ) et  $sn_2$  ( $\blacksquare$ ) du lipide deutéré  $DMPC\text{-}^2H_{54}$  inséré dans les liposomes DMPC :  $DMPC\text{-}^2H_{54}$  et TBBPC :  $DMPC\text{-}^2H_{54}$  avec 5% (en haut); 10% (au milieu) et 15% (en bas) d'éthanol ajouté, pour une hydratation de 90% dans  $H_2O$  dédeutérée avec 0.1M NaCl à 40°. A chaque graphe de profil d'ordre est associé les spectres RMN  $^2H$  expérimentaux (—) et simulés (.....) correspondants.

B) Superposition des graphes reportant les paramètres d'ordre  $S^{CD}$  en fonction de la position des carbones sur la chaîne aliphatique deutérée ( $sn_2$ ) du lipide  $DMPC\text{-}^2H_{54}$  pour les liposomes DMPC :  $DMPC\text{-}^2H_{54}$  (95 :5) (gauche) et TBBPC :  $DMPC\text{-}^2H_{54}$  (95 :5) (droite) pour 0% ( $\blacksquare$ ), 5% ( $\square$ ), 10% ( $\blacktriangle$ ) et 15% ( $\triangle$ ) de quantité d'éthanol ajoutée.

% EtOH	0%	5%	10%	15%
$c/a^*$ ( $^{31}P$ ) $\pm 0,01$	0.42	0.36	0.33	0.27
$c/a$ ( $^{31}P$ dopés) $\pm 0,01$	0.45	n.d	n.d	n.d
$c/a$ ( $^2H$ dopés) $\pm 0,01$	0.54	0.50	0.49	0.46

**Tableau IV.7 :** Tableau comparatif montrant les rapports  $c/a$  ( $\pm 0,01$ ) obtenus après simulation des spectres  $^2H$  et  $^{31}P$  des liposomes TBBPC :  $DMPC\text{-}^2H_{54}$  (95 :5) préparés avec trois cycles chaud-froid-agitation ( $B_0=18,8T$ ,  $T=40^\circ C$ ) auxquels sont ajoutés 0%, 5%, 10% et 15% d'éthanol (en volume). L'astérisque correspond aux valeurs de  $c/a$  pour les systèmes purs (non dopés avec du  $DMPC\text{-}^2H_{54}$ ).

III.1.4.3: Estimation de la longueur des chaînes aliphatiques.

D'après le tableau  $S_1$  en annexe, répertoriant les valeurs des paramètres d'ordre pour le DMPC- $^2H_{54}$  inséré dans les liposomes TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$  et DMPC: DMPC- $^2H_{54}$  à 40°C, et les équations IV.2 et IV.3, on calcule une moyenne des longueurs des chaînes hydrophobes  $sn_1$  et  $sn_2$  présentées dans les tableaux IV.8. et IV.9, pour les systèmes dopés avec du cholestérol et de l'éthanol respectivement.

Longueur moyenne de la chaîne aliphatique (en Å ± 0.1)	0% chol	+10% chol	+20% chol	+30% chol
TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$	10.4	10.8	11.2	11.8
DMPC : DMPC- $^2H_{54}$	10.4	10.7	11.3	11.7

**Tableau IV.8:** Estimation de la longueur moyenne des chaînes aliphatiques ( $sn_1+sn_2$ ) (en Å) du DMPC- $^2H_{54}$  au sein des liposomes TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$  et DMPC: DMPC- $^2H_{54}$  à 40°C, formulés en liposomes en présence de 0%, 10%, 20% et 30% de cholestérol.

Longueur moyenne de la chaîne aliphatique (en Å ± 0.1)	0% EtOH	5% EtOH	10% EtOH	15% EtOH
TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$	10.4	10.1	9.9	9.8
DMPC : DMPC- $^2H_{54}$	10.4	10.2	10	9.9

**Tableau IV.9:** Estimation de la longueur moyenne des chaînes aliphatiques ( $sn_1+sn_2$ ) (en Å) du DMPC- $^2H_{54}$  au sein des liposomes du TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$  et DMPC: DMPC- $^2H_{54}$  à 40°C, formulés en liposomes en présence de 0%, 5%, 10% et 15% d'éthanol.

Pour les systèmes biphényles et DMPC, la présence de 30% de cholestérol augmente la longueur des chaînes aliphatiques d'environ 2,8Å à 40°C, ce qui est en accord avec les données trouvées dans la littérature (Leonard 1991). L'ajout de 15% d'éthanol induit une diminution de l'épaisseur hydrophobe de  $1,2 \pm 0,1$ Å.

Fernandez puente et ses collaborateurs (Fernandez-Puente 1994) ont établi une dépendance linéaire entre le module de l'élasticité de courbure ( $k$ ) et le carré de l'épaisseur membranaire (longueur hydrophobe) ( $b$ ) pour les systèmes de DMPC et DPPC. Ainsi, en se référant aux travaux de ces derniers, nous pourrions dire que pour les liposomes TBBPC,  $k$  augmente avec l'augmentation de la teneur en cholestérol, ce qui va de pair avec l'augmentation du carré de l'épaisseur de la bicouche lipidique.

#### **IV- Discussion.**

Les résultats majeurs de notre étude peuvent se résumer ainsi:

- i La déformation des vésicules dans un champ magnétique dépend de la nature des lipides qui les constituent.
- ii La déformation augmente avec l'intensité du champ magnétique  $B_0$ ,
- iii La déformation est modulée par la fluidité /rigidité membranaire,
- iv Les effets liés à la température et à la taille des vésicules sont relativement faibles dans nos conditions.

Ces quatre résultats seront discutés successivement et comparés à ceux obtenus dans la littérature.

##### **IV.1: La déformation dépend de la nature des lipides:**

L'anisotropie de susceptibilité magnétique ( $\Delta\chi$ ) des lipides DMPC et TBBPC est le facteur clé de la déformation en prolate et oblate des liposomes saturés et biphényles respectivement. Le  $\Delta\chi$  positif des deux cycles phényles greffés sur la chaîne  $sn_2$  du TBBPC induit une orientation privilégiée de l'axe moléculaire du lipide parallèle au champ magnétique. Ainsi, les liposomes de TBBPC auront tendance à s'aplatir pour favoriser un nombre maximal de lipides avec l'orientation  $\theta=0$  ; quant aux liposomes DMPC, ces derniers s'aplatissent d'une manière où l'orientation privilégiée de l'axe moléculaire du lipide saturé est perpendiculaire au champ magnétique (figure IV.15). Afin de mieux comprendre ce

phénomène, nous allons calculer  $c-a$  à partir de nos mesures et utiliser l'équation d'Helfrich pour calculer  $\Delta\chi$ .

Si on considère que le volume du liposome avant et après déformation demeure constant, on en déduit une relation entre la valeur du rayon ( $r$ ) du liposome non déformé et les semi-axes majeurs ( $c$ ) et mineurs ( $a$ ) de l'ellipsoïde:

$$r^3 = a^2 * c \quad (IV.4)$$

En tenant compte des valeurs de  $c/a=m$  obtenues par simulation spectrale, la valeur du semi-grand axe  $c$  et semi petit axe  $a$  de l'ellipsoïde de révolution s'exprime par :

$$a = \sqrt[3]{\frac{r^3}{m}} \quad \text{et } c/a = m \quad (IV.5)$$

La connaissance des valeurs de  $c$  et  $a$ , nous permet d'appliquer l'équation IV.1, pour en tirer l'anisotropie de susceptibilité magnétique ( $\Delta\chi$ ) du lipide TBBPC et DMPC et comparer les valeurs obtenues à celles de la littérature.

En combinant les résultats des techniques de diffusion de la lumière (DLS) et ceux de microscopie optique à contraste de phase différentiel interférentiel (DIC) (chapitre V), nous pouvons dire que les liposomes TBBPC et DMPC formulés avec un cycle chaud-froid-agitation ont respectivement un rayon de  $3,8 \pm 1,5 \mu\text{m}$  et  $2,2 \pm 2 \mu\text{m}$ .

Le dernier paramètre à déterminer est la constante d'élasticité de courbure ( $k$ ). D'après les résultats de Fernandez-Puente (Fernandez-Puente 1994) et ceux de Méléard, P. (Meleard 1997),  $k$  est proportionnel au carré de l'épaisseur hydrophobe de la bicouche ( $b$ ) ainsi qu'à la teneur en cholestérol (figure IV.15). La méthode pour l'obtention des valeurs de  $k$  consiste à l'observation par microscopie à contraste de phase des oscillations de formes induites par les fluctuations thermiques des vésicules. De telles mesures n'ont pas été réalisées sur nos systèmes, c'est pour cette raison que les valeurs des constantes d'élasticité de courbure obtenues pour des liposomes de DMPC ( $1,27 \times 10^{-19} \text{ J}$ ) par Méléard, P. et ses collaborateurs seront utilisées et extrapolées pour celles des liposomes TBBPC.

Ainsi, à partir de l'équation IV.1 :  $c - a = \frac{r^3 b B_0^2}{k} \Delta\chi$

Nous pouvons déduire une anisotropie de susceptibilité magnétique volumique moyenne de:

$$\Delta\chi = \frac{k(c-a)}{r^3 b B_0^2} \text{ de } 9,1 \cdot 10^{-3} (\pm 0,3) \text{ N.m}^{-1} \text{ (S.I)} \text{ pour les liposomes TBBPC et de } -5,8 \cdot 10^{-3} (\pm 0,4)$$

$\text{N.m}^{-1} \text{ (S.I)} \text{ pour les liposomes DMPC. On remarque que les deux valeurs d'anisotropie de susceptibilité magnétique sont bien de signe opposé, et que } \Delta\chi \text{ (TBBPC) est pratiquement}$

supérieure d'un facteur 2 en valeur absolue par rapport à  $\Delta\chi$  (DMPC).

$B_0$ (T)	c-a ( $TBBPC$ ) $\pm 0.3$	$\Delta\chi_{TBBPC}$ (N. m <sup>-1</sup> )	c-a ( $DMPC$ ) $\pm 0.4$	$\Delta\chi_{DMPC}$ (N. m <sup>-1</sup> )
7.1	0.19	$5.9 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.3$ )	-0.31	$-4.6 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.4$ )
9.4	1.53	$1.4 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.3$ )	-0.68	$-5.8 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.4$ )
11.7	2.46	$1.4 \cdot 10^{-2}$ ( $\pm 0.3$ )	-1.27	$-7.0 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.4$ )
16.4	2.94	$9.2 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.3$ )	-2.23	$-6.2 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.4$ )
18.8	3.68	$7.8 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.3$ )	-2.50	$-5.3 \cdot 10^{-3}$ ( $\pm 0.4$ )

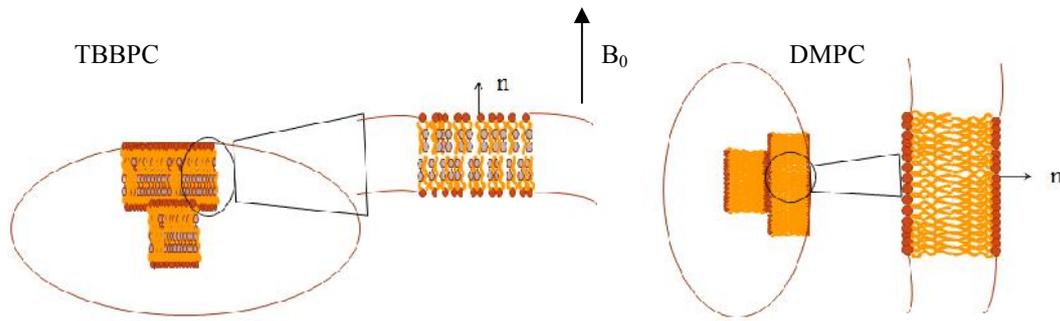
**Tableau IV.10 :** Tableau comparatif reportant les valeurs de c-a ( $\mu\text{m}$ ) et de l'anisotropie de susceptibilité magnétique  $\Delta\chi$  (N.m<sup>-1</sup>) en fonction du carré des différentes intensités du champ magnétique statique pour les liposomes TBBPC et DMPC à 40°C.

#### IV.2: La déformation augmente avec $B_0$ :

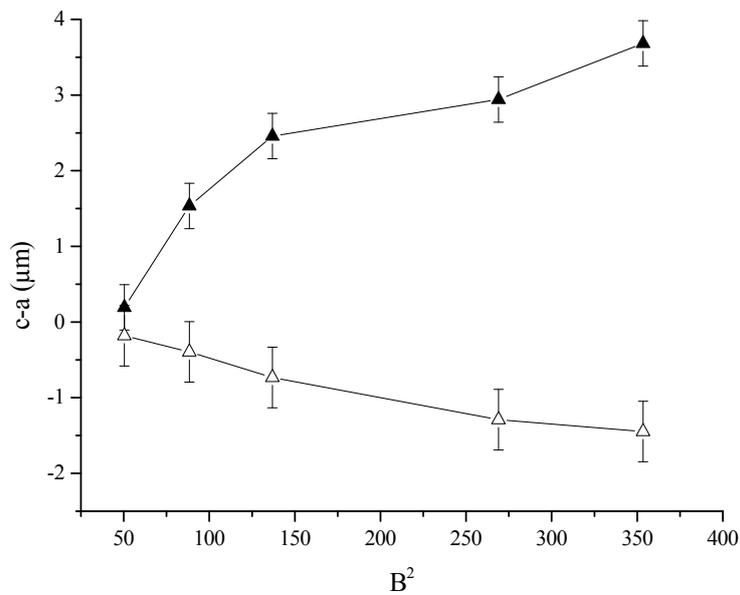
Il apparaît que la déformation s'accroît avec l'intensité du champ magnétique, que ce soit prolata dans le cas des vésicules DMPC ou oblate pour celles de TBBPC. Ceci se traduit par une diminution des rapports d'intensités  $I_{90}/I_0$ , et des c/a pour les liposomes TBBPC et un comportement inverse pour les liposomes DMPC.

La figure IV.16 reporte les valeurs de c-a en fonction de l'intensité du champ magnétique statique  $B_0$ . On constate que la déformation en prolata des liposomes DMPC est deux fois moins importante que celle des liposomes TBBPC en oblate pour les mêmes conditions de préparation. Ceci s'explique par une valeur moyenne  $\Delta\chi$  plus importante pour TBBPC ( $9,1 \cdot 10^{-3}$  ( $\pm 0,3$ ) N.m<sup>-1</sup>) que pour DMPC ( $-5,8 \cdot 10^{-3}$  ( $\pm 0,3$ ) N.m<sup>-1</sup>) et de signe opposé. On note aussi que les valeurs de l'anisotropie de susceptibilité magnétique des liposomes TBBPC et DMPC sont constantes, en tenant compte de l'erreur expérimentale, et ne varient pas quelle que soit l'intensité du champ magnétique (tableau IV.10).

Enfin, c'est la première fois que la déformation si prononcée en prolata des liposomes DMPC est mise en valeur dans un champ magnétique intense ; ceci peut-être intéressant pour de futures applications biophysiques des liposomes saturés qui constituent l'un des modèles membranaires les plus utilisés actuellement.



**Figure IV.15** : Schéma représentatif des liposomes de TBBPC (gauche) et DMPC (droite) déformés en oblate et prolata respectivement sous un champ magnétique supérieur ou égale à 9,4T.



**Figure IV.16** Graphe reportant les valeurs de  $c-a$  obtenues par simulation en fonction du carré de l'intensité du champ magnétique pour les liposomes DMPC ( $\Delta$ ) et TBBPC ( $\blacktriangle$ ), préparés avec un cycle chaud froid,  $h=90\% \text{H}_2\text{O}+0,1\text{M NaCl}$ ,  $B_0=18,8\text{T}$  et  $T=40^\circ\text{C}$ .

**IV.1: La déformation est modulée par la fluidité/rigidité membranaire.**

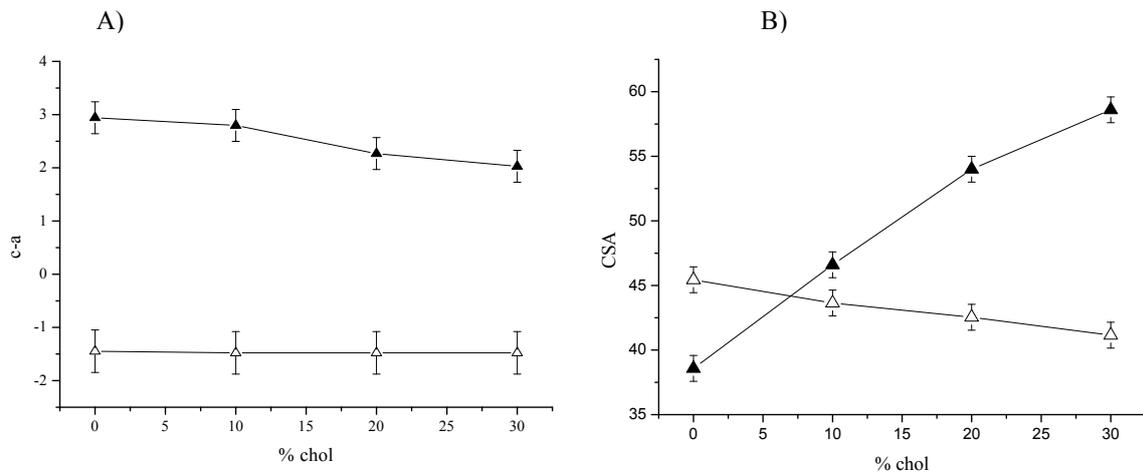
iii. Effet de l'ajout de cholestérol

Nous avons également calculé les valeurs de  $c-a$  à partir des rapports  $c/a$  obtenus pour les liposomes TBBPC et DMPC comprenant différentes teneurs en cholestérol (figure IV.17 graphe A). Pour les liposomes DMPC, on constate que le  $c-a$  reste constant pour tous les pourcentages de cholestérol étudiés ; il n'y a donc pas de changement de la déformation en prolata. Par contre, pour les liposomes TBBPC, plus la quantité de cholestérol augmente, plus  $c-a$  diminue ce qui traduit une déformation en oblate moins prononcée. L'anisotropie de blindage électronique des spectres RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\Delta\sigma$ ) (figure IV.17 graphe B) des liposomes TBBPC augmente avec la teneur en cholestérol alors qu'elle diminue légèrement pour les liposomes DMPC. Cette augmentation du  $\Delta\sigma$  traduit une augmentation de la rigidité au niveau des têtes des lipides biphényles avec le cholestérol alors qu'au contraire une diminution du CSA pour les liposomes saturés traduit une fluidité plus importante des têtes lipidiques DMPC. De plus, d'après les profils d'ordre (figure IV.14) obtenus à partir des spectres RMN des solides  $^2\text{H}$ , l'ajout de cholestérol augmente les paramètres d'ordre et donc la rigidité des chaînes lipidiques aussi bien pour les liposomes DMPC que TBBPC. L'ensemble de ces résultats prouvent que le cholestérol se localise à l'interface tête/chaîne aliphatique pour le lipide TBBPC, alors qu'il se localise uniquement au niveau des chaînes aliphatiques pour le DMPC. Ceci est en accord avec les résultats de la littérature ; Leonard et al. (Leonard 1991) ont en effet prouvé qu'au-dessus de  $T_m$ , l'ajout de cholestérol à des liposomes de DMPC s'accompagne d'une diminution de la dynamique moléculaire et d'une libération intermoléculaire des têtes (augmentation de la distance moyenne inter-têtes) due à une localisation du cholestérol au niveau des chaînes aliphatiques. Ils ont également montré, par des études de diffraction des neutrons, que le cholestérol s'orientait perpendiculairement dans le cœur de la bicouche. Il effectuerait des liaisons hydrogènes entre son groupement hydroxyle OH et le carbonyle de l'acide gras du DMPC.

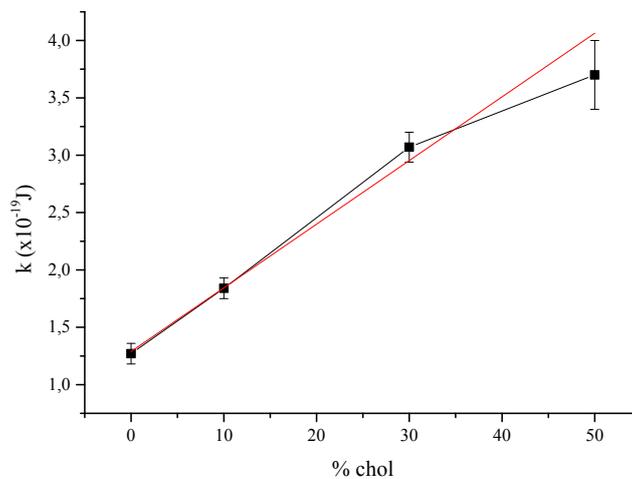
Comme nous avons vu, selon l'équation d'Helfrich, les valeurs de  $c-a$  dépendent de l'épaisseur de la bicouche ( $b$ ) ainsi que de la constante d'élasticité de courbure ( $k$ ).

Il est intéressant de calculer les valeurs de cette constante d'élasticité de courbure  $k$  des liposomes TBBPC pour différents pourcentages de cholestérol insérés, en partant de l'hypothèse que  $k \propto b^2$  (Fernandez-Puente, 1994), et de comparer ces valeurs à celles des liposomes DMPC contenant du cholestérol, issue de la littérature. La valeur de l'épaisseur membranaire ( $b$ ) peut être mesurée par un simple calcul de la longueur hydrophobe (Douliez

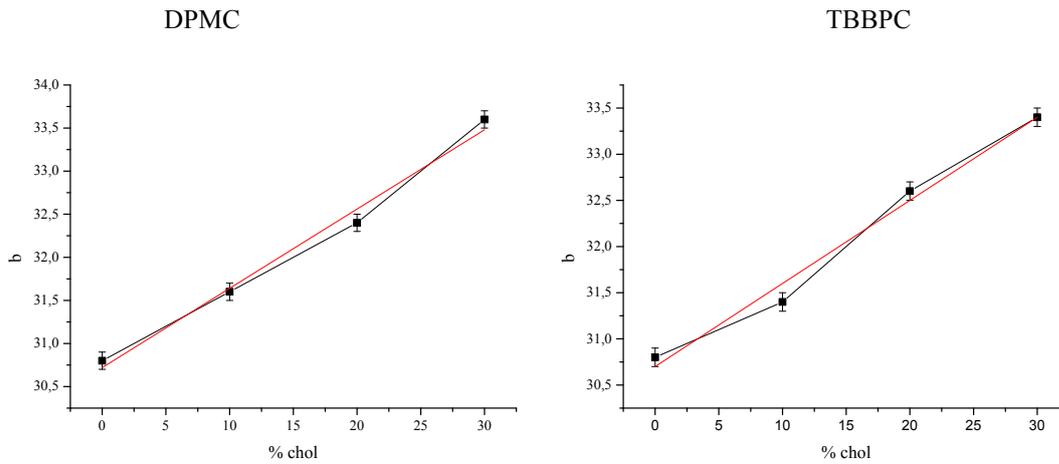
et al, 1995) proposé par Douliez à partir de l'idée de Schindler et Seelig (Schindler et Seelig, 1975), permettant de calculer les épaisseurs hydrophobes dans les membranes à partir des paramètres d'ordre  $S_{CD}$  des chaînes lipidiques. Le principe étant de relier les  $S_{CD}$  aux paramètres d'ordre des liaisons C-C ( $S_{CC}$ ), et de faire la somme de toutes les longueurs moyennes des liaisons C-C de la chaîne aliphatique, projetée sur la normale à la bicouche. Les valeurs de la constante d'élasticité de courbure  $k$  en fonction de la teneur en cholestérol sont quant à elle connues dans la littérature pour les liposomes DMPC (Méléard et al. 1997) (voir tableau IV.11 et la figure IV.18).



**Figure IV.17 :** A) : Graphe reportant les valeurs de  $c-a$  en fonction du pourcentage de cholestérol ajouté aux liposomes DMPC ( $\Delta$ ) et TBBPC ( $\blacktriangle$ ), préparés avec 3 cycles chaud froid, pour une hydratation  $h=90\% H_2O+0,1M NaCl$ ,  $B=18,8T$ ,  $T=40^\circ C$ . B) Graphe reportant les valeurs de l'anisotropie de blindage électronique CSA ( $\pm 1$ ) en fonction du pourcentage de cholestérol ajouté aux liposomes de DMPC ( $\Delta$ ) et TBBPC( $\blacktriangle$ ) préparés avec 3 cycles chaud froid,  $h=90\% H_2O+0,1M NaCl$ ,  $B_0=18,8T$  et  $T= 40^\circ C$ .



**Figure IV.18 :** Graphe reportant les valeurs de la constante d'élasticité de courbure  $k$  en fonction de la teneur en cholestérol des liposomes DMPC, à  $40^\circ C$  (adapté de Méléard, P. et al., 1997).



**Figure IV.19** : Graphe reportant les valeurs de l'épaisseur de la bicouche ( $b$ ) en  $\text{Å}$  ( $\pm 0,1$ ) en fonction de la teneur en cholestérol des liposomes DMPC (à gauche) et TBBPC (à droite) à  $40^\circ\text{C}$ .

% Chol	$k_{(\text{DMPC})}$ (J)	$k_{(\text{TBBPC})}$ (J) ( $\pm 0.3$ )	$b_{(\text{DMPC})}$ ( $\text{Å}$ ) ( $\pm 0.1$ )	$b_{(\text{TBBPC})}$ ( $\text{Å}$ ) ( $\pm 0.1$ )
0%	$1.27 \times 10^{-19}$ ( $\pm 0.09$ )	$1.27 \times 10^{-19}$	30.8	30.8
10%	$1.84 \times 10^{-19}$ ( $\pm 0.09$ )	$1.84 \times 10^{-19}$	31.6	31.4
20%	n.d	$1.34 \times 10^{-19}$	32.4	32.6
30%	$3.07 \times 10^{-19}$ ( $\pm 0.13$ )	$3.0 \times 10^{-19}$	33.6	33.4

**Tableau IV.11** : Tableau reportant les valeurs des constantes d'élasticité de courbure  $k$  des liposomes DMPC (déterminées par Méléard et al. 1997) et TBBPC (calculées en faisant l'hypothèse que  $k \propto b^2$ ) contenant des quantités croissantes de cholestérol de 0% à 30%, préparés avec trois cycles chaud-froid, à  $T=40^\circ\text{C}$  ainsi que les valeurs des épaisseurs de bicouches  $b$ , calculées selon la méthode de calcul des longueurs de chaînes aliphatiques de Douliez et al (Douliez, 1995)..

D'après le tableau IV.11, les mêmes valeurs de l'épaisseur de la bicouche  $b$  sont obtenues pour les liposomes biphényles et ceux saturés. Ayant utilisé les valeurs de  $k$  connues pour DMPC, et en prenant comme hypothèse que  $k \propto b^2$  (Fernandez-Puente, 1994), on peut penser que nous avons les mêmes valeurs de  $k$  pour les liposomes TBBPC. 30% de cholestérol augmente l'épaisseur membranaire des liposomes de DMPC et TBBPC de  $\approx 2,8\text{\AA}$  (figure IV.19). Ainsi, plus la membrane est fine, plus son élasticité de courbure est faible et inversement plus la membrane est épaisse, plus son élasticité de courbure est importante. Dans notre cas, après l'incorporation du cholestérol, nous observons une augmentation de l'épaisseur hydrophobe qui se traduit par une augmentation de la constante d'élasticité de courbure pour les liposomes TBBPC et DMPC. Cela signifie que plus  $k$  est grand et moins les liposomes se déforment.

Le tableau IV.11 permet d'expliquer pourquoi les valeurs de  $c/a$  varient ou pas avec l'ajout de cholestérol. En effet, selon l'équation d'Helfrich (IV.1) et l'hypothèse émise par Fernandez-Puente, on déduit que:

$$c - a \propto \frac{b}{k} \propto \frac{b}{b^2} \propto \frac{1}{b} \quad (\text{IV.7})$$

Ainsi, si la valeur de  $b$  augmente, celle de  $c/a$  devrait diminuer; ceci est observé pour les liposomes TBBPC mais ce n'est pas le cas pour ceux de DMPC. On pourrait corrélérer ce résultat à l'imprécision dans le calcul de  $c/a$  pour les liposomes saturés (tableau IV.4). En effet, l'épaulement à  $\theta=0^\circ$  des spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  des liposomes DMPC est difficilement discernable (figure IV.7), et donc le calcul de  $c/a$  est le même quelles que soit les conditions expérimentales.

#### ii Effet de l'ajout de l'éthanol

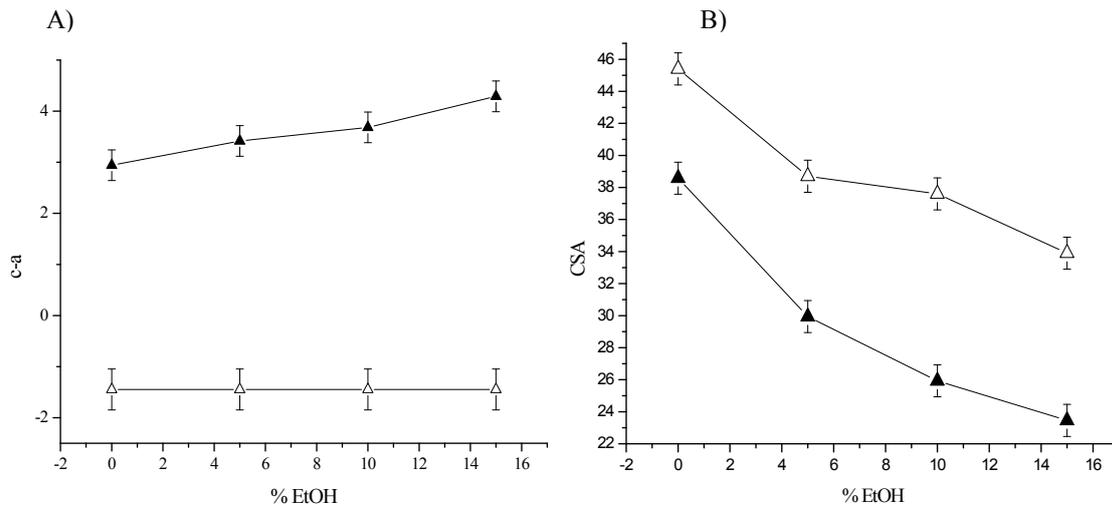
Les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  des liposomes DMPC indiquent que malgré l'augmentation de la quantité d'éthanol ajoutée, le rapport  $c/a$  demeure constant, par contre l'anisotropie de blindage électronique diminue (figure IV.20.B). Ceci indique que l'éthanol n'influe pas sur la déformation en prolate des vésicules DMPC mais exerce uniquement un effet de fluidification/réorientation au niveau de la tête polaire. De plus, les spectres RMN des solides- $^2\text{H}$  soulignent que l'ajout d'éthanol induit une diminution des éclatements quadrupolaires et donc du profil d'ordre sur toute la longueur des chaînes aliphatiques. Ainsi, l'éthanol présente un effet de fluidification à la fois sur la tête et sur les chaînes aliphatiques des lipides mais n'influe pas sur la déformation en prolate. Il semblerait qu'on ait atteint une

déformation maximale.

Les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  des liposomes TBBPC indiquent que l'augmentation de la quantité d'éthanol ajoutée, entraîne un rapport  $c/a$  et une anisotropie de blindage électronique qui diminuent. Ceci indique que l'éthanol favorise la déformation des vésicules TBBPC et exerce un effet de fluidification au niveau de la tête polaire. De plus, les spectres RMN des solides- $^2\text{H}$  soulignent que l'ajout d'éthanol induit une diminution des éclatements quadrupolaires et du profil d'ordre sur toute la longueur des chaînes aliphatiques. L'éthanol exerce donc un effet fluidifiant à la fois sur la tête et sur les chaînes aliphatiques des lipides.

En calculant l'épaisseur hydrophobe  $b$  (Douliez, 1995) (tableau IV.9) et en faisant l'hypothèse qu'il n'y a pas d'interdigitation, on constate que l'épaisseur de la bicouche des liposomes saturés et biphényles diminue en présence d'éthanol. Cette diminution de l'épaisseur membranaire est liée à une augmentation de l'élasticité membranaire ((Ly 2004, Tierney 2005, Pillman 2010, Kaye 2011)

Comme pour le cholestérol, ayant calculé  $c-a$  et  $b$  et en appliquant la relation de proportionnalité  $k \propto b^2$ , on obtient des valeurs de  $c - a \propto \frac{1}{b}$  qui devraient augmenter si l'épaisseur de la bicouche diminuent. C'est ce que l'on observe pour TBBPC (figure IV.20.A) mais ce n'est pas le cas pour les liposomes DMPC pour les mêmes raisons citées dans le paragraphe précédent (incertitude dans le calcul du  $c/a$ , due à un épaulement difficilement discernable à  $\theta = 0^\circ$  sur les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$ ). Les valeurs de l'épaisseur membranaire sont reportées dans le tableau IV.12, à la fois pour les liposomes saturés et biphényles. Dans les deux cas,  $b$  diminue avec l'ajout de l'éthanol ; en faisant l'hypothèse que  $k \propto b^2$ . Cette diminution de l'épaisseur membranaire s'accompagne donc d'une diminution de la constante d'élasticité de courbure  $k$ . La détermination de la constante d'élasticité de courbure ( $k$ ) des liposomes TBBPC et DMPC en présence d'éthanol n'a pas été réalisée, du fait de la grande approximation mise en jeu.



**Figure IV.20 :** A): Graphe reportant les valeurs de  $c-a$  en fonction du pourcentage d'éthanol ajouté aux liposomes DMPC ( $\Delta$ ) et TBBPC ( $\blacktriangle$ ), préparés avec 3 cycles chaud froid, pour une hydratation  $h=90\%$   $\text{H}_2\text{O}+0,1\text{M NaCl}$ ,  $B=18,8\text{T}$ ,  $T=40^\circ\text{C}$ . B) Graphe reportant les valeurs de l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  ( $\pm 1$ ) en fonction du pourcentage de cholestérol ajouté aux liposomes de DMPC ( $\Delta$ ) et TBBPC ( $\blacktriangle$ ) préparés avec 3 cycles chaud froid, avec une hydratation  $h=90\%$   $\text{H}_2\text{O}+0,1\text{M NaCl}$ ,  $B_0=18,8\text{T}$  et  $T=40^\circ\text{C}$ .

% EtOH	$c-a$ (DMPC) ( $\mu\text{m}$ ) $\pm 0.4$	$b$ (DMPC) ( $\text{\AA}$ ) ( $\pm 0.1$ )	$c-a$ (TBBPC) ( $\mu\text{m}$ ) $\pm 0.3$	$b$ (TBBPC) ( $\text{\AA}$ ) ( $\pm 0.1$ )
0%	-2.50	30.8	2.94	30.8
5%	-2.50	30.4	3.42	30.2
10%	-2.50	29.8	3.68	29.8
15%	-2.50	29.6	4.29	29.6

**Tableau IV.12 :** Tableau reportant les valeurs de  $c-a$  et de l'épaisseur membranaire  $b$ , des liposomes TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et DMPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$ , auxquels sont ajoutés des quantités croissantes d'éthanol de 0%, 5%, 10% et 15%, préparés avec trois cycles chaud-froid, à  $T=40^\circ\text{C}$  et  $B_0=18,8\text{T}$ .

iv. Effet de la température

Plus la température (T) augmente, plus les chaînes lipidiques ont un degré de liberté important, plus le système est fluide et donc plus il se déforme.

