



HAL
open science

Etude des interactions molécules d'intérêt pharmacologique/modèles membranaires : cas des polyènes et de nouvelles molécules antipaludiques

Thierry-Johann Robin

► **To cite this version:**

Thierry-Johann Robin. Etude des interactions molécules d'intérêt pharmacologique/modèles membranaires : cas des polyènes et de nouvelles molécules antipaludiques. Biotechnologies. Université de Technologie de Compiègne, 2014. Français. NNT : 2014COMP2165 . tel-01228513

HAL Id: tel-01228513

<https://theses.hal.science/tel-01228513v1>

Submitted on 13 Nov 2015

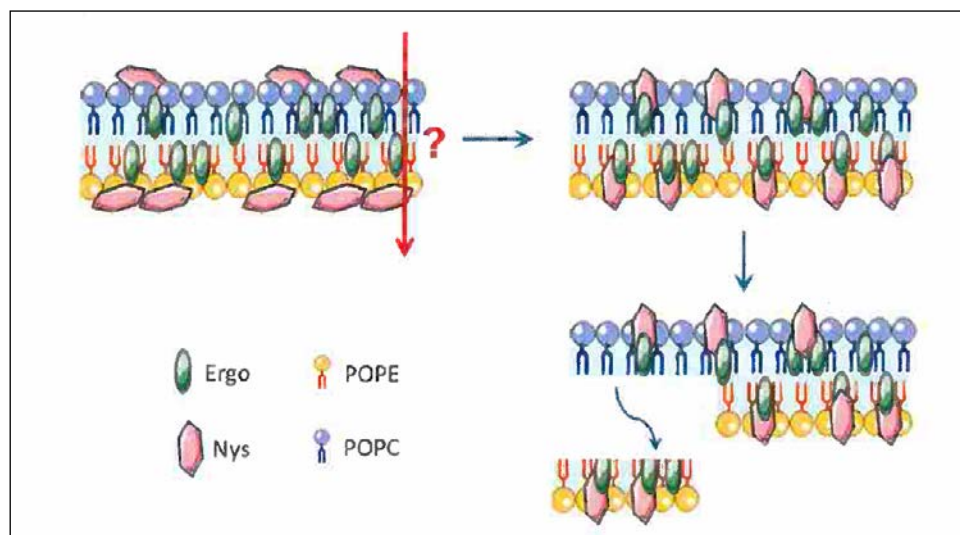
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par Thierry-Johann ROBIN

Étude des interactions molécules d'intérêt pharmacologique / modèles membranaires : cas des polyènes et de nouvelles molécules antipaludiques

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 17 décembre 2014
Spécialité : Biotechnologie

D2165



THÈSE DE DOCTORAT DE L'UTC

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TECHNOLOGIE DE COMPIÈGNE

Spécialité : Biotechnologie

Thierry-Johann ROBIN

ÉTUDE DES INTERACTIONS MOLÉCULES D'INTÉRÊT PHARMACOLOGIQUE/MODÈLES MEMBRANAIRES :

Cas des polyènes et de nouvelles molécules antipaludiques

Composition du Jury

MINGEOT-LECLERCQ M.P.	Directeur de Recherche à l'Université Catholique de Louvain
ROSILIO V.	Professeur à l'Université Paris-Sud
SARAZIN C.	Professeur à l'Université Picardie Jules Verne
SONNET P.	Professeur à l'Université Picardie Jules Verne
GRANJON T.	Maître de conférence à l'Université Claude Bernard Lyon 1
MORANDAT S.	Maître de conférence à l'Université de Technologie de Compiègne

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un financement ministériel dans le laboratoire Génie Enzymatique et Cellulaire FRE-CNRS 8318 à l'Université de Technologie de Compiègne, dirigé par Karsten Haupt. Je tiens donc à le remercier pour son accueil au sein du laboratoire. J'aimerais remercier Madame Véronique Rosilio et Madame Marie-Paule Mingeot-Leclercq pour avoir pris le temps d'évaluer ce travail de thèse. Merci également à Monsieur Thierry Gaujon, Monsieur Pascal Sonnet et Madame Catherine Sarazin d'avoir bien voulu participer au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Sandrine Morandat, ma directrice de thèse, qui m'aura accompagné avec toujours beaucoup de patience durant ces trois années. Ses idées, son soutien et sa confiance m'ont été très précieux. Merci sincèrement de la formation que tu m'auras dispensé durant ces trois années.

Je me dois d'associer Karim El-Kirat à ces remerciements : ses idées et les discussions autour des résultats m'ont été d'une aide précieuse. Je n'ai qu'un regret, c'est de ne pas avoir plus abusé de ses conseils.

La vie à Compiègne n'a pas toujours été tendre¹. Heureusement, il est des amis qui sont plus proches que des frères. N'est ce pas Jean? Et puis ce laboratoire est pourvu d'une richesse phénoménale : j'y aurais cotoyé pas moins de 20 nationalités différentes. Merci à Jacqueline et nos incessantes disputes pour savoir quelle île de la Caraïbes est la plus « hype » (il n'y a qu'elle qui ne sait pas que c'est la Guadeloupe). Et franchement, merci pour le morceau de poulet que tu m'as « lâché » la dernière nuit de correction. Mon estomac ne s'en ait pas encore remis mais sur le coup, ça m'a fait du bien. Merci à Zeynep et sa délicieuse nourriture turque, qui m'aura sorti de pas mal de galère. On en aura vécu des choses sympas, toi et moi. Life is unfair, but we are stronger than life! Merci à Yi, qui m'a fait comprendre que le thé lipton, c'est pour les ben dan. Ses chinoiseries et

1. pour s'en faire une idée, je vous invite à visiter le site <http://www.meteofrance.com/previsions-meteo-france/compiègne/60200>

nos récentes parties de tennis auront beaucoup égaillé mes journées. J'ai adoré les pasta carbonara de Serena, même si les miennes sont meilleures. Merci à Paolo le rital et Melody l'américaine pour les innombrables parties de poker, et pour les nombreux petit-dèj gratuit qui en ont découlé. Merci à Sofia parce que c'est bien d'avoir des calins grecques quand on s'y attend pas. Et puis, elle sent toujours bon ! Je serai un chacal si j'oubliais mon partenaire de chacalerie, Florian, qui m'aura bien fait rigoler en me demandant « du bois » à longueur de journée. Merci à Djing-Djing, Maria, Mira, Marcelina, Laeticia, Morgan, Zeynab, Amel, Bernadette, Chantal, Valérie, Carol, Christiane, Martins et Frank, qui auront tous été à un moment donné la « femme de ma vie ». Un bon courage à Hassan, qui reste dans le labo pour s'occuper de ce Harem imposant et à Seb, qui finit bientôt. Et je donne la « fòs » à tous les permanents, comme Carlo, Aude, Bérangère, Yolande, Sonia et Séverine, qui, pour la science, se sont sacrifiés pour vivre en Picardie. Une pensée pour Larissa qui commence sa thèse. J'espère que tu passeras de super moment à « Compy ».

Résumé en Français

L'objectif générale de ces travaux est de comprendre les mécanismes d'interaction de molécules d'intérêt avec les membranes afin de faciliter la synthèse de molécules plus efficaces contre leurs cibles tout en étant moins toxique pour l'Homme. Dans la première partie de ces travaux, nous avons étudié les interactions entre ces modèles membranaires et les polyènes antifongiques, connus pour interagir avec les stérols des membranes plasmiques. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la Nystatine et à l'Amphotéricine B, deux molécules de structure chimique très proche et actuellement utilisé dans l'industrie pharmaceutique. L'utilisation de différents modèles membranaires et de techniques adaptées a montré que la PhosphatidylEthanolamine avait très vraisemblablement un rôle primordial dans le mécanisme d'interaction de ces molécules avec les membranes. Dans la deuxième partie de ces travaux, nous nous sommes intéressés à l'inhibition de la formation du cristal d'hémozoïne formé lors de la croissance du parasite responsable du paludisme. Ce cristal est formé d'hématine, hautement toxique pour le parasite. L'hématine et l'inhibition de la formation de l'hémozoïne constituent une cible moléculaire idéale pour combattre cette maladie. La chloroquine, la méfloquine et de nouveaux inhibiteurs dérivés de la méfloquine ont été utilisés. L'étude de l'inhibition de la formation du cristal s'est faite en utilisant des monocouches de Langmuir, servant ainsi de biocapteurs. Ces travaux ont montré que l'énantiométrie, mais aussi la lipophilicité des nouveaux composés antipaludiques sont des paramètres importants en vue de la synthèse de molécules plus efficaces.

Résumé en Anglais

The main purpose of this work is to better understand the mechanisms of interaction between pharmaceutical relevant molecules and model membranes in order to facilitate the synthesis of new molecules, more efficient against their molecular target and less toxic for Humans. In the first part, we studied the interactions occurring between these models and antifungal polyene molecules. It has been reported that these molecules interacted preferentially with sterols. We specifically focused on Nystatin and Amphotericin B, two polyenes with a very similar chemical structure and presently used as a treatment against fungi and molds. Using different kind of model membranes, we showed PhosphatidylEthanolamine could have a very important role in the mechanism of action of these molecules. In the second part of this work, we studied the inhibition of the formation of a cristal called « hemozoïin », which is growing during the life cycle of the parasite responsible of malaria. This cristal is made of hemozoin, a toxic by-product of the degradation of hemoglobin, the main source of amino-acids for the parasite. Hemozoin and the inhibition of the growth of this cristal is a ideal molecular target to combat malaria. Chloroquine, mefloquine and new mefloquine-derivatives were studied. The study of the inhibition of the formation of the cristal was done using Langmuir monolayers as a biosensor. We showed that stereochemistry, but also lipophilicity of these compounds, are important parameters for the synthesis of more efficient antimalarial molecules.

Sommaire

1	Introduction générale	17
I	Les membranes naturelles et biomimétiques	20
2	Les membranes cellulaires	21
2.1	Les principaux lipides membranaires	22
2.1.1	Les glycérophospholipides	22
2.1.2	Les glycolipides	25
2.1.3	Les sphingolipides	25
2.1.4	Les stérols	26
2.2	Les différents états physiques des membranes	27
2.3	Les composants des membranes cellulaires sont distribués d'une manière non-homogène	29
2.3.1	Les membranes biologiques ont des feuillettes de compositions hétérogènes	30
2.3.2	Concept des Radeaux lipidiques	31
3	Les modèles membranaires	33
3.1	Les monocouches de Langmuir	33
3.1.1	Principe de formation d'une monocouche de Langmuir	34
3.1.2	Mesure de la pression de surface par la balance de Wilhelmy	35
3.1.3	Isothermes de compression de lipides purs	37
3.1.3.1	Module de compressibilité	37
3.1.3.2	Détermination des phases lipidiques	37
3.1.3.3	Miscibilité et idéalité des mélanges	39
3.1.4	Transfert de monocouches sur support solide	41
3.1.5	Applications des monocouches de Langmuir dans les études des interactions lipides/agents externes	41
3.2	Les liposomes	43

3.2.1	Préparation des liposomes	44
3.2.2	Les liposomes, un modèle de choix pour comprendre les interactions membranes / molécules exogènes	45
3.3	Les bicouches lipidiques supportées	46
3.3.1	Utilisation des SLBs pour l'étude des interactions molécules exo- gènes / membranes	48

II Interaction de molécules d'intérêt pharmacologique avec des membranes biologiques et biomimétiques **49**

4 Interactions de molécules d'intérêt pharmacologique avec les membranes biologiques **50**

5 Étude du mécanisme d'interaction des polyènes avec les membranes **52**

5.1	Généralités sur les polyènes	52
5.1.1	Introduction	52
5.1.2	Les polyènes ciblent les cellules fongiques	54
5.2	État de l'art sur l'interaction des polyènes avec les membranes biologiques	54
5.2.1	Les polyènes interagissent avec les membranes biologiques	54
5.2.1.1	Interactions avec les membranes riches en stérol	55
5.2.1.2	Interactions avec les membranes de PhosphatidylCholine	57
5.2.2	Les polyènes perméabilisent les membranes	58
5.2.3	Le mécanisme d'action des polyènes est-il aussi simple qu'il n'y paraît ?	60
5.3	Conclusion	61

6 L'hémozoïne, une cible moléculaire dans la lutte contre le paludisme **63**

6.1	Le paludisme	63
6.2	Cycle de vie du parasite	64
6.2.1	Aspects généraux	64
6.2.2	Description du cycle érythrocytaire	65
6.2.3	Hydrolyse de l'hémoglobine et détoxification de l'hémine	65
6.2.4	Les cibles thérapeutiques du parasite durant son cycle érythrocytaire	68
6.3	Les quinoléines, des molécules inhibant la polymérisation de l'hémine	70
6.3.1	La Chloroquine	70
6.3.2	La Méfloquine	73
6.3.3	Synthèse de nouveaux dérivés énantiopurs de la Méfloquine	74

7 Objectifs des différentes études **76**

III	Matériel et Méthodes	78
8	Molécules utilisées	79
8.1	Lipides	79
8.2	Molécules d'intérêt	79
8.3	Préparation des tampons	81
9	Préparation des modèles membranaires	82
9.1	Les monocouches de Langmuir	82
9.1.1	Principe de la technique	82
9.1.2	Etude de l'insertion de molécules exogènes	82
9.1.3	Étude de l'inhibition de l'insertion de l'hématine dans des mono- couches de DPPC/DOPC	83
9.1.4	Isothermes de compression	83
9.1.5	Transfert de monocouches	84
9.1.5.1	Principe	84
9.1.5.2	Méthode	84
9.2	Les liposomes	85
9.2.1	Principe	85
9.2.2	Méthode générale	85
9.2.3	Liposomes unilamellaires obtenus par sonication	85
9.2.4	Liposomes unilamellaires obtenus par extrusion	85
9.3	Dosage des lipides par la méthode de Stewart	86
9.3.1	Principe	86
9.3.2	Méthodes	86
10	Techniques de caractérisation	87
10.1	Microscopie à l'Angle de Brewster	87
10.1.1	Principe	87
10.1.2	Matériel et Méthodes	88
10.2	Microscopie à Force Atomique	89
10.2.1	Principe	89
10.2.2	Les modes d'acquisition	89
10.2.3	Matériel et méthodes	90
10.3	Spectroscopie de fluorescence	90
10.3.1	Étude de perméabilité membranaire	91
10.3.1.1	Principe	91
10.3.1.2	Méthodes	92
10.3.2	Étude de l'ordre des membranes	92
10.3.2.1	Principe	92

10.3.2.2	Matériel et Méthodes	93
10.4	Diffusion dynamique de la lumière	94
10.4.1	Principe	94
10.4.2	Matériel et Méthodes	94
IV	Résultats	95
11	Interaction de la Nystatine avec des modèles membranaires	96
11.1	Interactions de la Nys avec des monocouches de Langmuir	97
11.1.1	Propriétés interfaciales de la Nys	97
11.1.2	La Nys s'insère préférentiellement dans des monocouches de stérols et de POPE	99
11.1.2.1	Étude du pouvoir membranotrope dans des monocouches de phospholipides	100
11.1.2.2	Conclusion des études du pouvoir membranotrope de la Nys dans des monocouches de lipides	104
11.1.3	La Nys modifie les propriétés biophysiques des lipides	104
11.1.3.1	Interactions avec les monocouches de DPPC	105
11.1.3.2	Interactions avec les monocouches de PE	108
11.1.3.3	Interaction avec des monocouches de stérols	116
11.1.3.4	Conclusion des isothermes de compression	121
11.1.4	La Nys provoque la solubilisation des monocouches de POPE/Ergo	122
11.2	Interaction de la Nys avec des bicouches lipidiques	127
11.2.1	La Nys ne perméabilise pas les liposomes enrichis en POPE mais provoque l'augmentation de leur diamètre	127
11.2.2	La perturbation de l'ordre des membranes est plus importante dans les vésicules contenant de l'Ergo que dans celles contenant du Chol	130
11.2.2.1	Interactions de la Nys avec des SUVs	130
11.2.2.2	Interactions de la Nys avec des LUVs de 200 nm	131
11.2.2.3	Interactions de la Nys avec des LUVs de 400 nm	134
11.2.2.4	Conclusion des expériences sur l'enfouissement de la Nys .	135
11.3	Conclusions des expériences sur la Nys	137
12	Interactions de l'Amphotéricine B avec des modèles membranaires	138
12.1	Interactions de l'AmB avec des monocouches de Langmuir	138
12.1.1	Propriétés interfaciales de l'AmB	138
12.1.2	L'AmB s'insère uniquement dans des monocouches enrichies en stérols	140
12.1.2.1	Étude de l'insertion dans des monocouches de lipides . . .	141
12.1.2.2	Conclusions sur les propriétés membranotropes de l'AmB .	144
12.1.3	L'AmB modifie les propriétés biophysiques des monocouches de stérols	144

12.1.4	La POPE est plus favorable à l'insertion de l'AmB dans les monocouches enrichies en Ergo que la POPC	149
12.2	L'AmB modifie très fortement l'ordre des membranes	153
12.2.0.1	Interactions de l'AmB avec des liposomes de 200 nm . . .	153
12.2.0.2	Interactions de l'AmB avec des liposomes de 400 nm . . .	155
12.2.0.3	Conclusions des expériences de GP	157
12.3	Conclusions	158
13	Inhibition de l'insertion de l'hématine dans des modèles membranaires par des dérivés énantiopurs de la MEF	159
13.1	Insertion et inhibition de l'hémine dans les monocouches de Langmuir par la CQ	160
13.1.1	Conclusion	165
13.2	Les dérivés stéréochimiquement purs de la MEF sont capables d'inhiber l'insertion de l'hémine	165
13.2.1	Inhibition de l'insertion de l'hémine par la MEF	166
13.2.2	Inhibition de l'insertion de l'hémine par des dérivés énantiopurs de la MEF	172
13.3	Conclusion	179
14	Discussion	182
14.1	Les polyènes	182
14.2	Les molécules antipaludiques	190
15	Conclusion générale	193
16	Perspectives	195

Table des figures

2.1	Représentation d'une membrane cellulaire	21
2.2	Relation entre le type cellulaire et la composition lipidique des membranes	22
2.3	Structure d'une chaîne acyle saturée, d'une chaîne acyle monoinsaturée et structure chimique de différents acides gras retrouvés dans les phospholipides	23
2.4	Structure des phospholipides les plus retrouvés dans les membranes cellulaires	24
2.5	Représentation de trois glycolipides retrouvés dans les membranes des chloroplastes	25
2.6	Structure des sphingolipides	26
2.7	Structure du Chol, de l'Ergo et du Sitostérol	27
2.8	Représentation et caractéristiques des phases L_d et S_o	28
2.9	Représentation de la phase Ripple	29
2.10	Représentation et caractéristiques de la phase L_o	29
2.11	Répartition des phospholipides entre les feuillet interne et externe de la membrane des érythrocytes	30
2.12	Représentation de l'organisation des Rafts et des cavéoles dans la membrane plasmique	32
3.1	Principe de la formation des films monomoléculaires par la technique de Langmuir	35
3.2	Principe de la balance de Wilhelmy	36
3.3	Exemple d'isotherme de compression	38
3.4	Répartition de lipides miscibles (a), partiellement miscibles (b) et non miscibles (c) à l'interface air/eau	39
3.5	Principe du transfert de monocouches par la technique de Langmuir-Schaefer	41
3.6	Principe du transfert de monocouches par la technique de Langmuir-Blodgett	42
3.7	Représentation d'un liposome multilamellaire et d'un liposome unilamellaire	45
3.8	Principe de la préparation de bicouches par la technique de Langmuir-Blodgett	47

3.9	Mécanismes probables de formation d'une bicouche supportée à partir de liposomes	47
5.1	Structure de la Nys, de l'AmB, de la Natamycine et de la Filipine	53
5.2	Modèle proposé pour l'interaction Stérol/AmB	56
5.3	Illustration des différentes structures formées par l'AmB dans les bicouches lipides	59
5.4	Représentation des modèles d'interactions de l'AmB et de ses proches homologues structuraux avec les membranes	60
6.1	Cycle de développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	64
6.2	Structures chimiques de l'hémine et de l'hématine	66
6.3	Représentation des différentes formes d'hématine en solution	66
6.4	Structures chimiques de l'hémozoïne	67
6.5	Mécanisme de formation de l'hémozoïne <i>in vitro</i>	67
6.6	Mécanisme proposé de formation de l'hémozoïne.	69
6.7	Cibles potentielles des molécules antipaludiques identifiées chez <i>Plasmodium</i>	70
6.8	Structure de la CQ	71
6.9	Structure de la MEF	73
6.10	Analogues synthétisés de la MEF par l'équipe du Pr Pascal Sonnet	74
8.1	Structure des phospholipides utilisés	80
8.2	Structure des têtes polaires utilisées	80
10.1	Principe de fonctionnement du BAM	88
10.2	Structure de la calcéine	91
10.3	Cinétique théorique de la variation de la fluorescence de la calcéine encapsulée dans des liposomes sous l'effet de molécules perméabilisant les membranes.	91
10.4	Représentation des sondes Laurdan et Prodan	93
11.1	Isotherme de compression et module d'élasticité d'une monocouche de Nys	97
11.2	Suivi de la compression de la Nys par imagerie BAM	98
11.3	Adsorption de la Nys à l'interface air/tampon	99
11.4	Cinétiques d'insertion de la Nys dans des monocouches de différents lipides	100
11.5	Détermination de la PIM de la Nys dans des monocouches de lipides	102
11.6	Isothermes de compression et modules d'élasticité de monocouches de DPPC/Nys	105
11.7	Images de BAM des monocouches de DPPC/Nys à différentes pressions de surface	107
11.8	Images AFM de hauteur de monocouches de DPPC contenant 0 et 5% de Nys à 18 mN/m et 35 mN/m	108