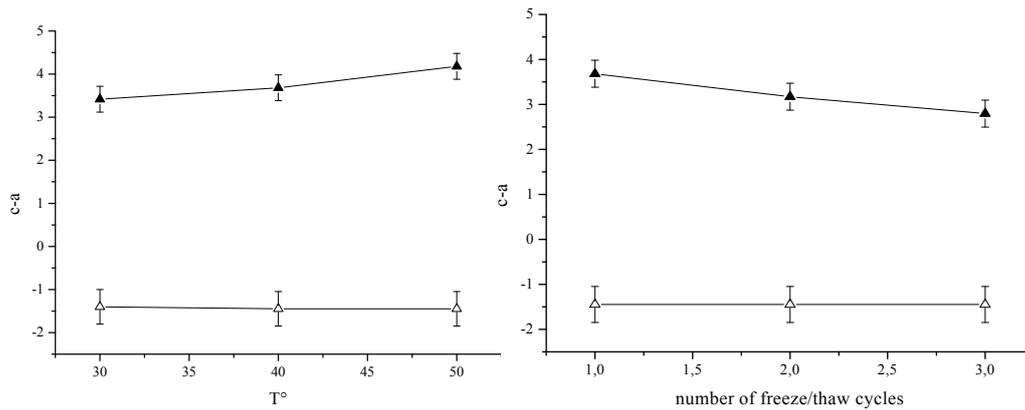
Quand la température augmente, b et k diminuent. En se basant sur l'équation d'Helfrich:

$c - a \propto \frac{1}{b}$  on doit donc s'attendre à une augmentation de la déformation avec T. Ceci est

observé pour les liposomes biphényles (figure IV.21 à gauche, tableau IV.13), mais ce n'est pas le cas pour les liposomes DMPC du fait également de l'importante incertitude dans le calcul du c/a, puisque le pic correspondant à l'orientation  $\theta=0^\circ$  sur les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  est difficilement discernable.

Ces résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Nagle (Pan 2008, Szekely 2012), qui ont montré par diffusion des rayons X que l'augmentation de la température entraîne une diminution de l'épaisseur de la bicouche (b) et une augmentation de l'espacement inter-bicouche (D) (périodicité) des vésicules de DOPC (Chen 1997).

La fluidité membranaire dépend fortement de la conformation des chaînes. Lorsque les chaînes sont ordonnées, les interactions entre elles sont fortes, les mouvements sont limités et la fluidité est donc faible. Le passage à l'état désordonné avec l'augmentation de la température s'accompagne d'une augmentation importante de la fluidité, ce qui explique pourquoi b et k diminuent.



**Figure IV.21 :** Graphe reportant les valeurs de  $c-a$  en fonction de la variation de température (gauche) et de la variation du nombre de cycles chaud-froid (droite) des liposomes DMPC ( $\Delta$ ) et TBBPC ( $\blacktriangle$ ), préparés avec 3 cycles chaud froid, pour une hydratation  $h=90\% H_2O+0,1M NaCl$ ,  $B=18,8T$ ,  $T=40^\circ C$ ).

Température	$c-a$ (DMPC) $\pm 0.4$	$c-a$ (TBBPC) $\pm 0.3$
30°	-2.50	3.42
40°	-2.50	3.68
50°	-2.50	4.28

**Tableau IV.13 :** Tableau reportant les valeurs de  $c-a$  des liposomes TBBPC :  $DMPC^{-2}H_{54}$  et DMPC :  $DMPC^{-2}H_{54}$ , en fonction de la température des liposomes DMPC et TBBPC, pour  $B_0=18,8T$ .

Cycles chaud-froid	$\Gamma_{DLS}$	$\Gamma_{Fluorescence}$	$c-a$ (DMPC) $\pm 0.4$	$c-a$ (TBBPC) $\pm 0.3$
	DMPC ( $\pm 0.4\mu m$ )	TBBPC ( $\pm 0.3\mu m$ )		
1	2,2	3,8	-2.50	3.68
2	2,2	n.d	-2.50	3.17
3	2,2	n.d	-2.50	2.80

**Tableau IV.14 :** Tableau reportant les valeurs de  $c-a$  ainsi que du rayon hydrodynamique obtenus par les deux techniques de DLS (Dynamic Light Scattering) et épifluorescence (chapitre V) pour les liposomes TBBPC et DMPC en fonction du nombre de cycles chaud-froid des liposomes DMPC et TBBPC, pour  $B_0=18,8T$  et  $T=40^\circ C$ .

**IV.4: Effet de la variation de la taille des vésicules.**

Pour les liposomes TBBPC, nous remarquons que plus le nombre de cycles chaud froid augmente, plus la déformation diminue, ainsi nous pouvons penser que la taille des vésicules diminue (puisque  $c-a$  est proportionnel à  $r^3$  d'après Helfrich). Pour ceux formulés avec le lipide saturé DMPC, nous avons la même allure de spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  que cela soit pour un, deux ou trois cycles chaud-froid-agitation, avec un rapport  $c/a$  identique, caractéristique d'une déformation en prolata.

Dans le tableau IV.14 sont reportées les valeurs de  $c-a$ , ainsi que celles des rayons hydrodynamiques obtenus par la technique de DLS (Dynamic light scattering) et par microscopie de fluorescence. On obtient par DLS une valeur de  $r=2,2\pm 2\mu\text{m}$  quelque soit le nombre de cycles chaud-froid-agitation appliqués pour les liposomes DMPC. Tandis que pour les liposomes TBBPC, nous allons voir dans le chapitre suivant, que ce lipide est fluorescent et donc, en effectuant des expériences de microscopie de fluorescence (épi-fluorescence), nous sommes capables de réaliser une statistique de taille et tirer un rayon moyen de  $3,8\pm 1,5\mu\text{m}$ . De plus, en appliquant la théorie d'Helfrich, on obtient  $c-a \propto r^3$ , ainsi, on s'attend à une très forte dépendance entre la valeur de  $c-a$  et le rayon, ce qui n'est pas observé dans le cas des liposomes DMPC (valeur de  $c-a$  reste constante). L'augmentation du nombre de cycles chaud froid ne jouant pas sur la déformation des vésicules de DMPC, nous pouvons émettre l'hypothèse suivante:

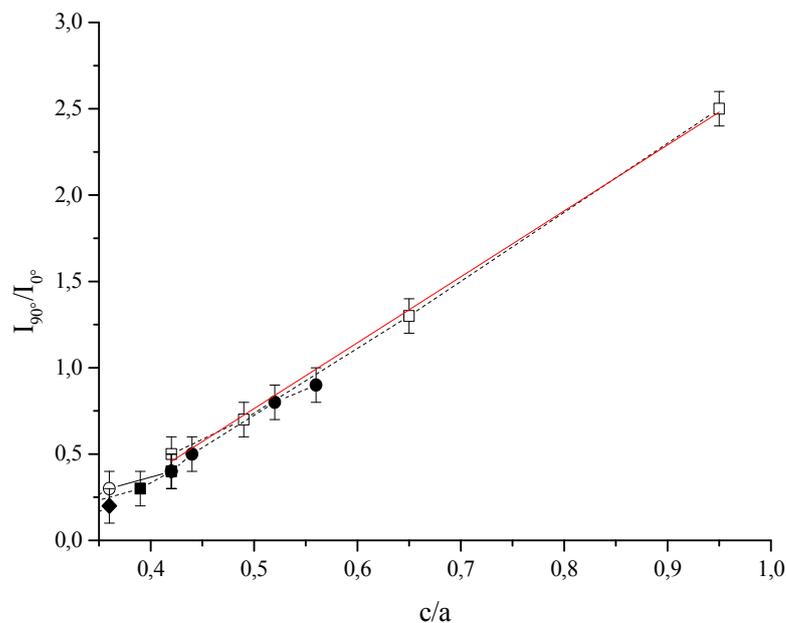
La déformation des liposomes dépend de la taille pour les lipides insaturés uniquement, ceci n'est pas applicable pour les lipides saturés (Traika 2000).

Plus le nombre de cycles chaud froid augmente plus la taille des vésicules DMPC diminue (comme dans le cas du TBBPC), mais l'effet de la taille des vésicules sur la déformation se fait ressentir pour un nombre de cycles chaud-froid plus important. En effet, nous ne sommes pas allés au-delà de 3 cycles chaud froid ; on peut penser qu'après 3 cycles, on reste dans une gamme de taille de vésicules très importante permettant une déformation en prolata optimale avec  $c/a=1,80$ . Il aurait été donc intéressant d'augmenter ce nombre de cycles (10, 20 voire 50) pour voir l'effet sur la déformation en prolata.

De même, il serait intéressant d'aller au delà des 3 cycles chaud-froid-agitation pour les liposomes TBBPC, afin de diminuer leur taille en dessous du micromètre et voir si la déformation en oblate est toujours observée. Des précédents travaux effectués dans le groupe (thèse de Loudet, C) ont montré que les vésicules biphényles formulées en LUVs donc présentant un caractère unilamellaire, dont le diamètre est inférieur ou égal à 800nm, perdent

leur déformabilité en oblate dans un champ magnétique de 11,7T. Il est donc intéressant de noter que la déformation n'est observée que pour les gros objets ayant suffisamment d'excès de surface pour accepter la déformation.

Afin de regrouper l'ensemble des résultats obtenus dans ce chapitre pour les liposomes TBBPC, une courbe de corrélation a été établie (figure IV.22) entre tous les rapports  $c/a$  obtenus par simulation spectrale et le rapport des intensités perpendiculaires  $I_{90^\circ}$  et parallèles  $I_{0^\circ}$  mesurés sur les spectres expérimentaux en fonction de l'intensité du champ magnétique, de la taille des liposomes, de la température, et du pourcentage de cholestérol et d'éthanol ajoutés aux liposomes de TBBPC. Cette courbe linéaire :  $y=3,82x-1,15$  permet de déterminer directement la valeur du rapport  $c/a$  sans procéder à de la simulation spectrale. Cette courbe de corrélation n'a pas été effectuée pour les liposomes de DMPC puisque les rapports  $c/a$  n'étaient pas modifiés suite à la variation des différents paramètres ( $c/a=1,80$ ).



**Figure IV.22:** Graphe de corrélation entre les valeurs de  $c/a$  (obtenues par simulation spectrale) et le rapport des intensités parallèles et perpendiculaires (obtenus des spectres expérimentaux) en fonction du champ magnétique ( $\square$ ), de la taille des liposomes ( $\blacksquare$ ), de la teneur en cholestérol ajoutée ( $\bullet$ ) en éthanol ( $\circ$ ) et de la température ( $\blacklozenge$ ) pour les liposomes de TBBPC à 1 cycle chaud froid,  $h=90\%$   $H_2O+0.1M NaCl$ .

### Conclusion

La structure du lipide TBBPC, et plus exactement la présence de l'unité biphenyle sur sa chaîne  $sn_2$ , influe directement sur ses propriétés physico-chimiques. Les cycles phényles impliquent une anisotropie de susceptibilité magnétique positive de la molécule, qui est à l'origine de la déformation en oblate des vésicules de TBBPC sous un champ magnétique d'au moins 9,4T. Cette déformation dépend donc de la nature lipidique mais aussi de l'intensité du champ magnétique, de la taille de la vésicule non déformée, de la température et de l'élasticité membranaire. Ces paramètres ont été étudiés un par un afin de déterminer l'anisotropie de susceptibilité magnétique des lipides DMPC et TBBPC et une bonne adéquation entre la théorie d'Helfrich et l'expérience a été trouvée. Les déformations des vésicules biphenyles de rayon initial de 2 à 4 $\mu$ m conduisent à des vésicules oblates de grande dimension et très applaties (semi-axe majeur de 6 à 7 $\mu$ m et semi-axe mineur de 0,5 à 1 $\mu$ m). Ce phénomène est également observable par microscopie optique. Nous allons dans ce qui suit étudier la rémanence de la déformation en oblate en dehors du champ magnétique par RMN des solides- $^{31}\text{P}$ , diffusion des rayons X aux petits angles et par microscopies optiques (fluorescence et à contraste de phase).

## CHAPITRE V

**Etude de la rémanence  
de la déformation  
en oblate  
des liposomes TBBPC  
en dehors du champ magnétique.**



## I. Introduction

Ce chapitre est consacré à l'étude de la rémanence de la déformation en oblate des liposomes TBBPC en dehors du champ magnétique, par plusieurs techniques d'analyse. Cette étude se base sur les résultats obtenus par Loudet-Courreges et al. (Courreges-Loudet 2011) sur la rémanence d'orientation des bicelles TBBPC : DCPC en dehors de  $B_0$  pendant plusieurs jours. La RMN des solides du phosphore sera employée en première approche pour caractériser cette rémanence en jouant sur l'intensité du champ magnétique statique  $B_0$ . Les microscopies optique et électronique seront ensuite utilisées et permettront de visualiser pour la première fois les objets déformés en dehors du champ magnétique et de déterminer statistiquement leur taille. Enfin, la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) confirmera la structure et la déformation rémanente des liposomes TBBPC en dehors de  $B_0$  et nous donnera des indications sur les distances inter-particules en solution ainsi que sur l'épaisseur des bicouches lipidiques constitutives des vésicules de TBBPC.

## II. Matériaux et méthodes

### II.1: Matériaux

Le lipide TBBPC a été synthétisé selon le mode opératoire détaillé dans le chapitre III. Les liposomes de TBBPC ont été préparés avec un taux d'hydratation (h) de 90% (0,16M), dans de l'eau ultrapure + 100mM NaCl, avec un cycle chaud-froid-agitation.

### II.2: Méthodes

#### a) Conditions d'acquisitions pour la RMN des solides- $^{31}\text{P}$

Un volume de 100  $\mu\text{L}$  d'un échantillon de liposomes TBBPC (110mg/ml, soit 0,16M) (h=90% + 100mM NaCl, un cycle chaud froid) a été placé dans un rotor de 4 mm de diamètre. Les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  découplés  $^1\text{H}$  ont été enregistrés à la fréquence de 162MHz ou 324MHz sur des spectromètres RMN respectivement de 9,4T ou 18,8T. La séquence d'Echo de Hahn a été utilisée avec un pulse  $90^\circ$  de 11,50 $\mu\text{s}$  pour les expériences effectuées à 9,4T et de 6,5 $\mu\text{s}$  pour celles effectuées à 18,8T. Le délai entre les deux pulses de l'écho est de 40 $\mu\text{s}$  et le temps de recyclage est de 5s dans les deux cas. L'enregistrement de chaque spectre a nécessité 1024 acquisitions. Un spectre  $^{31}\text{P}$  de référence du  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a été préalablement

calibré à 0 ppm et la température a été réglée à 37°C et stabilisée pendant 30 min avant l'acquisition. Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, la FID a été convoluée avec une exponentielle décroissante de type  $e^{(-LBt)}$  (opération de filtrage) avec un terme LB égal à 50Hz.

**b) Conditions d'acquisition pour la diffusion des rayons X aux petits angles**

Un capillaire en verre de 1,5 mm de diamètre a été rempli avec 30µl d'un échantillon de liposomes TBBPC à 0,16M, scellé, puis placé dans un rotor RMN, l'ensemble a été mis dans la sonde RMN, réglée à 40°C de telle sorte que le capillaire soit aligné parallèlement au champ magnétique statique  $B_0$ . Après une heure dans le champ magnétique à 18,8T, le capillaire a été transféré en 20 min dans l'appareil de diffusion des rayons X aux petits angles (modèle NanoStar de Bruker avec une source à anode de cuivre) lui-même réglé à 40°C, au CRPP (Centre de Recherche Paul Pascal sur Pessac). Les expériences sur les échantillons de TBBPC ont été effectuées avec la distance échantillon-détecteur de 105cm.

**c) Conditions d'acquisition pour la microscopie à contraste de phase interférentiel différentiel et l'épifluorescence.**

Un microtube a été rempli avec 100µl d'un échantillon de liposomes TBBPC de concentration 5mg/ml, (soit 7,2mM) puis placé à l'intérieur du spectromètre RMN, réglé à 40°C, à l'aide d'une ficelle, de telle sorte que le microtube soit aligné parallèlement au champ magnétique statique  $B_0$  (16,4T). Après une heure dans le champ magnétique, le dispositif a été transféré en 15 min dans le système de microscope. Les liposomes biphényles ont été déposés dans des chambres de culture à 8 puits (Lab-Tek™, Nalc Nunc International). Ces chambres sont constituées d'une lamelle de verre de 0,17µm d'épaisseur, adaptée pour l'observation en microscopie photonique à fort grossissement. Un dispositif en polystyrène est monté sur la lamelle constituant ainsi 8 compartiments indépendants. Les observations ont été réalisées en microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC en anglais pour Differential Interference Contrast) et en épifluorescence à l'aide du microscope IX81 (Olympus) équipé d'un objectif à immersion UplanFLN 60X à huile et de la caméra ColorviewIII (Olympus).

**d) Conditions d'acquisition pour la microscopie électronique (Cryo-TEM)**

Une goutte de liposomes TBBPC, de concentration 1 mM, est déposée sur une grille de microscopie en cuivre recouverte d'un film de carbone à trous (Lacey/Formvar/Carbon, Ted Pella). Cette grille est préalablement rendue hydrophile par un traitement à l'UV-ozone.

La méthode de congélation se fait par la technique de la «guillotine». L'excès de solution est éliminé par absorption à l'aide d'un papier filtre. De ce fait, seul un film mince de solution subsiste, suspendu dans les trous du film carbone. La grille est ensuite rapidement plongée dans l'azote liquide à  $-180^{\circ}\text{C}$ , transformant l'eau liquide en glace amorphe. La grille est disposée dans un porte-grille préalablement refroidi et maintenu dans les vapeurs d'azote liquide. La grille est ensuite montée sur un porte objet cryo (Gatan 626) maintenu à température de l'azote liquide pendant toute l'opération de transport. L'observation des échantillons est réalisée sur un microscope électronique en transmission Tecnai-F20 opérant à 200 kV. Les images sont acquises à un grossissement maximal de 50000 avec une caméra CCD 2k x 2k pixels (Gatan, CA, USA).

#### e) Conditions d'acquisition pour la Cryo-microscopie Electronique de Sections Vitreuses (CEMOVIS)

Ces expériences ont été menées en collaboration avec Etienne Gontier (Bordeaux Imaging Center-Bordeaux II). Des liposomes de DMPC et TBBPC ( $h=80\%$  dans  $\text{H}_2\text{O} + 20\%$  glycérol) en volume, sont aspirés par capillarité dans un tube de cuivre de diamètre  $250\mu\text{m}$  à l'aide d'un fil de platine. Les tubes de cuivre, placés dans leur dispositif de congélation, sont ensuite immergés dans la même solution de liposomes et tout le dispositif est introduit pendant une heure dans un champ magnétique de 18,8T. Les dispositifs sont introduits dans l'appareil de congélation à haute pression EMPACT (Leica-Microsystems, Vienna, Austria) immédiatement après application du champ magnétique. Les échantillons sont transférés dans un ultramicrotome (Leica FC6/UC6) et coupés dans l'azote liquide à  $-180^{\circ}\text{C}$  à l'aide d'un couteau diamant afin d'obtenir des tranches d'échantillon d'épaisseur 50nm. Ces dernières sont introduites dans un porte-objet (Gatan, CA, USA) maintenu à  $-170^{\circ}\text{C}$ , et observées à l'aide d'un microscope électronique FEI Tecnai F20 utilisant une tension de 200KV. Les images sont acquises à l'aide d'une camera  $2k \times 2k$  USC 1000 slow-scan CCD (Gatan).

### III. Résultats

#### III.1: Etude par RMN des solides- $^{31}\text{P}$

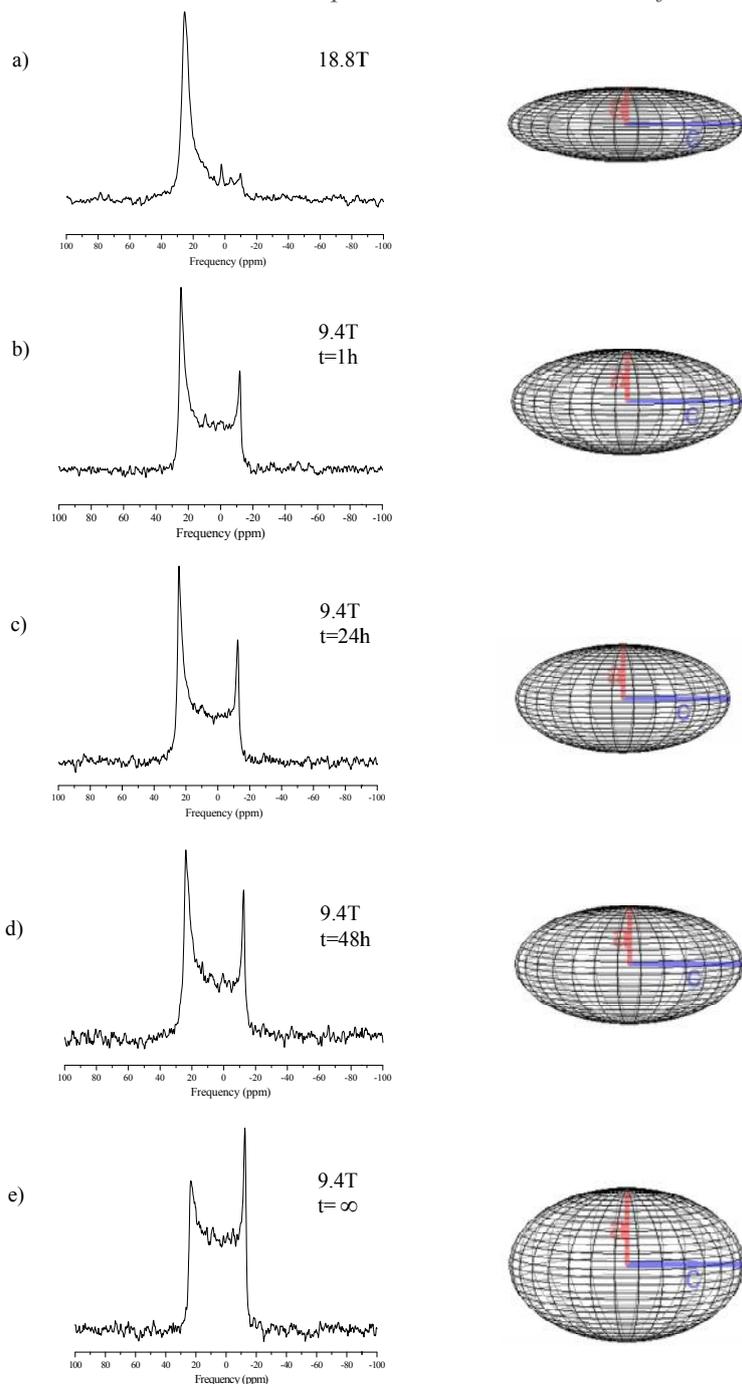
La figure V.1 présente une chronologie du comportement des liposomes TBBPC après passage dans des champs magnétiques de différentes intensités. Comme nous avons vu

précédemment (chapitre IV), les liposomes biphényles se déforment en oblate après passage pendant une heure dans un champ magnétique de 18,8T (spectre a).

Le rapport  $c/a$  obtenu par simulation est de 0,33. Les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  b), c) et d) ont été enregistrés sous un champ magnétique de 9,4T après que l'échantillon soit resté respectivement 1 heure, 24 heures et 48 heures en dehors du champ magnétique, après passage pendant 1 heure dans un champ magnétique de 18,8T. Les rapports  $c/a$  résultants de la simulation spectrale sont respectivement 0,45, 0,49 et 0,52. De même, plus l'échantillon est gardé en dehors de  $B_0$ , plus le rapport  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$  augmente (tableau V.1). La déformation en oblate est donc maintenue pour les cas b), c) et d) mais elle est moins importante que dans le cas a). Enfin, le spectre e) a été enregistré sous un champ magnétique de 9,4T cette fois sans passage au préalable de l'échantillon dans un champ magnétique d'intensité plus élevée, ce qui est équivalent à un échantillon qui a été déformé dans  $B_0=18,8\text{T}$  et qui a entièrement relaxé en dehors de  $B_0$  (donc après un temps considéré comme infini,  $t \infty$ ). Le spectre RMN des solides- $^{31}\text{P}$  e) présente une déformation en oblate avec un  $c/a=0,65$ , donc moins prononcée que pour les spectres b), c) et d) où le pic à  $\theta=0$  l'emporte largement sur celui à  $\theta=90^\circ$ . La déformation plus importante pour les cas b), c) et d) provient donc du passage préalable de l'échantillon dans un champ magnétique intense de 18,8T.

$B_0$	$I_{90^\circ}/I_{0^\circ} (\pm 0.1)$	$c/a (\pm 0.01)$
18.8T	0.2	0.33
↓ 1h		
9.4T	0.5	0.45
18.8T	0.2	0.33
↓ 24h		
9.4T	0.7	0.49
18.8T	0.2	0.33
↓ 48h		
9.4T	0.8	0.52
18.8T	0.2	0.33
↓ $\infty$		
9.4T	1.3	0.65

**Tableau V.1** : Tableau comparatif reportant les rapports des intensités mesurées à  $\theta = 90^\circ$  ( $I_{90^\circ}$ ) et  $\theta = 0^\circ$  ( $I_{0^\circ}$ ), et les rapports du semi petit axe  $c$  de l'ellipsoïde de révolution sur le semi grand axe  $a$  ( $c/a \pm 0,01$ ) des spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  enregistrés dans un champ magnétique de 9,4T à  $t=1\text{h}$ , 24h, 48h et  $\infty$  après passage pendant une heure dans un champ magnétique  $B_0=18,8\text{T}$ .



**Figure V.1:** Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) de liposomes TBBPC enregistrés a) sous un champ magnétique de 18,8T pendant une heure b) sous un champ magnétique de 9,4T après que l'échantillon soit resté 10 min en dehors du champ magnétique après passage pendant 1heure à 18,8T. c) sous un champ magnétique de 9,4T après que l'échantillon soit resté 24h en dehors du champ magnétique, après passage pendant 1heure à 18,8T et d) sous un champ magnétique de 9,4T après que l'échantillon soit resté 48h en dehors de  $B_0$ , après passage pendant 1heure à 18,8T. Le spectre e) correspond à l'échantillon enregistré sous un champ magnétique de 9,4T sans passage préalable par  $B_0=18,8\text{T}$ . A chaque spectre correspond un ellipsoïde de révolution obtenu avec Matlab.

Ainsi, même après 48 heures en dehors de  $B_0$ , la déformation en oblate persiste, l'échantillon garde en «mémoire» son passage dans un champ magnétique d'intensité élevée et donc sa déformation.

La RMN peut être considérée comme un outil d'analyse indirecte pour mesurer la rémanence de la déformation, étant donné qu'il faut un champ magnétique pour enregistrer un spectre, ce qui joue directement sur la déformation des liposomes TBBPC. Ainsi, il est intéressant de prouver cette rémanence de déformation en oblate des liposomes TBBPC par d'autres techniques physico-chimiques comme la microscopie et la diffusion des rayons X aux petits angles.

### **III.2: Observation par microscopies optiques et électroniques des liposomes TBBPC**

#### **III.2.1 : Microscopie optique à contraste de phase interférentiel différentiel (DIC) et épifluorescence:**

##### **a) Liposomes avant passage dans $B_0$ .**

De par la présence des cycles phényles sur la chaîne  $sn_2$  du lipide TBBPC, nous avons réalisé des analyses par spectroscopie UV pour voir si le lipide présente des propriétés de fluorescence. Sur la figure V.2, on constate que pour un spectre d'excitation à 254 nm, le lipide TBBPC présente un spectre d'émission à 320 nm qu'il soit dans du chloroforme ou formulés en liposomes, pour une même concentration de solution de 3  $\mu\text{M}$  il est donc bien fluorescent. De plus, nous remarquons que les spectres d'émissions relatifs au TBBPC formulé en liposomes présentent une intensité plus importante que ceux pour le lipide suspendu dans du chloroforme pour une même concentration. En effet, la différence de structuration du lipide TBBPC entre les deux préparations pourrait expliquer la différence d'intensité de fluorescence.

Ces mesures de fluorescence ont permis de déterminer, à partir de la loi de Beer Lambert, (en considérant une concentration de 3  $\mu\text{M}$  et un trajet optique de 1cm), le coefficient d'extinction molaire  $\varepsilon$  du lipide TBBPC qui est de 210 000  $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Le lipide TBBPC possède donc des propriétés d'émission de fluorescence, ce qui est très prometteur pour des applications biophysiques. Il serait intéressant de comparer  $\varepsilon$  de TBBPC avec celui d'autres marqueurs fluorescents de la membrane comme la DPH (Diphénylhexatriène) dans les mêmes conditions de concentration. Plus exactement, il s'agirait de déterminer le

rendement quantique  $\phi$  de TBBPC qui définit une efficacité de fluorescence, formalisé dans la relation suivante:

$$I_{\text{émission}} = 2,3 \cdot I_{\text{excitation}} \phi \varepsilon l c \quad (\text{V.1})$$

Où  $I_{\text{émission}}$  correspond à l'intensité émise par le fluorophore,  $I_{\text{excitation}}$  est l'intensité d'excitation,  $\varepsilon$  le coefficient d'extinction molaire,  $l$ , le trajet optique en cm et  $c$ , la concentration de la molécule absorbante (voir chapitre II).

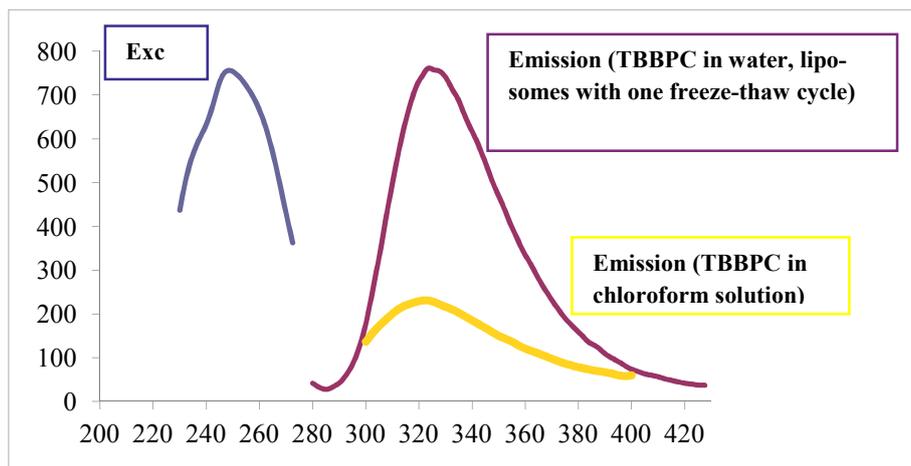
Nous n'avons pas pu mesurer le rendement quantique du lipide TBBPC, n'ayant pas référencé les spectres d'excitation et d'émission par rapport à une référence connue dont la longueur d'onde d'excitation est dans la même gamme de celle du lipide TBBPC, mais cette expérience est en prévision.

La figure V.3 présente deux images de DIC (gauche) et d'épifluorescence (droite). On observe un ensemble relativement polydisperse de vésicules sphériques qui présentent dans certains cas des multi-couches.

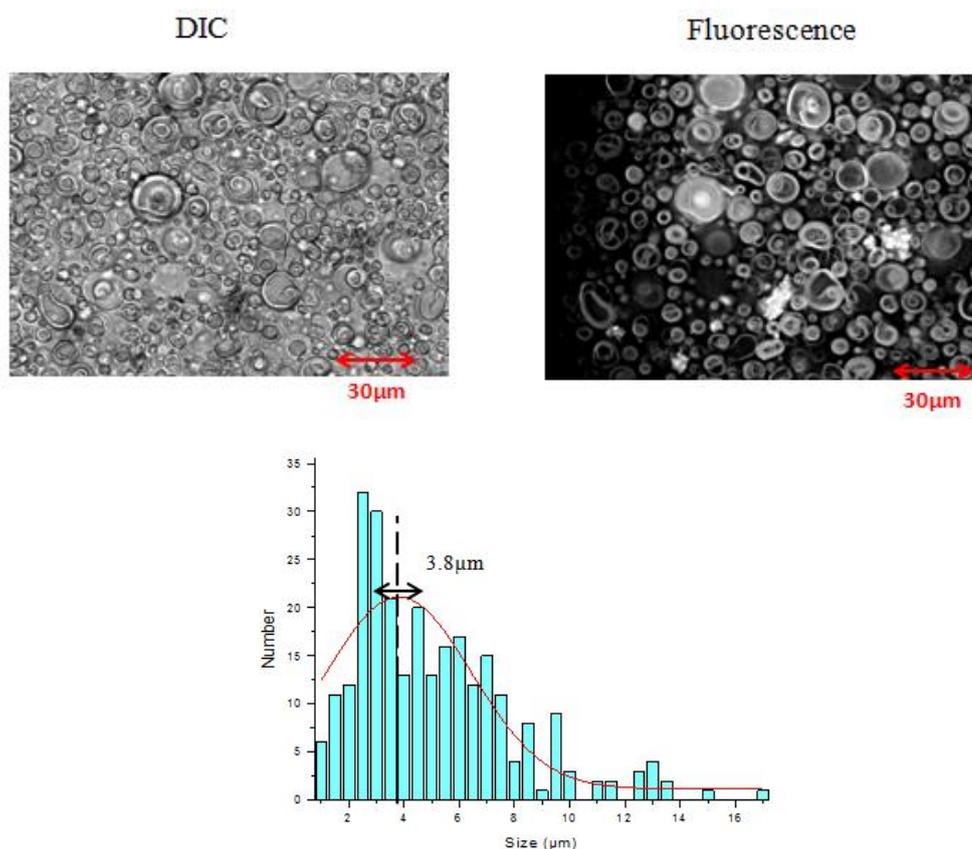
Une statistique de taille a été effectuée à partir d'une seule image de DIC, sur laquelle le diamètre de 257 objets a été mesuré à l'aide du logiciel ImageJ (1,47v). Nous n'avons pas considéré les images obtenues par épifluorescence pour cette statistique de taille à cause du problème d'élargissement de la tâche en halo (voir explications dans le chapitre II). Un histogramme de taille a ainsi été établi via le logiciel Origin (8,0) et un diamètre moyen de  $3,8\mu\text{m}$  ( $\pm 1,5\mu\text{m}$ ) a été obtenu pour les liposomes TBBPC non déformés.

#### **b) Liposomes après passage dans $B_0$ .**

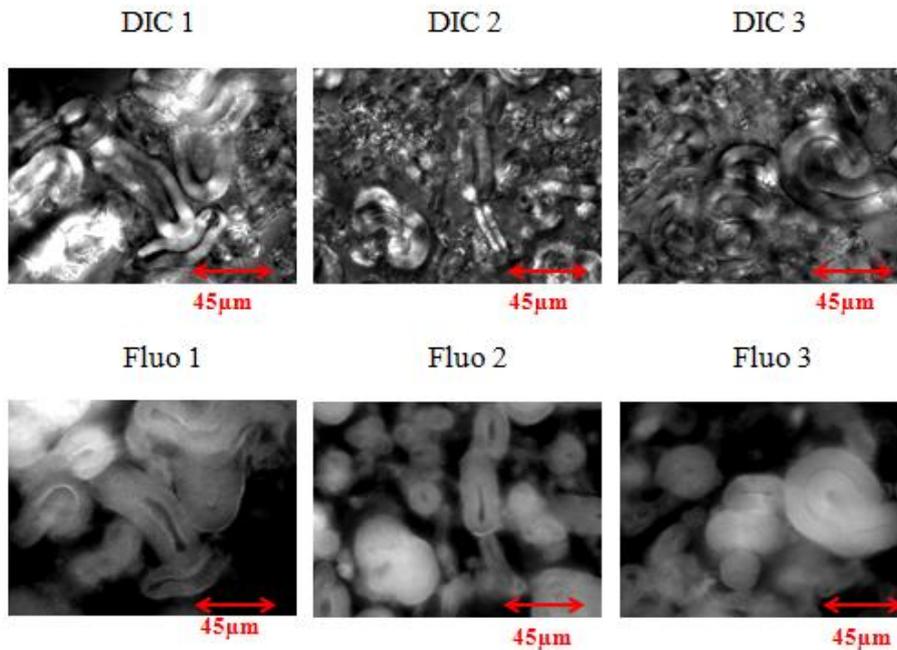
L'objectif de ces observations de microscopies est d'obtenir pour la première fois une image des liposomes TBBPC déformés par le champ magnétique. Ainsi, après une heure dans un champ magnétique de 16,4T, une goutte de vésicules TBBPC a été déposée sur un système de lamelle compartimentée en 8 puits, et les images de la figure V.4 de DIC et d'épifluorescence ont été obtenues. Nous remarquons que le passage par le champ magnétique entraîne l'obtention de vésicules de grandes tailles aplaties donc déformées, mais contrairement à ce qu'on pouvait penser, ces vésicules n'adoptent pas un sens unidirectionnel de déformation. Ceci est sûrement dû à la méthode de préparation où le dépôt de la goutte d'échantillon sur les plaques de microscopie doit modifier voire annihiler le côté unidirectionnel de la déformation en oblate.