11.9 Isothermes de compression et modules d'élasticité de mélanges DPPE/Nys et POPE/Nys	109
11.10 Images de BAM des monocouches de DPPE à différentes pressions	111
11.11 Images de BAM des monocouches de POPE à différentes pressions	112
11.12 Images AFM de hauteur de monocouches de POPE avec 0 et 5% de Nys	113
11.13 Détermination du ΔG_{ex} de l'interaction POPE/Nys	114
11.14 Isothermes de compression et modules d'élasticité des mélanges stérols/Nys	116
11.15 Images de BAM des monocouches de Chol à différentes pressions de surface	118
11.16 Images AFM de hauteur de monocouches de Chol avec 0 et 5% de Nys	119
11.17 Images de BAM des monocouches d'Ergo à différentes pressions de surface	120
11.18 Images AFM de hauteur de monocouches d'Ergo avec 0 et 5% de Nys	121
11.19 Cinétiques d'insertion de la Nys dans des mélanges phospholipides/stérols	123
11.20 Évolution du $\Delta\pi_{30}^{max}$ de la Nys dans des monocouches de POPC ou POPE mélangées avec différentes concentrations en Chol ou Ergo	124
11.21 Évolution du $T_{30}^{-5\%}$ en fonction de la concentration en Ergo	125
11.22 Évolution du $\Delta\pi_{30}^{fin}$ en fonction de la concentration en stérol	126
11.23 Suivi de la perméabilisation de liposomes de différentes compositions par la Nystatine	128
11.24 Suivi de la perméabilisation de liposomes de POPC/POPE/Ergo par la Nystatine	129
11.25 Étude de la modification du diamètre de liposomes incubés avec de la Nys	129
11.26 Effet de la température sur le GP du Laurdan et du Prodan de la Nys dans des SUVs de POPC/Ergo et POPC/Chol	131
11.27 Effets de la température et de la concentration en Nys sur le GP du Laurdan et du Prodan insérés dans des LUVs de 200 nm	132
11.28 ΔGPs engendrés par la Nys sur des liposomes de POPC/Stérol 7 : 3 (mol/mol) de 200 nm à 21°C et 37°C	133
11.29 Effets de la température et de la concentration en Nys sur le GP du Laurdan et du Prodan insérés dans des LUVs de 400 nm	134
11.30 ΔGPs engendrés par la Nys sur des liposomes de 400 nm	135
11.31 Comparaison des ΔGPs engendrés par la Nys sur des liposomes de 200 nm et 400 nm	136
12.1 Variation de la pression de surface en fonction de la concentration d'AmB injectée	139
12.2 Isotherme de compression d'une monocouche d'AmB	139
12.3 Images de BAM de l'AmB	140
12.4 Cinétiques d'insertion de l'AmB dans des monocouches de lipides	141
12.5 Détermination de la PIM de l'AmB dans des monocouches de lipides	143
12.6 Isothermes de compression de mélanges stérols/AmB	145

12.7	Images de BAM des monocouches de Chol/AmB	146
12.8	Images de BAM des monocouches d'Ergo/AmB	148
12.9	Cinétiques d'insertion de l'AmB dans des mélanges phospholipides/stérols .	149
12.10	Évolution du $\Delta\pi_{30}^{max}$ de l'AmB dans des monocouches de POPE ou POPC mélangées avec différentes concentrations en stérol	150
12.11	Évolution du $T_{30}^{-5\%}$ de l'AmB dans des monocouches de POPC/Ergo et POPE/Ergo	151
12.12	Évolution du $\Delta\pi_{30}^{fin}$ en fonction de la concentration en Ergo	152
12.13	Effet de l'AmB sur le GP du Laurdan et du Prodan dans des LUVs de 200 nm de différentes compositions	154
12.14	Δ GPs engendrés par l'AmB sur des liposomes de 200 nm à 21°C et 37°C .	154
12.15	Effet de l'AmB sur le GP du Laurdan et du Prodan dans des LUVs de 400 nm de différentes compositions lipidiques	155
12.16	Δ GPs engendrés par l'AmB sur des liposomes de 400 nm à 21°C et 37°C .	156
12.17	Comparaison des Δ GPs engendrés par l'AmB sur des liposomes de 200 nm et 400 nm	157
13.1	Cinétiques d'insertion de l'hémine et détermination de la PIM dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol)	160
13.2	Cinétiques d'insertion de la protoporphyrine dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol) à 20 mN/m	161
13.3	Cinétiques d'insertion de l'hématine incubée avec la CQ dans des mono- couches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol) à 20 mN/m	162
13.4	Suivi de l'inhibition de l'insertion de l'hématine en fonction du ratio CQ/hématine	163
13.5	Courbe de calibration de l'insertion de l'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC	164
13.6	Représentation de Scatchard de l'insertion de l'hématine inhibée par la CQ	165
13.7	Cinétiques d'insertion et détermination de la PIM de la MEF dans des monocouches de DPPC/DOPC	166
13.8	Cinétiques d'insertion et détermination de la PIM du mélange MEF/hémine 3 : 1 (mol/mol) dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol)	167
13.9	Cinétiques d'insertion des mélanges MEF/hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC à 20 mN/m	168
13.10	Cinétiques d'insertion des mélanges MEF/hématine à des ratios supérieurs à 0,5	169
13.11	Inhibition de la vitesse d'insertion de l'hématine par la MEF dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol)	170

13.12	Évolution du pourcentage d'inhibition de la vitesse d'insertion de l'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC.	171
13.13	Représentation de Scatchard de l'interaction MEF/hématine	172
13.14	Cinétiques d'insertion de dérivés de la MEF dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol)	173
13.15	Détermination de la PIM et du $\Delta\pi_{30}$ des dérivés de la MEF	173
13.16	Cinétiques d'insertion des mélanges AJPS013X/hémimine 3 : 1 (mol/mol) dans des monocouches de DPPC/DOPC	175
13.17	Détermination des PIMs des mélanges AJPS013X/hémimine	176
13.18	$\Delta\pi_{30}$ de l'insertion dans des monocouches de DPPC/DOPC des différents mélanges AJPS013X/hémimine 3 : 1.	177
13.19	Cinétiques d'insertion des mélanges AJPS013X/hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC à pression initiale de 20 mN/m	178
13.20	Inhibition de la vitesse d'insertion de l'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC à pression initiale de 20 mN/m	179
13.21	Représentation du pourcentage d'inhibition de la vitesse d'insertion de l'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC à pression initiale de 20 mN/m	179
13.22	Représentation de Scatchard de l'interaction MEF/hématine	180
14.1	Images de BAM des monocouches de Chol et d'Ergo	184
14.2	Évolution du $\Delta\pi_{30}^{fin}$ en fonction de la concentration en stérol et du polyène utilisé	185
14.3	Comparaison des ΔGPs engendrés par l'AmB et la Nys sur des liposomes de 400 nm à 21°C	187
14.4	Mécanisme d'interaction proposé entre les polyènes et les membranes	189

Abréviations

Les abréviations les plus couramment rencontrées dans ce document sont les suivantes :

AFM : Atomic Force Microscopy

BAM : Brewster Angle Microscopy

Chol : Cholestérol

CQ : Chloroquine

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DPPE : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

DPPS : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine

Ergo : Ergostérol

GPL : “Generalized Polarization” du Laurdan

GPP : “Generalized Polarization” du Prodan

LE : Liquide Expansé

LC : Liquide Condensé

MEF : Méfloquine

π^{fin} : Pression finale

π^{max} : Pression maximale

π^{min} : Pression minimale

PIM : Pression Maximale d’Insertion

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

POPE : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine

POPS : 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine

PC : PhosphatidylCholine

PE : PhosphatidylEthanolamine

PS : PhosphatidylSérine

SM : Sphingomyéline

Introduction générale

Les challenges sociétaux ont beaucoup évolué ces 50 dernières années. L'accès aux soins des populations a augmenté la consommation de médicaments. Cette augmentation a donné lieu à des comportements peu responsables, voire destructeurs au regard de l'efficacité de la pharmacopée disponible. Aujourd'hui, de nombreux pathogènes ont développé des mécanismes de résistance à la plupart des molécules disponibles dans l'industrie pharmaceutique utilisées pour les combattre. L'urgence actuelle est donc de développer de nouvelles molécules efficaces contre ces agents pathogènes résistants.

La nature a toujours été une source constante d'inspiration pour la recherche scientifique. C'est pourquoi, de plus en plus, le criblage de gigantesques banques de molécules synthétisées aléatoirement sont abandonnées au profit d'un développement sur mesure de nouvelles molécules inspirées par celles retrouvées dans la nature. Cette dernière stratégie est économiquement plus attractive et moins chronophage. Mais, pour synthétiser de nouvelles molécules selon ce principe, il est essentiel d'identifier les cibles moléculaires impliquées, mais aussi de comprendre comment les molécules existantes interagissent avec ces cibles afin de potentialiser leurs effets. Cette démarche n'est donc possible qu'à condition de connaître le mécanisme d'action de la molécule en question.

Les membranes biologiques sont la principale cible moléculaire de bon nombre de molécules d'intérêt pharmacologique. Pour beaucoup d'autres, qui ont des cibles moléculaires intracellulaires, elles sont le premier partenaire d'interaction. Ces membranes sont très importantes pour la vie de la cellule puisqu'elles séparent la cellule de son environnement et délimitent le cytoplasme cellulaire ainsi que les organites à l'intérieur de celui-ci. Elles lui permettent par ailleurs d'échanger et de communiquer avec le milieu extérieur et confinent de nombreuses réactions chimiques. Il n'existe pas aujourd'hui d'outil suffisamment sophistiqué pour étudier à l'échelle moléculaire toutes les interactions spécifiques entre une molécule et une membrane biologique. Cela est bien sûr dû au grand nombre de molécules différentes la composant, au fait que les membranes biologiques sont des systèmes très dynamiques, mais aussi à la complexité de la distribution des molécules au sein même de ces membranes.

Pour étudier ces interactions, nous avons donc décidé d'adopter une approche multitechniques basée sur l'exploitation des modèles membranaires. Nous avons utilisé différentes techniques de caractérisation biophysique des interactions entre des membranes préformées et nos molécules d'intérêt. La tensiométrie de surface, la microscopie à l'angle de Brewster, la microscopie à force atomique, mais aussi la spectroscopie de fluorescence sont autant de techniques que nous avons utilisées au cours de ce travail. Il reste néanmoins important de toujours garder en mémoire les avantages et inconvénients de l'utilisation de tels outils. Par conséquent, l'analyse des résultats se doit d'être globale afin de palier aux limites techniques de chaque appareil et de chaque modèle utilisés.

Durant ces travaux, notre attention s'est portée sur trois types de molécules différentes. Tout d'abord, nous avons étudié le mécanisme d'action des polyènes, des molécules antifongiques utilisées aujourd'hui dans l'industrie pharmaceutique. À l'heure actuelle, elles constituent notre meilleure ligne de défense contre les infections provoquées par les cellules fongiques, telles que les dermatophytoses ou les candidoses. Les polyènes sont connus pour interagir principalement avec les stérols des membranes, particulièrement l'Ergostérol, le stérol des membranes fongiques. Cependant, malgré de nombreuses années de recherche pour comprendre le mécanisme d'action de ces molécules, très peu de choses sont clairement définies.

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'interaction de deux différents polyènes, la Nystatine et l'Amphotéricine B avec des modèles membranaires. Nous avons utilisé les monocouches de Langmuir et la tensiométrie de surface pour caractériser les interactions entre ces molécules et différents lipides. Nous avons aussi étudié les modifications des propriétés biophysiques des monocouches engendrées par ces molécules et visualisé ces modifications par des techniques d'imagerie. Des modèles de bicouches ont complété cette étude, notamment pour interpréter l'interaction de ces molécules avec des modèles membranaires plus proches des cellules fongiques et animales que les monocouches. Des expériences de diffusion de la lumière et de fluorescence nous ont permis de montrer l'importance de la composition, mais aussi de la taille de ces modèles. Des interactions spécifiques entre des lipides et ces molécules ont pu être mises à jour.

Toujours dans le but de comprendre le mode d'action de molécules pour en créer de nouvelles plus spécifiques et plus efficaces, nous avons étudié l'interaction entre des modèles membranaires et des dérivés de la quinine, à savoir la Chloroquine et la Méfloquine. Ces molécules sont connues pour s'accumuler dans la vacuole digestive du parasite *Plasmodium* et empêcher la détoxification de l'hémine, un sous-produit de la dégradation de l'hémoglobine. Nous avons utilisé des modèles membranaires dans le but de caractériser l'insertion de l'hémine, mais aussi de suivre l'inhibition de cette insertion par ces deux molécules.

Nous avons eu l'occasion de collaborer avec le laboratoire de Glycochimie, des Agrosources et des Antimicrobiens à Amiens, plus particulièrement avec l'équipe du Pr. Pascal

Sonnet, qui a synthétisé de nouvelles molécules antipaludiques. Nous nous sommes intéressés au mécanisme d'action d'énantiomères purs de dérivés de la Méfloquine afin de comprendre le rôle de la configuration tridimensionnelle de ces molécules dans l'interaction avec leur cible moléculaire. Ces composés ont montré une augmentation de la réponse antiparasitaire corrélée à l'augmentation de l'inhibition de la détoxification de l'hémine. Nous montrerons au travers de ces travaux de recherche l'importance de la stéréochimie de ces molécules dans l'inhibition de l'interaction de l'hémine avec les membranes.

Nous avons par ailleurs étudié l'interaction et la reconnaissance moléculaire entre des dérivés de la pyoverdine, un chélateur de fer synthétisé par les bactéries à Gram -, et les membranes bactériennes. Cependant, ces travaux, très préliminaires, ne sont pas présentés dans ce manuscrit de thèse.

Dans ce manuscrit de thèse, nous présenterons tout d'abord la cible moléculaire des molécules étudiées, c'est à dire les membranes biologiques, mais aussi les méthodes utilisées pour l'étude de ces membranes. Nous ferons ensuite l'état de l'art des connaissances sur les molécules que nous avons étudiées. Les résultats obtenus et les discussions en découlant précéderont la conclusion générale de ces travaux.

Première partie

Les membranes naturelles et biomimétiques

Les membranes cellulaires

La *membrane cellulaire* désigne un assemblage protéolipidique en un double feuillet constitué de lipides, de protéines et de sucres (figure 2.1). La première fonction de ces membranes est de servir de rempart physique entre différents compartiments aqueux. Elles assurent une perméabilité sélective vis-à-vis des molécules présentes dans les différents milieux. Par ailleurs, elles assurent la transduction des signaux externes vers des cibles intracellulaires. Elles constituent le premier partenaire d'interaction des molécules ciblant les cellules.

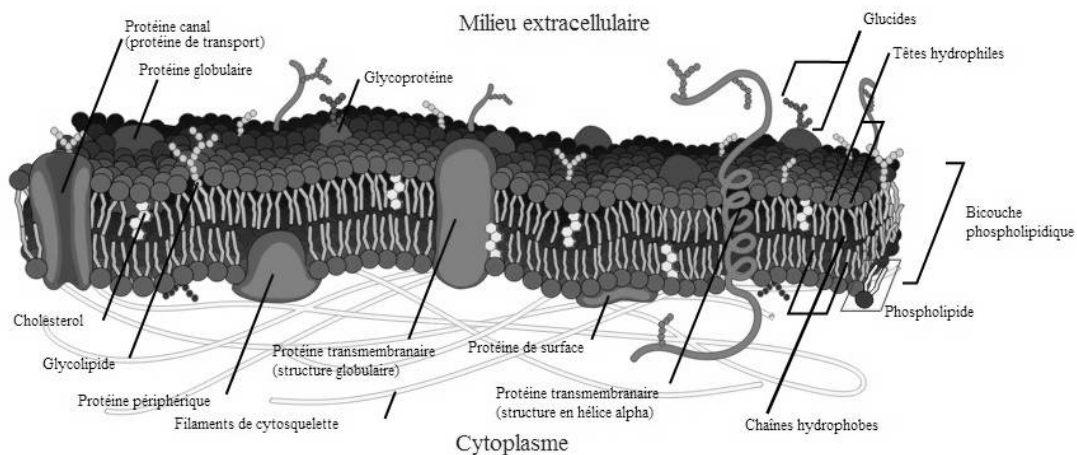


FIGURE 2.1 – **Représentation d'une membrane cellulaire** - image libre de droit

Selon le modèle de mosaïque fluide présenté par Singer et Nicholson en 1972 [1], les membranes biologiques sont des organites dynamiques très loin de l'équilibre. Du fait des éléments qui les composent, les feuillets des membranes possèdent une partie hydrophile et une autre hydrophobe. Les parties hydrophobes se font face, tandis que les parties hydrophiles sont au contact des solvants aqueux du milieu extérieur ou du milieu interne. Ces membranes fournissent ainsi un milieu adéquat pour de nombreuses molécules biologiques hydrophobes, telles que les protéines membranaires. Son intégrité est principalement maintenue par des liaisons de faible énergie entre les lipides, ce qui lui permet d'avoir un potentiel de réarrangement structural rapide. La structure et la fonc-

tion des membranes cellulaires sont basées sur les propriétés intrinsèques des lipides qui la composent.

2.1 Les principaux lipides membranaires

Les lipides membranaires constituent la base des membranes cellulaires et sont responsables de l'organisation en double feuillet. Ce sont des molécules amphiphiles, contenant une partie hydrophile et une autre hydrophobe. De nombreux types de lipides sont retrouvés dans les membranes. Ils sont généralement classés en 4 catégories :

- Les glycérophospholipides,
- Les glycolipides,
- Les sphingolipides,
- Les stérols.

La composition en lipide est très dépendante des fonctions de la membrane et des besoins de la cellule (figure 2.2).

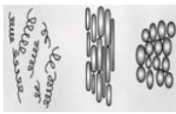

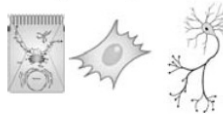
	Bacteria	Yeast	Higher Organisms
			
Lipid composition	Mainly PE and PG	4 SPs, GPs, and sterols	GPs, sterols, and tissue-specific SPs
Membrane properties	Robust Different shapes	Robust Different shapes Complex organelle morphology	Robust Different shapes Complex organelle morphology Complex and specific cellular architecture
Functionalities	Membrane protein incorporation	Membrane protein incorporation Membrane budding Vesicular trafficking	Membrane protein incorporation Membrane budding Vesicular trafficking Specific functions depending on the cell type

FIGURE 2.2 – **Relation entre le type cellulaire et la composition lipidique des membranes.** SPs : Shingolipides, GPs : Glycérophospholipides, PE : PhosphatidylEthanolamine, PG : PhosphatidylGlycérol

2.1.1 Les glycérophospholipides

Les glycérophospholipides sont des lipides à squelette glycérol. Un à deux acides gras sont estérifiés sur ce squelette en positions *sn*-1 et *sn*-2. Différents acides gras pouvant être retrouvés dans les glycérophospholipides sont présentés figure 2.3-tableau. Les acides gras retrouvés dans les membranes cellulaires sont majoritairement constitués de 16 carbones minimum ; ces chaînes acyles forment la partie hydrophobe des glycérophospholipides. Ils sont très souvent saturés sur la chaîne en *sn*-1 et insaturés sur la chaîne en *sn*-2. Les insaturations sont principalement en configuration *cis* ; des configurations *trans* peuvent être

retrouvées dans certains métabolismes, mais sont principalement générés par l'industrie agro-alimentaire.

Les acides gras saturés sont linéaires (figure 2.3-A) ; l'ajout d'une insaturation incline la chaîne acyle de 30° (figure 2.3-B). Un grand nombre de chaînes saturées génère une rigidification de la membrane due aux grand nombre d'interactions hydrophobes entre les chaînes. Les phospholipides avec un nombre important de chaînes acyles saturées sont généralement caractérisés par une température de transition solide/liquide élevée, autour ou au dessus des températures physiologiques (figure 2.3-tableau). Les insaturations empêchent ces interactions, ce qui fluidifie les membranes. Dans les membranes cellulaires, les chaînes acyles des phospholipides sont suffisamment insaturées pour permettre à la membrane d'être en phase fluide.