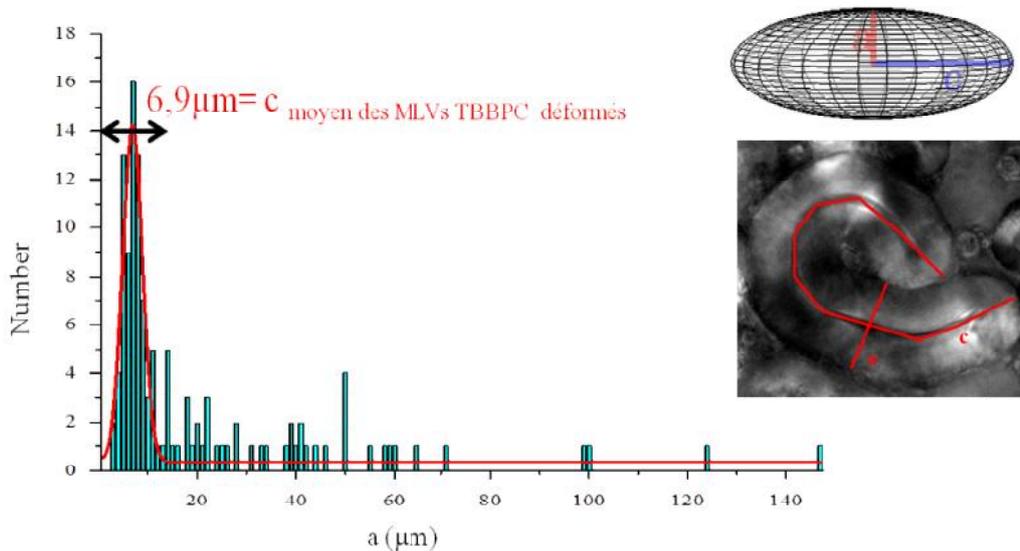
**Figure V.2:** Spectres de spectroscopie UV d'excitation à 254 nm (bleu) du lipide TBBPC formulé en liposomes et d'émission à 320 nm du lipide TBBPC formulé en liposomes (1mg/ml) (violet) et dans du chloroforme (jaune).



**Figure V.3:** Clichés de microscopie optique à contraste de phase (gauche) et d'épifluorescence (droite) d'un échantillon de liposomes de TBBPC ( $C=5\text{mg/ml}$ ) sans passage par un champ magnétique. Un histogramme de taille a été construit à partir de la mesure du diamètre de 257 objets sur une image de DIC. L'ajustement par une fonction gaussienne (courbe rouge) avec le logiciel Origin (8.0) permet de déterminer un diamètre moyen des liposomes TBBPC non déformés de  $3,8\mu\text{m}$  ( $\pm 1,5\mu\text{m}$ ).



**Figure V.4 :** Clichés de microscopie optique à contraste de phase interférentiel différentiel (ligne du haut) et d'épifluorescence (ligne du bas) de liposomes de TBBPC ( $C=5\text{mg/ml}$ ) après passage dans un champ magnétique de  $16,4\text{ T}$  pendant une heure à  $T=40^\circ\text{C}$ .



**Figure V.5 :** Histogramme reportant le nombre de vésicules en fonction du semi grand-axe  $a$  des liposomes TBBPC déformés en oblate après passage dans un champ magnétique de  $16,4\text{ T}$  à  $40^\circ\text{C}$  pendant une heure. Ce graphe a été construit à partir de la mesure de 123 objets sur 6 images de DIC. L'ajustement par une fonction gaussienne (courbe rouge) avec le logiciel origin (8.0) permet de déterminer une dimension moyenne  $a$  de  $6,9 \pm 1\ \mu\text{m}$  pour les liposomes TBBPC déformés après une heure dans le champ magnétique. Le croquis à droite associé à l'ellipsoïde de révolution explique comment les mesures ont été faites à l'aide du logiciel image J.

Une statistique de taille a été réalisée en mesurant le diamètre de 123 objets, à l'aide du logiciel ImageJ, à partir de l'ensemble des images de DIC (au nombre de 6).

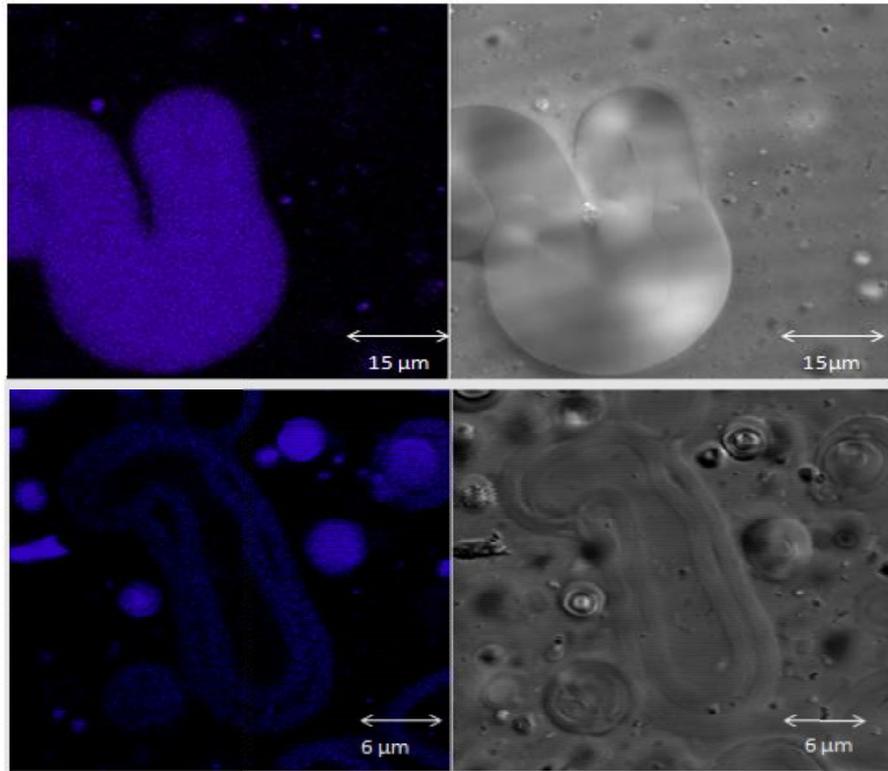
En comparaison, la statistique de taille pour les liposomes non déformés a été réalisée à partir de 257 vésicules d'un seul cliché DIC avec une échelle de taille considérée plus petite (30 $\mu$ m pour les vésicules non déformées et 45 $\mu$ m pour les déformées). Un histogramme de taille a ainsi été établi avec le logiciel Origin (8.0), permettant de déterminer une dimension moyenne du grand semi-axe  $a$  de  $6,9 \pm 1\mu\text{m}$  pour les liposomes TBBPC déformés après une heure dans un champ magnétique de 16,4T.

### **III.2.2: Microscopie confocale de fluorescence**

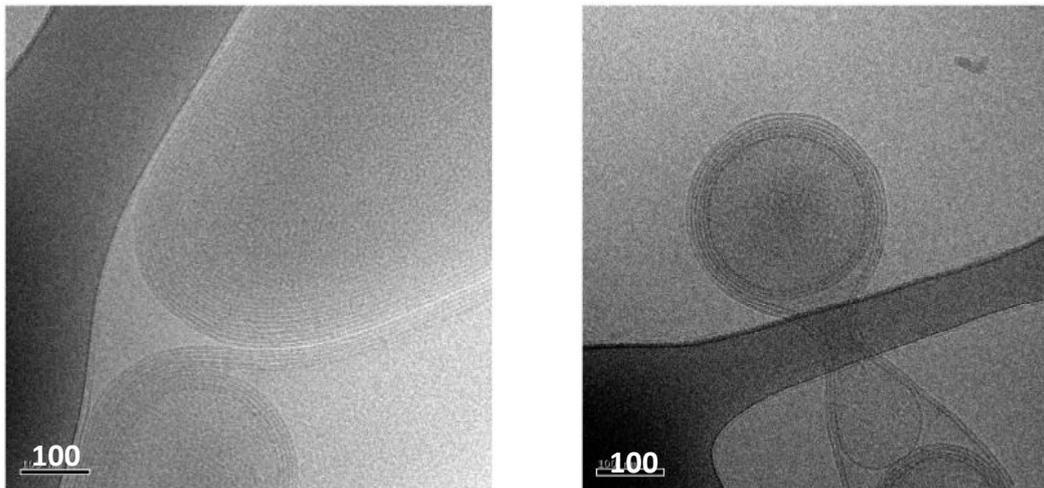
Il est intéressant de savoir si les liposomes TBBPC après passage dans un champ magnétique conservent leur aspect multi-lamellaire ou deviennent uni-lamellaires. Pour cela, nous avons réalisé des observations en microscopie optique confocale de fluorescence qui visualise des coupes virtuelles d'échantillon; ce qui permet de pallier au problème de perte de résolution affiliée aux techniques de microscopies optiques conventionnelles (se référer au chapitre II). Ainsi, une goutte de liposomes TBBPC préparés avec la même procédure pour les deux techniques DIC et épifluorescence a été placée sur une lamelle compartimentée en 8 puits et observée sous microscope confocal de fluorescence. Les images obtenues sont présentées en figure V.6. On remarque que les liposomes TBBPC présentent une structure allongée et donc ont subi la déformation mais nous ne pouvons pas discerner la bordure des bicouches et donc confirmer si les vésicules sont multilamellaires. Ceci est peut être lié au fait que les filtres des lasers du microscope n'étaient pas adaptés à l'analyse (longueur d'onde de 330 nm, donc bien au-dessus de celle de l'excitation optimale du lipide biphényle à 254 nm (figure V.2)).

### **III.2.3 : Cryo-microscopie électronique à transmission (Cryo-TEM) et Cryo-microscopie de sections vitreuses (CEMOVIS)**

C'est ainsi que nous avons eu recours à la microscopie électronique où la résolution est 100000 fois supérieure à celle d'un microscope photonique. Nous avons tout d'abord opté pour la cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) afin de prouver d'une part l'aspect multilamellaire des vésicules TBBPC et d'autre part le caractère rémanent de leur déformation en oblate. La figure V.7 présente deux clichés de cryo-TEM obtenus pour les liposomes TBBPC après déformation pendant une heure dans un champ magnétique de 18,8T à 40°C.



**Figure V.6 :** Clichés de microscopie confocale de fluorescence (à gauche) et de DIC (à droite) des liposomes TBBPC ( $C=5\text{mg/ml}$ ) après passage pendant une heure dans un champ magnétique de  $16,4T$  à  $T=40^\circ\text{C}$ .



**Figure V.7 :** Clichés de cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) de liposomes TBBPC ( $C=1\text{mg/ml}$ ) après passage pendant une heure dans un champ magnétique  $B_0$  de  $18,8T$  à  $40^\circ\text{C}$ .

On observe clairement des vésicules présentant un caractère multi-lamellaire, il est quasiment possible de compter le nombre de bicouches par vésicules (par exemple, sur le cliché de droite, six bicouches peuvent être comptabilisées pour la vésicule principale). Ainsi, la déformation des vésicules TBBPC dans  $B_0$  ne semble pas affecter leur aspect multilamellaire. Néanmoins, nous n'observons pas l'aspect unidirectionnel de la déformation en oblate des vésicules TBBPC.

Ceci peut être relié aux conditions de préparation de l'échantillon; en particulier, nous pensons que la grille de carbone, servant de support pour la goutte de liposomes, exerce une pression mécanique sur l'échantillon. De plus, après l'étape de congélation, l'excès de solution est éliminé à l'aide d'un papier filtre, cette déshydratation peut également fausser l'effet de la déformation. Ainsi, l'échantillon est manipulé plusieurs fois après son passage par le champ magnétique, ce qui perturbe la déformation initiale des vésicules dans  $B_0$ . Nous avons alors décidé de visualiser les liposomes TBBPC par une nouvelle technique dérivée de la cryo-microscopie électronique à transmission, qui est la cryo-microscopie de sections vitreuses ou bien CEMOVIS, récemment développée dans le groupe d'Olivier Lambert à CBMN. Cette technique présente l'avantage d'un minimum de manipulations de l'échantillon après sa déformation dans le champ magnétique. Les liposomes TBBPC ( $h=80\% \text{ H}_2\text{O}+20\% \text{ glycérol}$ ), sont aspirés dans un tube de cuivre de diamètre  $250\mu\text{m}$  à l'aide d'un fil de platine. Les tubes de cuivre, placés dans leur dispositif de congélation, sont suite immergés dans la même solution de liposomes et tout le dispositif est introduit pendant une heure dans un champ magnétique de  $18,8\text{T}$ . Les dispositifs sont congelés à haute pression immédiatement après déformation dans le champ magnétique. A l'étape de vitrification, suit une étape de cryo-section (voir chapitre II). L'opération a été renouvelée sur les liposomes TBBPC non déformés au préalable dans  $B_0$ . Les clichés de microscopie obtenus (non présentés ici) pour les deux échantillons sont difficilement exploitables. En effet, des traces de couteau (des striations) et une déformation (compression) liées davantage à la coupe de l'échantillon qu'à la déformation dans  $B_0$  sont visibles sur les clichés. De plus, la technique CEMOVIS impose l'utilisation du glycérol, utilisé comme cryo-protectant, ce qui atténuerait la déformation naturelle des vésicules. Ainsi, cette nouvelle technique CEMOVIS n'a pas permis, à son stade actuel de développement, d'observer des vésicules multilamellaires de TBBPC déformées de manière uni-directionnelle.

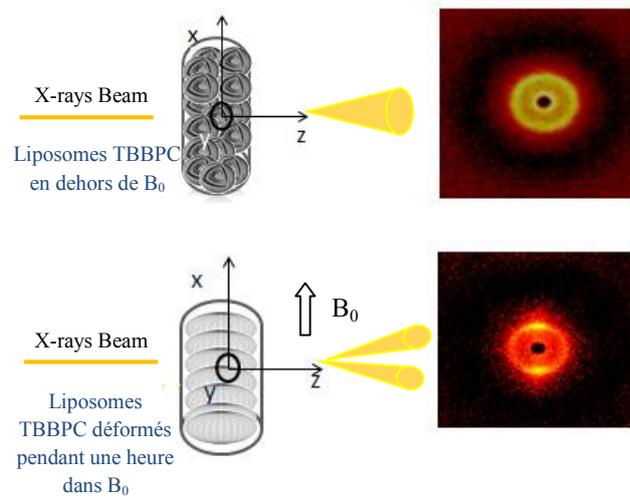
### **III.3: Caractérisation de la déformation des liposomes TBBPC par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)**

Il est intéressant de caractériser le caractère rémanent de la déformation en oblate des liposomes TBBPC par diffusion des rayons X aux petits angles, une technique qui confirmera leur structure, leur aspect multi-lamellaire, et qui nous donnera des indications sur les distances inter-particules en solution ainsi que sur l'épaisseur hydrophobe des vésicules de TBBPC.

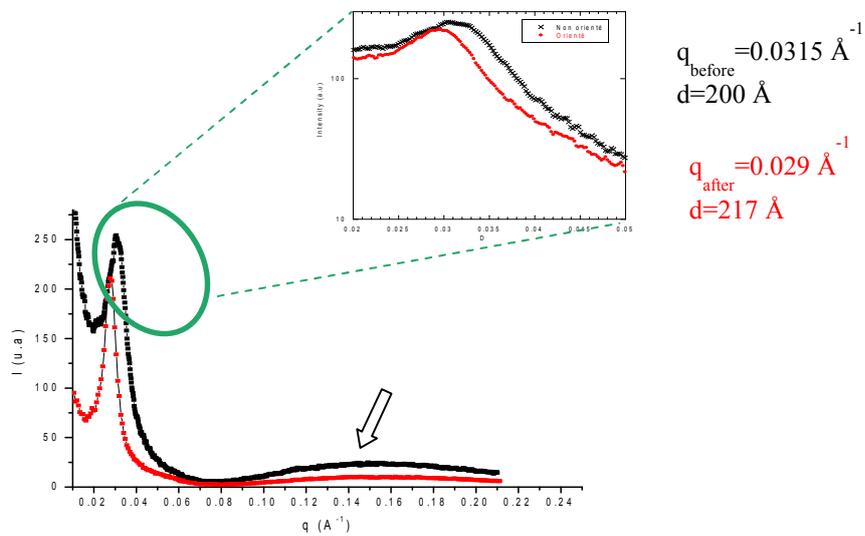
#### **III.3.1: Clichés de diffusion des rayons X aux petits angles des liposomes TBBPC**

La figure V.8 présente les clichés à deux dimensions de diffusion des rayons X aux petits angles pour les liposomes TBBPC (h=90% H<sub>2</sub>O+0,1M NaCl) à température ambiante sans passage au préalable dans un champ magnétique de 18,8T (cliché du haut) et après passage pendant une heure dans B<sub>0</sub> (cliché du bas) à t=35 min (le temps du transport de l'échantillon et de son alignement dans l'appareil SAXS). Dans le cas des vésicules TBBPC non déformées, le cliché 2D de diffusion consiste en un cercle isotrope, caractéristique d'un échantillon sans orientation privilégiée. Dans le cas des vésicules TBBPC déformées, deux spots alignés selon l'axe x, parallèle au champ magnétique statique B<sub>0</sub>, sont observés. Ce signal anisotrope est directement lié à la déformation en oblate spécifique aux vésicules TBBPC dans B<sub>0</sub>.

Les signaux sont ensuite intégrés afin de tracer le graphe I=f(q), où I représente l'intensité diffusée et q le vecteur d'onde de diffusion (en Å<sup>-1</sup>). Pour le système non déformé, l'intégration est effectuée sur 360° (intégration circulaire) tandis que pour le système déformé dans le champ magnétique, elle est réalisée uniquement selon l'axe x, parallèle à B<sub>0</sub> (intégration linéaire). Les courbes I=f(q) obtenues sont présentées sur la figure V.9. La courbe rouge correspond aux liposomes déformés dans B<sub>0</sub> et celle en pointillés est associée aux liposomes non déformés. Pour les liposomes préalablement déformés dans le champ magnétique, un pic de Bragg, représentatif du facteur de structure au 1<sup>er</sup> ordre du système, est observé à 0,029Å<sup>-1</sup>. D'après les rappels sur la diffusion des rayons X aux petits angles (Chapitre II), le vecteur d'onde q est inversement proportionnel à la distance de répétition d, de la structure en bicouche ( $q = \frac{2\pi}{d}$ ). Une périodicité de 217Å inter-bicouche est alors déterminée pour les liposomes TBBPC déformés dans B<sub>0</sub>. Pour les liposomes non déformés, le pic de Bragg est observé à q= 0,0315Å<sup>-1</sup>, ce qui correspond à une périodicité de 200Å.



**Figure V.8 :** Clichés 2D de diffusion des rayons X aux petits angles des liposomes TBBPC ( $h=90\%$   $H_2O + 0,1M NaCl$ ) à température ambiante sans passage au préalable dans un champ magnétique de  $18,8T$  (cliché du haut) et après passage pendant une heure dans  $B_0$  à  $t=35$  min (le temps du transport de l'échantillon et de son alignement dans l'appareil SAXS, cliché du bas).



**Figure V.9 :** Graphe  $I=f(q)$  des liposomes TBBPC après une intégration linéaire selon l'axe  $x$  pour le système déformé pendant une heure dans  $B_0=18,8T$  à  $t=35$  min (courbe rouge) et une intégration circulaire pour le système non déformé (courbe noire).

La large bosse (désignée par une flèche sur la figure V.9) obtenue sur le graphe  $I=f(q)$  pour les deux systèmes déformés et non déformés caractérise une structuration du système en bicouche, comme le souligne Riske et ses collaborateurs (Riske, Amaral et al. 2001).

On analyse en effet la répétition de la tête phosphore, participant à la diffusion des rayons X, au niveau des bicouches de phospholipides constituant les liposomes. Quant au facteur de structure du 2<sup>nd</sup> ordre, il tombe dans le creux du facteur de forme.

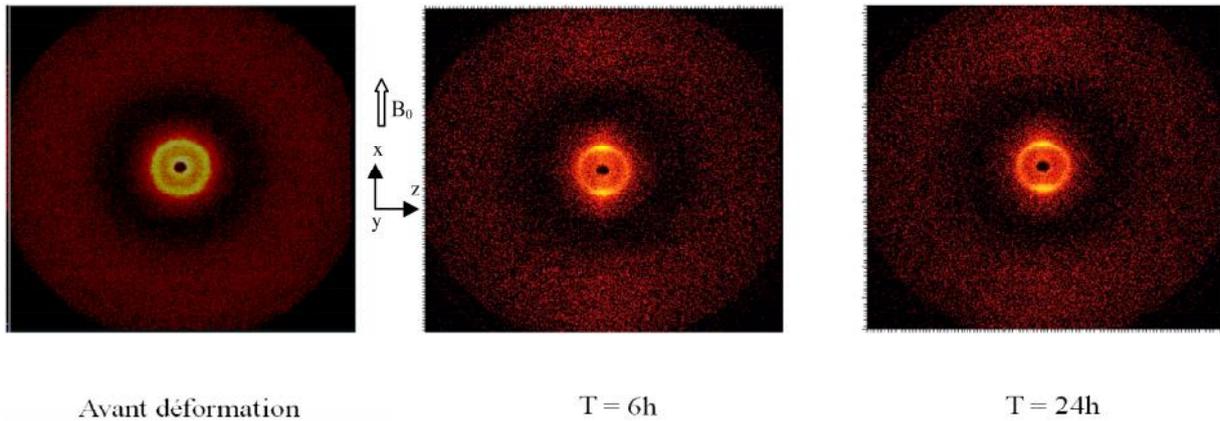
En principe, on devrait noter une différence d'intensité entre les deux systèmes analysés. En effet, l'intensité diffusée par les liposomes déformés est beaucoup plus importante que celle diffusée par les liposomes non déformés, ceci est directement lié à la quantité de matière diffusante: dans le premier cas, les liposomes sont déformés et empilés dans la même direction et participent tous à la diffusion tandis que dans le deuxième cas, les liposomes n'adoptent pas une orientation privilégiée, ce qui diminue le nombre d'objets participant à la diffusion des rayons X. Dans notre cas la différence d'intensité n'est pas clairement mise en évidence pour des raisons de normalisation des graphes. La présence du pic de Bragg est le signe d'un empilement multi-lamellaire de bicouche. Ce caractère multi-lamellaire ne dépend pas du caractère déformé ou non des liposomes, mais la visibilité du pic de Bragg dans une expérience SAXS est d'autant meilleure que l'orientation de la direction d'empilement est plus favorable (au sens de la loi de Bragg) vis-à-vis de la direction du faisceau incident.

#### **III.4: Relaxation de la déformation des liposomes TBBPC en dehors de $B_0$ : caractérisation par SAXS.**

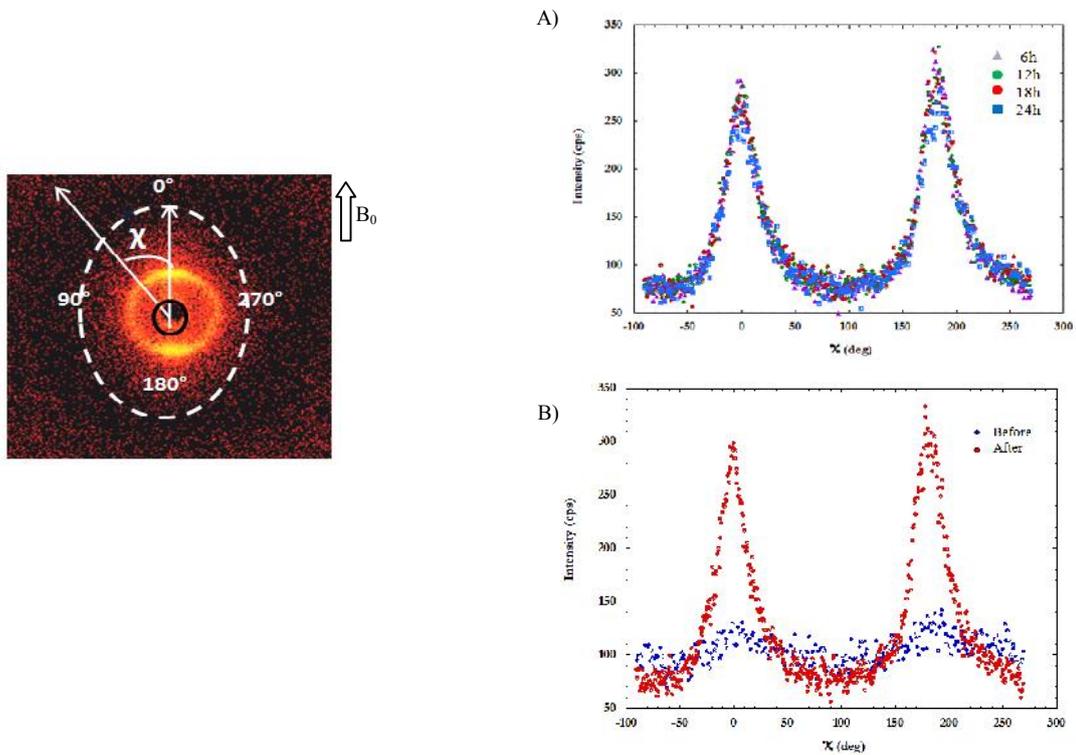
##### **V.4.1: Cinétique de relaxation des liposomes TBBPC**

Des études précédentes menées au laboratoire ont prouvé que les bicelles biphényles (TBBPC : DCPC) s'orientant dans le champ magnétique avec leur normale à la bicouche n parallèle à  $B_0$ , conservent leur orientation plusieurs jours en dehors du champ magnétique (Loudet-Courreges *et al.*, 2011). Nous avons donc décidé de réaliser une étude de cinétique de relaxation par diffusion des rayons X aux petits angles sur les liposomes TBBPC puisque nous venons de voir qu'après une heure dans le champ magnétique  $B_0$ , ces derniers conservent leur déformation spécifique en oblate, ce qui permet de les transporter facilement et de les étudier par SAXS en dehors de  $B_0$ . Ainsi, après la déformation des liposomes TBBPC dans un champ magnétique de 18,8T pendant une heure à 40°C, le transfert dans l'appareil SAXS (17 min après le retrait de  $B_0$ ) et l'alignement des faisceaux (18 min après le transfert dans l'appareil SAXS), une acquisition a été lancée toutes les deux heures.

La figure V.10 présente les clichés 2D de diffusion qui ont été enregistrés à  $t=35$  min,  $t=6$ h et  $t=24$ h après le passage dans le champ magnétique. Nous remarquons que 24 heures après l'exposition à  $B_0$ , le cliché de diffusion obtenu est toujours caractéristique d'un système anisotrope, avec deux spots alignés selon l'axe  $x$  parallèle à  $B_0$ , et dont l'intensité est similaire à celle des clichés obtenus à  $t=35$  min et  $t=6$ h. Afin d'analyser plus précisément la cinétique de relaxation de la déformation des liposomes TBBPC, une intégration linéaire (selon l'axe  $x$ ) des clichés de diffusion 2D a été réalisée et les intensités diffusées en fonction de l'angle azimutal d'intégration  $\chi$  ont été tracées (voir figure V.11). Si l'échantillon ne présente aucune orientation privilégiée vis-à-vis de la direction du faisceau incident, la représentation du signal diffusé en fonction de l'angle azimutal doit donner une constante. La variation azimutale de l'intensité est donc le signe que l'échantillon est orienté par rapport à la direction du faisceau incident, du fait dans notre cas qu'un champ magnétique ait été appliqué et que son effet n'ait pas encore relaxé. La figure V.11.A) présente les intensités diffusées en fonction de  $\chi$  pour les liposomes non déformés (graphe en bleu) et pour ceux déformés et retirés depuis 6 heures de  $B_0$  (graphe en rouge). Dans le premier cas, la variation d'intensité en fonction de  $\chi$  est très faible alors que dans le deuxième cas, on observe deux pics intenses pour  $\chi=0^\circ$  et  $\chi=180^\circ$  ; ce signal anisotrope caractérise la déformation en oblate spécifique des liposomes TBBPC. Ces deux pics à  $0^\circ$  et  $180^\circ$  sont toujours observés 24 heures après le retrait de  $B_0$  (voir figure V.II.B) avec une intensité légèrement plus faible et une largeur à mi-hauteur légèrement plus grande que celles observées 6 heures après le retrait de  $B_0$ , ce qui prouve une relaxation lente de la déformation des liposomes TBBPC en dehors du champ magnétique. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu suivre la relaxation des liposomes TBBPC en dehors de  $B_0$  plus longtemps ; il faudrait donc renouveler l'expérience afin de déterminer le temps total nécessaire pour que le système retrouve son état d'équilibre initial non déformé.

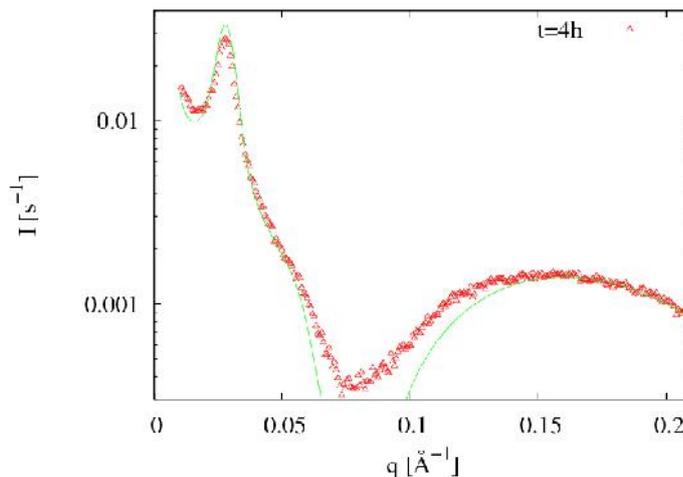


**Figure V.10 :** Clichés de diffusion  $X$  aux petits angles montrant la relaxation dans le temps en dehors de  $B_0$  de la déformation en oblate des liposomes TBBPC ( $h=90\%H_2O+0.1M NaCl$ ) 6 heures et 24 heures après leur passage dans un champ magnétique de  $18,8T$  pendant une heure.



**Figure V.11 :** A gauche, cliché anisotrope 2D de diffusion des rayons  $X$  aux petits angles avec la gamme des angles azimutaux d'intégration  $\chi$  (courbe en pointillés). A droite, A) Graphe de cinétique de relaxation reportant l'intensité diffusée en fonction de l'angle azimutal  $\chi$  enregistrée à température ambiante avant passage des liposomes TBBPC dans  $B_0$  et 6 heures après leur retrait ( $h=90\%H_2O+0.1M NaCl$ ). B) Graphe de cinétique de relaxation reportant l'intensité diffusée en fonction de l'angle azimutal  $\chi$  enregistrée à température ambiante 6 heures et 24 heures après passage pendant une heure dans un champ magnétique de  $18,8 T$ .

En collaboration avec le Professeur Frédéric Nallet du CRPP, une simulation de la courbe  $I=f(q)$  des liposomes TBBPC non déformés a été effectuée à partir d'un modèle assez simple, qui considère que le signal de rayons X provient de l'alignement périodique (d'où le pic de Bragg) d'un certain nombre de bicouches (d'où la « bosse diffuse » entre  $\approx 0,06$  et  $0,2\text{\AA}^{-1}$ ). Ce modèle, dans son expression mathématique, suppose que le système n'est pas orienté vis-à-vis de la direction du faisceau incident. La relativement bonne adéquation du modèle aux données expérimentales permet de confirmer la valeur de  $200\text{\AA}$  pour la périodicité d'empilement des bicouches lipidiques, et d'estimer les épaisseurs hydrophobes et hydrophiles de la monocouche lipidique respectivement à  $13\text{\AA}$  et  $6\text{\AA}$ . Il faut noter un défaut du modèle utilisé qui annule l'intensité du système vers  $0,07\text{\AA}^{-1}$ , alors qu'elle est clairement non nulle dans l'expérience. Ceci provient, d'une part, du bruit de fond expérimental qui n'est pas parfaitement bien soustrait et, d'autre part, du modèle qui ne prend pas en compte des effets « secondaires » tels que l'influence de la résolution du système de mesure ou une éventuelle polydispersité dans les valeurs des paramètres de la bicouche biphenyle pris pour la simulation.



**Figure V.12:** Courbes expérimental (rouge) et simulé (verte) des liposomes biphenyles non déformés ( $h=90\% + 0,1M NaCl$ ), représentant l'intensité diffusée en fonction du vecteur d'onde après une intégration circulaire.

## IV. Discussion

La combinaison des différentes techniques de microscopies optiques et électroniques et diffusion des rayons X aux petits angles nous a permis d'obtenir les résultats majeurs suivants :

- i. Le lipide TBBPC est un lipide fluorescent.
- ii. Des vésicules TBBPC déformées en oblate de grande taille ont été observées pour la première fois par microscopies.
- iii. La déformation en oblate des liposomes TBBPC est rémanente en dehors de  $B_0$  pendant plusieurs jours.
- iv. Les liposomes biphényles déformées sont des vésicules multi-lamellaires très hydratées.

### IV.1. Lipide TBBPC fluorescent.

Tout d'abord, la spectroscopie UV et la microscopie optique de fluorescence ont confirmé que le lipide TBBPC présente des propriétés de fluorescence grâce à ses deux cycles phényles sur la chaîne  $sn_2$ . Ce résultat est très prometteur car le lipide TBBPC pourrait être utilisé comme une sonde fluorescente des membranes en comparaison avec les autres marqueurs exogènes des bicouches lipidiques comme la DPH (diphénylhexatriène) (Kuhry 1983), la TMA-DPH (Triméthylammonium Diphénylhexatriène) (Van Ginkel 1989) qui présentent un coefficient d'extinction molaire inférieure à celui du TBBPC. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer que le TBBPC est un meilleur fluorophore n'ayant pas mesuré le rendement quantique.

### IV.2: Déformation des liposomes en oblate et obtention de vésicules de grande taille.

En second lieu, les microscopies optiques à contraste de phase (DIC) et fluorescence nous ont permis d'obtenir pour la première fois des images de liposomes biphényles déformés par le champ magnétique  $B_0$  de grande taille et de valider ainsi les résultats de déformation en oblate obtenus par RMN des solides. Néanmoins, aucune technique de microscopie utilisée n'a permis de mettre en évidence le caractère unidirectionnel de la déformation en oblate. Il faudrait optimiser les conditions de préparation des échantillons pour minimiser les manipulations et conserver la déformation des vésicules.