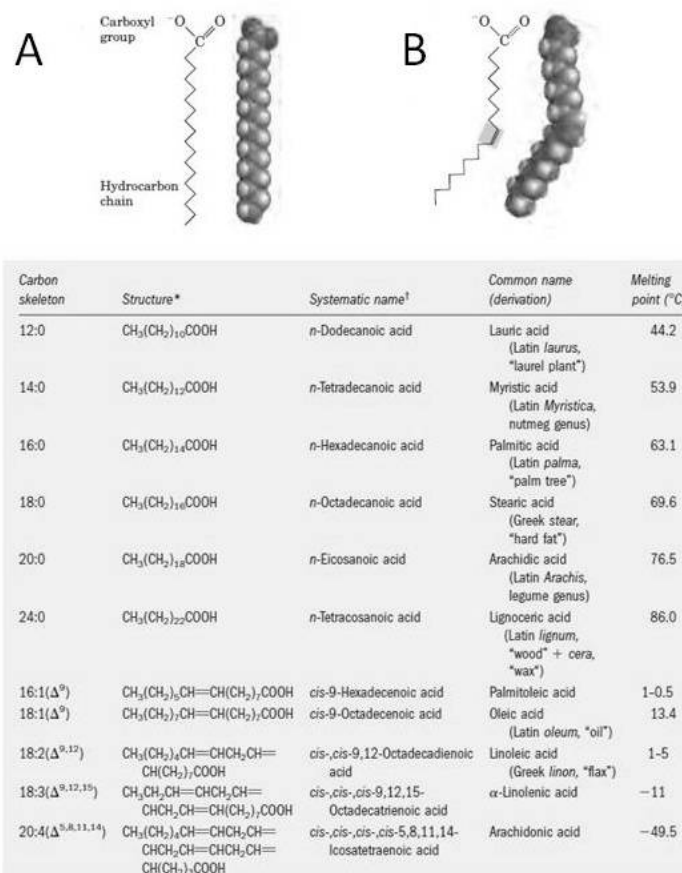


FIGURE 2.3 – Structure d'une chaîne acyle saturée (A), d'une chaîne acyle monoinsaturée (B) et structure chimique de différents acides gras retrouvés dans les phospholipides (tableau) - d'après [2]

Les phospholipides possèdent aussi un groupement polaire, hydrophile, appelé tête polaire. Ces têtes polaires sont positionnées sur la fonction hydroxyle libre du glycérol. Elles sont constituées d'un groupement phosphate et d'un groupement "R" variable qui détermine la nature et l'état de charge des phospholipides (figure 2.4). Dans les membranes eucaryotes, ces têtes polaires sont le plus souvent la phosphocholine, la phosphoéthanolamine, la phosphoserine et la phosphoinositol, donnant respectivement la PhosphatidylCholine,

la PhosphatidylEthanolamine, la PhosphatidylSerine et la PhosphatidylInositol ¹.

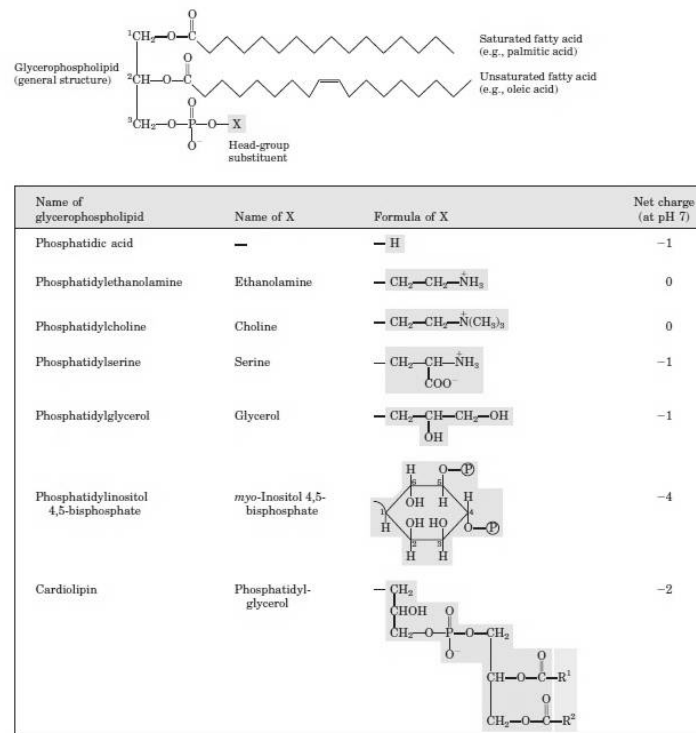


FIGURE 2.4 – Structure des phospholipides les plus retrouvés dans les membranes cellulaires - d'après [2]

La PC et la PE sont les lipides majoritaires des membranes du vivant. Dans les cellules de mammifères, la PC seule peut être retrouvée à hauteur de 50% des phospholipides totaux [3]. Elle est en revanche absente des membranes bactériennes, ces dernières ne pouvant synthétiser la tête polaire associée [4]. Sa charge nette est neutre, ce qui en fait un lipide zwitterionique.

La PE est aussi un lipide zwitterionique et est le 2^{ème} lipide le plus présent dans les membranes de mammifères. Dans ce type de cellules, elle peut être obtenue par décarboxylation de la PS [5]. Ce phospholipide est par ailleurs très présent dans les membranes cellulaires de la substance blanche du cerveau [6]. Dans les membranes des cellules fongiques, elle représente même, dans de nombreux cas, le lipide majoritaire [7]. De plus, la PE forme, avec le PhosphatidylGlycérol, la base des membranes bactériennes [8].

La PS est un lipide de charge nette négative responsable de la différence de potentiel entre les milieux extra- et intra-cellulaires. Elle est aussi impliquée dans le mécanisme d'apoptose des cellules [5]. Ce phospholipide est minoritaire mais est retrouvé dans tous les types cellulaires du corps humain [5].

La PI est impliquée dans beaucoup de processus cellulaires, comme la croissance cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire, l'endocytose et la différenciation cellulaire. Sa charge nette est négative mais elle est peu impliquée dans la différence de potentiel des

1. Respectivement : PC, PE, PS et PI

membranes biologiques car elle est présente qu'en faibles proportions. Selon une étude récente, la PI serait cependant le lipide majoritaire du lipidome de *S. cerevisiae* [9].

2.1.2 Les glycolipides

Les glycolipides sont des diacylglycérides : ils possèdent un squelette glycérol avec deux estérifications de chaînes acyles en *sn*-1 et *sn*-2. Le groupement hydroxyle libre du squelette glycérol est associé à un sucre par une liaison glycosidique (figure 2.5). Ce type de lipide est retrouvé en grand nombre dans les membranes des thylakoïdes des chloroplastes. Il représente de 70% à 80% des lipides totaux des plantes vascularisées [10].

Les membranes des plantes contiennent aussi des sulfolipides, dans lesquels un résidu glucosidique sulfaté est lié au diacylglycérol par une liaison glycosidique. Les sulfolipides sont chargés négativement ; cela est dû à la charge négative du groupement sulfonate (figure 2.5).

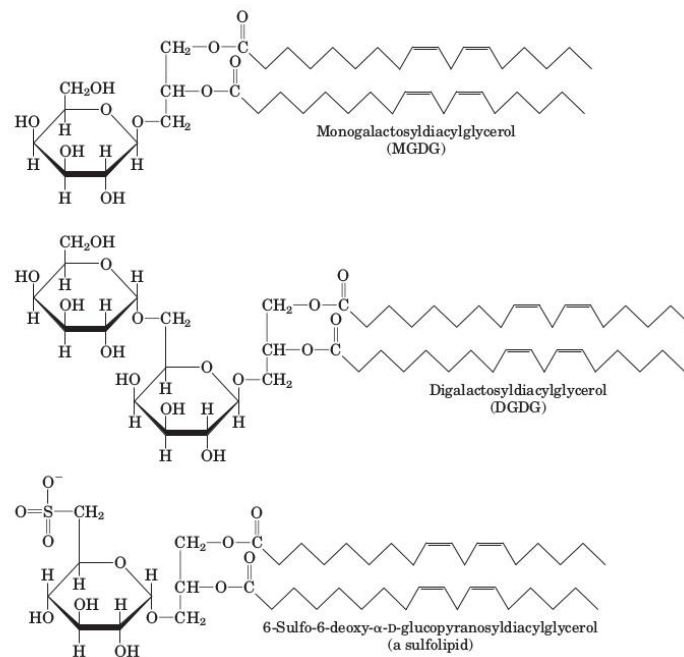


FIGURE 2.5 – Représentation de trois glycolipides retrouvés dans les membranes des chloroplastes - d'après [2].

2.1.3 Les sphingolipides

Le squelette des sphingolipides est la sphingosine ou l'un de ses dérivés. La sphingosine amidifiée sur son NH_2 par un acide gras de longueur et degré d'insaturation variables forme les céramides (figure 2.6). La partie sphingosine et l'acide gras forment la partie hydrophobe de la molécule. La partie hydrophile est constituée, comme pour les glycérophospholipides, d'une tête polaire pouvant être :

- Un groupement glucidique. Dans ce cas, il est question de « glycosphingolipides », divisés eux mêmes en deux groupes :

Les cérébosités, qui sont des glycosphingolipides avec un groupement monosaccharidique,

Les gangliosides, qui sont des glycosphingolipides avec un groupement oligosaccharidique,

- La phosphocholine, qui forme la SM².

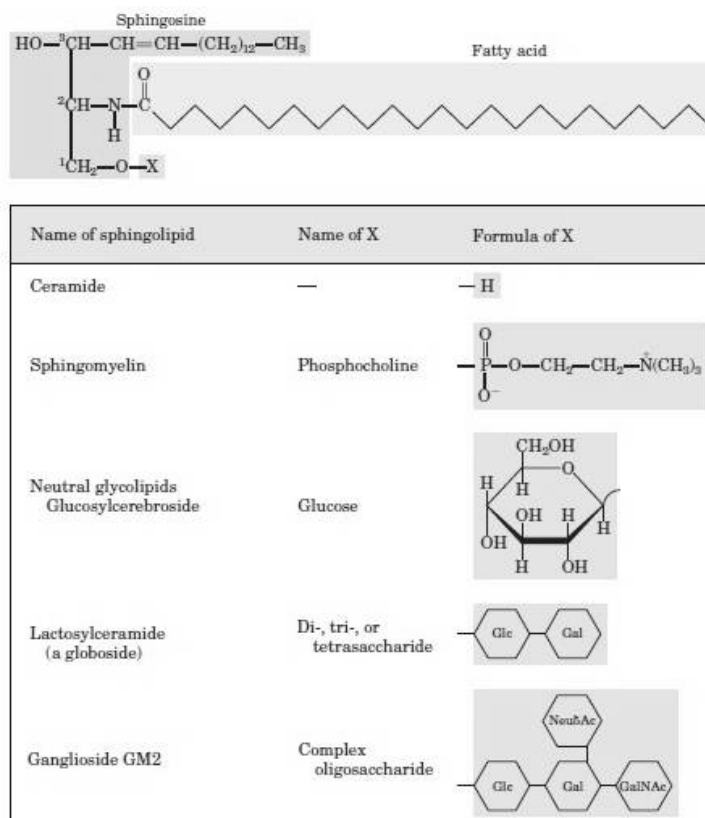


FIGURE 2.6 – Structure des sphingolipides - d’après [2]

La SM représente 10 à 20% des phospholipides totaux contenus dans les membranes des cellules humaines, tandis que les glycosphingolipides sont présents en très faibles quantités [11]. D’une manière générale, les sphingolipides jouent un rôle important dans la transmission du signal et la reconnaissance des cellules. Ils sont impliqués dans l’hétérogénéité des membranes, que nous aborderons plus loin.

2.1.4 Les stérols

Les stérols sont des composés cycliques caractérisés par la présence d’un noyau stéran³ portant une ou plusieurs fonction(s) alcool(s). Ce sont des molécules beaucoup plus apolaires que les lipides décrits plus haut. Ils sont retrouvés dans les membranes cellulaires

2. SM = Sphingomyéline

3. Stéran : alcane quadricyclique constitué de trois cycles à 6 atomes et d’un cycle à 5 atomes

des végétaux, des animaux et des fongiques. Leur principale fonction est de contrôler la compaction membranaire [2].

Le Cholestérol⁴ (figure 2.7-A) est le stérol le plus étudié dans la littérature scientifique. Il possède une toute petite tête polaire constituée d'un groupement $-OH$. Chez les plantes, les stérols majoritaires sont le Sitostérol (figure 2.7-C) et le Stigmastérol, tandis qu'on retrouve principalement l'Ergostérol⁵ (figure 2.7-B) dans les membranes des cellules fongiques.

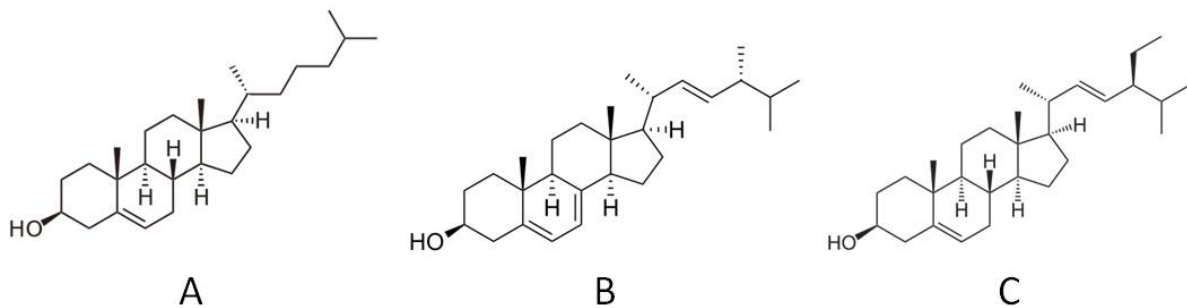


FIGURE 2.7 – Structure du Chol (A), de l'Ergo (B) et du Sitostérol (C)

Les membranes bactériennes ne contiennent pas de stérol. Le Chol est en revanche retrouvé à des pourcentages autour de 30% des lipides totaux dans les membranes des cellules de mammifères [3]. Il a pour effet d'augmenter le degré d'ordre des chaînes acyles et de diminuer l'aire moléculaire des lipides [12]. Il module la compaction membranaire sans réellement perturber la diffusion latérale des composants membranaires [12].

2.2 Les différents états physiques des membranes

Les bicouches peuvent adopter des états physiques différents appelés *phases lipidiques*. Lorsqu'elles sont composées d'un seul type de lipides, l'augmentation de la température du système provoque la réorganisation des lipides composant les bicouches d'une configuration dite "gel" vers une configuration dite "fluide". La température à laquelle se fait cette transition est appelée "température de transition" ou T_M . Cette T_M dépend de la longueur des chaînes lipidiques et du nombre d'insaturation des chaînes acyles, mais aussi de la nature de la tête polaire [13]. L'ajout d'une ou de plusieurs insaturation(s) fait baisser la T_M , tandis que des chaînes acyles longues et saturées vont la faire augmenter.

À une température supérieure à la T_M , une membrane sera en phase fluide (figure 2.8-A), souvent notée L_d ou L_α . Dans cette phase, la vitesse de diffusion des lipides est importante et les chaînes acyles sont très mobiles, ce qui entraîne un paramètre d'ordre S faible. Un faible paramètre S est associé à une faible épaisseur de membrane. Une membrane en phase fluide est élastique, capable de résister aux déformations, mais peu rigide.

4. Cholestérol : plus loin, Chol

5. Ergostérol : plus loin, Ergo

À une température inférieure à la T_M , une membrane lipidique sera en phase gel⁶ (figure 2.8-B), souvent notée S_o ou L_β . En phase gel, le paramètre d'ordre S est très élevé, ce qui provoque une rigidification des chaînes acyles et l'augmentation de l'épaisseur de la membrane. Cette membrane est plastique : elle est très rigide mais supporte mal les déformations. Le coefficient de diffusion D_T est en revanche faible : la vitesse de diffusion des lipides est très faible.

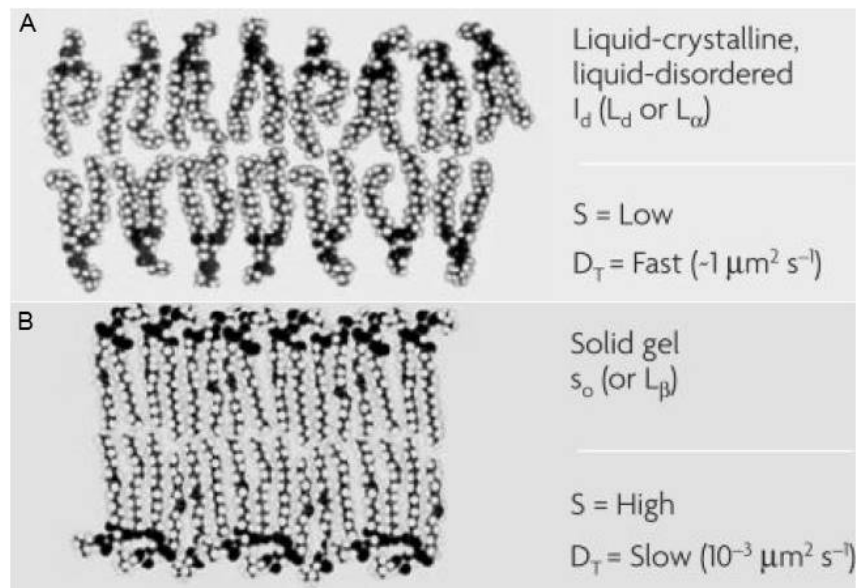


FIGURE 2.8 – **Représentation et caractéristiques des phases L_d et S_o** - d'après [12]
A : Phase fluide L_α ou L_d . B : phase solide L_β ou S_o .

Si la membrane est composée de différents phospholipides ayant des températures de transition différentes, alors il est possible d'observer une ségrégation latérale des lipides, générant ainsi des domaines lipidiques dans des états différents [15]. Certains lipides comme la DPPC, la DMPC et la DSPC⁷ possèdent une phase intermédiaire entre les phases gel et fluide, appelée "Ripple phase", ou phase plissée, notée P_β , qui aboutie à la formation d'ondulations périodiques à la surface de la membrane [16] (figure 2.9).

Cette phase apparaît à des températures dite de "pré-transition", juste avant la T_M . L'intervalle entre la température de pré-transition et la T_M dépend de la longueur de la chaîne acyle du phospholipide utilisé : plus la chaîne est courte et plus l'intervalle est grand. Il est par exemple de 10°C pour la DMPC et de 7°C pour la DPPC [17].

Le Chol favorise l'apparition d'une autre phase lipidique liquide appelé L_o pour "Liquid-ordered" [18, 19]. En phase L_o , les chaînes acyles des lipides ont des propriétés intermédiaires entre celles des phases L_d et S_o . Comme montré figure 2.10, la phase lipidique L_o possède, tout comme la phase L_d , un coefficient de diffusion D_T important, tout en ayant un paramètre d'ordre S comparable aux phases S_o .

6. Les membranes biologiques ne possèdent pas de phase gel [14].

7. respectivement, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine - C16 :0 ; 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-

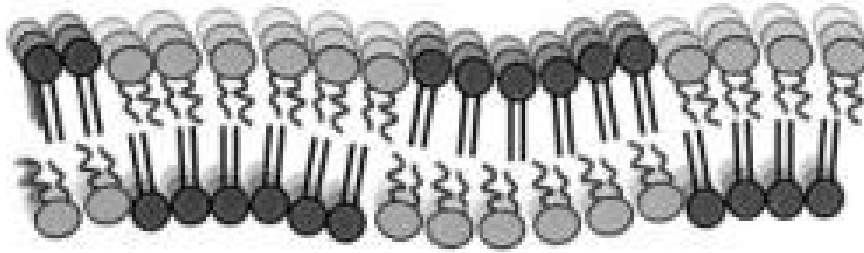


FIGURE 2.9 – **Représentation de la phase ripple** - d'après [16]. Les lipides en noir sont en phase gel, tandis que les lipides en gris sont en phase fluide.

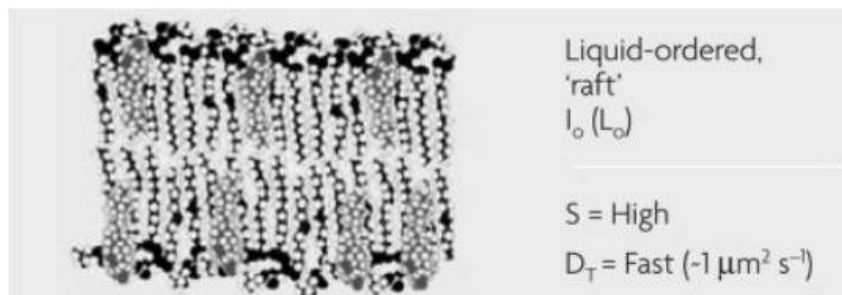


FIGURE 2.10 – **Représentation et caractéristiques de la phase L_o** - d'après [12]

Dans cette phase lipidique, le Chol participe à la rigidification des chaînes acyles des phospholipides, tout en maintenant une haute vitesse de diffusion D_T .

2.3 Les composants des membranes cellulaires sont distribués d'une manière non-homogène

Le premier modèle de membranes biologiques est attribué à Singer et Nicholson [1]. Selon ce modèle, les membranes biologiques sont des fluides bidimensionnels dans lesquels les molécules la composant possèdent un certain degré de mobilité latérale qui permet leur diffusion libre et leur distribution aléatoire dans la membrane. Cette théorie s'est vu affinée avec le temps, notamment pour expliquer le fait que les deux feuillets des membranes de mammifères avaient des compositions lipidiques différentes [20, 21]. Par ailleurs, il a été montré que les composants des membranes peuvent très bien créer des "structures ordonnées (ou domaines) qui diffèrent dans leurs compositions en lipides et/ou en protéines de la membrane environnante" [22].

3-phosphocholine - C14 :0 ; 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine - C18 :0

2.3.1 Les membranes biologiques ont des feuillettes de compositions hétérogènes

Le feuillet externe de la membrane contient principalement de la PC et des sphingolipides, tandis que le feuillet interne contient principalement de la PE et de la PS [20, 21]. La distribution des lipides entre les deux feuillettes des membranes n'est donc pas aléatoire. Une estimation de la distribution des phospholipides dans les membranes plasmiques des cellules eucaryotes est proposée figure 2.11.

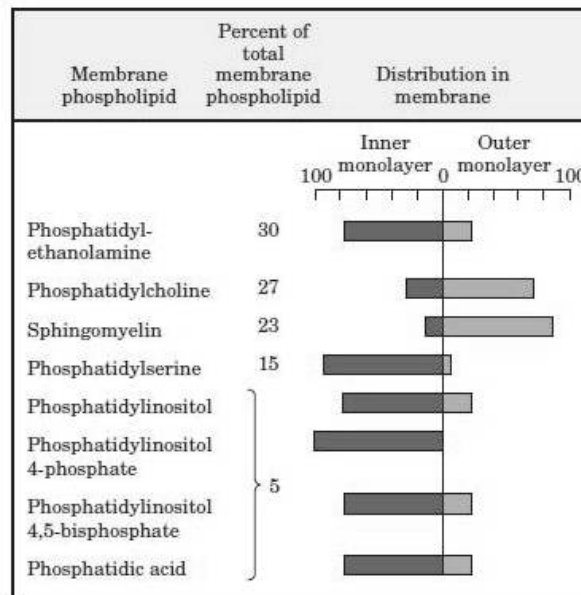


FIGURE 2.11 – Répartition des phospholipides entre les feuillettes interne et externe de la membrane des érythrocytes - d'après [2]

Selon cette estimation, les lipides possédant une tête polaire phosphocholine sont majoritaires et représentent 50% des phospholipides totaux (PC + SM). Viennent ensuite la PE, qui représente 30% et la PS, 15% des phospholipides totaux. Le feuillet externe est principalement constitué de PC et de SM, tandis que le feuillet interne est composé essentiellement de PE et de PS. Cette hétérogénéité est largement observée dans le monde du vivant, de la cellule fongique à la cellule animale et est utile pour la cellule, notamment pour la localisation de la PS, impliquée dans le mécanisme d'apoptose chez les cellules des mammifères [5].

La répartition non symétrique des lipides est principalement assurée par des protéines, notamment grâce aux flippases, floppases et scramblases des cellules humaines [5, 23]. La présence de protéines flip-flop dans les membranes de cellules fongiques n'a pas encore été établie, même si d'éventuels candidats ont été reportés, comme le transporteur CD1, une protéine transmembranaire faisant partie de la superfamille des ATP Binding-Cassette [24]. Cette distribution non homogène des lipides peut être aussi provoquée par des molécules externes comme des détergents, des alcanes ou encore l'insertion de protéines dans la membrane. De plus, certains lipides bioactifs, comme le diacylglycerol ou les céramides,

peuvent spontanément passer d'un feuillet à l'autre [23]. Lors de leur translocation, les céramides peuvent aussi entraîner la translocation d'autres phospholipides [23].

La distribution du Chol dans les membranes est cependant encore sujette à controverses. En effet, certains articles scientifiques montrent un enrichissement du Chol dans le feuillet externe des membranes plasmiques [25, 26, 27], tandis que d'autres montrent un enrichissement dans le feuillet interne : il y est retrouvé à hauteur de 75% dans les érythrocytes humains [28] et 85% dans les membranes des cellules synaptiques de souris [29, 30]. La distribution du Chol a aussi été montrée comme étant homogène entre les deux feuillets [31].

2.3.2 Concept des Radeaux lipidiques

La distribution latérale des composants des feuillets des membranes biologiques est elle aussi non-homogène. Ce constat est particulièrement évident pour les cellules polarisées des épithéliums, qui possèdent une face basale et une face apicale, chacune de composition protéique et lipidique très différentes [32].

Le Chol constituerait un des éléments clés de cette hétérogénéité. Il a été montré que pour des ratios en POPC/SM/Chol proches de ceux retrouvés dans les membranes biologiques, il y a coexistence des phases lipidiques L_o et L_d : la phase L_o est enrichie en SM et en Chol tandis que la phase L_d est enrichie en POPC [33]. Ainsi, le Chol serait capable de générer des domaines avec des compositions lipidiques et des propriétés physiques différentes au sein des membranes.

Pour expliquer cet arrangement non homogène, Kai Simons et Gerrit van Meer ont proposé le concept de *Raft*, ou *Radeau lipidique* [34]. Selon la compréhension actuelle, les rafts sont enrichis en SM, en glycosphingolipides, en Chol sur le feuillet externe, et en phospholipides, notamment en PE et PS dans le feuillet interne, comme montré figure 2.12.

Comparés au reste de la membrane, ces domaines possèdent peu d'insaturations, ce qui provoque un haut degré d'ordre des lipides. Ces domaines sont de petites tailles (100-200 nm), très dynamiques et compartimentalisent certains processus cellulaires, comme l'exocytose *via* le groupe de protéines de la famille SNARE [35, 36]. Ils peuvent par ailleurs être stabilisés par des interactions protéines/protéines ou protéines-lipides [11] qui peuvent amener les Rafts à devenir des plate-formes plus grandes [35]. L'existence des Rafts chez les cellules fongiques n'est pas encore clairement établie. Cependant, un premier pas a été fait dans ce sens puisqu'il a été montré que l'Ergo est aussi capable de générer et stabiliser des phases L_o [37].

Faute de preuve non-ambigüe de l'existence des rafts, leur composition lipidique a pu être identifiée grâce aux DRMs⁸. Ces DRMs ont été isolés à partir de nombreux types de membranes cellulaires en utilisant des détergents tel que le Triton X-100 [11]. Ils ont permis aux chercheurs de s'intéresser aux propriétés physico-chimiques des Rafts. Il a, par

8. DRM : Detergent-Resistant Membrane

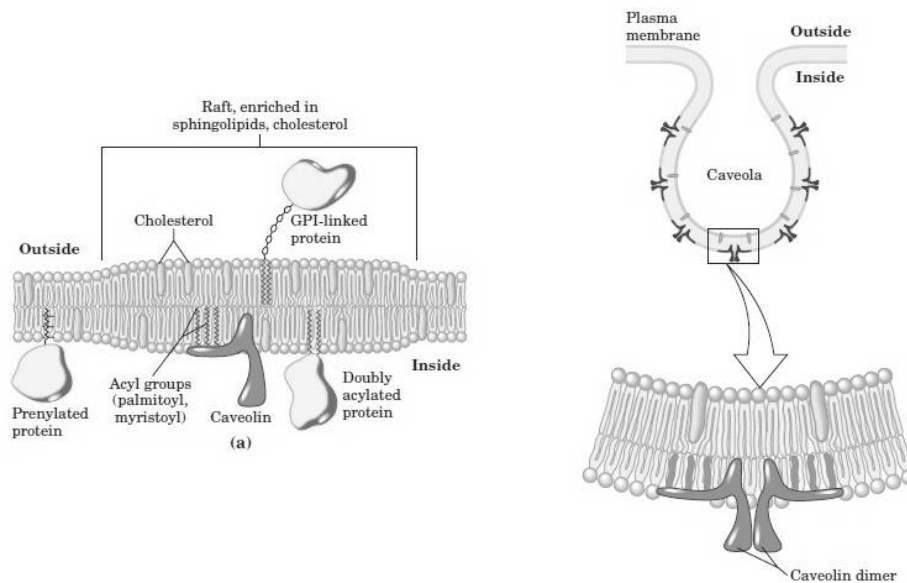


FIGURE 2.12 – Représentation de l'organisation des Rafts (gauche) et des cavéoles (droite) dans la membrane plasmique - d'après [2]. Gauche : Les Rafts se séparent du reste de la membrane qui contient principalement de la PC insaturée et un arrangement différent du Chol. Ils contiennent des protéines attachées au feuillet externe de la membrane par leur ancre GPI, liées au feuillet interne par une chaîne acyle ou encore des protéines associées par leur domaines transmembranaires. Le Chol (orange) est présent dans les deux feuilletts et bouche les espaces sous les têtes polaires des sphingolipides ou étend l'interdigitation des chaînes acyles des phospholipides du feuillet opposé. Droite : Les cavéoles sont formées par auto-association de la cavéoline, une protéine en forme de tête d'épingle, dans des domaines enrichis en SM et en Chol.

exemple, été montré que des liposomes ayant une composition lipidique mimant les Rafts étaient naturellement résistants aux détergents [38, 39]. El Kirat et Morandat ont montré, *via* l'AFM⁹, l'effet du Triton X-100 sur des bicouches planes mimant la composition des Rafts et des cellules animales [40]. Ils ont mis en évidence que ce détergent ne solubilisait pas les membranes mimant les Rafts comme il le fait pour les membranes mimant les cellules de mammifères, mais qu'il érodait les bords de ces membranes. Ils ont ainsi mis en avant l'importance du Cholestérol et sa participation à l'élaboration de la phase L_o pour expliquer cette résistance aux détergents.

Les cavéoles constituent aussi un type de domaine particulier. Elles correspondent à des invaginations de la membrane cellulaire (figure 2.12-droite) [41, 42]. Elles sont considérées comme un sous-groupe de Raft car elles ont une composition lipidique similaire : elles sont, comme les Rafts, enrichies en Chol et en SM. Elles sont formées sous l'action de la dimérisation de la cavéoline. La forme en tête d'épingle de cette protéine permet la stabilisation de l'invagination. Les cavéoles sont notamment impliquées dans les phénomènes de transcytose¹⁰ [42].

9. AFM : "Atomic Force Microscopy"

10. Transcytose : Endocytose sans clathrine cellulaire

Les modèles membranaires

Pour atteindre une cible intracellulaire, une molécule exogène doit pénétrer au sein de la cellule et donc franchir ce premier obstacle biologique qu'est la membrane plasmique. Son premier partenaire d'interaction est le feuillet externe de la membrane de la cellule. Actuellement, aucun outil ne permet une étude exhaustive des effets d'une molécule sur une membrane biologique intacte. La communauté scientifique a donc mis au point des outils et des techniques d'analyse afin de simplifier la recherche de potentiels partenaires membranaires d'interaction avec des molécules d'intérêt. Ces outils partent d'une idée simple : simplifier la composition des membranes tout en gardant leurs propriétés physico-chimiques fondamentales.

Les modèles membranaires miment les propriétés physico-chimiques des membranes tout en ayant une composition flexible. Ils constituent un moyen d'étude de l'interaction molécule/membrane efficace car tous ces modèles sont à l'équilibre. Par ailleurs, la composition lipidique de ces membranes étant connue, il est plus simple de caractériser une interaction particulière entre un lipide ou un ensemble de lipide et une molécule. Nous détaillerons dans ce chapitre les modèles membranaires les plus couramment utilisés et nous décrirons leurs applications possibles pour l'étude des interactions molécules/membranes.

3.1 Les monocouches de Langmuir

Les monocouches de Langmuir sont des films monomoléculaires permettant de mimer un des deux feuillets lipidiques des membranes biologiques. Ils sont très utilisés, notamment pour étudier les phénomènes d'insertion de molécules dans les membranes. Cependant, le fait qu'ils ne miment qu'un des deux feuillets des membranes biologiques rend impossible leur utilisation pour étudier les interactions protéines transmembranaires/membranes.

Ces modèles sont tout indiqués pour les études molécules/membranes aux interfaces biologiques en utilisant des techniques comme la tensiométrie de surface ou la Microscopie à l'angle de Brewster.

Le premier à avoir travaillé sur les monocouches de Langmuir est sans conteste Benjamin Franklin. En 1762, il se promène au bord de l'étang de Clapham en Angleterre, et décide d'y verser un peu d'huile, l'équivalent, selon ses dires, d'une cuillère. Il observe qu'une tache se forme à la surface et s'étend rapidement jusqu'à couvrir presque un quart de la superficie du plan d'eau. Les scientifiques de l'époque ont alors tenté de comprendre les phénomènes physiques mis en jeu. Ainsi, Agnes Pockels décrivit une méthode utilisant des barrières pour étudier ces films lipidiques. Rayleigh stipula 8 ans plus tard que ces films sont probablement monomoléculaires. C'est finalement Irving Langmuir qui, pour la première fois, en 1917, décrit une méthode d'étude de ces films lipidiques. Il proposa un dispositif expérimental permettant de les manipuler : il s'agissait d'une cuve munie d'une plaque isolant la plaque d'huile de la surface d'eau pure. En hommage à cette découverte, cette cuve porte aujourd'hui encore son nom.

En 1937, Katharine Burr Blodgett montra comment transférer un film lipidique monomoléculaire sur un support solide à partir de la manipulation des monocouches lipidiques proposée par Langmuir. Cette technique porte aujourd'hui le nom de transfert de "Langmuir-Blodgett".

La technique de Langmuir est entièrement basée sur le caractère amphiphile des molécules, caractère décrit section 2.1 page 22. Dans le cas où ils sont déposés à la surface d'une solution aqueuse, ces lipides vont s'auto-organiser en monocouche plane. Leur tête polaire, hydrophile, sera immergée dans le solvant aqueux tandis que leurs chaînes aliphatiques seront dirigées vers l'air.

3.1.1 Principe de formation d'une monocouche de Langmuir

Les monocouches de Langmuir sont préformées par étalement de lipides solubilisés dans un solvant organique. Ce solvant est souvent du chloroforme, mais il peut aussi s'agir d'hexane, ou encore de mélanges de solvants. La formation de la monocouche et la dispersion des lipides à l'interface air/eau sont fortement liées à la capacité d'étalement de ce solvant. Plus le coefficient d'étalement sera important et plus les lipides auront tendance à s'étaler sur tout l'espace disponible [43]. Dans une cuve de Langmuir, cet espace est délimité par les bords de la cuve elle-même et deux barrières mobiles (figure 3.1). Les lipides présents à l'interface air/eau modifient la tension de surface. Sous l'effet de l'avancement symétrique des barrières, la surface totale disponible diminue, réduisant l'aire disponible par molécule. Cela va obliger les lipides à s'organiser de manière de plus en plus condensée (figure 3.1 milieu et bas). Plus l'espace disponible est faible, plus l'état de compaction de la monocouche sera important et plus la tension superficielle sera importante. Cette évolution peut être mesurée par un tensiomètre. Dans le cas des monocouches de Langmuir, la "balance de Wilhelmy" est couramment utilisée. Ce dispositif possède une lamelle partiellement immergée qui permet de connaître la tension interfaciale. Il est ainsi possible de tracer l'isotherme ($\pi - A$) de compression du lipide étudié qui relie la pression

de surface π à l'aire moyenne occupée par une molécule à l'interface air/eau.

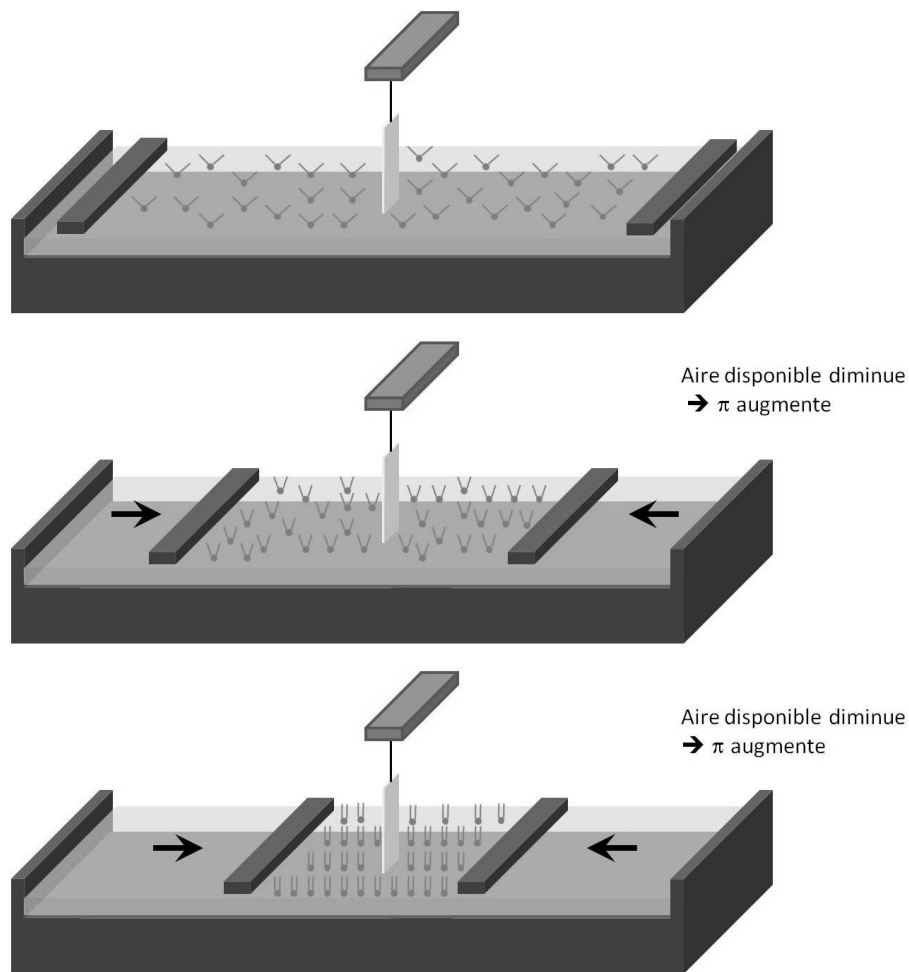


FIGURE 3.1 – Principe de la formation des films monomoléculaires par la technique de Langmuir

3.1.2 Mesure de la pression de surface par la balance de Wilhelmy

Il existe plusieurs techniques pour mesurer la tension de surface. En revanche, comme dit plus haut, la balance de Wilhelmy est le dispositif le plus répandu pour mesurer la variation de la tension de surface provoquée par des monocouches lipidiques.

La balance de Wilhelmy est un dispositif permettant de mesurer la variation de la tension de surface à l'aide d'une lame suspendue et partiellement immergée dans la sous-phase. Il est aussi possible de mesurer la pression de surface grâce à ce dispositif : cela nécessite de calibrer la balance sur une sous-phase dépourvue de lipide et de composition connue. La lame est soumise à un ensemble de force dont le vecteur est perpendiculaire au sol (figure 3.2). Cette force, notée F , est la résultante du propre poids de la lame, de la poussée d'Archimède et de la force due à la tension superficielle. La somme de ces forces pousse la lamelle vers le bas. La force F a pour formule :

$$F = \rho_{\text{lame}} \times l \times L \times e \times g + 2\gamma \cdot (e + 1) \cdot \cos\theta - \rho_{\text{eau}} \times l \times h \times e \times g \quad (3.1)$$

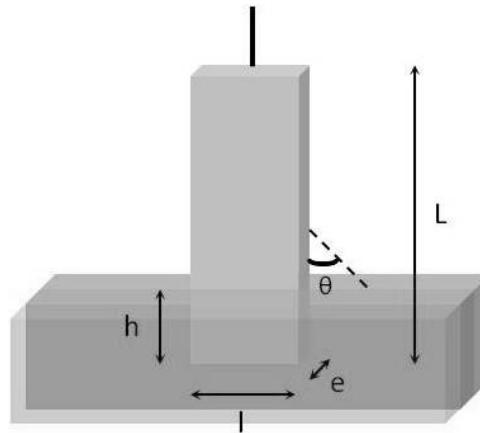


FIGURE 3.2 – Principe de la balance de Wilhelmy

avec :

- ρ_{eau} et ρ_{lame} : respectivement, la masse volumique de l'eau et de la lame
- g : accélération de la pesanteur
- γ : tension superficielle
- L et l : Longueur et largeur de la lame
- h : hauteur de la partie immergée de la lame
- e : épaisseur de la lame.

La mesure de la tension de surface γ est alors définie par :

$$\gamma = \frac{F}{2\cos\theta(e + l)} \quad (3.2)$$

Pour simplifier les calculs, des lamelles en papier filtre, en verre ou en platine sont couramment utilisées. Ces matières, parfaitement mouillantes, permettent d'avoir un angle de contact nul entre la lame et l'interface. Ainsi, l'expression devient :

$$\gamma = \frac{F}{2(e + l)} \quad (3.3)$$

Pour déterminer la pression de surface, il est nécessaire de mesurer le différentiel de force exercée sur la lame par l'eau pure et par l'eau en présence de surfactant. Toujours en considérant l'angle $\theta = 0$, ce différentiel de force ΔF est relié à une variation de la tension de surface et a pour formule :

$$\Delta F = 2(e + l)(\sigma_0 - \sigma) \quad (3.4)$$

avec σ_0 la tension de surface de l'eau pure et σ la tension de surface du système. Dans les expériences de Langmuir, il est généralement fait mention de la pression de surface π

plutôt que de la tension de surface.

$$\pi = \frac{\Delta F}{2(e+l)} \quad (3.5)$$

On obtient donc :

$$\pi = \sigma_0 - \sigma \quad (3.6)$$

Ainsi, la variation de la pression de surface correspond au différentiel de la tension de surface entre l'eau pure et le système étudié.