Les statistiques de taille ont été effectuées uniquement à partir des clichés de microscopie optique DIC. Il faut noter que cela reste une estimation, en effet les petits liposomes (inférieurs à  $1\mu\text{m}$ ) ne sont pas visibles par microscopie optique et donc n'ont pas été comptabilisés. A l'inverse, les techniques de cryo-microscopie électronique (cryo-fracture, cryo-TEM et Cemovis) permettent une mesure plus fiable des petits objets, mais ne permettent pas de visualiser entièrement des objets de plusieurs microns. La statistique de taille aurait pu être effectuée à partir des images de fluorescence, mais l'effet halo de fluorescence a tendance à augmenter la taille des objets (Perkins 1993).

Un certain nombre de techniques de diffusion de la lumière ont évolué afin de déterminer la taille des vésicules. Ces techniques fonctionnent très bien pour des objets homogènes en taille mais elles sont généralement incapables de décrire avec précision des systèmes hétérogènes et poly-disperses. Il est également impossible avec ces techniques de quantifier la forme et la géométrie des objets, une variable importante qui peut contribuer à l'erreur dans la mesure de la dimension.

Un autre résultat important de ces analyses par microscopie est que certaines vésicules TBBPC observées après déformation dans le champ magnétique présentent un diamètre beaucoup plus grand que celui avant déformation. En effet, d'après la statistique de taille effectuée (figure V.5), environ 15 à 20% de vésicules de diamètre supérieurs à  $40\mu\text{m}$ , voire  $100\mu\text{m}$ , sont observées après déformation, alors que la taille maximale mesurée pour les vésicules non déformées est de  $17\mu\text{m}$  et n'est obtenue qu'une seule fois. De plus, seuls 123 objets sont comptabilisés après déformation dans le champ magnétique à partir de 6 images de DIC (avec une échelle de  $45\mu\text{m}$ ) alors que pour le même échantillon étudié sans passage au préalable dans le champ magnétique, nous comptons un nombre beaucoup plus élevé de vésicules (257) à partir d'une seule image DIC (avec une échelle de  $30\mu\text{m}$ ). En moyenne, les liposomes non déformés présentent un diamètre de  $3,8\mu\text{m} \pm 1,5\mu\text{m}$ , alors que le diamètre des liposomes TBBPC déformés après une heure dans le champ magnétique augmente à  $6,88\mu\text{m} \pm 1\mu\text{m}$ . Cette taille moyenne des vésicules TBBPC déformées de  $\approx 7\mu\text{m}$  obtenue par microscopie est comparable à la valeur du semi grand axe  $a$  obtenue par simulation des spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  en appliquant la théorie d'Helfrich, ce qui valide notre approche détaillée dans le chapitre IV.

Ces résultats laissent penser que le champ magnétique entraîne une fusion des liposomes TBBPC. Cette fusion serait entraînée par la déformation en oblate des vésicules dans le champ magnétique, le fait qu'elles s'aplatissent rendrait leurs bords thermodynamiquement instables. On peut se demander si cette taille augmenterait avec le temps passé dans le et en

dehors du champ magnétique et si au bout d'un certain temps seules des grosses vésicules seraient visibles.

Cette fusion des vésicules biphényles s'avère être très intéressante pour des études biophysiques, dans la mesure où les liposomes de grandes tailles se rapprochent davantage des membranes des cellules biologiques.

#### **IV.3: Rémanence de la déformation en oblate des liposomes TBBPC en dehors de**

##### **$B_0$**

Il a été montré que l'orientation smectiques des bicelles TBBPC/DCPC est rémanente pendant plusieurs jours en dehors du champ magnétique (Courreges-Loudet 2011). Sur cette base, nous avons voulu étudier le comportement cette fois des liposomes biphényles déformés en oblate en dehors de  $B_0$ . La diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) a permis de confirmer cette déformation en oblate caractéristique des liposomes TBBPC après leur passage dans un champ magnétique. Le cliché 2D de diffusion présente en effet deux tâches anisotropes dans la direction de l'axe x parallèle à  $B_0$ . Ainsi, la technique SAXS peut être utilisée en complément de la RMN pour caractériser la déformation des liposomes et prouver la rémanence de cette déformation en dehors de  $B_0$ .

Cette technique a permis de mettre en évidence la relaxation lente ( $\geq 24$  heures) en dehors du champ magnétique des liposomes TBBPC préalablement déformés dans  $B_0$  pendant une heure ; leur comportement est donc similaire à celui des bicelles TBBPC/DCPC qui restaient orientées plusieurs jours en dehors de  $B_0$ . Cette rémanence de déformation pourrait s'expliquer par le fait que les liposomes TBBPC déformés sont empilés les uns au dessus des autres, ce qui crée une coopérativité entre les objets avec une organisation diminuant les encombrements stériques, ce qui décélère la relaxation de la déformation. La taille importante des liposomes déformés (plusieurs microns voir plusieurs dizaines de microns pour certains) peut également jouer un rôle; ces gros objets ont en effet besoin de temps pour retourner à leur état d'équilibre initial.

Il serait intéressant de poursuivre l'étude de cette cinétique de relaxation des liposomes TBBPC en dehors de  $B_0$  au-delà de 24 heures. De même, le temps de déformation au préalable dans le champ magnétique pourrait être modulé; ce qui permettrait de déterminer le temps minimal requis dans  $B_0$  pour observer une déformation des liposomes TBBPC ou voir si la déformation en oblate est accentuée au-delà d'une heure dans  $B_0$ .

Il serait également intéressant d'analyser la déformation en prolata des liposomes DMPC par diffusion des rayons X aux petits angles, ainsi que leur cinétique de relaxation en

dehors de  $B_0$ , afin de comparer les caractéristiques de déformations dans  $B_0$  et de relaxation en dehors de  $B_0$  des deux types de liposomes, TBBPC et DMPC.

#### **IV.4: Obtention de multicouches gonflées**

La technique de cryo-microscopie électronique à transmission a prouvé l'aspect multilamellaire des vésicules TBBPC déformées. La périodicité de 217Å entre deux bicouches du liposome TBBPC déformé est similaire à celle entre deux bicouches du liposome TBBPC non déformé (200Å). Dans les deux cas, les bicouches phospholipidiques sont donc très espacées, ce qui met en évidence une forte hydratation des systèmes. En comparaison, la périodicité entre deux bicouches de liposomes DMPC dans les mêmes conditions d'hydratation est de 64 Å (Faure 1996, Faure and Dufourc 1997). Ce fort gonflement inter-bicouche des liposomes TBBPC peut s'expliquer par un effet d'ondulation de la membrane à la température d'analyse. En effet, les expériences ont été réalisées à température ambiante ( $T=25^\circ\text{C}$ ), donc bien supérieure à la température de transition de phase du lipide TBBPC ( $T_m=-4^\circ\text{C}$ ), ce qui entraîne une fluidité de la membrane et donc des ondulations de celle-ci. Nous pouvons considérer que les cycles phényles se comportent comme « espaceur » moléculaire entraînant un gonflement très important des bicouches TBBPC. Nous avons par contre obtenu par RMN la même épaisseur hydrophobe ( $\approx 20,8\text{Å}$ ) pour les liposomes DMPC et TBBPC (Chapitre IV), donc les cycles phényles n'influent pas sur l'épaisseur membranaire mais sur la périodicité entre les bicouches en l'augmentant. Cette forte hydratation des liposomes TBBPC mime davantage les conditions physiologiques des membranes biologiques, ce qui constitue un atout supplémentaire pour l'application des liposomes TBBPC à l'étude structurale de protéines hydrosolubles ou de protéines membranaires.

### Conclusion

Plusieurs techniques ont été utilisées pour mettre en évidence la déformation en oblate des liposomes TBBPC et leur rémanence en dehors de  $B_0$ . En première approche, la RMN des solides en phosphore a permis de caractériser cette rémanence en modulant l'intensité du champ magnétique statique. Les techniques de microscopie optique et électronique ont permis par la suite d'obtenir pour la première fois une image des vésicules TBBPC déformées, qui conservent leur aspect multilamellaire et qui présentent un diamètre plus important que ceux non déformés ; l'hypothèse d'une fusion des liposomes TBBPC au cours de leur déformation a ainsi été soulevée. Enfin, la diffusion des rayons X aux petits angles a permis de mettre en évidence la déformation en oblate des liposomes TBBPC ainsi que leur rémanence sur 24 heures en dehors de  $B_0$ . L'empilement régulier des liposomes déformés confère au système la capacité de conserver sa déformation pendant plusieurs jours en dehors de  $B_0$ , ce qui présente un grand intérêt pour de nombreuses études biophysiques.



## CHAPITRE VI

### **Caractérisation physico-chimique des nouveaux lipides HBBPC et OBBPC.**

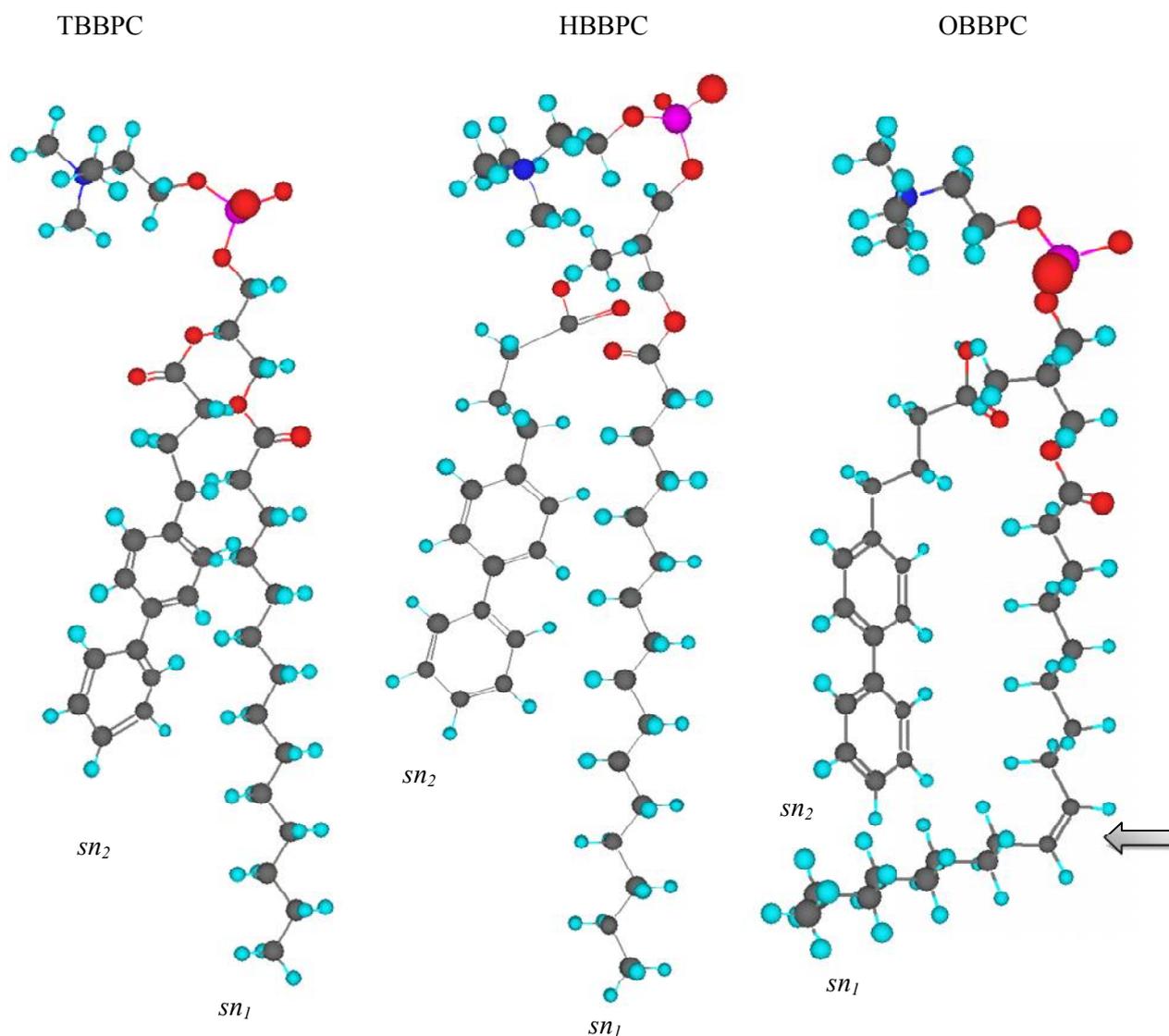


Dans le but de se rapprocher de la diversité lipidique présente dans les membranes biologiques, deux nouveaux lipides, nommés HBBPC et OBBPC, ont été synthétisés. Comme le lipide TBBPC, ils comportent une unité biphenyle sur leurs chaînes  $sn_2$ . Les lipides HBBPC et OBBPC présentent respectivement une chaîne aliphatique  $sn_1$  de longueur  $C_{16:0}$  sans insaturation et une chaîne aliphatique  $sn_1$  de longueur  $C_{18:1}$  avec une insaturation cis en position 9-10. Ce chapitre est consacré dans un premier temps à la détermination de la température de transition de phase gel-fluide des deux lipides HBBPC et OBBPC, puis à leurs applications dans la formation de modèles membranaires de type liposome. La déformation dans un champ magnétique des liposomes HBBPC et OBBPC sera caractérisée par RMN des solides- $^{31}\text{P}$  et la dynamique du DPPC- $\text{D}_{62}$ , inséré dans des liposomes HBBPC et OBBPC, sera ensuite analysée par RMN des solides- $^2\text{H}$ .

## I. Présentation des nouveaux lipides HBBPC et OBBPC

La figure VI.1 présente une structure tridimensionnelle possible pour les nouveaux lipides HBBPC et OBBPC en comparaison avec le lipide TBBPC déjà étudié dans la thèse de Cécile Loudet (2006). Il faut préciser qu'il ne s'agit que d'un schéma représentatif et que dans la réalité les chaînes lipidiques sont beaucoup plus flexibles. La structure du squelette glycérol implique que la chaîne  $sn_2$  des lipides remonte par rapport à celle  $sn_1$ . Ces configurations montrent clairement que la chaîne  $sn_2$  est plus courte que celle  $sn_1$ . Pour le lipide OBBPC, la présence de l'insaturation en position 9-10 crée un coude au milieu de la chaîne  $sn_2$  qui fait remonter celle-ci par rapport aux chaînes  $sn_2$  des lipides TBBPC et HBPPC.

Il serait intéressant d'étudier les molécules de TBBPC, HBBPC et OBBPC en dynamique moléculaire comme ce qui a été fait pour le DMPC (Aussenac 2003) on pourrait ainsi connaître plus exactement la configuration spatiale des lipides biphenyles et confirmer la différence de longueur entre leurs chaînes.



**Figure VI.1:** Structures tridimensionnelles obtenues avec le logiciel Chem Draw (7.0) des lipides TBBPC, HBBPC et OBBPC permettant de comparer les longueurs de chaînes  $sn_1$  et  $sn_2$  de chaque lipide. L'insaturation de la chaîne  $sn_1$  du lipide OBBPC est indiquée par une flèche.

## II. Matériaux et Méthodes

### II.1: Matériaux

Les lipides HBBPC et OBBPC ont été synthétisés selon le mode opératoire détaillé dans le chapitre III avec un rendement de 70%.

Les systèmes binaires suivants ont été considérés pour les expériences RMN des solides- $^2\text{H}$  : TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$ , HBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5) et OBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5) dans de l'eau dédeutérée (Eurisotop), avec les lipides DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et DMPC- $^2\text{H}_{62}$  fournis par Avanti Polar Lipids.

### II.2: Méthodes

#### II.2.1: Formation des liposomes :

Pour les expériences de RMN des solides- $^{31}\text{P}$ , des liposomes de TBBPC, HBBPC et OBBPC ont été préparés avec un taux d'hydratation (h) de 80% ou 90%, dans 100 $\mu\text{l}$  d'eau ultra pure en présence de 100mM de NaCl et en effectuant de un à trois cycles chaud-froid (voir Chapitre III).

Pour les expériences de RMN des solides  $^2\text{H}$ , les systèmes binaires suivants ont été considérés: TBBPC : DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95 :5; 0,16M/80mM), HBBPC : DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5; 0,156mM/77mM) et OBBPC : DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5; 0,15mM/75mM) avec une hydratation de 90% dans 100 $\mu\text{l}$  d'eau dédeutérée contenant 100mM de NaCl. Pour ces systèmes binaires, les poudres de lipides sont d'abord co-solubilisées dans un même solvant organique (généralement chloroforme/méthanol (2:1)). Après évaporation du solvant sous flux d'azote, le film lipidique est repris avec un large excès d'eau puis lyophilisé; l'opération peut être effectuée une nouvelle fois afin d'éliminer toute trace de solvant organique. Les poudres sont ensuite hydratées avec de l'eau dédeutérée et des liposomes sont formés en effectuant trois cycles chaud-froid-agitation.

#### II.2.2: Conditions d'acquisition des expériences RMN :

##### *i. RMN des solides- $^{31}\text{P}$ .*

Les spectres RMN des solides  $^{31}\text{P}$  découplés  $^1\text{H}$  ont été enregistrés à la fréquence de 162 et 342 MHz sur un spectromètre RMN de 9,4 Tesla et 18,8 Tesla respectivement. La séquence d'Echo de Hahn a été utilisée avec une impulsion  $90^\circ$  de 14,50 $\mu\text{s}$  à 9,4T et 6,50  $\mu\text{s}$  à

18,8T. Les pulses de  $90^\circ$  et  $180^\circ$  sont séparés d'un délai de  $30\mu\text{s}$ . Le temps de recyclage est de 5s et l'enregistrement de chaque spectre a nécessité 512 acquisitions. Un spectre RMN  $^{31}\text{P}$  de référence de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%) a été préalablement calibré à 0 ppm. La température est stabilisée pendant 20 min avant l'acquisition ce qui fait un temps total (régulation en température et acquisition) d'une heure pour chaque expérience. Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, le FID a été convolué avec une exponentielle décroissante de type  $e^{(-LBt)}$  (opération de filtrage) avec un terme LB égal à 100Hz.

ii. RMN des solides- $^2\text{H}$

Les spectres RMN des solides- $^2\text{H}$  ont été enregistrés à la fréquence de 122,8 MHz sur un spectromètre RMN de 18,8T. La séquence d'Echo solide quadrupolaire avec cyclage de phase a été utilisée avec un pulse  $90^\circ$  de  $4\mu\text{s}$ . Chaque pulse de  $90^\circ$  est séparé d'un délai de  $40\mu\text{s}$ . Le temps de recyclage est de 1,5 s et l'enregistrement de chaque spectre a nécessité 5120 acquisitions. La température est réglée à  $37^\circ\text{C}$  et stabilisée pendant 20 min avant l'acquisition. Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, la FID a été convoluée avec une exponentielle décroissante de type  $e^{(-LBt)}$  (opération de filtrage) avec un terme LB égal à 200Hz.

iii. Simulation spectrale

La simulation des spectres RMN  $^{31}\text{P}$  et  $^2\text{H}$  est effectuée à l'aide d'un programme Fortran (non publié), écrit par Dufourc, E.J., qui calcule la FID en fonction du rapport (c/a), de l'anisotropie de blindage électronique résiduel ( $\Delta\sigma$ ) (estimée à partir des spectres expérimentaux), des largeurs intrinsèques des raies à mi-hauteur ( $RT_2$ ), du poids moléculaire des espèces considérées (w) qui correspond au nombre de phosphore par lipides et du déplacement chimique isotrope. Le spectre simulé correspond au spectre expérimental avec une erreur estimée de 1% (voir chapitre IV).

**II.2.3: Détermination de la température de transition de phase ( $T_m$ ).**

Afin de déterminer la température exacte de transition de phase gel-fluide  $T_m$  des lipides HBBPC et OBBPC, les moments  $M_2$  (voir chapitre II) ont été calculés pour chaque spectre en phosphore obtenu en montée en température, en utilisant une routine "NMR friend" (mise au point par Sébastien Buchoux, non publiée). Après importation des spectres et conversion au format ASCII, des bornes qui correspondent aux extrémités du spectre et entre lesquelles  $M_2$  sera calculé, sont définies. Les moments  $M_2$  obtenus sont reportés en fonction

de la température et le point d'inflexion (ou rupture de pente) de la courbe obtenue correspond à la température de transition de phase gel-fluide du lipide  $T_m$ .

### III. Résultats

#### III.1: Etude par RMN des solides $^{31}\text{P}$ des lipides HBBPC et OBBPC en fonction de la température.

##### a) Liposomes HBBPC

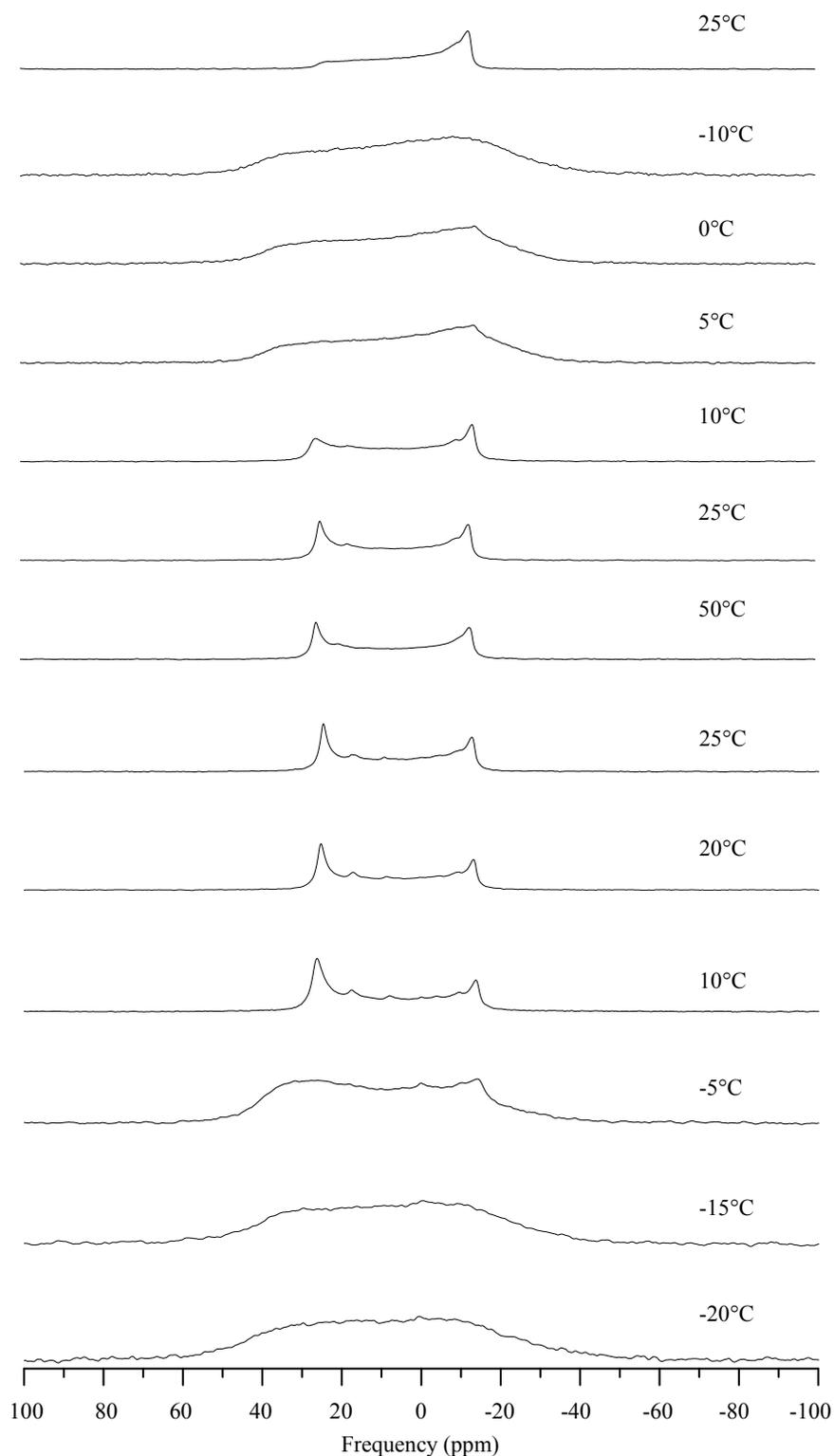
Des liposomes de HBBPC (h=80% dans  $\text{H}_2\text{O}+100\text{mM NaCl}$ ) ont été analysés par RMN des solides- $^{31}\text{P}$  ( $B_0=9,4\text{T}$ ) en faisant varier la température de  $-10^\circ\text{C}$  à  $50^\circ\text{C}$  puis de  $50^\circ\text{C}$  à  $-20^\circ\text{C}$ . Les différents spectres obtenus sont présentés dans la figure VI.2. Un premier spectre à  $25^\circ\text{C}$  a été réalisé avant les variations en température pour contrôle, caractéristique d'une phase lamellaire en phase fluide non déformée. De  $-10^\circ\text{C}$  à  $5^\circ\text{C}$  en montée en température, le spectre observé est large et associé à une phase lipidique gel, où tous les mouvements moléculaires sont limités. Pour des températures de  $5^\circ\text{C}$  à  $50^\circ\text{C}$ , l'anisotropie de blindage électronique ( $\Delta\sigma$ ) diminue et les spectres sont mieux définis. En effet, à  $-10^\circ\text{C}$ , même si la forme spectrale n'est pas caractéristique d'une phase à symétrie axiale,  $\Delta\sigma$  peut être estimé à 12,7 kHz soit 78,6 ( $\pm 3$ ) ppm alors que  $\Delta\sigma$  est égal à 6,3 kHz soit 39 ppm ( $\pm 1$ ) à  $10^\circ\text{C}$ . Au-dessus de  $5^\circ\text{C}$ , la forme spectrale caractérise l'état fluide d'une phase lamellaire à symétrie axiale présentant une déformation en oblate; en effet, l'épaulement à 25 ppm devient de plus en plus intense de  $10^\circ\text{C}$  à  $50^\circ\text{C}$ . Ainsi, plus la température augmente, plus la déformation en oblate des liposomes HBBPC est importante, ce qui était également le cas des liposomes TBBPC (voir Chapitre IV, III.1.3).

Ainsi, un changement d'organisation moléculaire du lipide, correspondant au passage d'une phase gel à fluide, se produit pour une température comprise entre  $5^\circ\text{C}$  et  $10^\circ\text{C}$  en montée et descente en température.

Le spectre obtenu à  $25^\circ\text{C}$  en descente en température (soit après 12 heures dans le spectromètre) présente une déformation en oblate ce qui n'était pas le cas du premier spectre contrôle à  $25^\circ\text{C}$  (obtenu après 1 heure dans le spectromètre). Ainsi, il y a un effet d'hystérèse, les liposomes HBBPC conservant leur déformation en oblate. Ceci peut-être du à la montée en température qui favorise la déformation et au temps qu'a passé l'échantillon dans le spectromètre. Ce phénomène d'hystérèse est également observé à  $10^\circ\text{C}$  et  $-5^\circ\text{C}$  en descente en température (l'épaulement correspondant à l'orientation  $\theta=0^\circ$  est plus important que sur les

premiers spectres obtenus en montée en température). A  $-15^{\circ}\text{C}$  et  $-20^{\circ}\text{C}$ , on retrouve un spectre large non déformé caractéristique d'une phase lamellaire gel.

Afin de déterminer la température exacte de la transition de phase gel-fluide  $T_m$  du lipide HBBPC, les moments  $M_2$  ont été calculés pour chaque spectre en phosphore. Les moments  $M_2$  sont alors reportés en fonction de la température sur la figure VI.4 et le point d'inflexion de la courbe permet de déterminer une température de transition de phase  $T_m(\text{HBBPC}) \approx 7^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . La valeur de  $T_m$  obtenue à partir des spectres enregistrés en descente en température est équivalente à celle en montée en température.

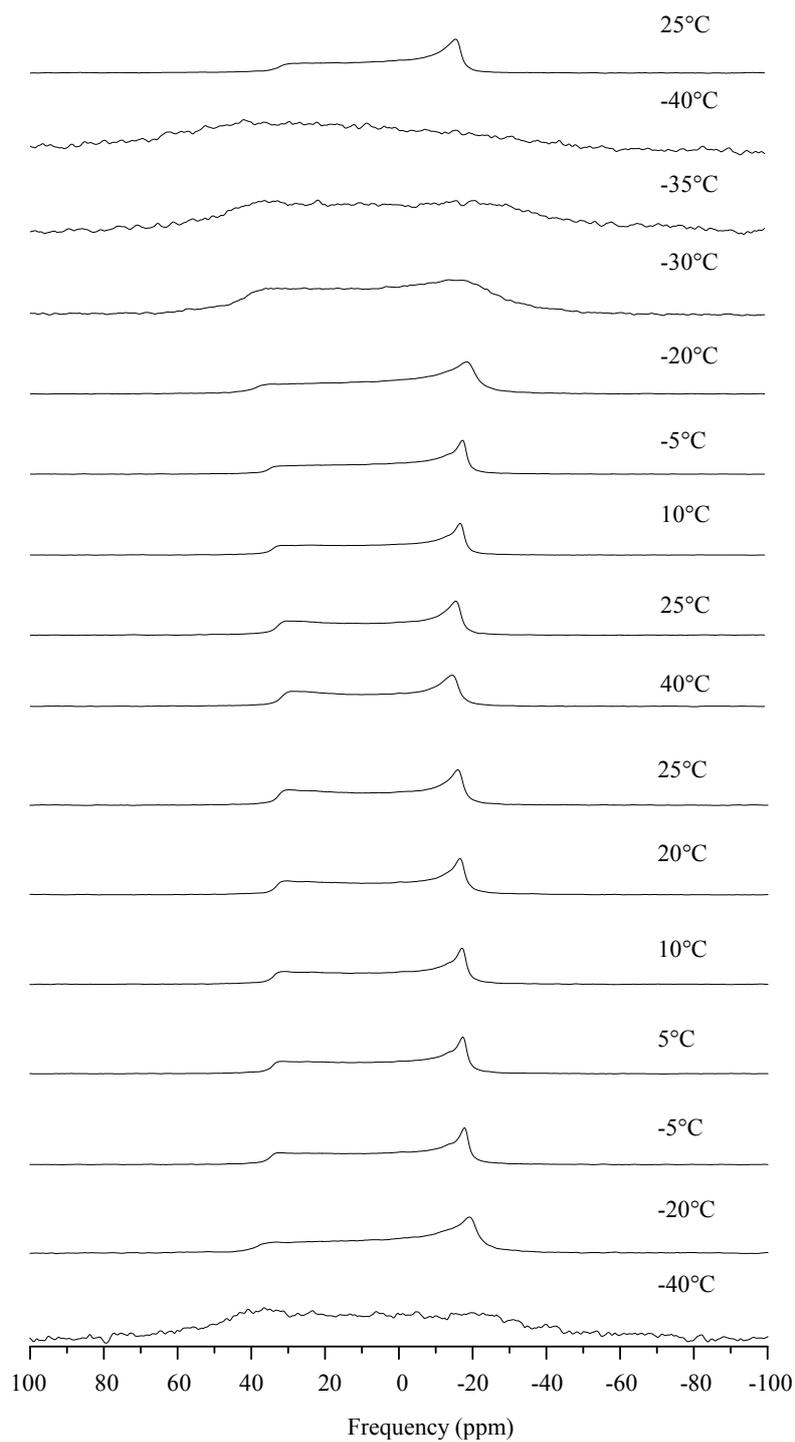


**Figure VI.2:** Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) de liposomes HBBPC pour une hydratation de 80% dans  $\text{H}_2\text{O}$  (+0,1M de NaCl) dans  $B_0=9,4\text{T}$ . Les températures sont indiquées sur la droite et chaque spectre est le résultat de 512 scans (lecture de haut en bas).

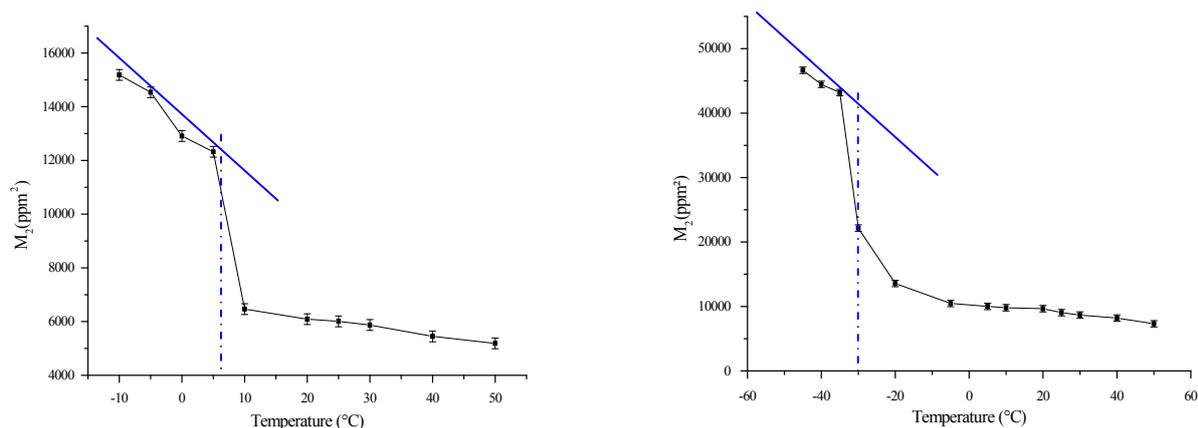
### b) Liposomes OBBPC

Des liposomes de OBBPC (h=80% dans H<sub>2</sub>O+100mM NaCl) ont été analysés par RMN des solides-<sup>31</sup>P (B<sub>0</sub>=9,4T) en faisant varier la température de -45°C à 50°C puis de 50°C à -40°C. Les différents spectres obtenus sont présentés dans la figure VI.3. Comme précédemment, un premier spectre à 25 °C a été réalisé avant les variations en température pour contrôle, caractéristique d'une phase lamellaire en phase fluide non déformée. De -45°C à -35°C en montée en température, le spectre observé est large et associé à une phase lipidique gel, où tous les mouvements moléculaires sont limités. Pour des températures de -35°C à 50°C, l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  diminue et les spectres sont mieux définis. En effet, à -40°C, même si le spectre n'est pas caractéristique d'une phase à symétrie axiale,  $\Delta\sigma$  peut être estimé à 21,9 kHz soit 134,9 ( $\pm 3$ ) ppm alors que  $\Delta\sigma$  est égal à 7,8 kHz soit 48 ( $\pm 1$ ) ppm à 10°C. Cette forme spectrale caractérise l'état fluide d'une phase lamellaire à symétrie axiale présentant une déformation en oblate; en effet, l'épaule à 30 ppm devient de plus en plus intense de -35°C à 50°C. Ainsi, plus la température augmente, plus la déformation en oblate des liposomes OBBPC est importante, ce qui était également le cas des liposomes TBBPC et HBBPC. Ainsi, un changement d'organisation moléculaire du lipide, correspondant au passage d'une phase gel à fluide, se produit pour une température comprise entre -35°C et -25°C en montée et descente en température.

Le spectre obtenu à 25°C en descente en température (soit après 12 heures dans le spectromètre) présente une déformation en oblate ce qui n'était pas le cas du premier spectre contrôle à 25°C (obtenu après 1 heure dans le spectromètre). Ainsi, comme pour TBBPC et HBBPC, il y a également un effet d'hystérèse pour les liposomes OBBPC qui conservent leur déformation en oblate. Comme précédemment, ceci peut-être du à la montée en température qui favorise la déformation et au temps qu'a passé l'échantillon dans le spectromètre. A -45°C et -40°C, on retrouve un spectre large non déformé caractéristique d'une phase lamellaire gel. Afin de déterminer la température exacte de la transition de phase gel-fluide T<sub>m</sub> du lipide OBBPC, les moments M<sub>2</sub> ont été calculés pour chaque spectre en phosphore. Les moments M<sub>2</sub> sont alors reportés en fonction de la température (voir figure VI.4) et le point d'inflexion de la courbe permet de déterminer une température de transition de phase T<sub>m</sub>(OBBPC)  $\approx$  -30°C  $\pm$  5°C. La valeur de T<sub>m</sub> obtenue à partir des spectres enregistrés en descente en température est équivalente à celle en montée en température.