3.1.3 Isothermes de compression de lipides purs

En couplant l'avancement des barrières à la mesure de la pression, il est possible de suivre l'évolution de l'aire moléculaire des lipides. La courbe reliant la pression de surface π à l'aire moléculaire moyenne (A) occupée par une molécule à une température donnée est appelée *isotherme de compression* ($\pi - A$). Lors de la compression, les monocouches passent par différents stades d'organisation. Les isothermes de compression ($\pi - A$), associé à la détermination du module de compressibilité de la monocouche, permettent de déterminer ces différents états.

3.1.3.1 Module de compressibilité

Il est possible, à partir de l'isotherme de compression, de déterminer la compressibilité de la monocouche. Par définition, la compressibilité, notée C_s , est une mesure de la capacité de déformation d'une monocouche de Langmuir lors de sa compression. Elle correspond à l'inverse de l'élasticité notée K_s et reflète l'état de viscoélasticité du film lipidique. Elle peut être calculée directement à partir de la pente de l'isotherme ($\pi - A$). Elle a pour définition :

$$C_s = \frac{-1}{A} \times \frac{dA}{d\pi} \quad (3.7)$$

Dans cette équation, A correspond à une aire moléculaire donnée à une pression π donnée et à une température T donnée [44, 45]. Au cours de la compression, le K_s augmente, ce qui fait aussi augmenter l'élasticité de la monocouche. Le K_s est donc lié aux différentes phases lipidiques observées sur une isotherme.

3.1.3.2 Détermination des phases lipidiques

Pour illustrer cette section, nous prendrons l'isotherme de compression représentée figure 3.3.

Sur la courbe, il existe 4 états différents. La partie "gaz" de la courbe correspond à une phase où la pression est nulle. Durant cette phase, la surface disponible est grande par rapport au nombre de molécules de lipides. Ces derniers n'interagissent pas entre eux et

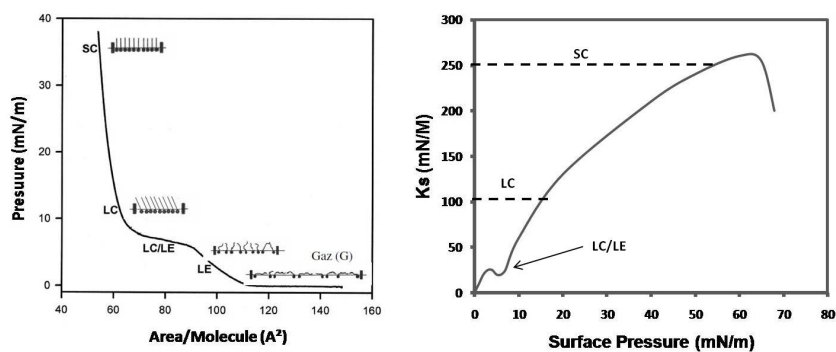


FIGURE 3.3 – **Exemple d'isotherme et de module de compression** Gauche : Isotherme ; Droite : Module de compression. LE : Liquide Expansé ; LC : Liquide Condensé ; SC : Solide

n'ont donc pas d'effet sur la pression de surface ; les lipides se comportent comme un gaz. À ce stade de l'isotherme, le K_s est égal à 0 mN/m [46]. Cette phase est appelée *phase gaz*.

En initiant la compression, la surface disponible va diminuer, ce qui va provoquer un rapprochement des lipides et faire augmenter la pression de surface. Cette état correspond à la partie "LE" de l'isotherme. Nous pouvons observer une augmentation de la pression significative, jusqu'à 5 mN/m. Dans cette phase, les chaînes alkyles du lipide étudié vont se redresser et interagir entre elles. La valeur de K_s associée à cet état physique est située autour de 50 mN/m [46]. Cet état est appelé *Liquide Expansé*.

La phase LE est suivie de la phase LC, nommée *phase Liquide Condensée*. Cette phase est caractérisée par un arrangement compact des têtes polaires et un agencement ordonné des chaînes alkyles. Les interactions lipides/lipides sont renforcées et l'élasticité de la monocouche est augmentée. Cette phase lipidique est atteinte lorsque le K_s est égale ou supérieur à 100 mN/m [46].

Dans le cas de notre isotherme, il existe une transition de phase observée sur l'isotherme entre 5 et 7 mN/m (notée LE/LC), qui correspond à une coexistence des deux phases LE et LC. Cette transition est dépendante de la température, de la nature du tampon et du lipide. Les transitions de phase provoquent une chute du K_s . Cette diminution est suivi d'une réaugmentation du K_s , signe que la transition de phase est terminée.

Sur l'isotherme, la phase LC est suivi de la phase solide (notée SC). Cette phase correspond à une forte compaction du film lipidique. La phase solide est atteinte à des valeurs de K_s élevées, autour de 250 mN/m [46]. L'isotherme se termine enfin par le collapse de la monocouche, représentée par une chute de pression sur l'isotherme de compression et une chute brusque du K_s . Ce collapse traduit une perte de matériel de l'interface air/eau vers la troisième dimension de l'espace : après cette pression de collapse, il y a formation de multicouches de lipides et/ou désorption de lipides dans la sous-phase.

3.1.3.3 Miscibilité et idéalité des mélanges

Les isothermes de compression sont utiles pour étudier les propriétés thermodynamiques de mélanges lipides/lipides ou lipides/agents externes. Elles peuvent renseigner sur le type d'interactions existant entre les molécules. Par exemple, les interactions lipides/lipides sont dues à leur orientation particulière : têtes polaires dans la phase aqueuse et queues hydrophobes dans l'air. Ainsi, dans cette configuration, deux effets influencent la force des interactions existantes. Le premier effet correspond à la force attractive entre les chaînes aliphatiques des lipides. Cet effet est notamment responsable de la formation de micelles. L'autre effet est dû à l'interaction entre les têtes polaires. Dans des monocouches à l'interface air/eau contenant deux molécules amphiphiles différentes, les têtes polaires peuvent être de natures différentes avec un état de charge différent. Des têtes polaires cationiques, zwitterioniques, neutres ou encore anioniques vont provoquer des phénomènes de répulsions et/ou d'attractions. Cet effet est en très grande partie responsable de la déviation de l'idéalité observée dans les mélanges [44].

Dans le cas de monocouches insolubles, les interactions entre les composants du mélange peuvent être interprétées en se basant sur leur miscibilité. Dans ce cas, il existe trois cas possibles :

- les composés sont miscibles et répartis de manière homogène à l'interface air/eau (figure 3.4-a),
- les composés sont partiellement miscibles et forment un film hétérogène (figure 3.4-b),
- les composés sont non-miscibles. Les lipides forment des domaines bien distinct et il existe une séparation nette des composés (figure 3.4-c).

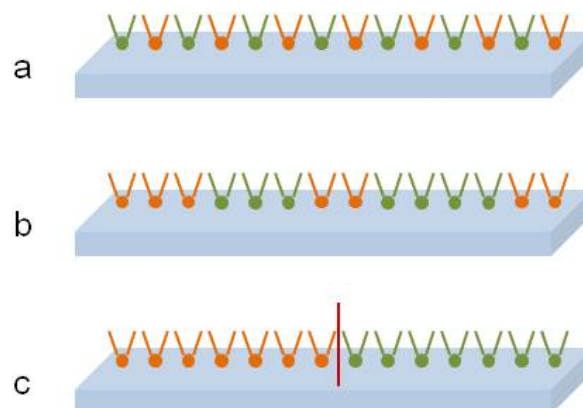


FIGURE 3.4 – Répartition de lipides miscibles (a), partiellement miscibles (b) et non miscibles (c) à l'interface air/eau

Le caractère de miscibilité d'un mélange peut être étudié en examinant les pressions de collapse de la monocouche. En effet, dans un mélange binaire non-miscible, il existe deux pressions de collapse différentes qui correspondent à la pression de collapse de la monocouche des deux composés purs. Dans le cas où les composants sont miscibles, la

pression de collapse des isothermes du mélange binaire aura pour formule :

$$\pi_{c1-2} = \pi_{c1}.X_1 + \pi_{c2}.X_2 \quad (3.8)$$

où X_1 et X_2 sont les fractions molaires des composés 1 et 2 et π_{c1} et π_{c2} les pressions de collapse des composés 1 et 2.

Dans le cas d'un mélange de molécules miscibles, l'idéalité du mélange peut être déterminé en calculant l'aire moléculaire idéale, A_{ideal} . Elle a pour formule :

$$A_{ideal} = X_1.A_1 + X_2.A_2 \quad (3.9)$$

avec X_1 et X_2 les fractions molaires des composés 1 et 2 et A_1 et A_2 leurs aires moléculaires à une pression π donnée et une température T donnée [44, 45]. Trois cas se présentent alors :

- $A_{ideal} > A_{reelle}$: ce cas de figure traduit une condensation, ou encore une contraction de l'aire moléculaire moyenne. Il existe donc des forces d'attractions intermoléculaires au sein de la monocouche. Le mélange est non-idéal.
- $A_{ideal} < A_{reelle}$: il y a augmentation de l'aire moléculaire moyenne par rapport à l'aire moléculaire des composés seuls. Il existe donc des forces de répulsion intermoléculaires au sein de la monocouche. Le mélange est non-idéal.
- $A_{ideal} = A_{reelle}$: ce cas de figure montre une aire moléculaire idéale identique à l'aire moléculaire réelle. Dans ce cas, le mélange est soit idéal, soit non miscible.

Toute comme l'aire moléculaire idéale, il existe un module de compressibilité de surface idéal qui peut être déterminé par l'équation :

$$Cs_{ideal} = \left(\frac{1}{A_{ideal}}\right)((Cs_1.A_1)_{X_1} + (Cs_2.A_2)_{X_2}) \quad (3.10)$$

où Cs_1 et Cs_2 représentent les modules de compressibilité des composés purs 1 et 2 [44, 45].

Il est possible d'utiliser les isothermes de compression afin de quantifier l'excès d'énergie libre ΔG_{ex} de l'interaction entre deux composés. Le ΔG_{ex} de la réaction est alors défini par :

$$\Delta G_{ex} = \int_0^\pi A_{1-2}d\pi - \int_0^\pi A_1.X_1d\pi - \int_0^\pi A_2.X_2d\pi \quad (3.11)$$

avec A_{1-2} , A_1 et A_2 les aires moléculaires du mélange, du composé 1 pur et du composé 2 pur, respectivement et X_1 et X_2 la fraction molaire des composés 1 et 2, respectivement [45]. Lorsque $\Delta G = 0$, cela signifie que le mélange est idéal et qu'il n'existe pas d'attraction ou de répulsion entre les molécules. Un ΔG positif est le signe d'interactions intermoléculaires répulsives tandis qu'un ΔG inférieur à 0 traduit des interactions intermoléculaires attractives.

3.1.4 Transfert de monocouches sur support solide

Il est possible de transférer une monocouche sur un support solide pour une observation par AFM, par exemple. Il existe deux méthodes de transfert :

- le transfert horizontal, dit de *Langmuir-Schaefer*,
- le transfert vertical, dit de *Langmuir-Blodgett*.

Les films de Langmuir-Schaefer sont formés d'une ou de plusieurs monocouches de Langmuir déposées sur la surface d'un substrat par immersion verticale (figure 3.5).

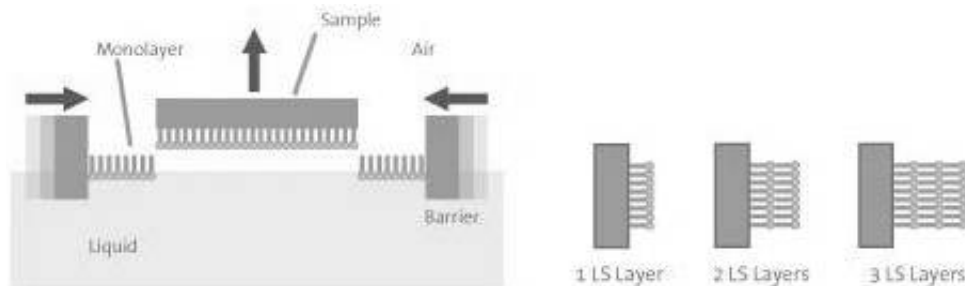


FIGURE 3.5 – Principe du transfert de monocouches par la technique de Langmuir-Schaefer. Adapté de www.biolinscientific.com

Les films obtenus peuvent être très organisés, pouvant aller d'une simple monocouche à des structures plus complexes contenant des centaines de monocouches. Cette méthode est hors-équilibre, donc irréversible, et le taux de transfert est quasiment indépendant de la pression de dépôt.

Au cours de ces travaux, nous avons utilisé uniquement la technique de Langmuir-Blodgett. Cette technique est basée sur un prélèvement vertical de la monocouche à pression constante. La diminution de pression engendrée par le transfert de lipides de l'interface air/eau vers le support solide est compensée par les barrières de la cuve de Langmuir, qui vont ajuster la pression interfaciale du système.

Selon la nature du support utilisé, l'interaction avec les lipides sera différente (figure 3.6). Le prélèvement de la monocouche par un support hydrophile se fera par émergence et ce sont les têtes polaires qui s'adsorberont au support (figure 3.6-a). Le prélèvement par un support hydrophobe se fera par immersion et les lipides seront adsorbés par interaction avec les queues hydrophobes (figure 3.6-b). Il est possible d'obtenir plusieurs couches de lipides sur un même support par plusieurs cycles d'immersion/émergence (figure 3.6-c). Le nombre de couches de lipides dépendra du nombre de fois où le support traversera la monocouche.

3.1.5 Applications des monocouches de Langmuir dans les études des interactions lipides/agents externes

Les monocouches de Langmuir sont un modèle d'étude très utilisé. Elles ont largement été employées pour étudier les interactions entre des lipides et différents composés : pro-

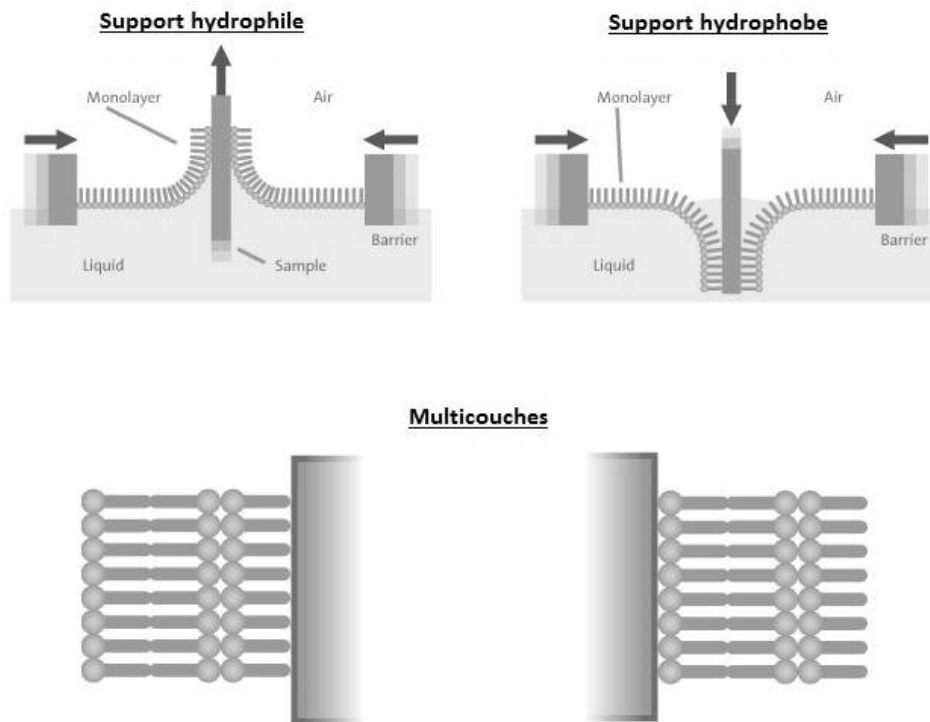


FIGURE 3.6 – Principe du transfert de monocouches par la technique de Langmuir-Blodgett. Adapté de www.biolinscientific.com

téines, sucres, polymères, médicaments et autres molécules. Elles permettent d'étudier le potentiel membranotrope d'une molécule pour une membrane de composition définie. Cela est possible en injectant la molécule d'intérêt dans la sous-phase de la membrane, sans casser le ménisque entre la lamelle et la solution. Ces expériences se font à aire constante. Une variation de la pression de surface, de formule :

$$\Delta\pi = \pi^t - \pi^{ini} \tag{3.12}$$

avec π^t la pression interfaciale à un instant t et π^{ini} la pression interfaciale initiale, traduit une interaction entre la molécule et la monocouche. Cette variation est testée à différentes pressions initiales π^{ini} . Les différentes valeurs obtenues sont représentées par la fonction :

$$\Delta\pi = f(\pi^{ini}) \tag{3.13}$$

Cette représentation graphique donne une droite à partir de laquelle différentes informations peuvent être obtenues.

Une pente positive correspond à une adsorption d'une molécule dans une monocouche. Cette adsorption est dépendante de la concentration en lipides à l'interface air/tampon : plus il y a de lipides et plus cette interaction est importante.

Une pente négative correspond en revanche à une insertion de la molécule dans la monocouche. Cette insertion est dépendante de la pression initiale de la membrane. Différents

paramètres peuvent être étudiés à partir de ce type de droite. Tout d'abord, la PIM¹ qui correspond à la pression jusqu'à laquelle la molécule étudiée peut s'insérer dans les membranes. La comparaison de différentes valeurs de PIM pour des compositions de monocouches données permet d'évaluer leur pouvoir membranotrope. La pression latérale des membranes biologiques est évaluée entre 30 et 35 mN/m [47]. Par ailleurs, une étude sur la DMPC a révélé que les monocouches et les bicouches de ce lipide sont dans le même état de compaction à 30 mN/m [48]. Une PIM supérieur à 30 mN/m en monocouche traduirait donc une insertion de cette molécule dans des membranes préformées constituées du lipide ou du mélange lipidique utilisé à pression latérale physiologique.

Il est aussi possible de comparer la quantité de molécules d'intérêt insérée dans la monocouche. Pour cela, un autre paramètre peut être étudié, le $\Delta\pi_{30}$. Il correspond au différentiel de pression $\Delta\pi$ généré par l'insertion d'une molécule dans une monocouche comprimée à une pression de 30 mN/m. Il reflète la quantité de molécules capables de s'insérer dans une monocouche à une pression équivalente à la pression latérale des membranes biologiques.

De nombreuses études relatent l'utilisation des monocouches de Langmuir pour l'étude des paramètres physico-chimiques des interactions molécules/membranes. Les molécules étudiées sont très diverses, et portent sur des interactions avec des mimes de membranes de nombreux organismes vivants. Par exemple, l'étude de l'interaction de l'AmB avec des modèles membranaires a pu montrer une insertion préférentielle dans les monocouches enrichies en stérols [49]. Maget-Dana a rapporté les différents travaux de l'interaction entre des peptides antimicrobiens connus pour interagir avec les membranes bactériennes, notamment la mélittine, et les modèles membranaires [50]. Récemment, Azouzi et ses collaborateurs ont pu montrer l'effet de la cyclosporine A sur des monocouches de Langmuir [51, 52]. Ils ont pu montrer pour la première fois que malgré sa toxicité pour l'homme, cette molécule pourrait être efficace contre les parasites de type *Plasmodium*, responsables du paludisme. Une autre équipe de recherche a même pu utiliser ces monocouches pour étudier et mieux comprendre le processus de fusion membranaire de peptides viraux du VIH [53].

3.2 Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques lipidiques possédant un compartiment interne aqueux. Ils permettent de mimer les deux feuilletts lipidiques des membranes. Ces modèles possèdent des propriétés biophysiques proches des cellules. Il est possible de modifier tant leurs compositions que leurs diamètres. Ils sont utilisés pour étudier les interactions entre des membranes et tout type de molécules chimiques et biologiques, notamment les protéines membranaires. Cependant, le rayon de courbure de ces modèles

1. PIM : Pression d'Insertion Maximale

peut poser problème : un rayon de courbure trop faible peut entraîner des modifications dans l'interaction membrane/molécule tandis qu'un rayon de courbure trop important rend les liposomes instables.

Ces modèles sont particulièrement adaptés aux études spectroscopiques, tel que la RMN ou encore les spectroscopies UV-Vis² et de fluorescence.

3.2.1 Préparation des liposomes

Comme vu précédemment, les phospholipides sont des molécules amphiphiles, possédant une partie hydrophile, la tête polaire, et une partie hydrophobe, les chaînes acyles³. Lorsqu'ils sont plongés dans un milieu aqueux, les films secs de phospholipides vont s'auto-organiser dans la configuration thermodynamique la plus favorable : les têtes polaires vont s'auto-exposer au contact du solvant tandis que les chaînes aliphatiques vont se regrouper entre elles et former un espace hydrophobe.

La structure résultante de cette association dépend de la forme des phospholipides utilisés. Cullis et De Kruijff ont introduit ce concept de forme en 1979 [54], stipulant que le volume occupé par la tête hydrophobe par rapport aux chaînes aliphatiques déterminait le type d'organisation qu'un lipide adoptera dans l'eau. Pour obtenir des liposomes, il est donc essentiel d'utiliser majoritairement un lipide de type conique tronqué, comme la PC. En fonction du mode de préparation, il existe plusieurs types de liposomes qui varient selon la taille et la structure interne :

- Les MLVs pour *MultiLamellar Vesicles*, qui sont des liposomes multilamellaires (figure 3.7-a),
- Les ULVs pour *UniLamellar Vesicles*, qui sont des liposomes unilamellaires, avec un seul double-feuillet lipidique (figure 3.7-b). Selon leur taille, on distingue :
 - Les SUVs pour *Small Unilamellar Vesicles*, qui sont des liposomes unilamellaires de tailles inférieures à 100 nm,
 - Les LUVs pour *Large Unilamellar Vesicles*, qui sont des liposomes unilamellaires de tailles comprises entre 100 nm et 1 μm ,
 - Les GUVs pour *Giant Unilamellar Vesicles*, qui sont des liposomes unilamellaires de tailles supérieures à 1 μm .

Toutes les techniques de préparation ont en commun la première étape. Elle consiste en l'évaporation du solvant utilisé pour solubiliser le lipide afin d'obtenir un film sec. Le film est ensuite resolubilisé dans un tampon aqueux puis incubé sous agitation à une température supérieure à la température de transition gel-fluide. Il en résulte la formation de MLVs, très hétérogènes en taille, de 100 nm à 1 μm , et en nombre de couches lipidiques. Il existe plusieurs méthodes pour former des liposomes unilamellaires à partir des MLVs obtenues, avec entre autres : la sonication [55], l'extrusion à travers une membrane de

2. UV-Vis : Ultra-Violet-Visible

3. Pour plus de détails, voir section 2.1.1 page 22



FIGURE 3.7 – Représentation d’un liposome multilamellaire (gauche) et d’un liposome unilamellaire (droite) - Adapté de <http://www.encapsula.com>

polycarbonate [56], la presse de French [57] ou encore la microfluidisation [58].

Une autre méthode consiste à générer des LUVs par dialyse de micelles détergents/lipides [59].

3.2.2 Les liposomes, un modèle de choix pour comprendre les interactions membranes / molécules exogènes

L’utilisation de liposomes comme modèle membranaire a permis l’étude de nombreuses propriétés biophysiques des membranes. Il a, par exemple, été possible d’étudier l’effet des sels monovalents et divalents sur des lipides zwitterioniques et anioniques, mais aussi l’influence de la température sur l’organisation de la bicouche [60, 61, 62, 63]. Le mécanisme de flip-flop, encore largement méconnu, a pu être aussi étudié [64].

Les liposomes peuvent être utilisés pour étudier les interactions protéines/membranes. Des études sur l’importance du rayon de courbure, et donc de la taille des liposomes, mais aussi de la nature de la tête polaire sur l’insertion des protéines dans les membranes ont été menées [65]. D’autres paramètres, comme l’influence du pH ou celle de la mobilité des têtes polaires ont déjà été étudiés [66, 67]. Les liposomes peuvent même servir d’environnement lipidique fonctionnel pour l’étude de protéines transmembranaires : il est alors question de protéoliposomes. Ce type de liposomes a été notamment utilisé pour étudier le fonctionnement de l’aquaporine [68].

Les molécules d’intérêt pharmacologique ne sont pas en reste car les liposomes ont été largement utilisés pour comprendre leur mécanisme d’action. On peut citer par exemple le cas des terpènes, des hydrocarbures produits par de nombreuses plantes, essentiellement les conifères. Ces molécules ont des propriétés antimicrobiennes et peuvent aussi bien s’attaquer aux bactéries à Gram + qu’aux bactéries à Gram -. Des études utilisant les liposomes comme modèles membranaires ont montré que l’activité antibactérienne de ces molécules devait être sans doute grandement due à une forte perturbation des membranes lipidiques. L’effet antimicrobien serait par ailleurs associé à la composition lipidique et à la charge nette de la membrane [69, 70, 71]. Turina et ses collaborateurs ont pu mettre en

évidence une corrélation entre le moment dipolaire de différents terpènes et leur enfouissement dans des bicouches modèles [72].

Les liposomes ont particulièrement été utilisés pour comprendre le mécanisme d'action de peptides antimicrobiens. Un des plus étudiés est la mélittine, le principale agent toxique du venin de l'abeille *Apis Mellifera*. Ce peptide cationique de 26 acides aminés a une activité hémolytique en formant des pores dans les membranes cibles. Il a été très utilisé comme peptide modèle pour l'étude des interactions avec des modèles membranaires [73, 74, 75]. L'utilisation de liposomes a permis entre autres de montrer que l'orientation et l'activité lytique sont dépendantes des propriétés physiques du système (pH, température, etc.) et de la composition lipidique de la membrane cible [76, 77]. Il a été aussi montré que les insaturations des chaînes lipidiques modulaient le pouvoir lytique de la mélittine et ses propriétés de micellisation des membranes [78, 79]. Elle serait active au niveau des têtes polaires des lipides en diminuant leur mobilité [80]. Hall et ses collaborateurs ont récemment utilisé les liposomes pour déterminer l'importance des interactions électrostatiques dans l'activité membranotrope de la mélittine [81].

Le mécanisme des lantibiotiques, et particulièrement la Nisine, a été aussi très largement étudié grâce aux modèles membranaires. La Nisine est un peptide de 34 acides aminés produit par certaines souches de la bactérie *Lactococcus Luctis*. Elle possède un spectre d'activité très large contre les bactéries à Gram -. Des études sur le pouvoir lytique et l'orientation de la Nisine dans des liposomes de différentes compositions ont été menées [82, 83]. Il a été démontré que l'interaction de la Nisine et des liposomes impliquait la translocation du côté C-terminal du peptide [84]. Il existe actuellement de plus en plus de bactéries résistantes à la Nisine. Aussi, les interactions d'autre lantibiotiques avec des liposomes, comme la bovicine, ont été étudiées afin de comprendre le mécanisme général de ces molécules, ce qui permettrait d'en découvrir d'autres pour lesquelles il n'existe pas de résistance [85, 86].

3.3 Les bicouches lipidiques supportées

Les SLBs⁴ sont des bicouches planes formées sur un support hydrophile. Tout comme les liposomes, ces bicouches miment les deux feuillettes des membranes biologiques. En revanche, le support utilisé peut être un aspect limitant : celui-ci doit être plan afin d'obtenir un fort taux de recouvrement par la membrane.

Ce modèle est particulièrement adapté au suivi *via* AFM des modifications apportées à la structure des membranes par une molécule exogène.

Il existe deux méthodes d'obtention de bicouches préparation différentes.

La première méthode consiste en un transfert de monocouches de Langmuir, sur un support hydrophile, comme montré figure 3.8.

4. SLBs : bicouches lipides supportées

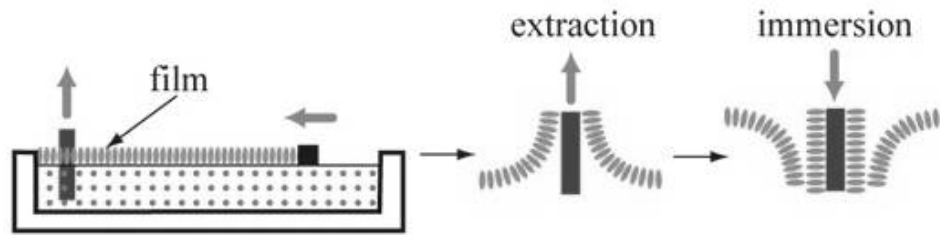


FIGURE 3.8 – Principe de la préparation de bicouches par la technique de Langmuir-Blodgett Adaptée de www.eng.thesaurus.rusnano.com

Cette méthode permet d'obtenir des bicouches asymétriques, c'est à dire avec des feuillets de compositions lipidiques différentes. En revanche, des précautions particulières doivent être prises lors du transfert afin d'éviter l'apparition de structures déformées voire de trous dans la SLB lors du transfert [87, 88]. Il est par ailleurs admis par la communauté scientifique que le transfert de monocouches sur un support solide est difficile dès lors que le lipide à transférer n'est pas en phase LC, le film lipidique manquant alors de rigidité.

La deuxième méthode consiste à former une bicouche par simple dépôt de vésicules unilamellaires sur un support hydrophile. Cette technique est simple et peut être réalisée en une étape. Les liposomes vont alors fusionner sur la surface, donnant naissance à une bicouche lipidique homogène recouvrant toute la surface du support.

Plusieurs équipes de recherche ont travaillé sur le mécanisme de formation de bicouches à partir de liposomes [89, 90, 91]. En 2006, l'équipe d'Alain Brisson a proposé plusieurs mécanismes menant à la formation de SLBs. Ces mécanismes sont repris figure 3.9.

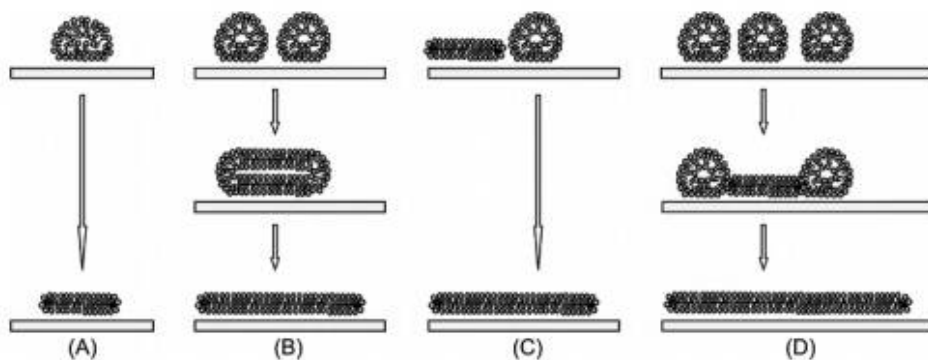


FIGURE 3.9 – Mécanismes probables de formation d'une bicouche supportée à partir de liposomes - D'après [89]. A : Rupture spontanée ; B : Fusion de vésicules proches puis rupture ; C : Rupture de la vésicule induite par la présence d'une bicouche lipidique ; D : Coopération active entre vésicules induisant leur rupture.

La première étape commune à tous ces mécanismes est l'adsorption de liposomes sur la surface du substrat. Suite à cette adsorption, la vésicule est déformée. Deux cas de figure se présentent alors : soit il y a fusion spontanée des vésicules, donnant lieu à une bicouche lipidique, soit les vésicules restent intactes. Reviakine et Brisson ont défini un

rayon critique d'adsorption et un rayon critique de rupture des liposomes [90]. Lorsque le rayon de la vésicule est inférieur au rayon critique, la vésicule s'adsorbe sur la surface sans rompre. En revanche, lorsque le rayon de la vésicule est supérieur à ce rayon critique de courbure, le liposome se rompt et forme un disque de bicouche sur la surface (figure 3.9-A). Par ailleurs, la fusion de vésicules donne lieu à une vésicule dont le rayon final peut dépasser le rayon critique. La vésicule va se rompre et formera alors une bicouche (figure 3.9-B).

La quantité de liposomes déposée à la surface du substrat est déterminante pour l'obtention d'une bicouche. Si le nombre de vésicules est suffisamment important, les interactions liposomes/liposomes seront elles aussi plus importantes, ce qui favorisera la fusion de vésicules et donc la formation de bicouches lipidiques (figure 3.9-D). Une fois la rupture effectuée, le disque de bicouche présente une bordure avec une conformation défavorable d'un point de vue thermodynamique. Cette bordure entraînerait la fusion de vésicules adjacentes afin de rendre le système plus stable (figure 3.9-C).

3.3.1 Utilisation des SLBs pour l'étude des interactions molécules exogènes / membranes

Les SLBs peuvent être utilisées pour un grand nombre d'études différentes, comme pour la caractérisation de peptides ayant une activité membranotrope, la reconstitution de canaux ioniques ou encore l'effet de modifications apportées aux propriétés biophysiques de la membrane sur la fonctionnalité de protéines membranaires.

Des bicouches de POPC ont été utilisées pour étudier la conductimétrie de ces membranes induite par l'action de la mélittine [92]. Il a par la suite été possible d'étudier l'influence de différents stérols sur la capacité de la mélittine à perméabiliser des bicouches lipidiques [93].

Les bicouches ont été aussi utilisées pour étudier le mécanisme d'insertion des Cell-Penetrating Peptides dans les membranes. Ce modèle a permis l'étude de la formation des pores générés par ces peptides et les effets de l'épaisseur, de la composition et de la charge globale de la membrane sur leurs fonctionnements [94, 95, 96].

K. El Kirat et S. Morandat ont pu étudier l'effet du Triton X-100, un détergent non ionique, sur des SLBs. Dans cette étude, les auteurs ont pu proposer un mécanisme d'action de ce détergent expliquant comment il pourrait solubiliser les membranes [97].

D'autres types d'études ont été menées sur les interactions avec des protéines, notamment le cytochrome C [98, 99, 100].

Deuxième partie

Interaction de molécules d'intérêt
pharmacologique avec des membranes
biologiques et biomimétiques

Interactions de molécules d'intérêt pharmacologique avec les membranes biologiques

Les molécules d'intérêt pharmacologique peuvent changer la structure et les propriétés des membranes biologiques, ce qui peut expliquer leur activité d'un point de vue pharmacologique et la modulation de leur toxicité. Ces membranes peuvent être impliquées directement ou indirectement dans le mécanisme d'action de ces molécules. Dans ce cas, elles peuvent aussi être la cible des effets secondaires provoqués par ces molécules.

Leur interaction avec les membranes biologiques peut être directement impliquée dans leur pouvoir antimicrobien. C'est notamment le cas de la surfactine, un lipopeptide cyclique possédant un pouvoir antifongique et antibactérien. Des études ont montré que le pouvoir antimicrobien de la surfactine était principalement lié à sa capacité à perméabiliser les membranes biologiques [101, 102].

La cyclosporine A est une molécule reconnue comme ayant un pouvoir antipaludique. Son interaction préférentielle avec la SM empêcherait le parasite de former son réseau tubulo-vésiculaire, indispensable à son cycle de développement érythrocytaire [52].

L'interaction entre les molécules d'intérêt pharmacologique et les membranes biologiques peut aussi contribuer de manière indirecte au pouvoir antimicrobien de ces molécules. Citons l'exemple des fluoroquinolones, qui sont des antibiotiques à large spectre, utilisés contre les bactéries à Gram + et Gram -. Avant d'atteindre leur cible moléculaire, ces molécules doivent franchir les membranes bactériennes. La diffusion à travers les membranes lipidiques est le principal processus permettant à ces médicaments d'atteindre leur cible moléculaire que sont l'ADN gyrase et les topoisomérases II et IV, empêchant ainsi la réplication de l'ADN bactérien [103]. La diffusion à travers les membranes bactériennes est facilitée par l'interaction particulière des fluoroquinolones avec le PG, en forte concentration dans ce type de membrane [104]. Par ailleurs, il a été suggéré que l'augmentation de la capacité de ces molécules à traverser les membranes augmentait leur concentration

intra-cellulaire, et donc, par voie de conséquence, leur efficacité [104].

Dans d'autres cas, les interactions entre les molécules d'intérêt pharmacologique et les membranes peuvent être la cause d'effets indésirables plus ou moins sévères. Comme vu plus haut, la cyclosporine A possède une activité antipaludique, mais cette molécule est avant tout un agent immunosuppresseur se liant à la cyclophiline des lymphocytes immunocompétents, diminuant ainsi la réponse immunitaire par inhibition de la transcription du gène de l'interleukine 2. Son utilisation thérapeutique a permis un essor considérable du domaine de la transplantation d'organes en prévenant le rejet des greffes. En revanche, cette molécule diminue le potentiel de membrane des mitochondries des cellules tubulaires du rein en induisant la perméabilisation de ses membranes externes et internes et génère des espèces réactives de l'oxygène qui vont dégrader notamment les phospholipides [105]. Par ailleurs, elle perturbe les phénomènes de fusion/fission de cet organite, provoquant vraisemblablement l'apoptose de la cellule [105].

L'azithromycine, un antibiotique utilisé notamment pour traiter les infections des voies respiratoires, altère la synthèse des protéines bactériennes en se fixant sur les ribosomes. Ce médicament possède cependant de nombreux effets secondaires, qu'ils soient digestifs, hépatiques ou neurologiques. Des études sur l'influence de cette molécule sur les membranes ont montré que dans des systèmes DPPC/DOPC, elle érodait les domaines de DPPC [106]. Par ailleurs, elle modifie le module de compression des monocouches de DOPC [107]. Il est possible que les modifications des propriétés biophysiques des lipides puissent participer aux effets secondaires de cette molécule.

Au cours de notre étude, nous avons choisi de nous intéresser à deux groupes différents de molécules d'intérêt pharmacologique. Nous avons d'abord étudié l'interaction des antifongiques polyéniques avec des membranes modèles. Ces molécules sont connues pour cibler spécifiquement les membranes des cellules fongiques, mais possède aussi une toxicité vis-à-vis des cellules animales. Leur interaction avec les membranes est responsable tant de leur effet antifongique que de leur toxicité envers les cellules animales. Malgré de nombreux efforts de recherche, leur mécanisme d'action reste incompris. La découverte de nouvelles molécules antifongiques passe pourtant par une meilleure compréhension de ce mécanisme.

Nous avons ensuite étudié la capacité de nouvelles molécules antipaludiques à inhiber l'insertion de l'hématine, un sous-produit de la dégradation de l'hémoglobine, dans des membranes modèles. L'insertion de l'hématine dans les membranes biologiques participerait à un mécanisme de détoxification mis en place par le parasite responsable du paludisme. Notre but est d'étudier l'inhibition de cette insertion et de l'utiliser comme cible moléculaire pour lutter contre la prolifération de ce parasite dans les érythrocytes.

Étude du mécanisme d'interaction des polyènes avec les membranes

5.1 Généralités sur les polyènes

5.1.1 Introduction

Les antibiotiques polyéniques, encore appelés polyènes antimycotiques ou plus simplement "polyènes"¹, forment une très grande famille de molécules antifongiques. Ils sont synthétisés par les bactéries de type *Streptomyces*. La structure chimique de ces molécules comporte un anneau macrolide refermé par une liaison ester. Elle contient plusieurs doubles liaisons conjuguées sur un côté de l'anneau et plusieurs groupes hydroxyles liés à l'autre côté de l'anneau. Ces molécules disposent souvent d'un groupement *d*-mycosamine², dont la structure a été décrite dès les années 50 [108]. La série de doubles liaisons conjuguées absorbe fortement dans la région de l'Ultra-Violet/Visible du spectre électromagnétique, ce qui leur confère leur couleur jaune. Les polyènes sont répartis en deux groupes, selon la taille de leur anneau macrolide :

- Le groupe I, possédant de petits anneaux macrolides (< 4 doubles liaisons) dont le plus célèbre représentant est la Natamycine,
- Le groupe II, possédant de grands anneaux macrolides (> 4 doubles liaisons). Les exemples les plus connus sont la filipine, la Nystatine et l'Amphotéricine B.

Ces molécules ne sont pas inconnues de notre société puisque la découverte du premier polyène, la Nys³, date de 1949. C'est Rachel Fuller Brown et Elizabeth Lee Hazen qui ont décrit pour la première fois les effets antifongiques de cette molécule [109]. L'AmB⁴ a été découverte un peu plus tard, en 1957. Les formules chimiques des 4 polyènes les plus étudiés dans la littérature scientifique, c'est-à-dire la Nys, l'AmB, la Natamycine et

1. Nous utiliserons la dénomination "polyène" dans la suite du document

2. le *d*-mycosamine est un amino-glycoside

3. Nys : Nystatine

4. AmB : Amphotéricine B

la Filipine, sont montrées figure 5.1.

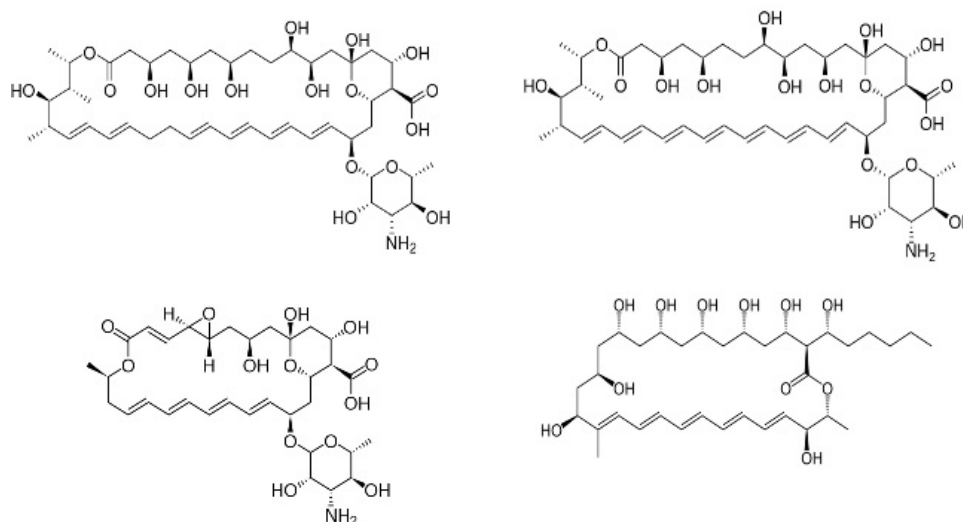


FIGURE 5.1 – Structures de la Nys (haut, gauche), de l’AmB (haut, droite), de la Natamycine (bas, gauche) et de la Filipine (bas, droite)

Ces molécules sont largement utilisées contre les différentes levures pathogènes. Dans l’industrie alimentaire, la Natamycine est utilisée comme conservateur pour la viande et les fruits. Les polyènes sont aussi utilisés par l’industrie pharmaceutique et constituent la base de crèmes antimycosiques, de suspensions buvables ou de comprimés oraux antifongiques. Les polyènes ne peuvent traverser la paroi intestinale [110]. Aussi, pour les cas d’infections fongiques graves, comme les candidoses systémiques, ces molécules sont injectées par intraveineuse.