**Figure VI.3:** Spectres RMN des solides  $^{31}\text{P}$ , (séquence Echo de Hahn avec découplage large-bande des protons), de liposomes OBBPC pour une hydratation de 80% dans  $\text{H}_2\text{O}$  (+0,1M NaCl) dans  $B_0=9,4\text{T}$  Les températures sont indiquées sur la droite et chaque spectre est le résultat de 512 scans. La lecture se fait de haut en bas.



**Figure VI.4:** Graphe reportant les valeurs du moment  $M_2$ , calculées à partir des spectres RMN- $^{31}P$  des figures VI.2 et VI.3, en fonction de la température. A partir du point d'inflexion de la courbe, on détermine la température de transition de phase gel-fluide  $T_m$  (HBBPC)  $\approx 7^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ . et  $T_m$  (OBBPC)  $\approx -30^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ .

$B_0$ (T)	TBBPC/40°C			HBBPC/40°C			OBBPC/40°C		
	c/a ( $\pm 0.01$ )	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 0.1$ )	$\Delta\sigma$ ( $\pm 1$ )	c/a ( $\pm 0.01$ )	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 0.1$ )	$\Delta\sigma$ ( $\pm 1$ )	c/a ( $\pm 0.01$ )	$I_{90}/I_0$ ( $\pm 0.1$ )	$\Delta\sigma$ ( $\pm 1$ )
9.4	0.65	1.3	39	0.63	1.5	39	0.72	2	50
11.7	0.49	0.7	38	0.57	0.90	41	0.59	1.0	52
18.8	0.33	0.2	39	0.36	0.40	41	0.39	0.50	53

**Tableau VI.1 :** Tableau comparatif montrant l'effet de la variation du champ magnétique sur la déformation des liposomes TBBPC, HBBPC et OBBPC à 40°C. Cette déformation est suivie par le rapport des intensités mesurées à  $\theta=90^\circ$  ( $I_{90}$ ) et  $\theta=0^\circ$  ( $I_0$ ), par le rapport du semi petit axe c de l'ellipsoïde de révolution sur le semi grand axe a ( $c/a \pm 0,01$ ) obtenus à partir des simulations spectrales et par l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  ( $\Delta\sigma = \sigma_{//} - \sigma_{\perp} = \sigma_{0^\circ} - \sigma_{90^\circ}$ ) à 40°C.

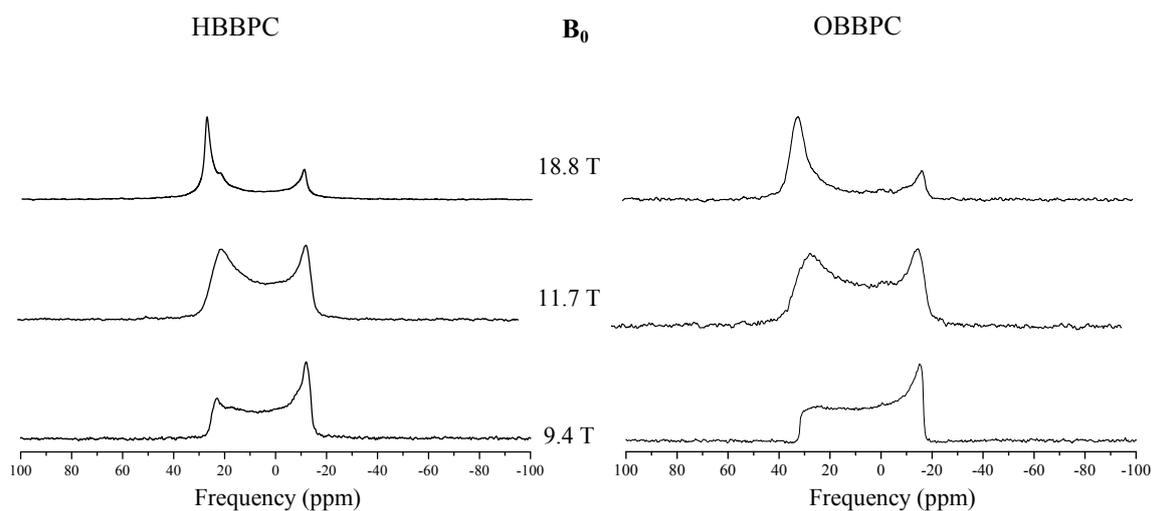
### **III.2: Déformation des liposomes HBBPC et OBBPC dans un champ magnétique.**

Des liposomes de TBBPC, HBBPC et OBBPC ont été préparés avec une hydratation de 90% dans H<sub>2</sub>O contenant 100 mM de NaCl, et analysés séparément par RMN des solides-<sup>31</sup>P sur trois spectromètres d'intensité égale à 9,4 T, 11,7 T et 18,8 T. Les spectres obtenus pour HBBPC et OBBPC sont présentés dans la figure VI.6. On observe que pour B<sub>0</sub>=9,4T et B<sub>0</sub>=11,7T, le signal relatif à l'orientation  $\theta=0^\circ$  devient de plus en plus intense et celui associé à  $\theta=90^\circ$  diminue progressivement. Cet effet devient encore plus important lorsque les vésicules sont placées dans un champ magnétique de 18,8T, où le signal correspondant à  $\theta=90^\circ$  est faible. Plus précisément, les rapports des intensités à  $\theta=90^\circ$  et  $\theta=0^\circ$ , reportés dans le tableau VI.1, diminuent de 1,5 à 9,4T à 0,4 à 18,8T pour les liposomes HBBPC, et de 2 à 9,4T à 0,5 à 18,8T pour ceux OBBPC. Comme on l'a vu dans le chapitre IV, cet effet est lié à la déformation en oblate des liposomes HBBPC et OBBPC qui augmente avec l'intensité du champ magnétique. La déformation en oblate est donc également observée pour les liposomes HBBPC et OBBPC, comme pour ceux de TBBPC, même si la longueur de chaîne aliphatique  $sn_l$  est plus importante ou qu'il y a une insaturation.

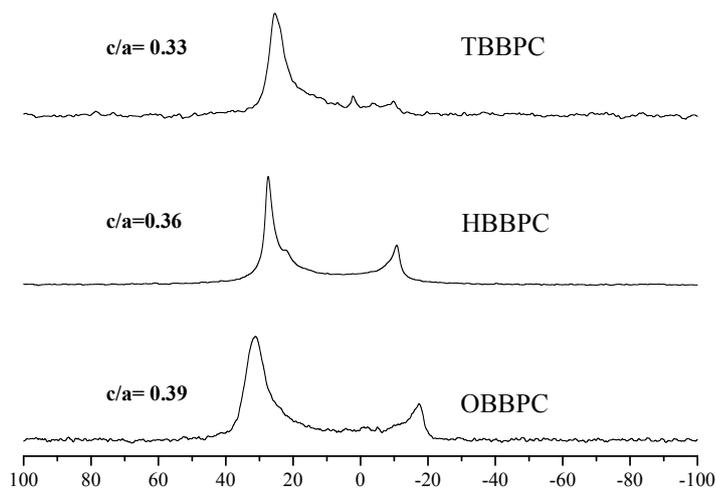
De plus, on constate que plus la longueur de la chaîne aliphatique  $sn_l$  augmente, plus l'anisotropie de blindage électronique augmente, avec  $\Delta\sigma$  (TBBPC)=39 ppm,  $\Delta\sigma$  (HBBPC)=41 ppm et  $\Delta\sigma$  (OBBPC)=53ppm.

La figure VI.7 présente la superposition des spectres RMN des solides-<sup>31</sup>P obtenue pour les liposomes TBBPC, HBBPC et OBBPC à 18,8T à 40°C. Afin de quantifier leur déformation, les spectres RMN des solides-<sup>31</sup>P ont été simulés suivant le même programme fortran utilisé précédemment. Des rapports c/a de 0,33, 0,37 et 0,39 ( $\pm 0,01$ ) ont été obtenus respectivement pour les liposomes TBBPC, HBBPC et OBBPC. Ainsi, plus la longueur de chaîne augmente, plus le rapport c/a augmente ce qui se traduit par une déformation en oblate moins prononcée. Dans l'ordre de la capacité de déformation, le lipide en C<sub>14:0</sub> arrive en tête devant le lipide en C<sub>16:0</sub> puis le lipide en C<sub>18:1</sub>.

Afin de compléter les résultats de RMN des solides-<sup>31</sup>P, il est nécessaire d'effectuer des expériences de RMN des solides-<sup>2</sup>H afin de sonder la dynamique au niveau des chaînes aliphatiques des lipides biphényles formulés en liposomes.



**Figure VI.6:** Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) des liposomes HBBPC (gauche) et OBBPC (droite), préparés avec un cycle chaud-froid-agitation, pour une hydratation  $h=90\%+0,1\text{M NaCl}$  en fonction de l'intensité du champ magnétique allant de 9,4 T à 18,8T à 40°C. Chaque spectre est le résultat de 1024 scans.



**Figure VI.7:** Superposition des spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  des liposomes TBBPC, HBBPC et OBBPC, préparés avec un cycle chaud-froid-agitation, pour une hydratation  $h=90\%$  dans  $\text{H}_2\text{O}+0,1\text{M NaCl}$ , et enregistrés à 18,8T à 40°C. La valeur du rapport  $c/a$  ( $\pm 0,01$ ) obtenue par simulation spectrale est indiquée à gauche de chaque spectre.

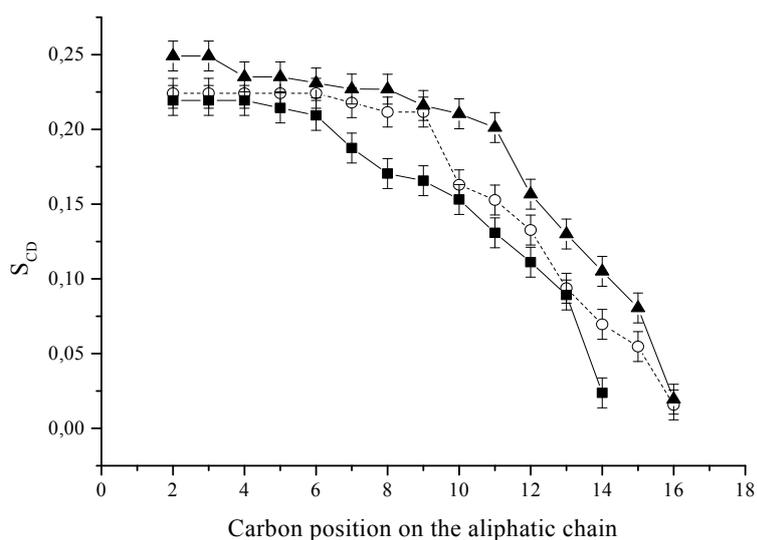
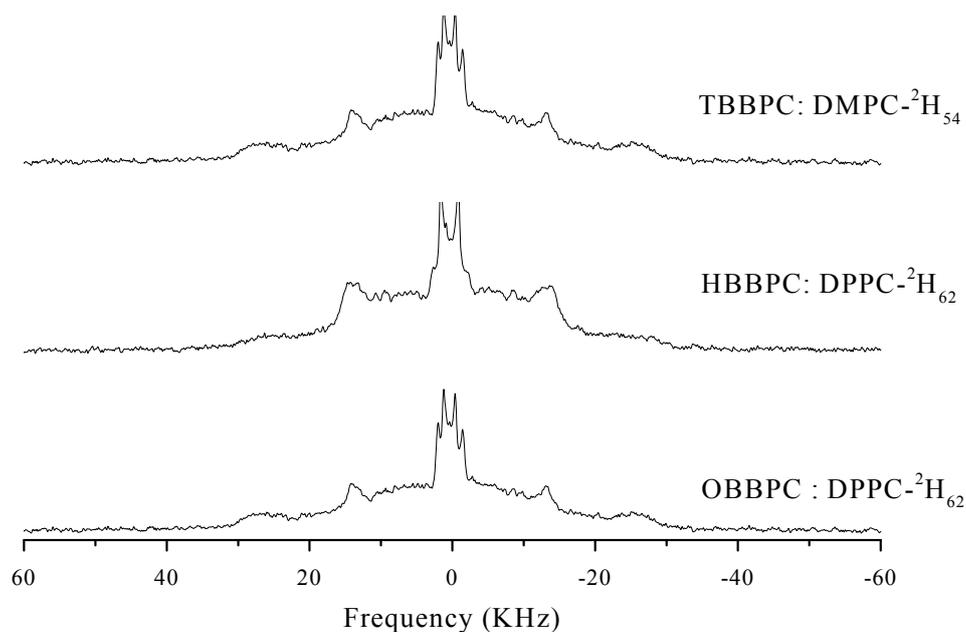
### **III.3: Caractérisation par RMN des solides $^2\text{H}$ de la dynamique des liposomes TBBPC, HBBPC et OBBPC.**

La synthèse des lipides biphényles deutérés HBBPC- $^2\text{H}_{62}$  et OBBPC- $^2\text{H}_{68}$  n'a pas pu être effectuée au cours de ce travail. Le lipide TBBPC- $^2\text{H}_{27}$  a été synthétisé dans le cadre de la thèse de Cécile Loudet mais a été entièrement utilisé. Des lipides deutérés disponibles commercialement ont donc été utilisés comme marqueur afin de sonder par RMN des solides  $^2\text{H}$  les mouvements des chaînes lipidiques. Ainsi, les liposomes de TBBPC ont été dopés avec 5% (en moles) de DMPC- $^2\text{H}_{54}$  et ceux de HBBPC et OBBPC ont été dopés avec 5% (en moles) de DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (le lipide OPPC- $^2\text{H}_{70}$  présentant une chaîne  $sn_1$  en  $\text{C}_{18:1}$  deutérée n'étant pas commercialisé). Ces liposomes TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95:5), HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5) et OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5) ont été préparés avec une hydratation de 90% dans de l'eau dédeutérée (contenant 100mM de NaCl).

#### **III.3.1: Profils d'ordre pour une même température d'analyse de 40°C**

Les spectres RMN des solides- $^2\text{H}$  expérimentaux et simulés des trois liposomes deutérés ainsi que leurs profils d'ordre  $S_{\text{CD}}=f(\text{position chaîne lipidique})$  pour une température d'analyse de 40°C (une température où tous les systèmes sont en phase fluide y compris les sondes deutérés (Davis 1979) et dans un champ magnétique  $B_0=18,8\text{T}$  sont présentés en figure VI.8.

On constate que les spectres RMN des solides  $^2\text{H}$  obtenus sont très similaires pour les trois systèmes étudiés. Pour chacun d'eux, il est possible d'attribuer de manière individuelle, en se basant sur les données de la littérature pour DMPC et DPPC (Douliez 196) les groupements aliphatiques des positions 16 à 8 en mesurant directement les éclatements quadrupolaires sur le spectre, ceux des positions 7 à 2 sont regroupés sous un même pic ; il faut noter que les deux carbones de la position 2 sur la chaîne  $sn_2$ , sont inéquivalents (configuration 2S et 2R) mais nous n'avons pas fait la distinction entre les deux sur les profils d'ordre (Douliez 1996). Ces derniers sont tracés à partir de la valeur moyenne des paramètres d'ordre obtenus pour les chaînes aliphatiques  $sn_1$  et  $sn_2$  qui ne présentent pas de réelles différences (voir annexe S3). Une fois de plus, nous avons eu recours à la simulation spectrale (voir chapitre IV) pour affiner nos attributions, qui sont faites autant que possible à partir des éclatements quadrupolaires mesurés sur les spectres RMN- $^2\text{H}$ .



**Figure VI.8:** En haut, spectres RMN des solides  $^2\text{H}$  (séquence écho solide) de liposomes TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95:5), HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95:5), et OBBPC:DPPC (95:5), préparés avec une hydratation de 90% dans  $\text{H}_2\text{O}$  déeutérée + 0,1M NaCl et 3 cycles chaud-froid-agitation. Chaque spectre est le résultat de 5120 scans et est enregistré sous un champ magnétique de 18,8T à une même température d'analyse de 40°C.

En bas, superposition des profils d'ordre reportant la moyenne des paramètres d'ordre  $S_{\text{CD}}$  calculés pour les deux chaînes aliphatiques  $sn_1$  et  $sn_2$  en fonction de la position des carbones sur les chaînes du lipide DMPC- $^2\text{H}_{54}$  pour les liposomes TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (■), et du lipide DPPC- $^2\text{H}_{62}$  pour les liposomes HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (▲) et OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (○, courbe en pointillés), pour une hydratation de 90% dans  $\text{H}_2\text{O}$  déeutérée avec 0,1 M NaCl à une même température d'analyse de 40°C.

La bonne superposition des spectres expérimentaux avec les spectres calculés nous permet de tracer les graphes  $S_{CD} = f(\text{position chaîne aliphatique})$ . Les trois profils d'ordre obtenus sont relativement proches, si l'on tient compte des barres d'erreur. On note toutefois que les paramètres d'ordre obtenus pour le DMPC- $^2\text{H}_{54}$  inséré dans les liposomes TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95:5) sont légèrement plus faibles que ceux obtenus pour le DPPC- $^2\text{H}_{62}$  inséré dans les liposomes HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5) ; ceci est relié à la longueur de chaîne plus importante pour HBBPC qui entraîne une rigidité du système plus importante. En adoptant le même mode calcul que dans le chapitre IV, on trouve en effet une longueur moyenne des deux chaînes aliphatique  $sn_1$  et  $sn_2$  de DPPC- $^2\text{H}_{62}$  dans HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5) de 12,1 Å contre 10,4 Å pour le DMPC- $^2\text{H}_{54}$  dans TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95:5) (voir tableaux VI.2). Pour le système OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5), on obtient des paramètres d'ordre intermédiaires entre ceux des systèmes biphényles  $C_{14:0}$  et  $C_{16:0}$ . De même, la longueur moyenne des chaînes  $sn_1$  et  $sn_2$  de DPPC- $^2\text{H}_{62}$  dans les liposomes OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  est estimée à 11,8 Å, donc plus grande que celle du système  $C_{14:0}$  mais plus petite que celle du système  $C_{16:0}$ . L'effet de rigidité lié à la longueur de chaîne plus importante semble être contre balancé par la présence de l'insaturation sur la chaîne  $sn_2$  de OBBPC.

Longueur de la chaîne aliphatique $sn_2$ (en Å) pour une température d'analyse de 40°C	
TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$ (40°C)	10.4 (±0.1)
HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$ (40°C)	12.1 (±0.1)
OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$ (40°C)	11.8 (±0.1)

Longueur de la chaîne aliphatique $sn_2$ (en Å) à une même température réduite de ≈ 45°C.	
TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$ (40°C)	10.4 (±0.1)
HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$ (50°C)	11.8 (±0.1)
OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$ (10°C)	12.0 (±0.1)

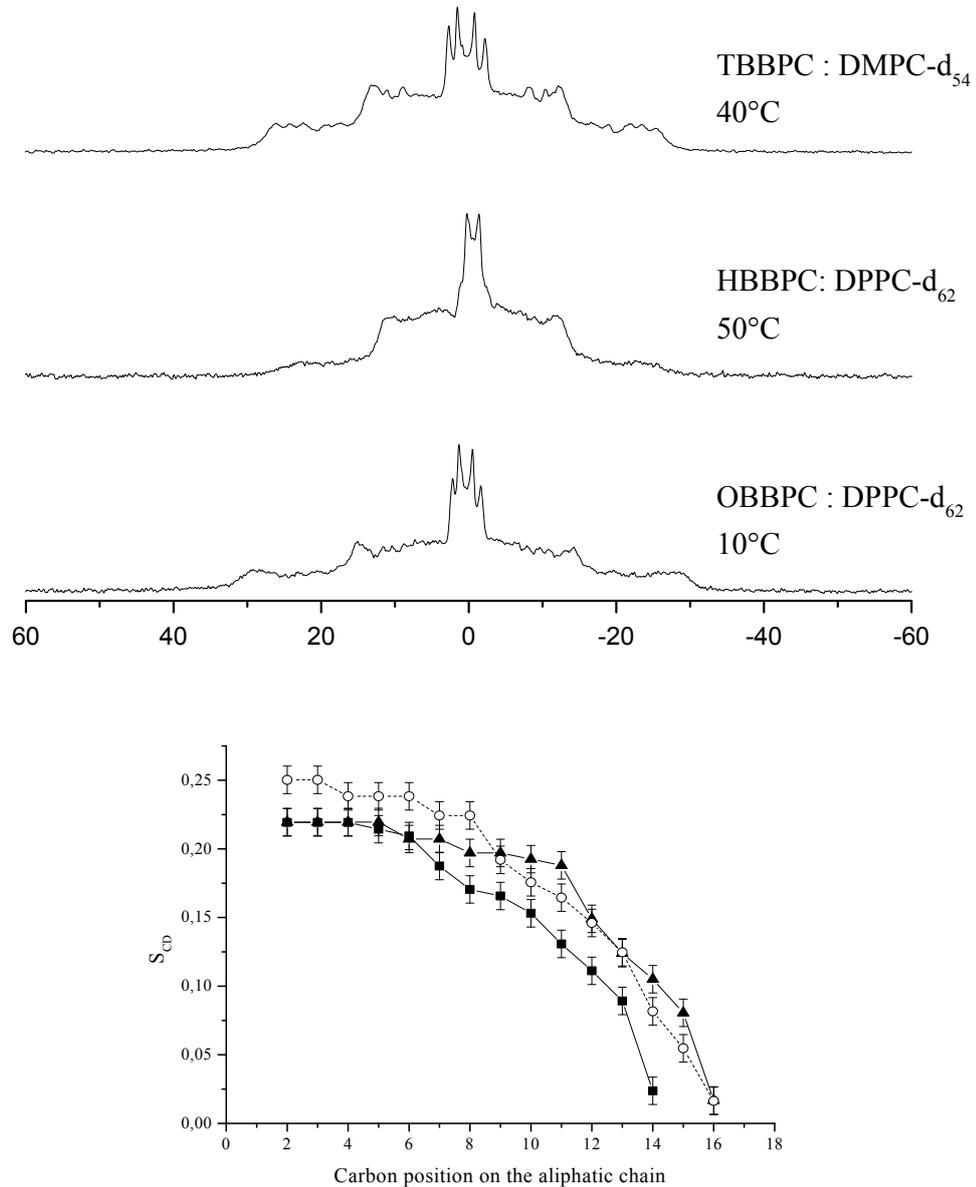
**Tableaux VI.2:** Estimation de la longueur moyenne de la chaîne aliphatique  $sn_2$  (en Å) du lipide DMPC- $^2\text{H}_{54}$  dans les liposomes TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$ , et du lipide DPPC- $^2\text{H}_{62}$  dans les liposomes HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  et OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  à une même température d'analyse de 40° C (gauche) et à une même température réduite de ≈ 43°C au-dessus de la température de transition de phase  $T_m$  de chaque lipide (droite).

### III.3.2 : Profils d'ordre pour une même température réduite de 40°C

On définit la température réduite comme l'écart (en valeur absolue) entre la température d'analyse et celle de transition de phase gel-fluide du lipide considéré (Cevc, G. 1983). Nous avons vu au début de ce chapitre que la température de transition de phase des lipides TBBPC, HBBPC et OBBPC est respectivement  $-4^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3$ ),  $+7^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 3$ ) et  $-30^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5$ ), celle du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  est quant à elle voisine de  $20^{\circ}\text{C}$  (Guard-Friar 1985) (Aussenac 2003) et celle de DPPC- $^2\text{H}_{62}$  est de  $39^{\circ}\text{C}$  (Davis, 1979).

Dans le cas des expériences précédentes effectuées à  $40^{\circ}\text{C}$ , la température réduite n'est pas la même pour les trois lipides (écart de  $44^{\circ}\text{C}$  pour le TBBPC, de 33 degrés pour le HBBPC et de 70 degrés pour le OBBPC). Or il est intéressant de comparer leur dynamique dans les mêmes conditions de températures réduites. La figure VI.9 présente les spectres RMN des solides- $^2\text{H}$  des liposomes TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$  à  $40^{\circ}\text{C}$  (écart de  $44^{\circ}\text{C}$  par rapport à la  $T_m$  de  $-4^{\circ}\text{C}$ ), HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  à  $50^{\circ}\text{C}$  (écart de  $43^{\circ}\text{C}$  par rapport à la  $T_m$  de  $7^{\circ}\text{C}$ ) et OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  à  $10^{\circ}\text{C}$  (écart de  $40^{\circ}\text{C}$  par rapport à la  $T_m$  de  $-30^{\circ}\text{C}$ ) ainsi qu'une superposition de leurs profils d'ordre  $S_{\text{CD}}=f$  (position du carbone sur la chaîne aliphatique). Les profils d'ordre obtenus sont différents de ceux obtenus à la température d'analyse de  $40^{\circ}\text{C}$ . Les paramètres d'ordre des positions 2 à 7 sont équivalentes entre les systèmes biphényles  $\text{C}_{14:0}$  et  $\text{C}_{16:0}$  alors que ceux des positions 8 à 16 sont plus grands pour le système  $\text{C}_{16:0}$  que pour le système  $\text{C}_{14:0}$ . Par ailleurs, la longueur moyenne des deux chaînes aliphatique  $sn_1$  et  $sn_2$  du lipide DPPC- $^2\text{H}_{62}$  dans les liposomes HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95 :5) est estimée à  $11,8\text{\AA}$  (voir tableaux VI.2), donc supérieure à celle du DMPC- $^2\text{H}_{54}$  dans TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95:5) qui est évaluée à  $10,4\text{\AA}$ . L'effet de rigidité lié à la longueur de chaîne plus importante pour le lipide biphényle  $\text{C}_{16:0}$  se fait donc ressentir surtout en milieu et en bout de chaîne du lipide DPPC- $^2\text{H}_{62}$ .

La dynamique du système OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  est quant à elle plus difficile à interpréter car le lipide OBBPC n'est pas exactement à la même température réduite ( $40^{\circ}\text{C}$ ) que les autres lipides ( $43^{\circ}\text{C}$  et  $44^{\circ}\text{C}$ ). Ceci pourrait expliquer la dynamique plus importante des positions 2 à 9 par rapport aux systèmes biphényles  $\text{C}_{14:0}$  et  $\text{C}_{16:0}$ ; Les paramètres d'ordre des positions 10 à 16 sont équivalents à ceux du système  $\text{C}_{16:0}$  en tenant compte des barres d'erreur. De même, la longueur moyenne des chaînes  $sn_1$  et  $sn_2$  de DPPC- $^2\text{H}_{62}$  dans OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  est estimée à  $12\text{\AA}$ , donc similaire à celle du DPPC- $^2\text{H}_{62}$  dans HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$ .



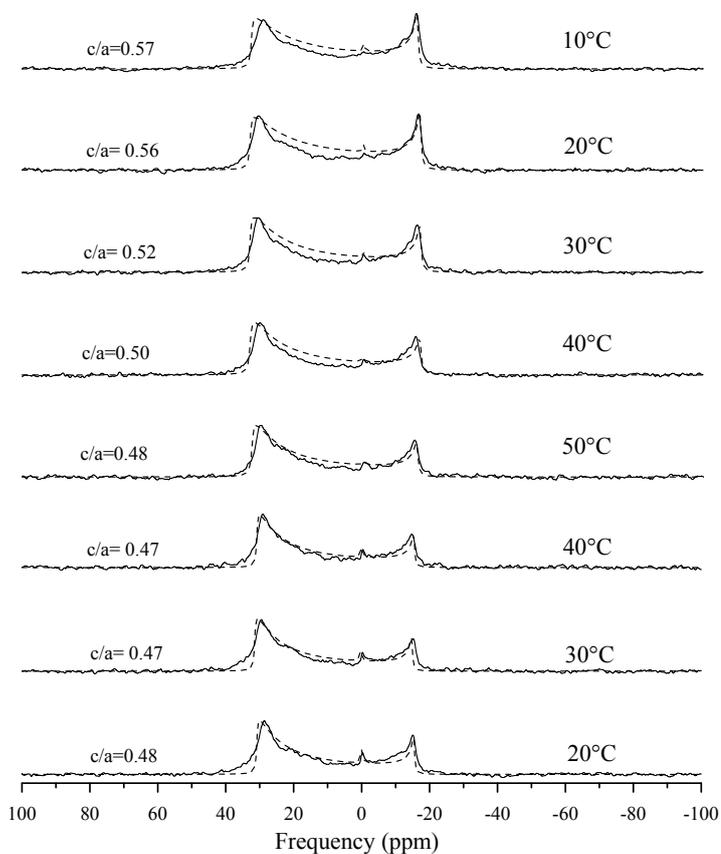
**Figure IV.9:** En haut, spectres RMN des solides  $^2\text{H}$  (séquence écho solide) de liposomes TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (95:5), HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95:5), et OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (95:5), pour une hydratation de 90% dans  $\text{H}_2\text{O}$  dédeutérée + 0,1M NaCl, avec 3 cycles chaud froid. Chaque spectre est le résultat de 5120 scans et est enregistré sous un champ magnétique de 18,8T. Les températures d'analyses (indiquées à droite de chaque spectre) correspondent à la même température réduite de  $\approx 43^\circ\text{C}$  au-dessus de la température de transition de phase  $T_m$  de chaque lipide.

En bas, superposition des profils d'ordre reportant la moyenne des paramètres d'ordre  $S_{CD}$  calculés pour les deux chaînes aliphatiques  $sn_1$  et  $sn_2$  en fonction de la position des carbones sur les chaînes du lipide DMPC- $^2\text{H}_{54}$  inséré dans les liposomes TBBPC:DMPC- $^2\text{H}_{54}$  (■), et du lipide DPPC- $^2\text{H}_{62}$  inséré dans les liposomes HBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (▲) et OBBPC:DPPC- $^2\text{H}_{62}$  (○ courbe en pointillés), pour une hydratation de 90% dans  $\text{H}_2\text{O}$  dédeutérée avec 0,1 M NaCl.

Si la température réduite était exactement la même pour les trois lipides, la dynamique des carbones des positions 10 à 16 de DPPC- $^2\text{H}_{62}$  dans OBBPC serait sûrement intermédiaire entre le TBBPC et HBBPC, du là encore à la présence de l'insaturation qui contre-balance l'effet de la longueur de chaîne. Ainsi, à la température réduite de  $\approx 43^\circ\text{C}$ , l'effet de la longueur de chaîne ou de l'insaturation se fait davantage ressentir en milieu et bout de chaîne lipidique.

**III.4: Analyse par RMN des solides  $^{31}\text{P}$  des liposomes mixtes  
TBBPC:HBBPC:OBBPC (1/3:1/3:1/3).**

La caractérisation des nouveaux lipides HBBPC et OBBPC présente un intérêt biologique puisque les chaînes en  $\text{C}_{18:1}$  et en  $\text{C}_{16}$  sont plus représentatives des membranes naturelles que les chaînes en  $\text{C}_{14:0}$ . Nous avons donc décidé de formuler des liposomes mixtes à partir des trois lipides biphényles en proportion égale (1/3:1/3:1/3), préparés avec un cycle chaud froid et une hydratation de 90% dans  $\text{H}_2\text{O}$  contenant 100 mM de NaCl. Les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  obtenus sont présentés dans la figure VI.10. On observe que plus la température augmente, plus le signal relatif à l'orientation  $\theta=0^\circ$  devient intense et celui associé à  $\theta=90^\circ$  diminue progressivement. Ces liposomes biphényles mixtes se déforment donc en oblate, comme les liposomes biphényles neutres. La simulation des spectres a permis d'obtenir le rapport  $c/a$  pour chaque température, qui est égal par exemple à 0,50 à  $40^\circ\text{C}$ . En comparaison, les rapports  $c/a$  obtenus pour les liposomes TBBPC, HBBPC et OBBPC sont respectivement égaux à 0,33, 0,36 et 0,39 pour la même température. La déformation des liposomes biphényles mixtes est donc moins importante que celles des liposomes biphényles neutres dans les mêmes conditions de températures. Il faut également noter qu'un seul  $\Delta\sigma$  est observé pour toutes les températures alors qu'on aurait pu en attendre trois, un pour chaque lipide ; en effet d'après les spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  de la figure VI.7, les liposomes TBBPC, HBBPC et OBBPC présentent chacun des  $\Delta\sigma$  différents. Ceci traduit une bonne homogénéité de l'échantillon, les trois lipides se mélangeant intimement sans former des domaines ou de séparation de phases. Comme pour les liposomes biphényles neutres, on constate que la déformation en oblate des liposomes TBBPC:HBBPC:OBBPC (1/3:1/3:1/3) est accentuée avec la température ( $c/a$  passe de 0,57 à  $10^\circ\text{C}$  à 0,50 à  $40^\circ\text{C}$ .) et qu'il y a un effet d'hystérèse ; le spectre obtenu à  $20^\circ\text{C}$  en descente en température présente une déformation en oblate plus importante ( $c/a=0,47$ ) par rapport à celle du premier spectre à  $20^\circ\text{C}$  ( $c/a=0,56$ ) obtenu après deux heures dans le spectromètre.



**Figure VI.10:** Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) expérimentaux et simulés (pointillés) de liposomes mixtes TBBPC:HBBPC:OBBPC (1/3:1/3:1/3) obtenus avec un cycle chaud-froid-agitation,  $h=90\% \text{H}_2\text{O}+0.1\text{M NaCl}$  dans un champ magnétique de 18,8T pour des températures allant de 10°C à 50° (en montée) et de 50°C à 20°C (en descente). Chaque spectre est le résultat de 1024 scans. La valeur du rapport c/a obtenue par simulation spectrale est indiquée à gauche de chaque spectre.

## IV. Discussion.

Nous pouvons résumer les résultats obtenus comme suit :

- i. La synthèse des nouveaux lipides HBBPC et OBBPC donne des rendements satisfaisants, équivalent à celui de la synthèse du lipide TBBPC.
- ii. La température de transition de phase de TBBPC, HBBPC et OBBPC est très basse, les trois lipides offrent donc une gamme en température en phase fluide très large.
- iii. La déformation en oblate dans  $B_0$  est également obtenue pour les liposomes formulés avec les nouveaux lipides de tous les systèmes dans  $B_0$  et orientation différente de la tête polaire.
- iv. La dynamique des chaînes aliphatiques des trois systèmes étudiés est similaire.

Nous allons dans ce qui suit discuter ces résultats un par un:

### VI.1: Synthèse des nouveaux lipides :

Il faut tout d'abord noter que les méthodes de synthèse du lipide TBBPC ont été facilement appliquées à celles des nouveaux lipides HBBPC et OBBPC ; ceux-ci ont en effet été synthétisés avec un rendement similaire voire supérieure pour HBBPC ( $\approx 77\%$ ) et avec une pureté satisfaisante (voir chapitre III).

### VI.2: Température de transition de phase de TBBPC, HBBPC et OBBPC :

La caractérisation par RMN des solides- $^{31}\text{P}$  des liposomes HBBPC et OBBPC a permis de déterminer leur température de transition de phase gel-fluide  $T_m$ , qui est respectivement de  $7^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  et  $-30^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ , via le calcul des moments  $M_2$ . Celle du lipide TBBPC ( $T_m = -4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ) a été déterminée par Loudet, C (Loudet 2005). Nous pouvons noter que la  $T_m$  du HBBPC et celle du OBBPC sont bien inférieures à celles du lipide DPPC ( $T_m = 41^\circ\text{C}$ ), comportant deux chaînes aliphatiques en  $\text{C}_{16:0}$  et de OPPC ( $-9^\circ\text{C}$ ), comportant une chaîne  $sn_2$  en  $\text{C}_{16:0}$  et une chaîne  $sn_1$  en  $\text{C}_{18:1}$ .