Du fait de leur forte toxicité, l’injection de ces médicaments n’est pas sans risque. Ces molécules peuvent provoquer, entre autre, de fortes fièvres, des nausées, de l’hypotension, une thrombopénie, des dommages irréversibles aux reins ou encore de graves arythmies cardiaques [110]. Pour contrer ces effets indésirables, la communauté scientifique s’est penchée ces 30 dernières années sur des formulations de polyènes moins toxiques pour l’organisme [111]. De nombreuses études ont montré que l’encapsulation de polyènes dans des liposomes réduisait la toxicité pour l’Homme et augmentait l’effet antimycotique [112, 113, 114].

Outre cette forte toxicité, l’augmentation des cas de résistance est un autre facteur qui freine l’utilisation des polyènes. Bien que la résistance aux polyènes des levures de type *Candida* reste rare [115, 116, 117], il existe de plus en plus de souches de levures pour lesquelles la Concentration Minimale Inhibitrice est revue à la hausse [118, 117]. Par exemple, les souches de type *Scedosporium prolificans* ont toutes développé une résistance à l’AmB [115].

Malgré cela, les polyènes constituent encore aujourd’hui une de nos meilleures (sinon la meilleure) lignes de défense contre les infections d’origine fongique. Aussi, pour dévelop-

per de nouvelles molécules plus efficaces contre les levures tout en étant moins toxiques pour l'Homme, la communauté scientifique s'est penchée ces dernières années sur leurs mécanismes d'action.

5.1.2 Les polyènes ciblent les cellules fongiques

La première étude du pouvoir fongicide des polyènes a été réalisée sur 37 souches de levures différentes [109]. Les auteurs ont montré que la Nys, nommée fungicide à l'époque, était capable de ralentir la prolifération de toutes les levures utilisées. Toujours dans cette étude, les auteurs ont injecté deux souches de levures à des souris, *C. neoformans* et *H. capsulatum*, et ont constaté, dans les deux cas, que les populations de souris infectées vivaient plus longtemps lorsqu'elles étaient traitées avec la fungidine. La Pimacrine, ou Natamycine, a été découverte quelques années plus tard et est, elle aussi, capable de ralentir la prolifération des cellules fongiques. La découverte de nouveaux polyènes antifongiques a alors connu un essor fulgurant. En 1957, pas moins de 60 polyènes différents étaient référencés, chacun possédant un pouvoir antifongique propre [119].

Des études ont, dans la foulée, montré que les polyènes n'avaient aucune action sur les bactéries [120] et que, par conséquent, ces molécules n'affectaient pas leur croissance [121, 122]. Par ailleurs, si les polyènes étaient d'abord considérés comme inoffensifs pour l'Homme et les cellules animales [120], des études ont mis en évidence qu'elles sont toxiques pour ce type de cellules [110, 123, 124].

5.2 État de l'art sur l'interaction des polyènes avec les membranes biologiques

5.2.1 Les polyènes interagissent avec les membranes biologiques

Le fait que les polyènes puissent interagir avec les cellules fongiques et de mammifères et non avec les bactéries a très tôt fait comprendre à la communauté scientifique qu'il existe probablement un partenaire d'interaction présent dans les cellules sensibles mais absent des bactéries. L'hypothèse que ce partenaire soit membranaire est fondée sur le fait que les cellules entières, les protoplastes et des fractions de membranes de levures sont capables de lier fortement les polyènes, tandis que les mêmes éléments provenant de bactéries sont incapables d'interagir avec ces molécules [120, 125]. Cette idée s'est très vite portée sur les stérols et la lécithine⁵ puisque les bactéries ne peuvent synthétiser ces deux lipides [4, 126], alors qu'ils sont présents dans les membranes eucaryotes [7, 9, 127].

5. lécithine : PC

5.2.1.1 Interactions avec les membranes riches en stérol

Une étude menée en 1962 a permis de montrer que l'interaction entre la Nys et les cellules était, dans une certaine mesure, réversible, notamment par ajout de solvant organique dans le milieu de culture. Les auteurs en ont conclu à une très probable interaction polyène/membrane dans laquelle au moins une molécule d'Ergo serait impliquée [128]. L'idée d'interaction entre les stérols et les polyènes est devenue évidente lorsqu'en 1966, l'équipe de Tavormina a démontré pour la première fois que l'ajout de stérols dans le milieu de culture de levures inhibait le pouvoir toxique de l'AmB, de la Nys, de la Natamycine et de la Filipine [129]. Dans cette étude, les auteurs ont montré que cette inhibition était particulièrement importante pour l'Ergo, le stérol des membranes fongiques. Ce stérol est le seul de tout ceux qui ont été utilisés à pouvoir inhiber le pouvoir antifongique de tous les polyènes étudiés. Le pourcentage d'inhibition maximal provoqué par ce stérol est toujours proche de 100%. Le groupe de Demel et de Kruijff a plus tard étudié l'interaction de polyènes avec la bactérie *Acholeplasma laidlawii* [130]. Cette bactérie est capable d'intégrer les lipides présents dans le milieu de culture dans sa membrane plasmique. Les auteurs ont montré que les polyènes n'ont aucun effet sur cette bactérie. En revanche, quand du Chol était ajouté au milieu de culture, et donc, par voie de conséquence, intégré dans les membranes des bactéries, les polyènes avaient une activité toxique pour ces cellules. Ainsi, le Chol rendait les bactéries sensibles aux polyènes. De plus, les auteurs ont montré que l'incubation d'érythrocytes avec l'AmB ou la Filipine conduisait à une hémolyse importante de ces cellules⁶. Cette hémolyse est cependant moins importante que l'effet antifongique observé. Ces résultats suggèrent que les polyènes interagissent donc préférentiellement avec le stérol des membranes fongiques, à savoir l'Ergo.

Pour vérifier cette hypothèse, Archer a étudié l'impact de l'Ergo et du Chol sur l'efficacité de l'AmB et de la Filipine [131]. Il a utilisé deux modèles différents : un modèle bactérien pouvant intégrer dans sa membrane des stérols et un modèle synthétique, des liposomes de PC. Dans son étude, l'effet de la Filipine est reporté comme étant deux fois plus important avec les modèles membranaires contenant de l'Ergo qu'avec ceux contenant du Chol. Pour les deux modèles de membranes, la présence d'Ergo favorise l'action des polyènes [131]. De plus, il a été montré que les stérols, et notamment le Chol, modifie l'état d'agrégation de l'AmB et le type d'interaction avec la membrane [132].

Une étude par dichroïsme circulaire sur l'insertion de l'AmB et la Nys dans des LUVs contenant soit de l'Ergo, soit du Chol, a montré une stœchiométrie réactionnelle très favorable à l'Ergo, puisque ce stérol peut lier beaucoup plus d'AmB et de Nys que le Chol [133]. Les auteurs ont montré que la liaison Ergo/AmB et les effets associés sont purement dépendant de la concentration, contrairement au Chol, pour lequel un ratio minimal Chol/AmB doit être atteint.

6. Il est intéressant de noter que dans cette étude, la Nys est le seul polyène à ne pas provoquer la lyse des érythrocytes

Une autre étude s'est intéressée aux isothermes de stérols mélangés à des concentrations croissantes d'AmB [134]. À partir de ces isothermes, les auteurs en ont déduit les ΔG des interactions Stérol/AmB et ont montré que ce polyène interagit plus fortement avec l'Ergo qu'avec tous les autres stérols testés. Afin de caractériser l'interaction de l'AmB avec le Chol et l'Ergo, des images de BAM ont été enregistrées pour visualiser les perturbations engendrées par l'AmB sur les monocouches de stérol [135]. Ces images montrent une interaction plus importante de l'AmB dans les membranes de Chol que dans les membranes d'Ergo, malgré la plus grande affinité démontrée pour le dernier stérol. Les auteurs attribuent cet effet à une différence d'arrangement de la monocouche d'Ergo provoquée par sa différence structurale, ce qui rendraient les lipides moins accessible aux polyènes par rapport aux monocouches de Chol. L'utilisation de la Nys en lieu et place de l'AmB a confirmé ces résultats [45]. En revanche, les mêmes auteurs ont montré que l'insertion de l'AmB est moins importante dans les monocouches de DPPC/Chol que dans les monocouches de DPPC/Ergo [136]. Toujours selon eux, cette différence est explicable par un état de compaction du mélange contenant le Chol plus important que celui contenant l'Ergo. Cette différence de compaction permettrait aux polyènes d'accéder plus facilement à l'Ergo qu'au Chol dans des systèmes mixtes.

L'interaction préférentielle des polyènes avec des membranes contenant de l'Ergo a été démontré par de multiples autres études utilisant diverses techniques comme la spectroscopie Ultra Violet / Dichroïsme Circulaire [137, 138, 139, 140], l'étude de la perméabilisation des membranes [138, 141, 142], ou par simulation informatique [143, 144, 145, 146]. Il est aujourd'hui largement admis que cette différence d'interaction est due à une interaction molécule/molécule particulière qui favorise l'interaction Ergo/polyène par rapport à l'interaction Chol/polyène.

Une étude de 2003 [136] a proposé un modèle d'interaction Stérol/AmB, montré figure 5.2.

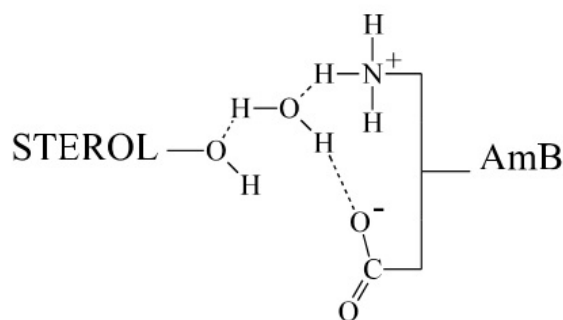


FIGURE 5.2 – **Modèle proposé pour l'interaction Stérol/AmB** - D'après [136].

Dans ce modèle, la reconnaissance entre le stérol et le polyène passe par l'établissement de liaisons hydrogènes entre le groupement hydroxyle du stérol et le groupement carboxylique et le groupement amide du polyène. Une molécule d'eau ferait le lien entre les deux

molécules. Cependant, ce mécanisme ne prend pas en compte l'interaction préférentielle des polyènes avec l'Ergo par rapport au Chol. Pour comprendre les bases moléculaires de cette interaction, Hsuchen et ses collaborateurs ont réalisé une étude portant sur l'efficacité de l'AmB et la Nys en interaction avec des membranes de compositions différentes, contenant chacune un stérol différent [147]. Ils ont démontré que les faibles différences structurales des différents stérols utilisés suffisent à modifier considérablement l'activité toxique des polyènes. De plus, une étude récente a utilisé des analogues de l'Ergo, contenant des chaînes latérales modifiées, et étudié l'effet de ces analogues sur l'efficacité de l'AmB [148]. Les auteurs ont montré par ce moyen que le polyène reconnaît spécifiquement la chaîne latérale des stérols. Les différences de structure retrouvées sur la chaîne latérale de l'Ergo expliquerait donc en partie l'interaction spécifique de l'AmB avec les membranes fongiques.

5.2.1.2 Interactions avec les membranes de PhosphatidylCholine

L'idée que la lécithine, ou PC, puisse être un autre partenaire d'interaction a été étayée par différentes études, la première étant très certainement celle de Goldfine et Hellis en 1964 [4]. Cette étude montrait que les bactéries ne pouvaient pas synthétiser ce type de lipide. Considérant que la molécule cible des polyènes doit être membranaire et non présente chez les bactéries, la lécithine est devenue d'elle même un partenaire d'interaction potentiel. La communauté scientifique a donc étudié son impact sur l'action des polyènes. Demel et ses collaborateurs ont rapporté que la lécithine, à l'instar des stérols, est capable d'inhiber la toxicité des polyènes [49]. Pour déterminer les partenaires membranaires de l'action des polyènes, ils ont étudié la capacité de la Nys, de l'AmB et de la Filipine à pénétrer des monocouches composées de lipides purs. Les auteurs ont montré que si les polyènes pénètrent les monocouches d'Ergo et de Chol, la Filipine était incapable de pénétrer les monocouches de phospholipides testées, tout comme la Nys ou l'AmB. Les auteurs en ont conclu que les polyènes interagissent uniquement avec les stérols. Cette étude ne couvrait cependant que des phospholipides à très courtes (C10 : 0) ou très longues (C24 : 0) chaînes aliphatiques, toutes entièrement saturées.

Une autre étude utilisant des LUVs formés de DPPC, DOPC ou de PC de jaune d'oeuf a montré en revanche que tant l'AmB que la Nys étaient capables d'interagir avec les membranes sans stérol [147]. L'incorporation de Chol ou de Stigmastérol inhibait cette interaction.

La célèbre revue de Bolard sur les polyènes fait état d'études montrant que l'AmB est capable d'interagir avec des bicouches de DPPC [149]. Cette interaction est plus forte lorsque le phospholipide est en phase gel [150]. L'étude de Couthino et ses collaborateurs en 2003 [151] montre que la Nys est capable d'interagir avec les liposomes de DPPC et de POPC. L'étude de Hac-Wydro en 2006 [45] s'est penchée sur les isothermes de compression ($\pi - A$) de la DPPC, de l'Ergo et du Chol mélangés à la Nys. Ils ont montré que la

DPPC possède un ΔG plus important que le Chol ou l'Ergo (jusqu'à 4000 J/mol pour la DPPC contre 1500-2000 J/mol pour les stérols). Cette étude avance même que la DPPC pourrait être impliquée dans le mécanisme d'action de la Nys.

Toutes ces éléments montrent que les stérols ne seraient pas les uniques partenaires d'interaction des polyènes. Cependant, notons que la DPPC n'est pas un lipide retrouvé dans les membranes, sauf au niveau du surfactant pulmonaire.

5.2.2 Les polyènes perméabilisent les membranes

Stephen Kinsky a été un pionnier dans la découverte des effets des polyènes sur les membranes. Il a montré que l'action de la Nys sur des protoplastes de *Neurospora crassa* provoquait une diminution de leur masse sèche [152] et l'apparition dans le milieu réactionnel de constituants du cytoplasme [125]. Une autre étude réalisée la même année a montré que la Nys inhibe le potentiel de membrane de *Neurospora* [153]. Ces études indiquent que la Nys induit une altération de la perméabilité des membranes. À partir d'études sur la perméabilisation des membranes aux ions et aux molécules non-électrolytes induite par la Nys et l'AmB, une grande partie de la communauté scientifique a admis que les polyènes s'organisent en pores [154, 142]. Le pore formé impliquerait une interaction polyène/stérol, avec une préférence marquée pour l'Ergo par rapport au Chol [147]. Cette interaction stérol/polyène était considérée comme indispensable à ce mécanisme d'action : elle expliquait le fait que lorsque des modèles membranaires étaient utilisés, l'action antifongique des polyènes augmentait généralement avec l'augmentation de la concentration en stérol [155, 156, 130]. Mais d'autres études ont par la suite démontré que les polyènes perméabilisent aussi les membranes des LUVs de DPPC ou POPC sans stérol [138, 141, 149, 133]. Pour comprendre ce phénomène, Venegas et ses collaborateurs ont étudié la résistance bactérienne à l'AmB en utilisant la conductimétrie des membranes pour détecter la formation de canaux ioniques induite par ce polyène [157]. Ils ont montré que l'AmB était capable de générer des canaux dans les membranes bactériennes, signe que les stérols n'étaient pas nécessaires à leur formation. Pour expliquer la résistance des bactéries aux polyènes, ils ont postulé que les stérols permettraient aux polyènes d'accéder plus facilement au coeur lipidique des membranes, potentialisant ainsi leur effet antifongique.

La compréhension actuelle du mécanisme d'interaction polyènes/membranes considère que ces molécules sont capables de former deux types de pores. Ces deux pores sont montrés figure 5.3.

Le premier type de canal (dénommé plus loin "type I"), montré figure 5.3-gauche, est en fait un demi-canal qui traverse qu'un seul des deux feuillet de la membrane lipidique. Il serait formé à de faibles concentrations en polyènes, réagissant principalement comme un canal ionique, ne laissant passer que les petites molécules et étant bloqué efficacement par

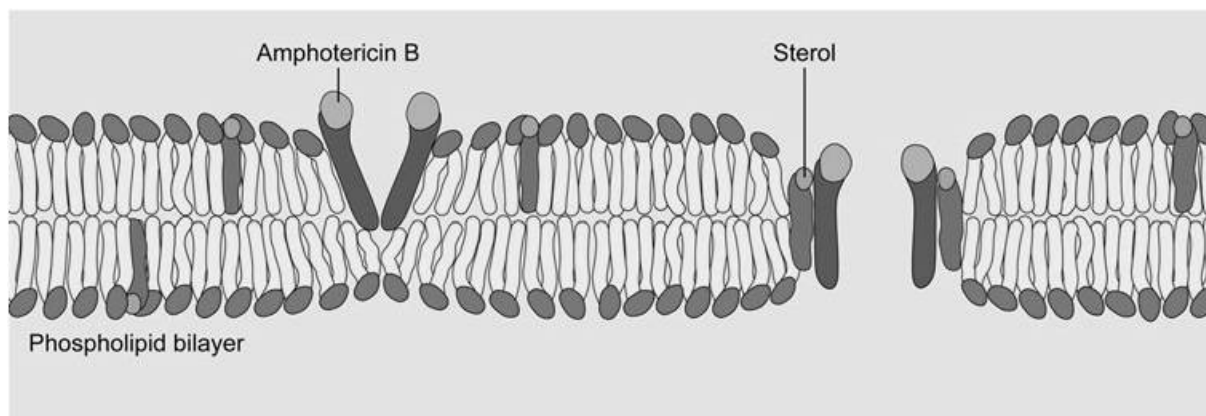


FIGURE 5.3 – Illustration des différentes structures formées par l'AmB dans les bicouches lipidiques - d'après [158].

le tétraéthylamonium⁷ [158, 159]. Ce type de pore serait perméable aux cations monovalents, mais beaucoup moins aux anions monovalents.

Le deuxième type de canal (dénommé plus loin "type II"), figure 5.3-droite, forme une structure circulaire composée de 4 à 12 molécules traversant entièrement la membrane lipidique [158, 159]. Il serait formé à des concentrations plus importantes en polyène, laissant passer tous les ions monovalents, le Ca^{2+} , mais aussi de plus grosses molécules comme le glucose ou l'urée. Il serait bloqué par le tétraéthylamonium beaucoup moins efficacement.

Yang *et al.* ont mesuré l'effet de l'AmB sur la formation de pore dans des membranes contenant de l'Ergo en utilisant des molécules de différents rayons de Stokes [160]. Ils ont montré que dans ce type de membrane, le rayon moyen des pores dépend de la concentration en AmB dans le système. Pour de faibles concentrations (50 pg/ml), il est de 0,16 nm, tandis qu'il passe à 16 nm lorsque la concentration en AmB est de 2 ng/ml. D'autres études se sont intéressées à la différence de diamètre entre les canaux générés dans les membranes contenant de l'Ergo et du Chol. Tant par AFM [161, 162] que par mesures de conductimétrie des membranes [163, 164], aucune différence de taille n'a été mise en évidence, suggérant que le stérol n'affecte pas significativement le diamètre du canal.