Ceci prouve l'influence des deux cycles phényles sur les mouvements moléculaires de HBBPC et OBBPC, qui se traduit par une diminution importante de  $T_m$ . De même, plus la longueur de la chaîne aliphatique  $sn_1$  augmente, plus la valeur de  $T_m$  augmente, l'épaisseur hydrophobe de la membrane étant plus importante. Ce n'est pas le cas pour le lipide OBBPC, qui comporte une insaturation cis en position 9 sur la chaîne  $sn_1$  et qui présente une température de transition de phase bien plus basse. L'effet d'abaissement de la  $T_m$  exercé par

les cycles phényles s'ajoute à celui bien connu des liaisons insaturées sur les chaînes aliphatiques (Cevc 1993). Cette insaturation en milieu de chaîne induit un défaut qui augmente la fluidité membranaire et contre balance l'effet rigide imposé par la longueur de chaîne (Holte, Peter et al. 1995, Rawicz 2000). Pechhold et Trauble ont montré que les insaturations de configuration cis induisent des défauts gauches de type kink le long de la chaîne aliphatique et provoquent une perturbation dans le "packing" des chaînes, qui entraîne une flexibilité membranaire plus importante que les insaturations trans (Pechhold 1968, Trauble 1971, Niemelä 2006). Il est intéressant aussi de noter que les membranes constituées de TBBPC, HBBPC et OBBPC sont en phase fluide pour une gamme de température très importante, surtout pour le lipide OBBPC qui est en phase fluide pour des températures négatives bien inférieures à 0°C. Cette spécificité peut-être un atout pour des applications biophysiques.

### **VI.3: Déformation dans $B_0$ :**

La déformation en oblate est obtenue pour les liposomes HBBPC et OBBPC, donc avec une longueur de chaîne plus importante que TBBPC et avec la présence d'une insaturation en milieu de chaîne  $sn_1$  pour OBBPC, ce qui prouve une fois de plus que les cycles phényles sont la clé de la déformation en oblate. L'anisotropie de susceptibilité magnétique des lipides HBBPC et OBBPC a été calculée, suivant la même méthode utilisée au chapitre IV, et est égale respectivement à  $6,6.10^{-3} \pm 0,3 \text{ A.m}^{-1}$  et  $4,4.10^{-3} \pm 0,3 \text{ A.m}^{-1}$  en comparaison avec  $\Delta\chi$  (TBBPC) =  $9,1.10^{-3} \pm 0,3 \text{ A.m}^{-1}$ . Etant donnée l'erreur importante ( $0,003 \text{ A.m}^{-1}$  due notamment à l'approximation faite sur k et r), on peut considérer que les  $\Delta\chi$  des trois lipides biphényles sont équivalents. Cette déformation est plus prononcée pour TBBPC que pour HBBPC et OBBPC pour une même température d'analyse. Nous avons vu dans le chapitre IV qu'en se basant sur la relation établie par Puente (Fernandez-Puente 1994), la constante d'élasticité (k) est proportionnel au carré de l'épaisseur de la bicouche (b), ainsi, nous pouvons dire que plus la longueur aliphatique augmente, plus b et k augmentent. Ainsi, plus la longueur de chaîne est importante, plus le système serait rigide et moins il se déforme. Toutefois, pour une même température d'analyse de 40°C, l'écart par rapport à la température de transition de phase est de 44°C pour TBBPC et de 33°C pour HBBPC. La fluidité membranaire augmentant avec la température, le système en  $C_{14:0}$  est donc plus mobile à 40°C que celui en  $C_{16:0}$ , ce qui peut expliquer pourquoi la déformation en oblate est plus importante. Par ailleurs, pour le système en  $C_{18:1}$ , la  $T_m$  est de  $\approx -30^\circ\text{C}$ , donc à 40°C on est à

70°C au-dessus de la  $T_m$ , ce qui devrait entraîner une déformation plus importante que pour les deux systèmes  $C_{14:0}$  et  $C_{16:0}$  or ce n'est pas le cas. On peut penser que c'est l'insaturation en position 9 et 10 sur la chaîne  $sn_1$  qui induit cette diminution de la déformation en oblate des liposomes OBBPC.

L'augmentation plus prononcée de l'anisotropie de blindage électronique pour les liposomes OBBPC par rapport à ceux HBBPC et TBBPC peut s'interpréter par une dynamique et/ou une orientation des têtes phosphore des lipides OBBPC différente de celle de HBBPC et TBBPC, qui présentent un  $\Delta\sigma$  proche. Ce phénomène pourrait donc provenir de la présence de l'insaturation.

Enfin, en formulant des liposomes mixtes TBBPC:HBBPC:OBBPC (1/3:1/3:1/3), la déformation en oblate est toujours observée et il n'y a pas de séparation de phase ni d'apparition de nouveaux domaines, même si la déformation est moins importante que pour les liposomes biphényles neutres. Pour approfondir ces analyses, il serait intéressant de caractériser la déformation des systèmes binaires (HBBPC : OBBPC), (TBBPC : HBBPC) et (TBBPC : OBBPC) 50/50, 25/75 ou autre, et d'insérer le lipide biphényle TBBPC, HBBPC ou OBBPC dans des liposomes DMPC et voir à partir de quel pourcentage de lipide biphényle la déformation change de prolata à oblate et inversement.

#### **VI.4: Dynamique des chaînes aliphatiques :**

L'autre point important est la dynamique relativement identique des chaînes lipidiques au sein des liposomes TBBPC, HBBPC et OBBPC. En effet, la comparaison de leurs spectres RMN des solides- $^2H$  et de leurs profils d'ordre aussi bien pour la même température d'analyse que la même température réduite, montre que les différences sont faibles. Toutefois, plus la longueur de la chaîne aliphatique augmente, plus le système est rigide, et la présence d'une insaturation contre-balance l'effet de la longueur de chaîne en augmentant la fluidité membranaire.

Comme nous avons déjà mentionné, des lipides deutérés, disponibles commercialement, ont été utilisés comme marqueur pour sonder par RMN des solides- $^2H$  les mouvements des chaînes lipidiques. Afin de montrer que ces sondes deutérées n'ont pas d'effet sur la dynamique du système, une comparaison à titre comparatif a été effectuée entre les paramètres d'ordre associés aux groupements aliphatiques des chaînes lipidiques du lipide TBBPC- $^2H_{27}$  formulé en liposomes à 30°C dans un champ magnétique  $B_0 = 11,7T$  (obtenus dans le cadre de la thèse de Cécile Loudet, 2006) et ceux du DMPC- $^2H_{54}$  inséré dans les

liposomes TBBPC:DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> à 40°C dans B<sub>0</sub>=18,8T (voir tableau VI.3). Les paramètres d'ordre obtenus, même s'ils ne sont pas à la même température d'analyse sont tout à fait comparables ; la présence de 5% (en moles) de lipide deutéré ne perturbe donc pas la dynamique globale du système.

CD <sub>2</sub> position on the aliphatic chain	S <sub>CD</sub> (TBBPC- <sup>2</sup> H <sub>27</sub> ) T=30°C	S <sub>CD</sub> (TBBPC : DMPC - <sup>2</sup> H <sub>54</sub> ) T=40°C
2	0.227	0.213
3	0.227	0.213
4	0.227	0.213
5	0.218	0.213
6	0.204	0.213
7	0.192	0.207
8	0.172	0.193
9	0.153	0.174
10	0.138	0.150
11	0.112	0.140
12	0.076	0.115
13	0.05	0.101
14	0.024	0.022

**Tableau VI.3** : Comparaison entre les paramètres d'ordre associés aux groupements aliphatiques des chaînes lipidiques sn<sub>1</sub> du lipide TBBPC-<sup>2</sup>H<sub>27</sub> formulé en liposomes à 30°C dans un champ magnétique B<sub>0</sub> =11,7T (obtenus dans le cadre de la thèse de Cécile Loudet, 2006) et ceux du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> inséré dans les liposomes TBBPC:DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> à 40°C dans B<sub>0</sub>=18,8T.

La caractérisation des nouveaux lipides HBBPC et OBBPC présente donc deux relevances ; un premier aspect biologique puisque les chaînes en C<sub>18:1</sub> et en C<sub>16:0</sub> sont plus représentatives des membranes biologiques que les chaînes en C<sub>14:0</sub>. L'autre aspect mis en jeu est physico-chimique, puisqu'il s'agit d'une augmentation de l'effet hydrophobe (augmentation de la longueur de chaîne) et de la fluidité membranaire (ajout d'insaturations).

## **V. Conclusion**

La structure des lipides TBBPC, HBBPC et OBBPC influe directement sur leurs propriétés physico-chimiques. Tout d'abord, le caractère "insaturé" des deux cycles phényles, la longueur et le degré d'insaturation de la chaîne sn1 jouent sur la température de transition de phase des lipides, estimée autour de  $-4^{\circ}\text{C}$  pour TBBPC,  $7^{\circ}\text{C}$  pour HBBPC et  $-30^{\circ}\text{C}$  pour OBBPC. Ensuite la déformation en oblate des liposomes biphényles est conservée, de par la présence de l'unité biphényle, même avec une longueur de chaîne plus grande ou avec la présence d'une insaturation. Enfin, la dynamique des chaînes lipidiques est très similaire pour les trois systèmes étudiés. Nous allons maintenant étudier les applications des lipides biphényles dans l'étude structurale et orientationnelle par RMN des solides des peptides ou protéines membranaires.

## CHAPITRE VII

### **Applications des liposomes Biphényles et Saturés à l'étude structurale et orientationnelle de peptides et protéines membranaires par RMN des Solides $^{15}\text{N}$ et $^{31}\text{P}$ .**



## I. Introduction

Ce chapitre aborde les applications potentielles des liposomes biphényles et saturés, de par leur déformation respective en oblate et prolata dans le champ magnétique, comme modèles membranaires pour l'étude structurale et orientationnelle de biomolécules telles que les peptides et les protéines, par RMN des solides- $^{15}\text{N}$  et  $^{31}\text{P}$ .

Deux types de biomolécules uniformément marquées  $^{15}\text{N}$  seront analysés : un lipopeptide de 7 acides aminés, appelé Surfactine (SF) et la protéine membranaire de l'enveloppe du bactériophage, nommée Pf<sub>1</sub>, formé de 46 acides aminés.

## II. Matériaux et méthodes:

### II.1. Matériaux:

La synthèse de la chaîne carbonée de sept acides aminés du lipopeptide SF- $^{15}\text{N}$  a été réalisée par Benoit Odaert du laboratoire CBMN. La surfactine a été produite sous forme  $^{15}\text{N}$  marquée en milieu Landry à 35°C avec une souche de Bacillus Subtilis pendant 5 jours. Le protocole décrit par Volpon et al (Volpon, Besson et al. 2000) a été suivi. Le milieu Landry contient 20g de glucose, 2g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5g de  $\text{MgSO}_4$ , 0,5g de  $\text{KCl}$ , 6,8g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2mg de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , 0,4mM de  $\text{MnSO}_4$  et 1,6mgde  $\text{CuSO}_4$  par litre. Le pH de culture a été ajusté à 7,7. Les lipopeptides produits sont extraits du milieu de culture par changement de pH dans l'eau et solubilisation dans 100% méthanol. A un pH de 2,5; ils forment un précipité et à un pH de 7 dans l'eau, ils sont solubles. Après pré-purification par saut de pH, les lipopeptides pré-purifiés sont dissous avec un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{Acétonitrile}$  (20/80). Les isoformes sont ensuite séparées par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse par un gradient de 30 minutes avec comme conditions finales  $\text{H}_2\text{O}/\text{Isopropanol}$  (20/80) et un débit de 1 ml/min. On obtient alors trois formes avec des chaînes carbonées en  $\text{C}_{13}$  (48%, poids de 1008 Daltons),  $\text{C}_{14}$  (31%, poids de 1022D) et  $\text{C}_{15}$  (21%, poids de 1036D). Seule la forme avec la chaîne en  $\text{C}_{13}$  a été utilisée pour notre travail.

La protéine membranaire de l'enveloppe du bactériophage Pf<sub>1</sub>- $^{15}\text{N}$  (46 résidus) provient du laboratoire du Professeur Stanley Opella, UCSD, CA, USA. Le protocole de synthèse est décrit dans (Thiriot, Nevzorov et al. 2004).

Le lipide HBBPC, synthétisé selon le mode opératoire détaillé dans le chapitre III, et le lipide DMPC, fournis par Avanti Polar Lipids, ont été utilisés dans le cadre de ce chapitre.

## **II.2. Méthodes:**

### **II.2.1. Formation de liposomes :**

#### *a) Insertion de SF-<sup>15</sup>N dans les liposomes DMPC et HBBPC*

Pour la formation des liposomes DMPC et HBBPC contenant le lipopeptide Surfactine uniformément marqué <sup>15</sup>N sur ses sept acides aminés, une solution mère de SF dans du chloroforme de concentration définie en peptide est tout d'abord préparée. Le volume nécessaire de cette solution mère est ensuite ajouté à 30 mg de lipide (DMPC ou HBBPC) en respectant un rapport molaire peptide/lipides  $R_i = 1/50$  (3mM/0,16M). Le solvant est évaporé sous flux d'azote gaz, l'échantillon est ensuite hydraté avec de l'eau distillée puis lyophilisé pour éliminer toutes traces de solvants organiques. Les poudres de SF-<sup>15</sup>N et de lipides, parfaitement mélangés et débarrassés de solvant organique, sont ensuite hydratés en respectant une hydratation finale de 80% dans du tampon tris (50mM à pH=6,5). Des liposomes sont ensuite formés en effectuant trois cycles chaud-froid-agitation.

#### *b) Insertion de Pf<sub>1</sub>-<sup>15</sup>N dans des liposomes de DMPC et HBBPC.*

Une solution mère de Pf<sub>1</sub> uniformément marqué <sup>15</sup>N dans du TFE (trifluoroéthanol) de concentration définie est préparée. Le volume nécessaire de cette solution mère est ensuite ajouté à 30 mg de lipides (DMPC ou HBBPC), en respectant un rapport molaire peptide/lipide  $R_i = 1/140$  (1,1mM/0,16M). Après évaporation du solvant organique sous flux d'azote gaz, hydratation de l'échantillon dans de l'eau distillée et lyophilisation, les poudres obtenues sont hydratées (h=80%) avec du tampon Tris (50mM, pH=6,5). Des liposomes sont ensuite formés en effectuant trois cycles chaud-froid-agitation.

### **II.2.2. Paramètres d'acquisition des expériences RMN :**

Pour les analyses par RMN des solides <sup>15</sup>N, la séquence dite CP (Cross Polarisation) a été utilisée (Hartmann 1962). Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, le principe de cette séquence repose sur un transfert de polarisation des noyaux <sup>1</sup>H, dont la susceptibilité magnétique  $\chi_H$  est importante, vers les noyaux <sup>15</sup>N, dont  $\chi_N$  est plus faible; ces deux noyaux interagissant via un couplage dipolaire. Avant de lancer l'acquisition, il est nécessaire de régler, sur un échantillon référence (dans notre cas, la glycine marquée <sup>15</sup>N en poudre ou en solution dans H<sub>2</sub>O), certains paramètres de la séquence CP pour que ces derniers vérifient les

conditions d'Hartmann-Hahn; en particulier, il est important d'optimiser le temps de contact pendant lequel se fait le transfert de polarisation. Dans notre cas, nous avons utilisé un temps de contact de 1ms.

Un découplage des protons est également effectué pendant l'acquisition. En RMN des solides, les puissances associées à ce découplage sont généralement très importantes, il est donc important de vérifier que les puissances appliquées pendant une certaine durée respectent les spécificités de la sonde RMN, sans quoi celle-ci pourrait être endommagée. Le délai de relaxation, noté  $D_1$ , est également un paramètre important à régler. Ce délai dépend de la dynamique du noyau considéré, qui est liée à la nature chimique de ce dernier et à son environnement. Ainsi, le  $D_1$  associé au noyau  $^{15}\text{N}$  de la glycine de référence dans l'eau est différent de celui du noyau  $^{15}\text{N}$  du peptide SF inséré dans les liposomes biphényles. Or ce délai influe directement sur le rapport signal sur bruit enregistré. Dans le cas de la glycine  $^{15}\text{N}$  dans l'eau et pour une séquence de type simple pulse, un  $D_1$  de 20 secondes améliore le rapport signal sur bruit RMN- $^{15}\text{N}$  d'environ 40% par rapport à un délai de 5s; toutefois, plus le  $D_1$  augmente, plus le temps d'acquisition est long, il faut donc trouver le bon compromis. Pour la séquence de type CP, le délai  $D_1$  dépend de la relaxation des protons et non de l'azote 15. Nous avons considéré un  $D_1=5\text{s}$  mais ce délai n'est qu'estimé, car faute de sensibilité, une détermination précise de  $D_1$  ne peut pas être effectuée dans des temps d'acquisitions raisonnables avec ce type d'échantillon.

*i. Conditions d'acquisition pour la RMN des solides- $^{31}\text{P}$*

Les spectres RMN- $^{31}\text{P}$  découplés  $^1\text{H}$  ont été enregistrés à la fréquence de 324 MHz sur un spectromètre RMN de 18,8 Tesla, équipé d'une sonde CP MAS dual, broad band. La séquence d'Echo de Hahn a été utilisée avec un pulse  $90^\circ$  de  $6,50\mu\text{s}$ , un temps d'acquisition de 81ms. Chaque pulse est séparé d'un délai de  $40\mu\text{s}$ . Le temps de recyclage est de 5 s et l'enregistrement de chaque spectre a nécessité l'acquisition de 2048 scans. Un spectre  $^{31}\text{P}$  de référence du  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%) a été préalablement enregistré et calibré à 0 ppm et la température, réglée à  $37^\circ\text{C}$ , a été stabilisée pendant 30 min avant l'acquisition. Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, la FID a été convoluée avec une exponentielle décroissante de type  $e^{(-LBt)}$  (opération de filtrage) avec un terme LB égal à 100Hz.

ii. Conditions d'acquisition pour la RMN des solides-<sup>15</sup>N

Les spectres 1D RMN-<sup>15</sup>N des solides ont été obtenus à la fréquence de 81 MHz sur un spectromètre RMN de 18,8 Tesla, équipé d'une sonde CP MAS dual, broad band. La séquence de type Cross Polarisation a été utilisée avec un temps de contact de 3ms, un délai de recyclage D<sub>1</sub> de 5 s, un temps d'acquisition de 41ms et un pulse 90° de 6,25µs à -0,5dB. L'enregistrement des spectres a nécessité l'acquisition de 16000 scans pour la SF et de 20480 scans pour Pf<sub>1</sub>, et la température, réglée à 37°C, a été stabilisée pendant 30 min avant l'acquisition. Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, la FID a été convoluée avec une exponentielle décroissante de type  $e^{(-LBt)}$  (opération de filtrage) avec un terme LB égal à 300Hz.

iii. Conditions d'acquisition pour la RMN des liquides-<sup>15</sup>N

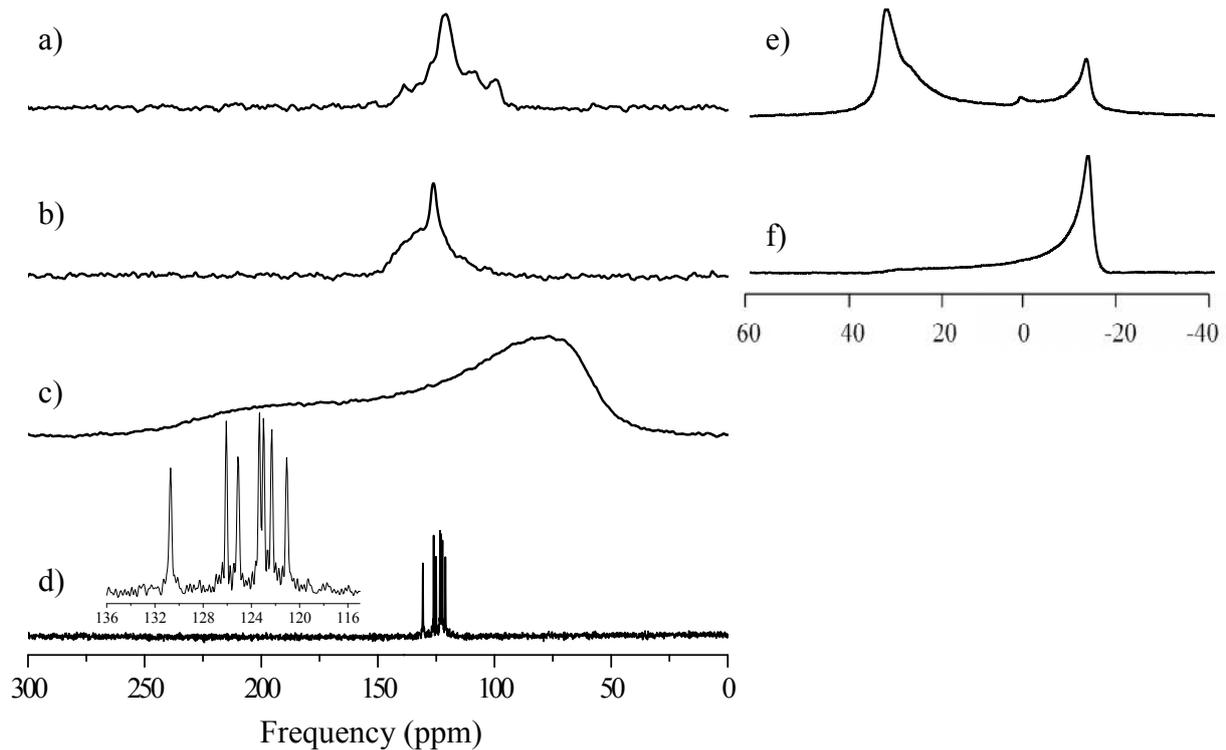
Les spectres 1D RMN-<sup>15</sup>N des liquides ont été obtenus à la fréquence de 81 MHz sur un spectromètre RMN de 18,8 Tesla, équipé d'une sonde CP MAS dual, broad band. La séquence de type zgpg (avec découplage des protons avant et pendant l'acquisition) a été utilisée avec un délai de recyclage D<sub>1</sub> de 5s, un temps d'acquisition de 48ms et un pulse 90° de 6,25µs à -0,5dB. L'enregistrement des spectres a nécessité l'acquisition de 1024 scans et la température, réglée à 37°C, a été stabilisée pendant 30 min avant l'acquisition. Afin de diminuer le bruit détecté sur le spectre RMN, le FID a été convolué avec une exponentielle décroissante de type  $e^{(-LBt)}$  (opération de filtrage) avec un terme LB égal à 1Hz.

### III. Résultats

#### III.1: Etude du lipopeptide surfactine uniformément marqué <sup>15</sup>N

##### III.1.1 : Etude par RMN des solides <sup>31</sup>P et <sup>15</sup>N

La surfactine uniformément marquée <sup>15</sup>N a été incorporée dans des liposomes HBBPC et DMPC suivant la procédure décrite précédemment. Les spectres RMN des solides-<sup>31</sup>P obtenus pour les liposomes HBBPC+SF et les liposomes DMPC+SF sont présentés respectivement en figure VII.1 e) et f). Le spectre e) est caractéristique d'une déformation en oblate avec le pic à 30ppm prédominant sur celui à -15ppm. Le rapport des intensités à  $\theta=90^\circ$  et  $\theta=0^\circ$ ,  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$  équivaut à 0,6, alors qu'il est de 0,5 pour les liposomes HBBPC sans SF pour les mêmes conditions de température et d'intensité de champ magnétique.



**Figure VII.1.** A gauche, spectres RMN des solides- $^{15}\text{N}$  (séquence de type cross polarisation) de la surfactine uniformément marquée  $^{15}\text{N}$  enregistrés sous 18,8 T à 37°C a) dans des liposomes HBBPC, b) dans des liposomes DMPC, c) sous forme de poudre. Le spectre RMN des liquide- $^{15}\text{N}$  de la SF dans  $\text{H}_2\text{O}$  d) a été enregistré avec une séquence de type zgpg à 18,8T et à 37°C.

A droite, spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) de la surfactine marquée  $^{15}\text{N}$  enregistrés sous 18,8 T à 37°C a) dans des liposomes HBBPC, b) dans des liposomes DMPC.

	$I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$	c/a ( $\pm 0.01$ )	$\Delta\sigma \pm 1(\text{ppm})$
HBBPC	0,5 ( $\pm 0.1$ )	0.44	43
HBBPC : SF	0,6 ( $\pm 0.1$ )	0.46	50
DMPC	33 ( $\pm 5$ )	1.80	47
DMPC : SF	17 ( $\pm 5$ )	1.77	48

**Tableau VII.1 :** Tableau comparatif présentant le rapport des intensités mesurées à  $\theta = 90^\circ$  ( $I_{90^\circ}$ ) et  $\theta = 0^\circ$  ( $I_{0^\circ}$ ), le rapport du semi petit axe c de l'ellipsoïde de révolution sur le semi grand axe a (c/a  $\pm 0,01$ ), l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  ( $\Delta\sigma = \sigma_{//} - \sigma_{\perp} = \sigma_{0^\circ} - \sigma_{90^\circ}$ ) à 37°C et 18,8T des liposomes DMPC, DMPC : SF (1/50), HBBPC et HBBPC : SF (1/50) préparés avec trois cycles chaud froid et une hydratation h=80%.

La simulation spectrale, qui quantifie la déformation, donne un rapport  $c/a=0,46$  pour les liposomes HBBPC+SF alors qu'il est de 0,44 pour les liposomes purs. Ainsi, la surfactine perturbe peu la déformation en oblate des liposomes HBBPC (tableau VII.1).

De plus, il faut aussi noter que l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  passe de 43 ppm pour les liposomes sans SF à 50ppm avec SF, ce qui s'explique par soit une rigidification du système après ajout de SF, soit un changement d'orientation de la tête phosphatée.

Le spectre f), relatif aux liposomes DMPC + SF, est quant à lui caractéristique d'une déformation en prolata, avec un  $c/a=1,77$  donc proche du  $c/a=1,80$  correspondant aux liposomes DMPC seuls. La présence de la surfactine ne modifie pas la déformation en prolata des liposomes DMPC.

Le spectre RMN des liquides  $^{15}\text{N}$  1D de la surfactine uniformément marquée  $^{15}\text{N}$  en solution dans  $\text{H}_2\text{O}$  (Figure VII.1.d), présente 7 pics entre 121 à 131 ppm correspondant aux sept noyaux  $^{15}\text{N}$  des sept acides aminés présents dans la chaîne carbonée peptide.

Le spectre RMN des solides  $^{15}\text{N}$  1D de la surfactine poudre, uniformément marquée  $^{15}\text{N}$ , (spectre VII.1.c)) est caractéristique d'une symétrie quasi-axiale du tenseur de blindage électronique dont l'axe principal est colinéaire à la liaison  $^{15}\text{N}-^1\text{H}$ . Une anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  de  $220\pm 10$  ppm est mesurée, ce qui est en bon accord avec les valeurs de la littérature obtenus pour les 7 acides aminés présents dans la chaîne carbonée de la surfactine (Lee 1999, Brender 2001). Le spectre RMN des solides  $^{15}\text{N}$  découplés  $^1\text{H}$  de la SF incorporée dans les liposomes DMPC (spectre VII.1.b) est clairement différent de celui obtenu pour la SF poudre, avec un  $\Delta\sigma$  diminué à  $45\pm 10$ ppm (entre 105ppm et 150ppm). En comparaison avec le spectre d) en solution, la contribution isotrope est relativement faible. Ce spectre b) prouve que la SF est insérée dans les liposomes DMPC, qui de par leur déformation en prolata dans  $B_0$ , présentent une anisotropie de blindage électronique qui diminue en faveur de l'orientation perpendiculaire par rapport à  $B_0$ . Le spectre RMN des solides  $^{15}\text{N}$  découplés  $^1\text{H}$  de la SF incorporée dans les liposomes HBBPC (spectre VII.1.a) est lui aussi différent de celui obtenu pour la SF poudre (spectre c), avec une largeur spectrale diminuée à  $55\pm 10$ ppm (entre 95ppm et 150ppm) et la contribution isotrope est quasi-nulle en comparaison avec le spectre d). Ainsi, le peptide SF est également bien inséré dans les liposomes HBBPC déformés en oblate, qui favorisent l'orientation parallèle à  $B_0$ . Par rapport au spectre  $^{15}\text{N}$  de la SF dans les liposomes DMPC, la largeur spectrale est supérieure de 10 ppm et la résolution spectrale est meilleure ; il est en effet possible de distinguer 6 signaux sur les 7 attendus relatifs aux 7 acides aminés marqués  $^{15}\text{N}$  de SF.

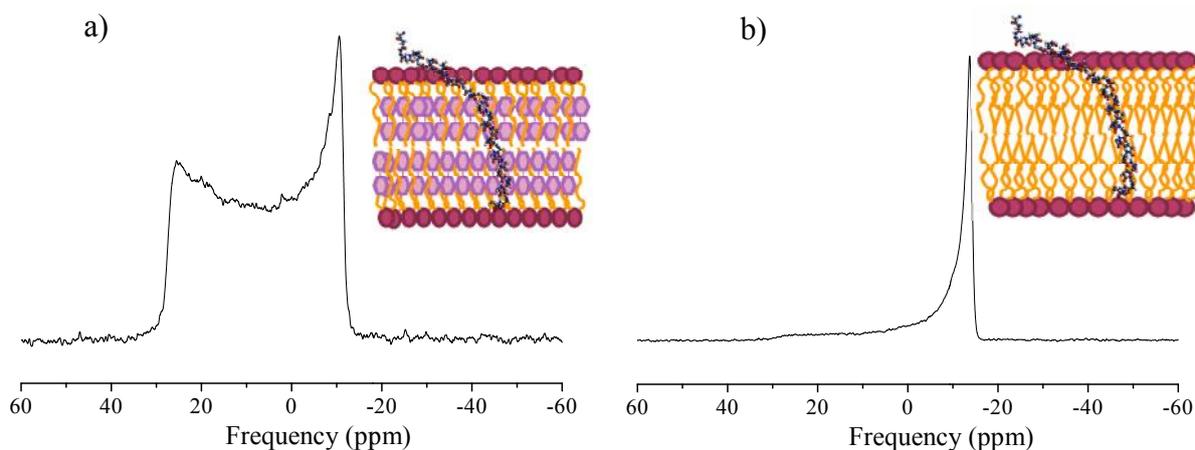
### **III.2: Etude du peptide membranaire Pf<sub>1</sub> (la protéine de l'enveloppe du bactériophage Pf<sub>1</sub>) uniformément marqué <sup>15</sup>N**

La structure, l'orientation et la dynamique de la protéine Pf<sub>1</sub> ont été analysées au sein d'un modèle membranaire de type bicelles (Park, Loudet et al. 2008, Park, Marassi et al. 2010), ainsi, il s'avère intéressant de reproduire ces expériences mais cette fois en insérant la protéine dans des liposomes biphényles.

Les spectres RMN des solides-<sup>31</sup>P correspondants aux échantillons de liposomes DMPC et HBBPC contenant la protéine Pf<sub>1</sub> avec un rapport molaire peptide/lipides de 1/140 sont présentés dans la figure VII.2. Pour les liposomes DMPC (spectre de droite), on retrouve le spectre caractéristique de la déformation en prolate des vésicules avec le pic à  $\sigma = -15$ ppm très majoritaire, ceci va de pair avec un rapport d'intensité  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$  de 26 et un ratio  $c/a$  de 1,80 qui sont donc similaires à ceux des liposomes DMPC seuls. La protéine Pf<sub>1</sub> ne perturbe donc pas la déformation en prolate des vésicules DMPC. Quant aux liposomes HBBPC (spectre de gauche), le spectre obtenu présente un pic à 25ppm plus intense que celui que l'on peut retrouver sur un spectre de poudre classique de vésicules non déformées, mais bien inférieur à celui à -15ppm. Le rapport d'intensités  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}=2,1$  et un ratio  $c/a=0,68$ , donc supérieur aux valeurs trouvées pour les liposomes HBBPC seuls (voir tableau VII.1). Les liposomes HBBPC ne présentent donc pas une déformation en oblate très prononcée en présence de la protéine Pf<sub>1</sub>.

Le spectre 1D RMN des solides <sup>15</sup>N de la protéine Pf<sub>1</sub> uniformément marquée <sup>15</sup>N insérée dans les liposomes DMPC est présenté en figure VII.3. Du signal est observé autour de 120 ppm après 20480 scans, dans la zone de déplacements chimiques attendue en comparaison avec les résultats déjà obtenus dans les bicelles en présence de Pf<sub>1</sub> (Park, Loudet et al. 2008). Ce signal est difficilement interprétable car le rapport signal sur bruit est très faible même après un nombre de scans conséquent. Il s'agirait de reproduire ces expériences en augmentant le rapport peptide/lipides.

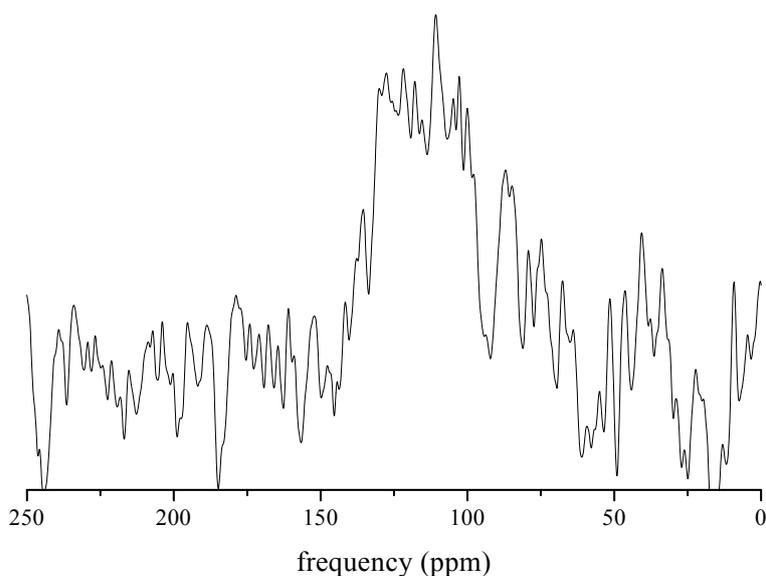
La déformation en oblate des liposomes HBBPC en présence de la surfactine n'étant pas optimale, il n'a pas été possible d'obtenir un spectre RMN des solides <sup>15</sup>N 1D pour ce système.



**Figure VII. 2 :** Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) de la protéine de l'enveloppe du bactériophage Pfl uniformément marquée  $^{15}\text{N}$  enregistrés sous 18,8 T à 40°C a) dans des liposomes HBBPC, b) dans des liposomes DMPC. A droite de chaque spectre est représenté un schéma de la protéine Pfl insérée dans la bicouche lipidique.

	$I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$	$c/a (\pm 0.01)$	$\Delta\sigma \pm 1(\text{ppm})$
HBBPC	0.5 ( $\pm 0.1$ )	0.44	43
HBBPC : Pfl <sub>1</sub>	2.1 ( $\pm 0.1$ )	0.68	42
DMPC	33 ( $\pm 5$ )	1.80	47
DMPC : Pfl <sub>1</sub>	26 ( $\pm 5$ )	1.80	46

**Tableau VII.1 :** Tableau comparatif présentant le rapport des intensités mesurées  $I_{90^\circ}/I_{0^\circ}$ , le rapport  $c/a (\pm 0,01)$ , l'anisotropie de blindage électronique  $\Delta\sigma$  à 37°C et pour  $B_0=18,8\text{T}$ , des liposomes DMPC, DMPC : Pfl<sub>1</sub> (1/140), HBBPC et HBBPC : Pfl<sub>1</sub> (1/140) préparés avec trois cycles chaud froid et une hydratation  $h=80\%$ .



**Figure VII. 3 :** Spectre RMN des solides- $^{15}\text{N}$  (séquence de type cross polarisation) de  $\text{Pfi}$  uniformément marquée  $^{15}\text{N}$  dans des liposomes DMPC, enregistré sous 18,8 T à 37°C.

#### **IV: Discussion**

Deux principaux résultats ont été obtenus dans le cadre de ce chapitre :

- i) Le peptide SF s'insère aussi bien dans les liposomes biphényles que saturés qui conservent leur déformation respective en oblate et prolatae.
- ii) La protéine  $\text{Pfi}$  s'insère bien dans les liposomes saturés sans modifier leur déformation en prolatae, mais perturbe la déformation en oblate des liposomes biphényles.

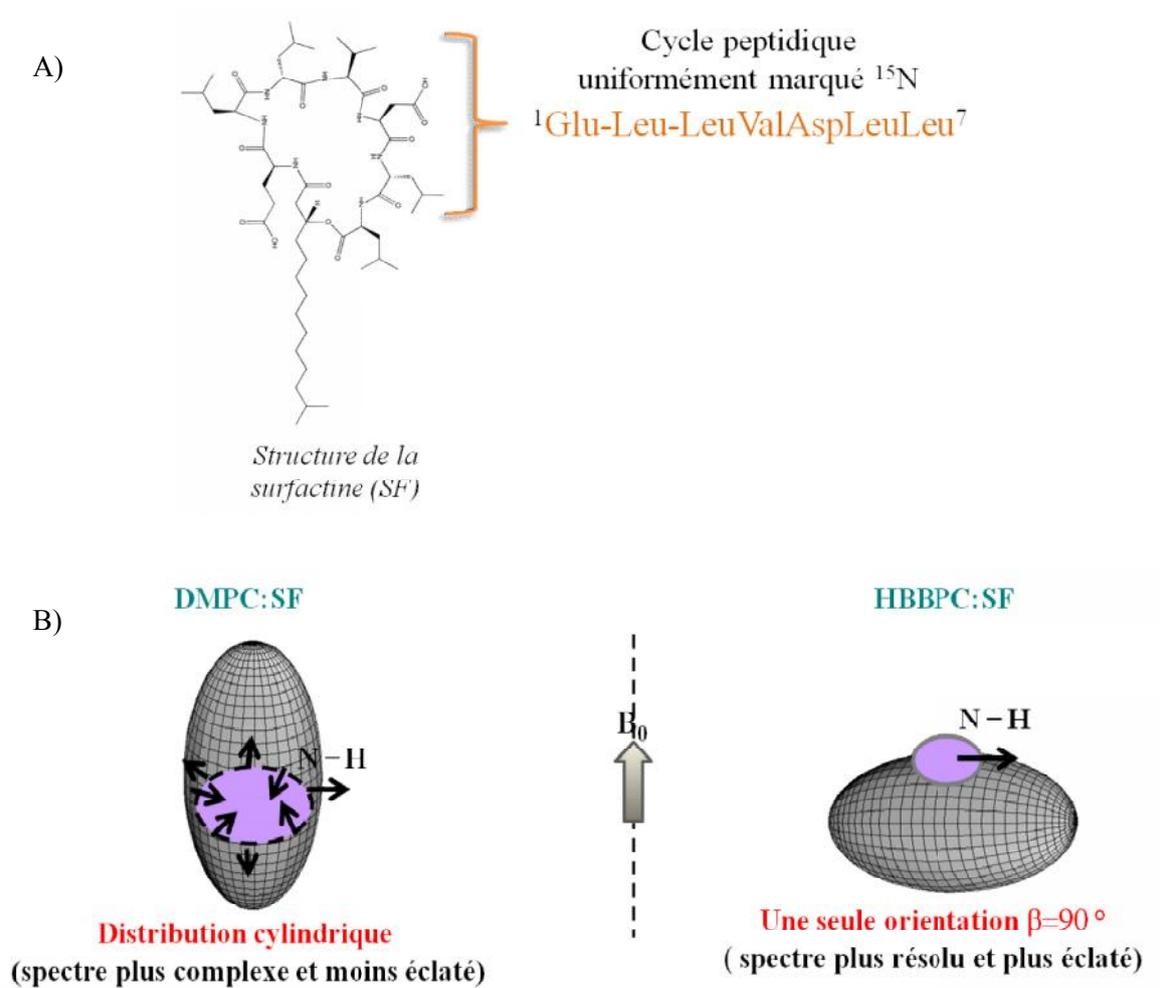
En premier lieu, les résultats de RMN des solides- $^{15}\text{N}$  et  $^{31}\text{P}$  indiquent clairement que le peptide surfactine marqué  $^{15}\text{N}$  est bien ancré dans les liposomes DMPC et HBBPC, qui conservent leur déformation spécifique en prolatae et oblate respectivement. Les contraintes de courbures imposées par la déformation des vésicules n'empêche donc pas le peptide de se lier à la membrane lipidique, que celle-ci comprennent des cycles phényles ou non. D'après Buchoux et al, 2008, le cycle peptidique de la SF est localisé à la surface de la membrane et l'ancre lipidique est insérée dans la membrane (voir chapitre I). Dans notre cas, seul le cycle peptidique est marqué  $^{15}\text{N}$  et donc détectable par RMN des solides- $^{15}\text{N}$ .

Il faut noter que la résolution des spectres RMN des solides- $^{15}\text{N}$  n'est pas optimale, les liposomes étant déformés et non orientés dans le champ magnétique comme les bicelles

DMPC/DCPC ou TBBPC/DCPC (Diller 2009). Il y a donc une distribution d'orientation des axes moléculaires des lipides et des peptides insérés plus importante que dans les bicelles (où seules les orientations  $0^\circ$  et  $90^\circ$  sont considérées), ce qui se traduit par un élargissement des raies spectrales pour les liposomes. On constate toutefois que la résolution spectrale obtenue pour les liposomes biphényles + SF est meilleure que celle des liposomes DMPC + SF.

Dans le cas des liposomes DMPC, le peptide SF- $^{15}\text{N}$ , en diffusant à la surface de la membrane, présente une distribution cylindrique de son axe moléculaire par rapport au champ magnétique statique, ce qui entraîne l'obtention d'un spectre large englobant toutes les orientations possibles entre  $0^\circ$  et  $360^\circ$ .

Par contre, dans le cas des liposomes biphényles, la diffusion du peptide à la surface de la membrane, s'effectue avec l'orientation privilégiée de  $90^\circ$  par rapport au champ magnétique. Ceci se traduit par un spectre RMN des solides- $^{15}\text{N}$  plus résolu, comprenant en majorité les signaux  $^{15}\text{N}$  correspondants à l'orientation  $90^\circ$  par rapport à  $B_0$ . Ainsi, dans le cas de la SF- $^{15}\text{N}$ , le modèle des liposomes biphényles, de par leur déformation en oblate, présente un avantage par rapport aux liposomes saturés (figure VII.4).



**Figure VII.4:** A) structure primaire du cycle peptidique de la surfactine (SF) uniformément marqué  $^{15}\text{N}$ . B) Schéma représentant la surfactine (qui se positionne à la surface) associée aux liposomes DMPC (gauche) et aux liposomes biphényles (droite).

Des analyses par modélisation moléculaire menées par Buchoux et al. sont actuellement en cours au laboratoire pour déterminer l'orientation exacte de la surfactine dans des membranes de POPC et DMPC. L'idée est de calculer le spectre RMN théorique pour une orientation donnée de SF et de le comparer ensuite au spectre expérimental RMN des solides- $^{15}\text{N}$  obtenu. On peut également noter que dans le cas de la SF, il n'est pas intéressant d'effectuer des expériences 2D de type PISEMA qui corrélerent le déplacement chimique  $^{15}\text{N}$  avec le couplage dipolaire  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , étant donné que le peptide se localise à la surface de la membrane et qu'il n'adopte pas une structure secondaire particulière de type hélice  $\alpha$  ou feuillet $\beta$ .

En second lieu, les premiers résultats obtenus avec  $\text{Pf}_1$  montrent que cette protéine, de 46 résidus, structurée en hélice  $\alpha$ , perturbe la déformation en oblate des liposomes biphényles alors qu'elle devrait la renforcer. Par contre, elle s'insère dans les liposomes saturés en conservant leur déformation en prolata. Deux hypothèses sont possibles pour expliquer ce résultat :

1) La méthode d'insertion de  $\text{Pf}_1$  dans les liposomes biphényles est à optimiser, sachant que  $\text{Pf}_1$  s'insère sans problème majeur dans les bicelles TBBPC/DCPC (Park, Loudet et al. 2008).

2) La présence de  $\text{Pf}_1$  modifie les paramètres de déformation de l'équation d'Helfrich (voir chapitre IV) des liposomes biphényles, comme par exemple, la rigidité membranaire ou l'épaisseur qui se traduit par une déformation moins prononcée en oblate.

Par manque de protéine, nous n'avons pas pu répéter ces expériences de RMN des solides- $^{31}\text{P}$  qu'il faut de toute façon renouveler avant de conclure sur l'influence de  $\text{Pf}_1$  sur la déformation en oblate des liposomes biphényles.

Concernant  $\text{Pf}_1$  inséré dans les liposomes DMPC, les premiers résultats obtenus sont très prometteurs, il s'agit maintenant de reproduire ces expériences de RMN des solides- $^{15}\text{N}$  1D en augmentant le rapport peptide /lipide (par exemple de 1/50) afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, en espérant que la déformation en prolata est toujours conservée.

Ainsi, suivant la nature des peptides ou protéines insérées dans les liposomes HBBPC et DMPC, la déformation en oblate et prolata respectivement est perturbée ou non, ce qui conditionne la poursuite des analyses structurales et orientationnelles des peptides par RMN des solides. Pour  $\text{PF}_1$ , il est particulièrement intéressant d'effectuer des expériences RMN 2D de type PISEMA comme ce qui a été fait avec les bicelles pour déterminer le tilt d'orientation du peptide  $\text{PF}_1$ , structuré en hélice alpha, dans la membrane par rapport au champ magnétique.

### Conclusion

Nous avons voulu montrer au cours de ce chapitre que les liposomes biphényles et saturés peuvent être considérés comme des modèles de biomembranes, mais nous avons vu que l'étude orientationnelle et structurale par RMN des solides- $^{15}\text{N}$  de peptides ou protéines membranaires marqués  $^{15}\text{N}$  associés à ces liposomes, est encore difficile à appliquer et nécessite davantage d'investigations. Pour les deux exemples de biomolécules choisis, le résultat avec la surfactine est le plus concluant, puisque sa présence ne perturbe ni la déformation en prolata des liposomes DMPC ni celle en oblate des liposomes biphényles et des spectres RMN des solides  $^{15}\text{N}$  1D ont pu être obtenus avec des temps d'acquisition raisonnables. Par contre, la protéine Pf<sub>1</sub> semble bien s'insérer dans les liposomes DMPC mais perturbe ceux formulés avec les lipides biphényles, résultat à confirmer en renouvelant les expériences.

Dans tous les cas, ces premiers résultats sont très prometteurs pour l'application des liposomes biphényles et saturés à l'étude structurale et orientationnelle de biomolécules, étant donné que ce sont des modèles membranaires faciles à obtenir et de grande taille donc plus représentatifs des cellules biologiques.



## CHAPITRE VIII

### **Conclusion Générale et Perspectives**



Toute notre étude est basée sur le lipide TBBPC, qui de par la présence d'une unité biphényle sur sa chaîne  $sn_2$ , présente une anisotropie de susceptibilité magnétique  $\Delta\chi$  positive, qui entraîne une déformation importante en oblate des liposomes TBBPC dans un champ magnétique intense. L'objectif de ce travail était de caractériser les différents paramètres influant sur cette déformation en oblate dans  $B_0$ , en se basant sur les travaux d'Helfrich (1973). Une comparaison avec les liposomes DMPC a été effectuée tout au long de ce travail qui s'est avérée très intéressante, mettant en évidence une déformation en prolata prononcée des liposomes DMPC dans  $B_0$ . Le but final de notre d'étude est de concevoir un nouveau modèle de biomembrane de type liposome pour l'analyse structurale, dynamique et orientationnelle de biomolécules telles que les peptides ou les protéines.

L'intérêt de notre approche est d'avoir développé les différentes étapes de la conception de ce nouveau modèle membranaire potentiel. Ainsi, après la synthèse et la caractérisation du lipide biphényle, sa formulation en liposomes a été effectuée et la déformabilité de ces derniers dans  $B_0$  a été caractérisée de manière précise. Enfin les applications de ces objets membranaires dans l'étude orientationnelle de biomolécules ont été abordées.

Cette approche multidisciplinaire a été réalisée en combinant plusieurs techniques d'analyses complémentaires (RMN, Diffusion des rayons X, Microscopies optiques et électroniques). La RMN des solides a permis en particulier de décrire à l'échelle moléculaire la structure et la dynamique locale de nos modèles via des sondes moléculaires lipidiques ou protéiques non invasives (observations des noyaux  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ).

Sur la base de Tan et al. (Tan et al., 2002) et Loudet et al (Loudet et al., 2005), nous avons réussi à synthétiser le lipide TBBPC(1-tétradécanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine), possédant un cycle biphényle greffé sur sa chaîne aliphatique  $sn_2$ , ainsi que deux autres lipides biphényles: HBBPC (1-hexanoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine) et OBBPC (oleoyl-2-(4-(4-biphényle)butanoyle)-sn-glycero-3-phosphatidylcholine) présentant respectivement des chaînes aliphatiques en  $C_{16:0}$  et  $C_{18:1}$  avec une insaturation en position 9-10. Il serait à présent intéressant de synthétiser ces nouveaux lipides avec leurs chaînes aliphatiques  $sn_1$  deutérée afin d'étudier plus précisément la dynamique de celles-ci au sein des liposomes.

L'anisotropie positive des deux cycles phényles confère à la molécule TBBPC une anisotropie de susceptibilité magnétique positive de  $9,1 \cdot 10^{-3} (\pm 0,3) \text{ N.m}^{-1}$ , à l'origine de la déformation des liposomes TBBPC en oblate, en comparaison avec celle du lipide DMPC qui présente une anisotropie magnétique négative de  $-5,8 \cdot 10^{-3} (\pm 0,3) \text{ N.m}^{-1}$  responsable de la déformation en

prolate des liposomes saturés. Cette déformation dépend donc de la nature lipidique et de l'intensité du champ magnétique mais aussi de l'élasticité membranaire et de la taille des vésicules. Ces paramètres ont été étudiés un par un afin de confirmer l'adéquation entre la théorie d'Helfrich et l'expérience.

La spectroscopie UV et la microscopie optique de fluorescence ont confirmé que le lipide TBBPC présente des propriétés de fluorescence grâce à ses deux cycles phényles sur la chaîne  $sn_2$ . Ce résultat est très prometteur car le lipide TBBPC pourrait être utilisé comme une sonde fluorescente des membranes. Il serait intéressant de quantifier l'efficacité de fluorescence du lipide TBBPC (en calculant notamment son rendement quantique) pour analyser ses applications potentielles en tant que marqueur de membranes ou de cellules sans avoir recours à des sondes exogènes. Les microscopies optiques à contraste de phase (DIC) et fluorescence nous ont permis d'obtenir pour la première fois des images de liposomes biphényles déformés par le champ magnétique, pour lesquels une taille moyenne de  $6,9\mu\text{m}$  a été déterminée, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par RMN. Les liposomes biphényles présentent une taille plus importante après déformation, mettant en relief un aspect fusogène potentiel. Il serait intéressant d'approfondir ce phénomène de fusion des vésicules sous champ magnétique, d'étudier sa réversibilité et la relation taille des vésicules avec le temps passé dans le champ magnétique.

La diffusion des rayons X aux petits angles a permis de mettre en évidence la déformation en oblate des liposomes TBBPC ainsi que leur rémanence sur 24 heures en dehors de  $B_0$ . L'empilement régulier des liposomes déformés confère au système la capacité de conserver sa déformation pendant plusieurs heures en dehors de  $B_0$ , ce qui présente un grand intérêt pour de nombreuses études biophysiques. On pourrait ainsi envisager d'analyser la structure de biomolécules associées aux liposomes préalablement déformés par dichroïsme circulaire vibrationnel, par spectroscopie Raman ou ATR. Il serait intéressant de poursuivre l'étude de cette cinétique de relaxation des liposomes TBBPC en dehors de  $B_0$  au-delà de 24 heures. De même, le temps de déformation au préalable dans le champ magnétique pourrait être modulé; on pourrait ainsi déterminer le temps minimal requis dans  $B_0$  pour observer une déformation des liposomes TBBPC ou voir si la déformation en oblate est accentuée au-delà d'une heure dans  $B_0$ .

Il serait également intéressant d'analyser la déformation en prolate des liposomes DMPC par diffusion des rayons X aux petits angles, ainsi que leur cinétique de relaxation en

dehors de  $B_0$ , afin de comparer les caractéristiques de déformations dans  $B_0$  et de relaxation en dehors de  $B_0$  des deux types de liposomes, TBBPC et DMPC.

Des liposomes formulés avec les nouveaux lipides biphényles HBBPC et OBBPC présentent également une déformation en oblate, caractérisée par RMN des solides, comparable à celle des liposomes TBBPC ; ce résultat est très intéressant et prometteur puisque les lipides en  $C_{16:0}$  et en  $C_{18:1}$  sont plus représentatifs de la membrane biologique.

L'application des liposomes biphényles à l'étude de peptides ou protéines, est l'aspect qui reste le plus à approfondir ici. Comme les bicelles biphényles et saturées, nous avons voulu montrer que les liposomes biphényles et saturés peuvent être considérés comme des modèles de biomembranes permettant d'étudier la structure de biomolécules, mais nous avons vu que l'étude orientationnelle et structurale par RMN des solides- $^{15}\text{N}$  de peptides ou protéines membranaires marqués  $^{15}\text{N}$  associés à ces liposomes, est encore difficile à appliquer et nécessite davantage d'investigations. Pour les deux exemples de biomolécules choisis, le résultat avec la surfactine est le plus concluant, puisque sa présence ne perturbe ni la déformation en prolata des liposomes DMPC ni celle en oblate des liposomes biphényles. Par contre, la protéine Pfl semble bien s'insérer dans les liposomes DMPC mais perturbe ceux formulés avec les lipides biphényles, résultat à confirmer en renouvelant les expériences.

Dans tous les cas, ces premiers résultats sont très prometteurs pour l'application des liposomes biphényles et saturés à l'étude structurale et orientationnelle de biomolécules, étant donné que ce sont des modèles membranaires faciles à obtenir et de grande taille et donc plus représentatifs des cellules biologiques. Par ailleurs, on pourrait utiliser ce type de modèle membranaire afin de fabriquer des protéoliposomes et effectuer des analyses RMN en rotation à l'angle magique de type HR-MAS.

Un autre point important est de vérifier si l'activité des biomolécules est conservée au sein des liposomes TBBPC. Il faudrait en particulier étudier l'influence des deux cycles phényles du TBBPC sur la structure et donc la fonction des biomolécules. On peut en effet envisager que leurs interactions seront différentes de celles rencontrées avec la chaîne carbonée du DMPC. Toutefois, de nombreux cycles phényles sont naturellement présents dans les molécules des membranes biologiques, comme dans le cholestérol; les liposomes biphényles possèdent donc un aspect des biomembranes supplémentaire par rapport aux systèmes saturés.

Enfin, avec l'essor des nanotechnologies de nos jours, il serait intéressant d'étudier les applications de ces nouveaux liposomes magnétiques fluorescents en tant que systèmes vecteurs pour la délivrance de médicaments ou pour effectuer de l'imagerie IRM.



# BIBLIOGRAPHIE



## A

- Abragam, A., Ed. (1961). Principles of Nuclear magnetism. London, Oxford University Press.
- Alexandre, H., Berlot, J.P., Charpentier, C. (1994). "Effect of ethanol on membrane fluidity of protoplasts from *saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* growth, with or without ethanol, measured by fluorescence anisotropy." Biotechnology techniques **8**(5): 295-300.
- Aussenac, F., Laguerre, M., Schmitter, J.M., Dufourc; E.J. (2003). "Detailed structure and dynamics of bicelle phospholipids using deuterated and perdeuterated labels  $^2\text{H}$  and molecular mechanics study." Langmuir **19**(25): 10468-10479
- Aussenac, F., Tavares, M., Dufourc, E.J. (2002). "cholesterol dynamics in membranes of raft composition: a molecular point of view from  $^2\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  solid state NMR." Biochemistry **42**: 1383-1390.

## B

- Banci, L., Bertini, I., Huber, J.G, Luchinat, C., Rosato, A. (1998). "Partial Orientation of oxidized and reduced cytochrome b5 at high magnetic fields: magnetic susceptibility anisotropy contributions and consequences for protein solution structure determination." J Am Chem Soc **120**: 12903-12909.
- Barelli, H. and B. Antony (2009). "Cell biology: Detached membrane bending." Nature **458**(7235): 159-160.
- Barry, J. A., Gawrisch, K. (1994). "Direct NMR Evidence for Ethanol Binding to the Lipid-Water Interface of Phospholipid Bilayers " **33**: 8082-8088.
- Bechinger, B. (2001). "Membrane insertion and orientation of polyalanine peptides: a  $^{15}\text{N}$  Solid State NMR Spectroscopy Investigation." Biophys J **81**: 2251-2256
- Becker, W. M., Kleinsmith, L.J., Hardin, J., Ed. (2003). The world of the cell, Benjamin/Cummings Pub. Co.
- Bloom, M., Davis, J.H., Mackay, A.L. (1981). "Direct determination of the oriented sample NMR spectrum from the powder spectrum for the systems with local axial symmetry " Chem. Phys. Letters **80**(1): 198-202.
- Bolze, J., Fujisawa, T., Nagao, T., Norisada, K., Saito, H., Naito, A. (2000). "Small Angle X-ray Scattering and  $^{31}\text{P}$  NMR studies on the phase behavior of phospholipid bilayered mixed micelles." Chem.Phys.Lett **329**: 215-220.
- Borne, M., Wolf, E. (1980). Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light, Elsevier Science
- Bothorel, P., Lussan, C. (1970). "Some new aspects of a dynamic model of biological membrane." C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. **271**(7): 680-683.
- Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." J Biol Chem **275**(23): 17221-17224.
- Brender, J. R., Taylor, D.M., Ramamoorthy, A. (2001). "Orientation of amide-nitrogen-15 chemical shift tensors in peptides: A quantum chemical study." J. Am. Chem. Soc **123**: 914-922.

Bruggeller, P., Mayer, E. (1980). "Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions." Nature **288**: 569-571.

Buchoux, S., Lai-Kee-Him, J., Garnier, M., Tsan, P., Besson, F., Brisson, A., Dufourc, E. J. (2008). "Surfactin-triggered small vesicle formation of negatively charged membranes: a novel membrane-lysis mechanism." Biophys J **95**(8): 3840-3849.

Burnett, L. J., Muller, B.H. (1971). "Deuteron Quadrupole Coupling Constants in Three Solid Deuterated Paraffin Hydrocarbons: C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>, C<sub>4</sub>D<sub>10</sub>, C<sub>6</sub>D<sub>14</sub>." The Journal of Chemical Physics **55**(12): 5829-5831.

## C

Callan-Jones, A., Sorre, B., Bassereau, P. (2011). "Curvature-driven lipid sorting in biomembranes." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(2).

Canham, P. B. (1970). "The minimum energy of bending as a possible explanation of the biconcave shape of the human red blood cell." J Theor Biol **26**(1): 61-81.

Carnie, S., Israelachvili, J. N., Pailthorpe, B. A. (1979). "Lipid packing and transbilayer asymmetries of mixed lipid vesicles." Biochim Biophys Acta **554**(2): 340-357.

Cevc, G., Ed. (1993). Phospholipid handbook.

Chen, F. Y., Hung, W.C., Huang, H.W. (1997). "Critical swelling of phospholipid bilayers." Phys Rev Lett **79**(20): 4026-4029.

Courreges-Loudet, C., Nallet, F., Dufourc, E.J., Oda, R. (2011). "Unprecedented observation of days long remanent orientation of phospholipid bicelles: a small angle X ray scattering and theoretical study." Langmuir **27**: 9122-9130.

Cullis, P. R., De Kruijff, B. (1979). "Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes." Biochim Biophys Acta **559**(4): 399-420.

Cullis, P. R., Fenske, D.B., Hope, M.J. , Ed. (1996). Physical Properties and Functional Roles of Lipids in Membranes. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes (New Comprehensive Biochemistry. Amsterdam, Elsevier Science.

## D

Das, B. B., Nothnagel, H. J., Lu, G. J., Son, W. S., Tian, Y., Marassi, F. M., Opella, S. J. (2012). "Structure determination of a membrane protein in proteoliposomes." J Am Chem Soc **134**(4): 2047-2056.

David, F., Ed. (2004). Statistical mechanics of membranes and surfaces. Singapore.

Davis, J. H. (1983). "The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by 2H-NMR." Biochim Biophys Acta **737**(1): 117-171.

Davis, J. H. (1979). "Deuterium magnetic resonance study of the gel and liquid crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine." Biophys J **27**(3): 339-358.

De Gennes, P.G. (1974). "Coil-stretch transition of dilute flexible polymers under ultra high velocity gradients." J. Chem. Phys., **60** (12), 5030-5042.

Dickey, A. N., Yim, W. S., Faller, R. (2009). "Using ergosterol to mitigate the deleterious effects of ethanol on bilayer structure." J Phys Chem B **113**(8): 2388-2397.

Diller, A., Loudet, C., Aussenac, F., Raffard, G., Fournier, S., Laguerre, M., Grélard, A., Opella, S.J., Dufourc, E.J. (2009). "Bicelles: a natural "molecular goniometer" for structural, dynamical and topological studies of molecules in membranes." Biochimie **91**: 744-751.

Douliez, J. P., Léonard, A., Dufourc, E.J. (1995). "Restatement of order parameters in biomembranes: calculation of C-C bond order parameters from C-D quadrupolar splittings." Biophys J **68**: 1727-1739.

Douliez, J. P., Léonard, A., Dufourc, E.J. (1996). "Conformational order of DMPC sn-1 versus sn-2 chains and membrane thickness: an approach to molecular protrusion by solid state  $^2\text{H}$ -NMR and neutron diffraction." J.Chim.Phys **100**: 18450-18457.

Dubinnyi, M. A., Lesovoy, D.M., Dubovskii, P.V., Chupin, V.V., Arseniev, A.S. (2006). "Modeling of  $^{31}\text{P}$  NMR spectra of magnetically oriented phospholipid liposomes: a new analytical solution." Solid State Nucl Magn Reson **29**: 305-311.

Dubochet, J., Zuber, B., Eltsov, M., Bouchet-Marquis, C., Al-Amoudi, A., Livolant, F. (2007). "How to "read" a vitreous section." Methods Cell Biol **79**: 385-406.

Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W., Schultz, P. (1988). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens." Q Rev Biophys **21**(2): 129-228.

Dubochet, J., McDowell, A. (1981). "Vitrification of pure water for electron microscopy." Journal of Microscopy **124**.

Dufourc, E. J., Buchoux, S., Toupe, J., Sani, M. A., Jean-Francois, F., Khemtemourian, L., Grelard, A., Loudet-Courreges, C., Laguerre, M., Elezgaray, J., Desbat, B., Odaert, B. (2012). "Membrane interacting peptides: from killers to helpers." Curr Protein Pept Sci **13**(7): 620-631.

Dufourc, E. J. (2008). "Sterols and membrane dynamics." J.Chem.Biol: 63-77.

Dufourc, E. J., Mayer, C., Stohrer, J., Althoff, G., Kothe, G. (1992). "Dynamics of phosphate headgroups in biomembranes: Comprehensive analysis using phosphorus-31 nuclear magnetic resonance lineshape and relaxation time measurements." Biophysical journal **61**: 42-57.

Dufourc, E. J. (1986). La résonance magnétique nucléaire du deutérium et du phosphore dans les milieux organisés. Théorie et applications à l'étude de l'action de la mélittine et de la delta-lysine sur les membranes biologiques. Thèse de l'état de l'université de Bordeaux I. France, Univeristé Bordeaux I.

Dufourc, E. J., Smith, I. C., Jarrell, H. C. (1984). "Amphotericin and model membranes. The effect of amphotericin B on cholesterol-containing systems as viewed by  $^2\text{H}$ -NMR." Biochim Biophys Acta **776**(2): 317-329.

Dufourc, E. J., Smith, I.C.P., Jarell, H.C. (1983). "A  $^2\text{H}$ -NMR analysis of dihydrosterculoylcontaining lipids in model membranes: structural effects of a cyclopropane ring." Chem.Phys.Lipids **33**: 153-177.

## E

Eckler, S. A., Kuehn, R., Gautam, M. (2005). "Deletion of N-terminal rapsyn domains disrupts clustering and has dominant negative effects on clustering of full-length rapsyn." Neuroscience **131**(3): 661-670.

Edidin, M. (2003). "The state of lipid rafts: from model membranes to cells." Annu Rev Biophys Biomol Struct **32**: 257-283.

Eggers, K., Fyles, T.M., Montoya-Pelaez, P.J. (2001). "Synthesis and characterization of photoswitchable lipids containing hemithioindigo chromophores." J.Org.Chem **66**: 2966-2977.

Egorova-Zachernyuk, T. A., Hollander, J., Fraser, N., Gast, P., Hoff, A. J., Cogdell, R., de Groot, H. J., Baldus, M. (2001). "Heteronuclear 2D-correlations in a uniformly [<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N] labeled membrane-protein complex at ultra-high magnetic fields." *J Biomol NMR* **19**(3): 243-253.

Emptage, N. J. (2001). "Fluorescent imaging in living systems." *Curr Opin Pharmacol* **1**(5): 521-525.

Evans, E., Needham, D. (1987). "Physical Properties of Surfactant Bilayer Membranes: Thermal Transitions, Elasticity, Rigidity, Cohesion, and Colloidal Interactions " *J.Phys.Chem.* **91**: 4219-4228.

Evans, E. and W. Rawicz (1990). "Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes." *Phys Rev Lett* **64**(17): 2094-2097.

## F

Farge, E. and P. F. Devaux (1992). "Shape changes of giant liposomes induced by an asymmetric transmembrane distribution of phospholipids." *Biophys J* **61**(2): 347-357.

Farsad, K. and P. De Camilli (2003). "Mechanisms of membrane deformation." *Curr Opin Cell Biol* **15**(4): 372-381.

Faure, C. and E. J. Dufourc (1997). "The thickness of cholesterol sulfate-containing membranes depends upon hydration." *Biochim Biophys Acta* **1330**(2): 248-252.

Faure, C., Tranchant, J. F., Dufourc, E. J. (1996). "Comparative effects of cholesterol and cholesterol sulfate on hydration and ordering of dimyristoylphosphatidylcholine membranes." *Biophys J* **70**(3): 1380-1390.

Fernandez-Puente, L., Bivas, I., Mitov, M.D., Meleard, P. (1994). "Temperature and chain length effects on bending elasticity of phosphatidylcholine bilayers." *Europhysics letters* **28**: 181-186.

Furnis, B. S., Hannaford, A.J., Smith, P.W.G., Tatchell, A.R., Ed. (1989). *Vogel's textbook of practical organic chemistry*, Longman.

## G

Gabriel, N. E. and M. F. Roberts (1984). "Spontaneous formation of stable unilamellar vesicles." *Biochemistry* **23**(18): 4011-4015.

Gabriel, N. E. and M. F. Roberts (1986). "Interaction of short-chain lecithin with long-chain phospholipids: characterization of vesicles that form spontaneously." *Biochemistry* **25**(10): 2812-2821.

Gabriel, N. E. and M. F. Roberts (1987). "Short-chain lecithin/long-chain phospholipid unilamellar vesicles: asymmetry, dynamics, and enzymatic hydrolysis of the short-chain component." *Biochemistry* **26**(9): 2432-2440.

Guard-Friar, D., Chen, C.H., Engle, A.S. (1985). "Deuterium isotope effect on the stability of molecules: phospholipids." *J.Phys.Chem.* **89**: 1810-1813.

Ghosh, R. (1988). "<sup>31</sup>P and <sup>2</sup>H NMR studies of structure and motion in bilayers of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine." *Biochemistry* **27**(20): 7750-7758.

Graham, T. R. and M. M. Kozlov (2010). "Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature." *Curr Opin Cell Biol* **22**(4): 430-436.

Gurtovenko, A. A., and Anwar, J. (2009). "Interaction of Ethanol with Biological Membranes: The Formation of Non-bilayer structures within the Membrane Interior and their Significance." J. Phys. Chem. B **113**: 1983-1992.

## H

Han, H. M., Zuber, B., Dubochet, J. (2008). "Compression and crevasses in vitreous section under different conditions." Journal of Microscopy **230**: 167-171.

Hartmann, S. R., Hahn, E.L. (1962). "Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame." Phys. Rev **128**(5): 2042-2053.

Hayat, M. A. (1970). Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications. London, Van Nostrand Reinhold.

Helfrich, W. (1973). "Elastic properties of lipid bilayers: Theory and Possible Experiments." Z. Naturforsch **28**: 693-703.

Helfrich, W. (1973). "Lipid bilayer spheres: deformation, and birefringence in magnetic field." physic letters **43A**(5): 409-410.

Holte, L. L., Peter, S. A., Sinnwell, T. M., Gawrisch, K. (1995). "<sup>2</sup>H nuclear magnetic resonance order parameter profiles suggest a change of molecular shape for phosphatidylcholines containing a polyunsaturated acyl chain." Biophys J **68**(6): 2396-2403.

Ingram, L. O. and T. M. Buttke (1984). "Effects of alcohols on micro-organisms." Adv Microb Physiol **25**: 253-300.

## I

Ipsen, J. H., et al. (1990). "Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol." Biophys J **57**(3): 405-412.

Israelachvili, J., Mitchell, D.J., Ninham, B.W. (1976). "Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers." J. Chem. Soc. Faraday Trans II **72**: 1525-1568.

Israelachvili, J., Mitchell, D.J., Ninham, B.W. (1977). "Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles." Biochim Biophys Acta **470**(2): 185-201.

Israelachvili, J. N., Marcelja, S., Horn, R.G. (1980). "Physical principles of membrane organization." Q Rev Biophys. **13**(2): 121-200.

## J

Jacobson, K., Dietrich, C. (1999). "Looking at lipid rafts?" Trends Cell Biol. **9**(3): 87-91.

## K

Katz, Y., Diamond, M.J. (1974). "Thermodynamic constants for non electrolyte partition between dimyristoyl lecithin and water." J. Membrane Biol **17**: 101-120.

Kaye, M. D., Schmalzl, K., Conti Nibali, V., Tarek, M., Rheinst, M.C. (2011). "Ethanol enhances collective dynamics of lipid membranes." Physical review E **83**: 50907-50911.

Ketchum, R. R., Hu, W., Cross, T. A. (1993). "High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR." Science **261**(5127): 1457-1460.

Ketchum, R. R., Lee, K. C., Huo, S., Cross, T. A. (1996). "Macromolecular structural elucidation with solid-state NMR-derived orientational constraints." J Biomol NMR **8**(1): 1-14.

Kreishman, G. P., Graham-Britain, C., Hitzemann, R.J. (1985). "determination of ethanol partition coefficients to the interior and the surface of dipalmityl-phosphatidylcholine liposomes using deuterium nuclear magnetic resonance spectroscopy." Biochem Biophys Res Commun **130**(1): 301-305.

Krueger-Koplin, R. D., et al. (2004). "An evaluation of detergents for NMR structural studies of membrane proteins." J Biomol NMR **28**(1): 43-57.

Kuhry, J. G., Fonteneau, P., Duportail, G., Maechling, C., Laustriat, G. (1983). "TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells." Cell Biophys. **5**(2): 129-140.

Kummrow, M. and W. Helfrich (1991). "Deformation of giant lipid vesicles by electric fields." Phys Rev A **44**(12): 8356-8360.

## L

Lafleur, M., Bloom, M., Eikenberry, E. F., Gruner, S. M., Han, Y., Cullis, P. R. (1996). "Correlation between lipid plane curvature and lipid chain order." Biophys J **70**(6): 2747-2757.

Lafleur, M., Fine, B., Sternin, E., Cullis, P.R., Bloom, M. (1989). "Smoothed orientational order of lipid bilayers by  $^2\text{H}$  nuclear magnetic resonance." Biophys J **56**: 1037-1041.

Lando, L. D., Lifshitz, E.M., Ed. (1986). Theory of elasticity. Oxford, Butterworth-Heinemann.

Lee, D. K., Santos, J.S., Ramamoorthy, A. (1999). "A Nitrogen-15 chemical shift anisotropy and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  dipolar coupling tensors associated with the phenylalanine residue in the solid-state." Chem. Phys. Letters **309**: 209-214.

Leonard, A., Dufourc, E.J. (1991). "Interactions of cholesterol with the membrane lipid matrix. A solid state NMR approach." Biochimie **73**: 1295-1302.

Leonard, A., Escribe, C., Laguerre, M., Pebay-Peyroula, E., Néri, W., Pott, T., Katsaras, J., Dufourc, E.J (2001). "Location of cholesterol in DMPC membranes. A comparative study by neutron diffraction and molecular mechanics simulation." Langmuir **17**: 2019-2030.

Lichtman, J. W. and J. A. Conchello (2005). "Fluorescence microscopy." Nat Methods **2**(12): 910-919.

Lipowsky, R., Sackmann, E., Ed. (1995). Structure and Dynamics of Membranes, Handbook of Biological Physics Amsterdam, Elsevier Science.

Lohman, J. A. B., Maclean, C. (1978). "Magnetic field induced alignment effects in  $^2\text{H}$  NMR spectra." Chem.Phys.Lett **58**(4): 483-486.

Lohman, J. A. B., Maclean, C. (1979). "Magnetic susceptibility anisotropies from quadrupolar magnetic field effects in high field  $^2\text{H}$  NMR." Molecular physics **38**(4): 1255-1261.

London, E. and D. A. Brown (2000). "Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts)." Biochim Biophys Acta **1508**(1-2): 182-195.

Loudet, C., Diller, A., Grelard, A., Oda, R., Dufourc., E.J . (2010). "Biphenyl phosphatidylcholine: a promoter of liposome deformation and bicelle collective orientation by magnetic fields." Progress in Lipid Research **49**: 288-297.

Loudet, C., Khemtémourian, L., Aussenac, F., Gineste, S., Achard, M., Dufourc., E.J. (2005). "Bicelles Membranes and their use for hydrophobic peptide studies by circular dichroism and solid state NMR." Biochim Biophys Acta **1724**: 315 - 323.

Loudet, C., Manet, S., Gineste, S., Oda, R., Achard, M., Dufourc., E.J. (2007). "Biphenyl bicelles disks align perpendicular to magnetic fields on large temperature scales: a study combining synthesis, solid state NMR, TEM and SAXS." Biophysical journal **92**: 3949-3959.

Ly, H. V., Longo, M.L. (2004). "The Influence of Short-Chain Alcohols on Interfacial Tension, Mechanical Properties, Area/Molecule, and Permeability of Fluid Lipid Bilayers." Biophysical journal **87**: 1013-1033.

## M

Marassi, F. M., Ma, C., Gratkowski, H., Straus, S. K., Strebel, K., Oblatt-Montal, M., Montal, M., Opella, S. J. (1999). "Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14336-14341.

Marsh, D. (2006). "Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers." Chemistry and Physics of Lipids **144**: 146-159.

Matsumori, N., Morooka, A., Murata, M. (2006). "Detailed description of the conformation and location of membrane-bound erythromycin using isotropic bicelles." J Med Chem **49**(12): 3501-3508.

McCaughan, L. and S. Krimm (1982). "Biochemical profiles of membranes from x-ray and neutron diffraction." Biophys J **37**(2): 417-426.

McDermott, A., Polenova, T., Bockmann, A., Zilm, K. W., Paulson, E. K., Martin, R. W., Montelione, G. T. (2000). "Partial NMR assignments for uniformly (<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N)-enriched BPTI in the solid state." J Biomol NMR **16**(3): 209-219.

McIntosh, T. J., Magid, A. D., Ed. (1993). Phospholipid Handbook. New York, Marcel Dekker.

McMahon, H. T. and J. L. Gallop (2005). "Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling." Nature **438**(7068): 590-596.

McMullen, T. P. W., Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N. (2004). "Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes." Current Opinion in Colloid and Interface Science **8**: 459-468.

Mehring, M. (1963). Principles of high resolution NMR in solids. Berlin, Springer-Verlag.

Meleard, P., Gerbeaud, C., Pott, T., Puente, L.F., Bivas, I., Mitov, M.D., Dufourcq, J., Bothorel, P. (1997). "Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content." Biophys J **72**: 2616-2629.

## N

Nagle, J.F., Tristram-Nagle, S. (2000). "Structure of lipid bilayers." Biochim Biophys Acta **1469**: 159-195.

Needham, D. and R. S. Nunn (1990). "Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol." Biophys J **58**(4): 997-1009.

Niemelä, P. S., Hyvönen, M.T., Vattulainen, I. (2006). "Influence of chain length and unsaturation on on sphingomyelin bilayers" *Biophys J* **90**: 851-863.

Nyblom, M., Poulsen, H., Gourdon, P., Reinhard, L., Andersson, M., Lindahl, E., Fedosova, N., Nissen, P. (2013). "Crystal Structure of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the Na<sup>+</sup>-Bound State." *Science* **342**(6154): 123-127.

## O

Oldfield, E., Meadows, M., Rice, D., Jacobs, R. (1978). "Spectroscopic studies of specifically deuterium labeled membrane systems. Nuclear magnetic resonance investigation of the effects of cholesterol in model systems." *Biochemistry* **17**(14): 2727-2740.

Opella, S. J., Kim, Y., McDonnell, P. (1994). "Experimental nuclear magnetic resonance studies of membrane proteins." *Methods Enzymol* **239**: 536-560.

Opella, S. J. and F. M. Marassi (2004). "Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy." *Chem Rev* **104**(8): 3587-3606.

Oradd, G., Shahedi, V., Lindblom, G. (2009). "Effect of sterol structure on the bending rigidity of lipid membranes: a <sup>2</sup>H NMR transverse relaxation study." *Biochim Biophys Acta* **1788**: 1762-1771.

Ozeki, S., Kurashima, H., Abe, H. (2000) " High magnetic field effects on liposomes and black membranes of dipalmitoylphosphatidylcholine: magnetoresponses in membrane potential and magnetofusion." *J Phys Chem* **104**(24): 5657-5660

## P

Pan, J., Tristram-Nagle, S., Kucerka, N., Nagle, J.F. (2008). "Temperature dependence of structure, bending rigidity and bilayer interactions of dioleoylphosphatidylcholine bilayers." *Biophys J* **94**: 117-124.

Park, S. H., et al. (2010). "Mechanically, magnetically, and "rotationally aligned" membrane proteins in phospholipid bilayers give equivalent angular constraints for NMR structure determination." *J Phys Chem B* **114**(44): 13995-14003.

Park, S. H., Loudet, C., Marassi, F. M., Dufourc, E. J., Opella, S. J. (2008). "Solid-state NMR spectroscopy of a membrane protein in biphenyl phospholipid bicelles with the bilayer normal parallel to the magnetic field." *J Magn Reson* **193**(1): 133-138.

Park, S. H., Mrse, A. A., Nevzorov, A. A., De Angelis, A. A., Opella, S. J. (2006). "Rotational diffusion of membrane proteins in aligned phospholipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy." *J Magn Reson* **178**(1): 162-165.

Park, S. H., Mrse, A.A., Nevzorov, A.A., De Angelis, A.A., Opella, S.J. (2006). "Rotational diffusion of membrane proteins in aligned phospholipid bilayers by solid state NMR spectroscopy." *J Magn Reson* **178**: 162-165.

Park, S. H., Son, W. S., Mukhopadhyay, R., Valafar, H., Opella, S. J. (2009). "Phage-induced alignment of membrane proteins enables the measurement and structural analysis of residual dipolar couplings with dipolar waves and lambda-maps." *J Am Chem Soc* **131**(40): 14140-14141.

Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B.W., Holopainen, J., Karttunen, M. (2006). "Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers." *Biophysical journal* **90**: 1121-1135.

Pechhold, W. (1968). Kolloid Z. Polym **228**(1).

Perkins, W. R., Minchey, S.R., Ahl, P.L., Janoff, A.S. (1993). "The determination of liposome captured volume." Chemistry and Physics of Lipids **64**: 197-217.

Picard, F., Paquet, M.J., Levesque, J., Bélanger, A., Auger, M. (1999). "<sup>31</sup>P NMR first spectral Moment study of the partial magnetic orientation of phospholipid membranes." Biophys J **77**: 888-902.

Pike, L. J. (2009). "The challenge of lipid rafts." J Lipid Res **50 Suppl**: S323-328.

Pillman, H. A., Blanchard, G.J. (2010). "Effects of Ethanol on the Organization of Phosphocholine Lipid Bilayers." J. Phys. Chem. B **114**: 3840-3846.

Prosser, R.S., Hwang, J.S., Vold, R.R. (1998). "Magnetically Aligned Phospholipid Bilayers with Positive Ordering: A New Model Membrane System". Biophys J **74**: 2405-2418

Prosser, R.S., Volkov, V.B., Shiyanovskaya, I.V. (1998). "Solid-State NMR studies of magnetically aligned phospholipid membranes: taming lanthanides for membrane protein studies." Biochem. Cell Biol. **76**: 443-451

Prosser, R.S., Evanic, F., Kitevski, J.L., Al abudul wahid, M.S. (2006). "Current applications of bicelles in NMR studies of membrane associated amphiphiles and proteins." Biochemistry **45** (28): 8453-8465

Pott, T., Dufourc, E.J. (1995). "Action of Mellitin on the DPPC-cholesterol liquid -ordered phase : A solid state <sup>2</sup>H and <sup>31</sup>P-NMR study." Biophys J **68**: 965-977.

Pucadyil, T. J. and S. L. Schmid (2009). "Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation." Science **325**(5945): 1217-1220.

## R

Rance, M., Byrd, R.A. (1983). "Obtaining high-fidelity spin-1/2 powder spectra in anisotropic media : phase-cycled Hahn echo spectroscopy." J. Magn. Reson **52**: 221-240.

Rawicz, W., Olbrich, K.C., McIntosh, T., Needham, D., Evans, E. (2000). "Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers." Biophys J **79**: 328-339.

Reinl, H., Brumm, T., Bayerl, T. M. (1992). "Changes of the physical properties of the liquid-ordered phase with temperature in binary mixtures of DPPC with cholesterol: A H-NMR, FT-IR, DSC, and neutron scattering study." Biophys J **61**(4): 1025-1035.

Riske, K. A., Amaral, L. Q., Lamy-Freund, M. T. (2001). "Thermal transitions of DMPG bilayers in aqueous solution: SAXS structural studies." Biochim Biophys Acta **1511**(2): 297-308.

Rowe, E. S. (1981). "Membrane:buffer partition coefficient for ethanol in dimyristoylphosphatidylcholine." Alcohol Clin Exp Res **5**(2): 259-263.

## S

Sackmann, E. (1994). "The seventh Datta Lecture. Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions." FEBS Lett **346**(1): 3-16.

- Sanders, C. R., 2nd, Schaff, J. E., Prestegard, J. H. (1993). "Orientational behavior of phosphatidylcholine bilayers in the presence of aromatic amphiphiles and a magnetic field." Biophys J **64**(4): 1069-1080.
- Sanders, C. R., Landis, G.C. (1995). "Reconstitution of membrane proteins into lipid-rich bilayered mixed micelles for NMR studies." Biochemistry **34**: 4030-4040.
- Sanders, C. R. and R. S. Prosser (1998). "Bicelles: a model membrane system for all seasons?" Structure **6**(10): 1227-1234.
- Sankaram, M. B. and T. E. Thompson (1990). "Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state  $^2\text{H}$  nuclear magnetic resonance study." Biochemistry **29**(47): 10676-10684.
- Saxton, M. J. and K. Jacobson (1997). "Single-particle tracking: applications to membrane dynamics." Annu Rev Biophys Biomol Struct **26**: 373-399.
- Schechter, E. (1990). Biochimie et Biophysique des Membranes : Aspects structuraux et fonctionnels. Paris, Masson.
- Scholz, F., Boroske, E., Helfrich, W. (1984). "Magnetic anisotropy of lecithin membranes. A new anisotropy susceptometer." Biophys J **45**(3): 589-592.
- Seelig, J. (1977). "Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes." Q Rev Biophys **10**(3): 353-418.
- Seelig, J., Borle, F., Cross, T.A. (1985). "Magnetic ordering of phospholipid membranes." Biochim Biophys Acta **814**: 195-198.
- Separovic, F. (2013). Advanced biological NMR.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-572.
- Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." Science **175**(4023): 720-731.
- Sizun, C., Aussenac, F., Grelard, A., Dufourc, E. J. (2004). "NMR methods for studying the structure and dynamics of oncogenic and antihistaminic peptides in biomembranes." Magn Reson Chem **42**(2): 180-186.
- Szekely, P., Asor, R., Dvir, T., Szekely, O., Raviv, U. (2012). "Effect of temperature on the interaction between dipolar membranes." J.Phys.Chem **116**: 3519-3524.
- Slater, S. J., Ho, C., Taddeo, F. J., Kelly, M. B., Stubbs, C. D.. (1993). "Contribution of hydrogen bonding to lipid-lipid interactions in membranes and the role of lipid order: effects of cholesterol, increased phospholipid unsaturation, and ethanol." Biochemistry **32**(14): 3714-3721.
- Studer, D., Graber, W., Al-Amoudi, A., Eggli, P. (2001). "A new approach for cryofixation by high-pressure freezing." J Microsc **203**(Pt 3): 285-294.

## T

- Tan, C., Fung, B.M., Cho, G. (2002). "Phospholipid bicelles that align with their normals parallel to the magnetic field." J.Am.Chem. Soc **124**: 11827-11832.
- Tan, Q., Zhu, Y., Li, J., Chen, Z., Han, G. W., Kufareva, I., Li, T., Ma, L., Fenalti, G., Li, J., Zhang, W., Xie, X., Yang, H., Jiang, H., Cherezov, V., Liu, H., Stevens, R. C., Zhao, Q., Wu, B. (2013).

"Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex." Science **341**(6152): 1387-1390.

Thiriou, D. S., Nevzorov, A. A., Zagayanskiy, L., Wu, C. H., Opella, S. J. (2004). "Structure of the coat protein in Pfl bacteriophage determined by solid-state NMR spectroscopy." J Mol Biol **341**(3): 869-879.

Tierney, K. J., Block, D.E., Longo, M.L. (2005). "Elasticity and phase behavior of DPPC membrane modulated by cholesterol, ergosterol and Ethanol." Biophysical journal **89**: 2481-2493.

Traïka, M., Warschawski, D.E., Recouvreur, M., Cartaud, J., Devaux, P. (2000). "Formation of unilamellar vesicles by repetitive freeze-thaw cycles: characterization by electron microscopy and <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance." Eur Biophys Journal **29**: 184-195.

Trauble, H., Haynes, D. H. (1971). Chem. Phys. Lipids **7**,: 324-335.

Triba, M. N., Zoonens, M., Popot, J. L., Devaux, P. F., Warschawski, D. E. (2006). "Reconstitution and alignment by a magnetic field of a beta-barrel membrane protein in bicelles." Eur Biophys J **35**(3): 268-275.

Triba, M. N., Devaux, P. F., Warschawski, D. E. (2006). "Effects of lipid chain length and unsaturation on bicelles stability. A phosphorous NMR study." Biophys J **91**(4): 1357-1367.

Tribet, C., Audebert, R., Popot, J. L. (1996). "Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15047-15050.

## U

Ulrich-Gally, H., Niederberger, W., Seelig, J. (1975). "Conformation and motion of the choline head group in bilayers of dipalmitoyl-3-sn-phosphatidylcholine." Biochemistry **14**(16): 3647-3652.

Ulrich, A. S. and A. Watts (1994). "Molecular response of the lipid headgroup to bilayer hydration monitored by 2H-NMR." Biophys J **66**(5): 1441-1449.

## V

Valeur, B., Berberan-Santos, M.N. , Ed. (2004). Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Wiley-VCH.

Valeur, B., Ed. (2001). Molecular Fluorescence: Principles and applications, De Boeck.

Van Ginkel, G., Van Langen, H., Levine, Y.K. (1989). "The membrane fluidity concept revisited by polarized fluorescence spectroscopy on different model membranes containing unsaturated lipids and sterols." Biochimie **71**(1): 23-32.

Vanegas, J. M., Contreras, M. F., Faller, R., Longo, M. L. (2012). "Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes." Biophys J **102**(3): 507-516.

Vanegas, J. M., Faller, R., Longo, M. L. (2010). "Influence of ethanol on lipid/sterol membranes: phase diagram construction from AFM imaging." Langmuir **26**(13): 10415-10418.

Verkade, P., Simons, P. (1997). "Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells." Histochemistry and Cell Biology **108**: 211-220.

Visscher, I., Stuart, M. C., Engberts, J. B. (2006). "The influence of phenyl and phenoxy modification in the hydrophobic tails of di-n-alkyl phosphate amphiphiles on aggregate morphology." Org Biomol Chem **4**(4): 707-712.

Vist, M. R. and J. H. Davis (1990). "Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry." Biochemistry **29**(2): 451-464.

Volpon, L., Besson, F., Lancelin, J. M. (2000). "NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from Bacillus subtilis inhibitors of phospholipase A(2)." FEBS Lett **485**(1): 76-80.

## W

Wachinger, M., Kleinschmidt, A., Winder, D., von Pechmann, N., Ludvigsen, A., Neumann, M., Holle, R., Salmons, B., Erfle, V., Brack-Werner, R. (1998). "Antimicrobial peptides melittin and cecropin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression." J Gen Virol **79 ( Pt 4)**: 731-740.

Warschawski, D. E., Arnold, A. A., Beaugrand, M., Gravel, A., Chartrand, E., Marcotte, I. (2011). "Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins." Biochim Biophys Acta **1808**(8): 1957-1974.

Warschawski, D. E., Devaux, P.F. (2005). "Order parameters of unsaturated phospholipids in membranes and the effect of cholesterol : a <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C solid-state NMR study at natural abundance." Eur Biophys J **34**: 987-996.

## Y

Yeagle, P. L. (1985). "Cholesterol and the cell membrane." Biochim Biophys Acta **822**(3-4): 267-287.

# ANNEXES



CD <sub>2</sub> positions on the aliphatic chain	S <sub>CD</sub> (DMPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +0% chol) ± 0.001	S <sub>CD</sub> (DMPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +10% chol) ± 0.001	S <sub>CD</sub> (DMPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +20% chol) ± 0.001	S <sub>CD</sub> (DMPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +30% chol) ± 0.001
2	0.200	0.240	0.310	0.349
3	0.200	0.240	0.310	0.349
4	0.200	0.240	0.310	0.337
5	0.200	0.240	0.310	0.337
6	0.200	0.233	0.310	0.328
7	0.200	0.233	0.310	0.327
8	0.188	0.233	0.298	0.318
9	0.188	0.225	0.292	0.308
10	0.182	0.206	0.279	0.297
11	0.143	0.188	0.272	0.291
12	0.115	0.153	0.234	0.234
13	0.093	0.121	0.180	0.195
14	0.023	0.029	0.042	0.046
c/a±(0.01)	1.80	1.80	1.80	1.80

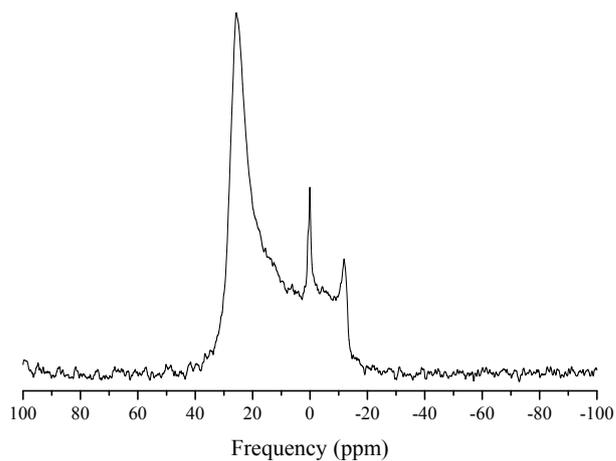
CD <sub>2</sub> positions on the aliphatic chain	S <sub>CD</sub> (TBBPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +0% chol) ± 0.001	S <sub>CD</sub> (TBBPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +10% chol ± 0.001)	S <sub>CD</sub> (TBBPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +20% chol) ± 0.001	S <sub>CD</sub> (TBBPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +30% chol) ± 0.001
2	0.213	0.241	0.294	0.372
3	0.213	0.241	0.294	0.372
4	0.213	0.241	0.294	0.372
5	0.213	0.241	0.290	0.372
6	0.213	0.241	0.287	0.372
7	0.207	0.241	0.283	0.372
8	0.193	0.241	0.279	0.350
9	0.174	0.241	0.267	0.336
10	0.151	0.208	0.262	0.319
11	0.141	0.180	0.220	0.309
12	0.115	0.153	0.187	0.287
13	0.101	0.121	0.139	0.233
14	0.022	0.026	0.033	0.037
c/a±(0.01)	0.54	0.59	0.64	0.69

**Tableau S1** : Tableau comparatif montrant les valeurs  $S_{CD}$  pour la chaîne aliphatique  $sn_2$  du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> inséré dans les liposomes DMPC:DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> et TBBPC : DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> en absence et en présence de 10%, 20% et 30% de cholestérol ainsi que la valeur du ratio c/a, avec  $B_0 = 18,8T$ ,  $T = 40^\circ C$ .

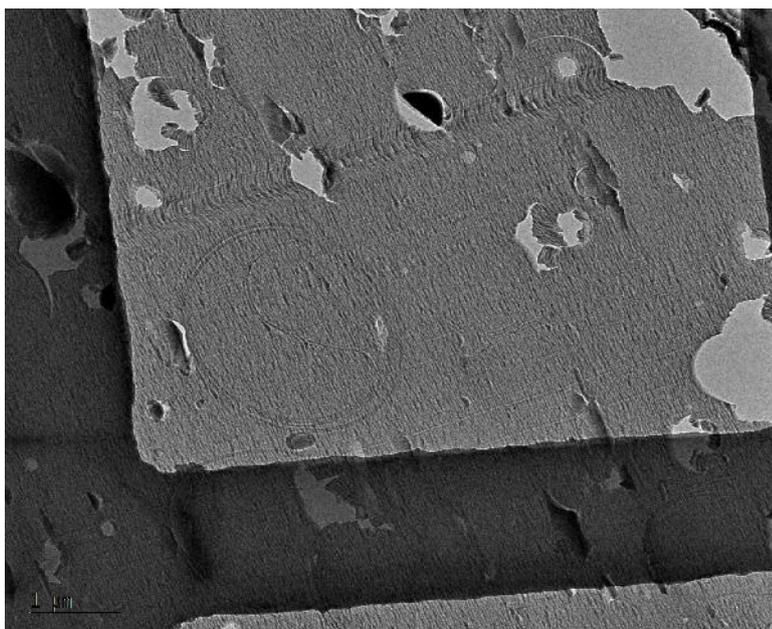
CD <sub>2</sub> positions on the aliphatic chain	S <sub>CD</sub> (DMPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +0% EtOH)	S <sub>CD</sub> (DMPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +5% EtOH)	S <sub>CD</sub> (DMPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +10% EtOH)	S <sub>CD</sub> (DMPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +15% EtOH)
2	0.200	0.192	0.180	0.167
3	0.200	0.192	0.180	0.167
4	0.200	0.192	0.173	0.152
5	0.200	0.182	0.164	0.152
6	0.200	0.182	0.164	0.152
7	0.200	0.167	0.164	0.133
8	0.188	0.167	0.147	0.125
9	0.188	0.160	0.137	0.107
10	0.182	0.139	0.120	0.097
11	0.143	0.127	0.097	0.089
12	0.115	0.104	0.089	0.077
13	0.093	0.081	0.070	0.057
14	0.023	0.019	0.018	0.016
c/a(±0.01)	1.80	1.80	1.80	1.80

CD <sub>2</sub> positions on the aliphatic chain	S <sub>CD</sub> (TBBPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +0% EtOH)	S <sub>CD</sub> (TBBPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +5% EtOH )	S <sub>CD</sub> (TBBPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +10% EtOH)	S <sub>CD</sub> (TBBPC:DMPC- <sup>2</sup> H <sub>54</sub> +15% EtOH )
2	0.213	0.179	0.16766	0.13293
3	0.213	0.179	0.16766	0.13134
4	0.213	0.179	0.1517	0.13134
5	0.213	0.179	0.14507	0.12575
6	0.213	0.167	0.14507	0.12774
7	0.207	0.167	0.13653	0.12774
8	0.193	0.157	0.12774	0.12335
9	0.174	0.157	0.12138	0.12335
10	0.151	0.129	0.11459	0.11713
11	0.141	0.119	0.09948	0.11218
12	0.115	0.102	0.07689	0.11018
13	0.101	0.080	0.06307	0.09142
14	0.022	0.020	0.01557	0.01198
c/a (±0.01)	0.54	0.50	0.50	0.50

**Tableau S2** : Tableau comparatif montrant les valeurs SCD pour la chaîne aliphatique sn<sub>2</sub> du DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> inséré dans les liposomes DMPC:DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> et TBBPC : DMPC-<sup>2</sup>H<sub>54</sub> en absence et en présence de 0%, 5%, 10% et 15% d'éthanol, ainsi que la valeur du ratio c/a, avec B<sub>0</sub>=18,8T et T=40°C.



**Figure S1:** Spectres RMN des solides- $^{31}\text{P}$  (séquence Echo de Hahn avec découplage large bande des protons) de liposomes TBBPC:DMPC (95:5) obtenus avec trois cycles chaud-froid-agitation,  $h=90\%$   $\text{H}_2\text{O}+0.1\text{M NaCl}$  dans un champ magnétique de 18.8T à  $T=40^\circ\text{C}$ .



**Figure S2 :** Cliché de cryo-microscopie électronique de sections vitreuses montrant les principaux artefacts liés à la cryo-section notamment : la compression des liposomes TBBPC ( $h=80\%$   $\text{H}_2\text{O}+20\%$  glycérol)

**Annexe: Code de programmation Matlab utilisé pour imager la déformation :**

```

ca =valeur;

Axes = 'oui';

TexteAxes = 'oui';

Ratio = 'oui';

% 'ca' correspond au rapport des axes c et a
% Si Axes = 'oui' les axes c et a sont dessinés
% Si TexteAxes = 'oui' les lettres c et a sont dessinées
% Si Ratio = 'oui' la phrase "c/a = ..." est écrite au-dessus de la figure
% Calcul de la longueur des axes à partir du ratio 'ca'
% Le plus grand axe est égal à 1

if ca >= 1
    c = 1;
    a = c/ca;
else
    a = 1;
    c = a*ca;
end

% Dessin de l'ellipsoïde
% Coordonnées du centre de l'ellipsoïde
xc = 0;
yc = 0;
zc = 0;

% Valeurs des axes de l'ellipsoïde
xr = a;
yr = c;
zr = c;

% Nombre de points pour dessiner l'ellipsoïde
n = 30;

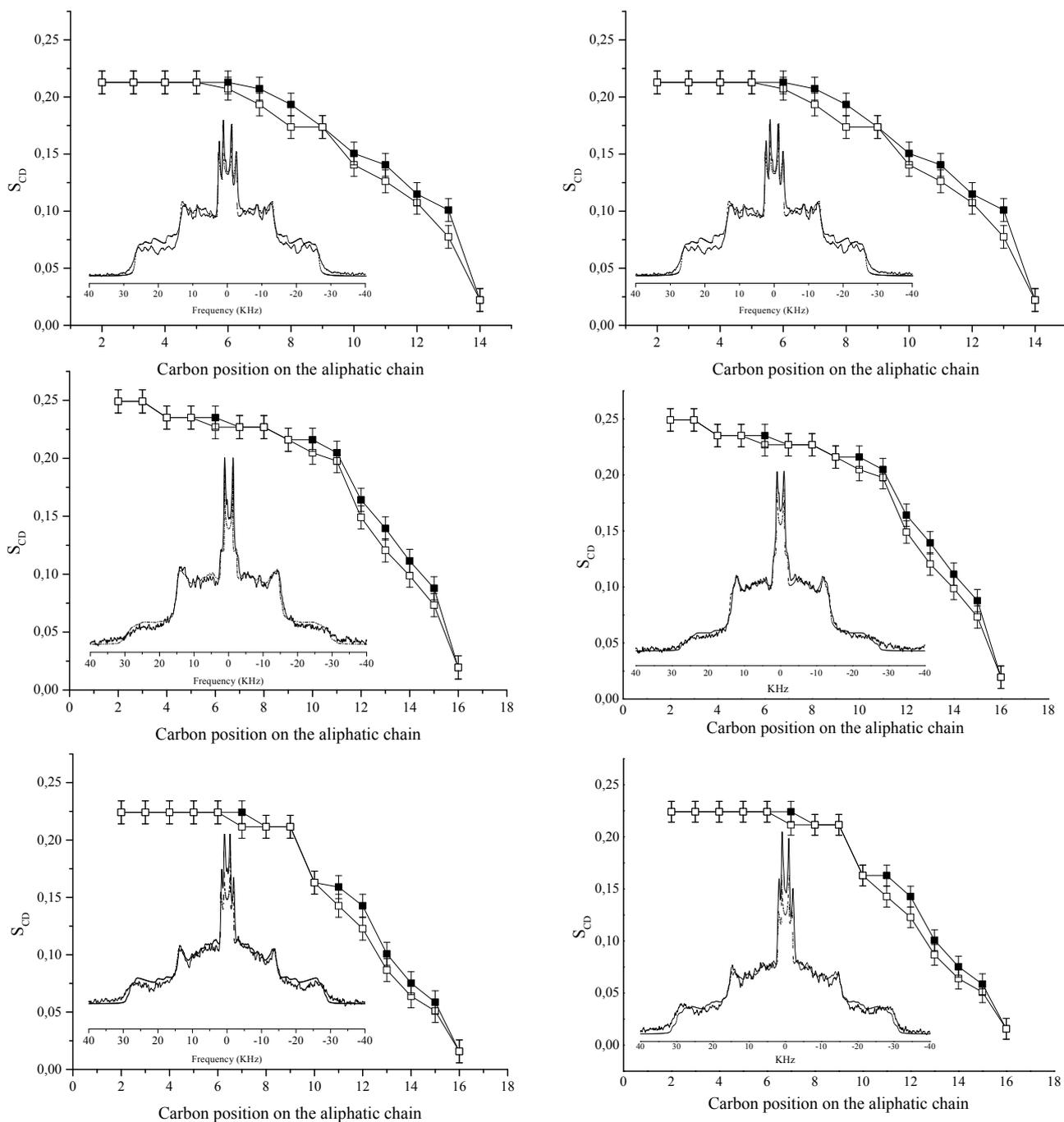
```

```
% Fonction qui dessine l'ellipsoide
[x,y,z] = ellipsoid(xc,yc,zc,xr,yr,zr,n);
surfl(x, y, z);

% Coloration de la surface de l'ellipsoide
colormap (white);
% Attention : si blanc, possibilite de ne pas voir la surface.
% Essayer une fois en bleu ou rouge, pour verification

% Transparence de la surface de l'ellipsoide
% 0 = transparent
% 1 = opaque
Alpha (0.5);

% Configuration du graphique
% Taille de la boite
% Les trois côtés (axes du graphique) sont de taille égale à 1
daspect([2 2 2]);
pbaspect([2 2 2]);
% Point de vue
view([0 20]);
% Pas de quadrillage
grid off;
% Pas d'axes
axis off;
% Juste pour mettre une valeur a la variable de sortie ....
succes = 1;
```



**Figure S3:** Graphes reportant les paramètres d'ordre  $S_{CD}$  en fonction de la position du carbone sur les chaînes aliphatiques  $sn_1$  ( $\square$ ) et  $sn_2$  ( $\blacksquare$ ) du lipide deutéré DMPC- $^2H_{54}$  inséré dans les liposomes TBBPC : DMPC- $^2H_{54}$  (en haut) et du DPPC- $^2H_{62}$  inséré dans les liposomes HBBPC : DPPC- $^2H_{62}$  (au milieu) et OBBPC : DPPC- $^2H_{62}$  (en bas) pour une hydratation de 90% dans  $H_2O$  dédeutérée avec 0,1M NaCl à 40°. A chaque profil d'ordre est associé les spectres RMN  $^2H$  expérimentaux et simulés (en pointillés) correspondants obtenus à 18,8T à une même température d'analyse de 40°C (gauche) et à une même température réduite (droite) de  $\approx 45^\circ C$  au-dessus de la température de transition de phase de chaque lipide.

### Résumé:

Un nouveau modèle de biomembrane de type liposome a été développé à partir de lipides synthétisés comportant une unité biphenyle sur leur chaînes  $sn_2$  et une chaîne aliphatique  $sn_1$  de longueur et insaturation variables. L'anisotropie de susceptibilité magnétique positive de ces molécules induit une déformation en oblate de ces liposomes dits « biphenyles » dans le champ magnétique  $B_0$ . Cette déformation spécifique a été caractérisée par RMN des solides  $^{31}\text{P}$  et  $^2\text{H}$  en faisant varier différents paramètres : l'intensité de  $B_0$ , l'élasticité membranaire, la température et la taille des liposomes (Helfrich, 1973). Ces vésicules déformées ont pu être observées par microscopies optiques et électroniques et la rémanence de la déformation en dehors de  $B_0$  a pu être analysée par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS).

Enfin, les premières applications des liposomes biphenyles comme nouveau modèle de biomembrane pour analyser la structure et l'orientation (par RMN des solides  $^{15}\text{N}$ ) de peptides ou protéines membranaires, ont été étudiées.

### Mots clés:

Liposomes fluorescents, Unité biphenyle, RMN des Solides  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , Déformation, Diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), Microscopies optiques et électroniques, Peptides et protéines membranaires.

### Abstract :

A new model of biomembrane (liposome) was developed from synthesized lipids containing a biphenyl unit on the  $sn_2$  aliphatic chain and possessing a  $sn_1$  aliphatic chain which varies in length and unsaturation. The positive magnetic susceptibility anisotropy of these molecules induces an oblate deformation of these « biphenyls » liposomes under the magnetic field  $B_0$ . This particular deformation has been characterized by  $^{31}\text{P}$  and  $^2\text{H}$  solid state NMR by varying different parameters: the intensity of  $B_0$ , the membrane elasticity, the temperature and the size of the liposomes (Helfrich, 1973). These deformed vesicles were observed by optical and electron microscopy and the remanence of the deformation outside  $B_0$  has been analyzed by Small angles X-ray scattering (SAXS).

Finally, the first applications of biphenyls liposomes as new biomembrane model to analyze the structure and orientation of membrane proteins or peptides were studied by  $^{15}\text{N}$  solid state NMR

### Key words :

Fluorescent liposomes, Biphenyl unit,  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  Solid State NMR, Small Angle X-ray Scattering (SAXS), Optical and Electron microscopy, Membrane peptides and proteins.