Cohen a rapporté les différentes expériences conduites dans des modèles de membranes sur les concentrations en polyène provoquant l'apparition des deux types de canaux dans des bicouches contenant de l'Ergo, du Chol et sans stérol [165]. Les valeurs listées montrent que les concentrations auxquelles apparaissent les pores de type I sont habituellement détectées autour de $0,05 \times 10^{-6}$ M dans les membranes contenant de l'Ergo, tandis qu'elles sont autour de $0,5 \times 10^{-6}$ M dans les membranes contenant du Chol. Les pores de type II apparaissent à $0,4 \times 10^{-6}$ et $2,0 \times 10^{-6}$ M dans les membranes contenant respectivement de l'Ergo et du Chol. La nature du stérol influe donc directement sur la concentration d'apparition des différentes structures. Concernant les membranes sans stérols, les concentrations d'apparitions des pores de type I et de type II sont respectivement de $0,5 \times 10^{-6}$

7. Le tétraéthylamonium est une molécule capable de bloquer les canaux ioniques

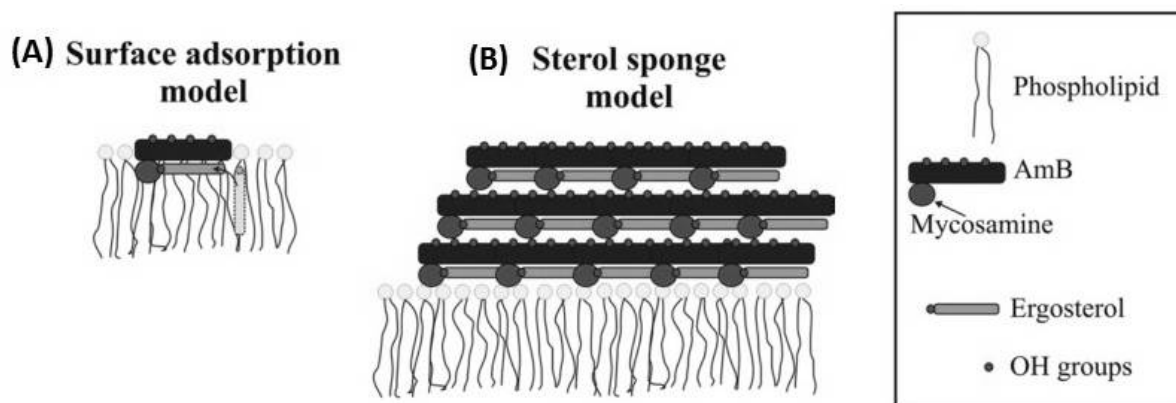


FIGURE 5.4 – Représentation des modèles d’interactions de l’AmB et de ses proches homologues structuraux avec les membranes - d’après [159].

M et $10-100 \times 10^{-6}$ M. Ainsi, seul l’Ergo favorise la formation des pores de type I. Les stérols favoriseraient en revanche l’insertion de l’AmB et de ses homologues proches dans le coeur hydrophobe des membranes en vue de la formation de pores de type II, ce qui confirmerait l’hypothèse formulée précédemment par Venegas et ses collaborateurs quant au rôle des stérols dans le mécanisme d’interaction des polyènes avec les membranes⁸. [157].

5.2.3 Le mécanisme d’action des polyènes est-il aussi simple qu’il n’y paraît ?

Aujourd’hui, une grande partie de la communauté scientifique admet que la toxicité des polyènes est provoquée par la formation de pores dans les membranes. En revanche, des études ont montré que ces pores ne sont pas indispensables au mécanisme d’action de ces molécules. Il a, par exemple, été montré que la Natamycine pouvait induire la mort cellulaire de levures sans formation de pores [166]. Deux études ont montré que le rôle des stérols dans la formation des pores peut être lié aux effets qu’ils possèdent sur les membranes elles-mêmes, notamment leurs effets sur la compaction de la membrane, plutôt qu’à une réelle participation à l’élaboration de canaux ioniques avec les polyènes [155, 157]. De plus, il a été montré que la seule interaction polyène/Ergo suffisait à tuer les cellules fongiques [167].

Pour expliquer ces phénomènes non-explicables par la théorie des pores membranaires, d’autres modèles d’interaction des polyènes avec les membranes ont émergé. Ces modèles sont repris figure 5.4.

Le premier concept (figure 5.4-A) est basé sur une adsorption de l’AmB à la surface de la membrane. Dans ce mécanisme, l’AmB est orienté parallèlement à la surface de

8. Pour rappel, Venegas *et al.* [157] ont montré que les polyènes pouvaient former des canaux dans les membranes des bactéries. Ils avaient alors postulé que les stérols potentialisaient l’effet antifongique des polyènes en favorisant leur insertion dans le coeur hydrophobe des membranes

la membrane et la déstabilise par séquestration de l'Ergo à la surface de la bicouche [168, 169]. Cependant, ce concept n'explique pas à lui seul la cause de la perméabilisation des membranes aux larges molécules.

Le deuxième concept est appelé « modèle de l'éponge de stérol », dans lequel l'AmB existerait sous forme de super-agrégats. Ces agrégats seraient localisés à proximité de la membrane fongique et en extraieraient l'Ergo [167, 170]. Cela n'est possible qu'à condition qu'il existe de très fortes interactions entre l'Ergo et l'AmB [171, 167]. Ce mécanisme est cohérent avec l'étude de Strachecka et ses collaborateurs, qui ont montré qu'*in vivo*, de larges agrégats d'AmB ou de structures riches en AmB étaient observables à la surface des levures [172]. Cependant, le bien-fondé de ce mécanisme a été remis en question [159], notamment parce que les ratios Ergo/lipides utilisés pour aboutir à ce mécanisme n'étaient pas physiologiques⁹. En effet, il a été montré qu'une modification de ce ratio par les levures pouvait participer à l'élaboration de phénomènes de résistances à l'AmB [174]. De plus, les levures possèdent une paroi riche en chitine, très hydrophile. Cette barrière naturelle serait problématique pour le transport de l'Ergo vers les super-agrégats d'AmB. Pour ces raisons, le modèle d'interaction des polyènes par la formation de pores reste aujourd'hui le modèle le plus plausible. Malgré cela, ce mécanisme n'explique pas à lui seul toutes les observations rapportées sur l'effet des polyènes sur les membranes.

5.3 Conclusion

Une analyse critique des différents mécanismes d'action des polyènes avec les membranes montrent qu'aucun d'eux ne prend en compte l'ensemble des phénomènes observés. Par exemple, tant les mécanismes de l'éponge de stérol que celui de l'adsorption des polyènes à la surface des membranes ne prennent en compte que l'interaction préférentielle des polyènes avec les stérols. Dans ces mécanismes, l'interaction des polyènes avec les stérols est considérée comme suffisante pour aboutir à l'effet toxique. Aucune prise en compte d'une possible interaction entre les polyènes et d'autres partenaires, tels que la PC, n'est effectuée.

Les mécanismes de formation de pores ioniques sont actuellement les mécanismes les plus largement admis dans la communauté scientifique. Cependant, il n'existe actuellement aucune étude sur l'interaction des polyènes avec d'autres phospholipides, tels que la PE ou la PS, deux phospholipides très présents dans les membranes eucaryotes. De plus, s'il existe des éléments dans la littérature scientifique pour comprendre l'interaction préférentielle des polyènes avec l'Ergo, peu d'études s'intéressent aux conséquences de cette interaction dans le mécanisme d'action des polyènes et des structures générées par cette interaction dans les membranes. Par ailleurs, nous l'avons montré chapitre 1, les feuillettes des mem-

9. Les ratios Ergo/lipide utilisés étaient de 1 : 10 [167] et 1 : 40 [170], alors qu'il est autour de 3 : 7 chez *S. Cerevisiae* [173]

branes biologiques ne possèdent pas le même contenu en lipide. Il n'existe aucune étude sur une potentielle différence d'interaction entre les polyènes et les feuilletts externes et interne des membranes. Pourtant, la différence du contenu en lipide, modifiant le packing des lipides, peut avoir une influence sur l'interaction des polyènes avec les membranes. Enfin, bien qu'il soit connu que les polyènes ont une efficacité et une toxicité intrinsèque envers les cellules, l'impact de faibles modifications dans leur structure et l'impact de ces modifications sur l'interaction avec les membranes est encore très peu étudié. Tous ces points sont cependant essentiels pour parvenir à une meilleure compréhension de l'interaction des polyènes avec les membranes.

L'hémozoïne, une cible moléculaire dans la lutte contre le paludisme

6.1 Le paludisme

Le paludisme, ou malaria, est une maladie infectieuse provoquée par un parasite du genre *Plasmodium*. Cette maladie est la première maladie parasitaire du monde : en 2013, le paludisme était considéré comme étant endémique pour 104 pays. Cela représente globalement une population à risque de 3,4 milliards d'individus, soit près de la moitié de la population mondiale. L'Organisation Mondiale de la Santé a dénombré 207 millions de cas de malaria dans le monde en 2012, pour 627 000 morts. La plupart des cas (80%) et des morts (90%) sont reportés en Afrique, et la plupart des morts concernent des enfants de moins de 5 ans (77%) [175].

Le paludisme est causé par 5 espèces de parasites qui affectent les humains ; tous ces parasites sont du genre *Plasmodium* : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. La forme de paludisme causée par *P. falciparum* est la forme la plus mortelle et est celle qui prédomine en Afrique. Cependant, *P. vivax* a une distribution plus large que *P. falciparum* car il est capable de se développer dans son vecteur de contamination à des températures plus basses, de survivre à des altitudes plus importantes et dans des climats plus froids que les autres formes. Il possède aussi un stade dit "dormant" durant lequel il est localisé dans le foie, ce qui lui permet de survivre pendant les périodes où le vecteur n'est pas présent pour continuer la transmission, comme durant les mois d'hivers. Bien qu'il soit répandu dans toute l'Afrique, le risque d'infection de *P. vivax* est réduit du fait d'une prédisposition génétique développée par les populations.

Le paludisme est transmis d'une personne à une autre *via* un moustique femelle du genre *Anophèle* au cours de son repas sanguin. Il existe près de 400 différents types d'*Anophèle*, mais seulement 60 sont des vecteurs d'importance majeure. Si les mesures de prévention sont de plus en plus répandues dans les pays concernées, force est de constater qu'il devient de plus en plus difficile de lutter contre le paludisme, principalement

parce que le parasite a su développer des mécanismes de résistances aux médicaments traditionnellement utilisés, comme la CQ¹.

6.2 Cycle de vie du parasite

6.2.1 Aspects généraux

Le parasite possède deux phases majeures de développement (figure 6.1) :

- un développement en partie sexué chez le moustique, où il y a fécondation suivie d'une sporogonie asexuée,
- un développement asexué chez l'Homme, où le développement parasitaire se décompose en un cycle érythrocytaire et un cycle hépatique.

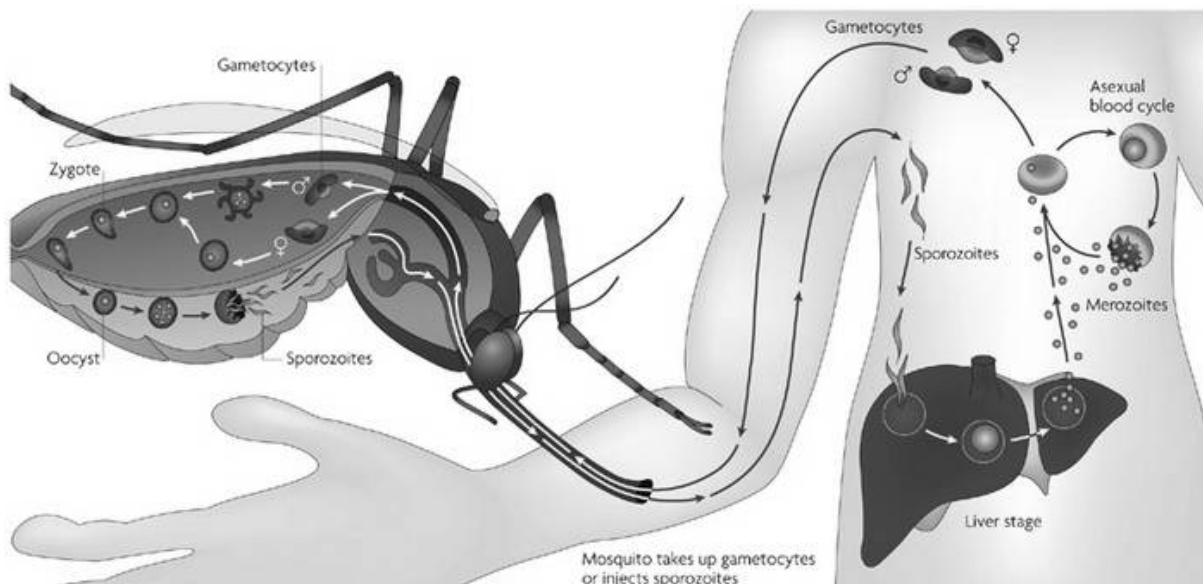


FIGURE 6.1 – Cycle de développement de *Plasmodium falciparum* - D'après [176]. Les gamétocytes sont ingérés par un moustique durant son repas sanguin. Ces gamétocytes subissent plusieurs étapes de maturation au sein du moustique. Ils sont ensuite transmis à l'homme lors de la piqûre et vont envahir des hépatocytes pour subir un premier cycle de divisions, jusqu'à devenir des mérozoïtes. Après éclatement de la cellule hépatique, les mérozoïtes sont libérés dans la circulation sanguine et leur multiplication se poursuit dans les érythrocytes. Cette multiplication asexuée donne lieu à des gamétocytes mâles et femelles. Le cycle de vie du parasite est complet lorsque ces gamétocytes sont ingérés par un autre moustique, ce qui perpétue la transmission.

Lors du repas sanguin de l'*anophèle* infectée, des dizaines de parasites sous forme de sporozoïtes sont transmis à l'Homme. Ces parasites gagnent d'abord le foie (cycle hépatique) et s'y développent. Après plusieurs divisions cellulaires, les hépatocytes infectés éclatent et relâchent dans la circulation sanguine des milliers de mérozoïtes. Ces mérozoïtes vont ensuite infecter les globules rouges pour continuer leur développement (cycle érythrocytaire).

1. CQ : Chloroquine

6.2.2 Description du cycle érythrocytaire

Le cycle érythrocytaire du parasite commence par l'invasion d'un globule rouge. Cette invasion est initiée par la reconnaissance et l'identification de la cellule hôte par le parasite. Cela entraîne son adhésion irréversible à la membrane du globule rouge. Cette adhésion constitue le point d'entrée du parasite dans la cellule. L'insertion du parasite va entraîner l'invagination de la membrane érythrocytaire, invagination qui donne naissance à la vacuole parasitophore. Cette vacuole est principalement formée de Chol et de SM provenant de la cellule hôte et constitue une zone de transit pour les protéines exportées depuis le parasite vers le globule rouge [177]. Après complète pénétration dans la cellule hôte, le parasite prend 3 formes successives :

- **Le stade anneau.** Ce stade constitue le premier stade de développement du parasite après invasion de l'hôte. Durant ce stade, le parasite met en place un réseau tubulo-vésiculaire impliqué dans l'import de nutriments, de protéines et de Chol.
- **Le stade trophozoïte.** Durant ce stade, le parasite digère de grandes quantités d'hémoglobine dans un compartiment dédié, la vacuole digestive. Cette digestion a pour but de libérer les acides aminés nécessaires à la synthèse de macro-molécules indispensables à la suite de son développement. Mais cette digestion est aussi accompagnée par la libération d'hémine, toxique pour les membranes parasitaires.
- **Le stade schizonte.** La biogénèse des organites nécessaires à la prochaine invasion a lieu au cours de ce stade.

6.2.3 Hydrolyse de l'hémoglobine et détoxification de l'hémine

Comme dit plus haut, l'hémoglobine représente la principale source d'acides aminés et d'osmolytes du parasite [178]. Ces acides aminés lui sont nécessaires pour élaborer de nouvelles macro-molécules. La dégradation de l'hémoglobine provoque la libération d'un sous-produit toxique, l'hémine (figure 6.2-A). L'hémine est une protoporphyrine contenant un atome de fer et correspond à l'hème ferreux de l'hémoglobine, responsable de la chélation de l'oxygène. Du fait de l'acidité de la vacuole digestive, l'hémine libérée par la dégradation de l'hémoglobine est rapidement oxydée en hématine (figure 6.2-B). Cette oxydation, faisant passer le groupe ferreux de Fe^{2+} à Fe^{3+} , confère à l'hématine de forte propriété oxydative, générant des espèces réactives de l'oxygène, très toxiques pour le parasite.

En théorie, l'hématine en solution peut exister sous trois formes différentes, à savoir sous forme monomérique, sous forme dimérique (dimère π - π ou dimère μ -oxo) ou sous forme

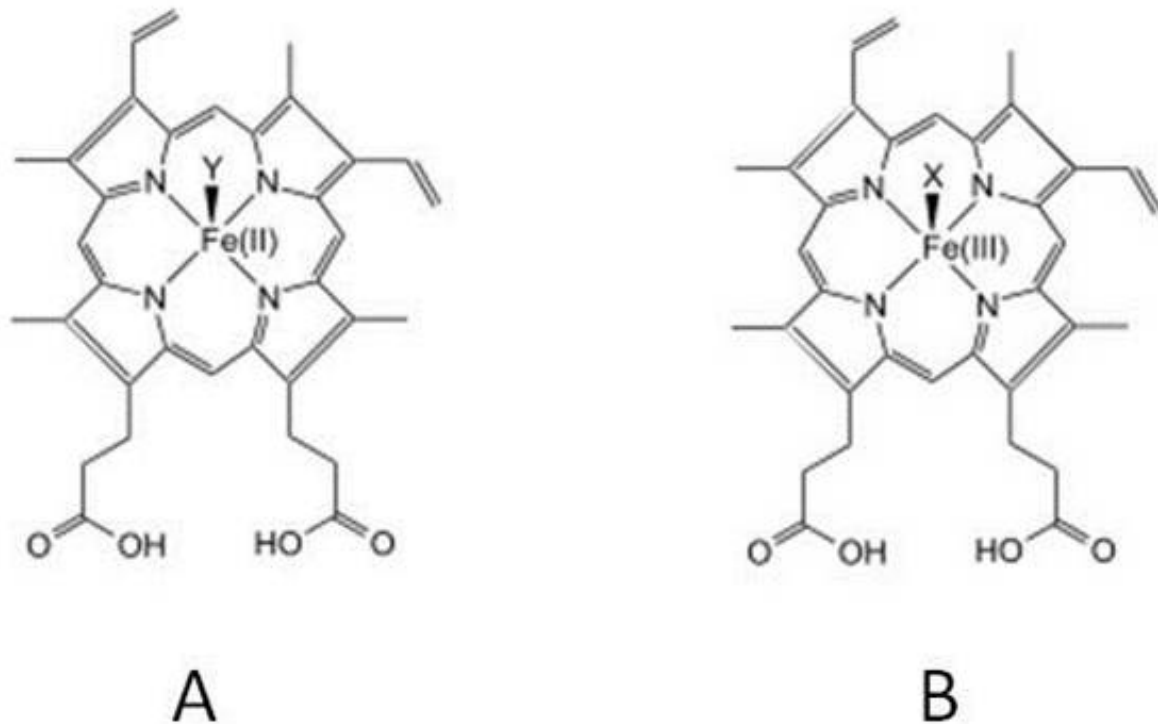


FIGURE 6.2 – Structure chimique de l'hémine (A) et de l'hématine (B).

d'agrégats de dimères (figure 6.3) [179]. Il a été montré que la forme monomérique de l'hématine était fortement membraonotrope [180] et provoquait la lyse de ses membranes et l'inhibition de ses protéases [181]. Une étude récente au laboratoire a montré cependant que les différentes formes dimériques ne possèdent aucun pouvoir membraonotrope.

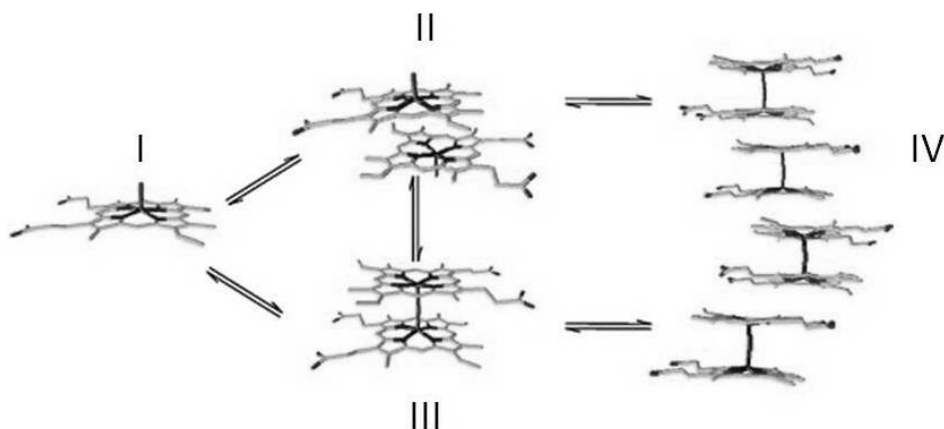


FIGURE 6.3 – Représentation des différentes formes d'hématine en solution - D'après [182]. L'hématine peut être retrouvée sous forme monomérique (I) ou dimérique. Ces dimères peuvent des dimères $\pi - \pi$ (II), μ -oxo (III) ou stables (IV).

La concentration en hématine, le pH et la force ionique sont autant de facteurs favorisant l'une ou l'autre des formes en solution [182]. Aussi, utilisant cette chimie du fer, le parasite a mis en place différentes stratégies de détoxification de l'hématine. Il a été montré

que le parasite pouvait dégrader l'hématine par peroxydation [183] ou par un système faisant intervenir le glutathion [184]. Ces mécanismes ne représentent cependant qu'un faible pourcentage de dégradation de l'hématine, puisque qu'Egan et ses collaborateurs ont montré que 95% de l'hématine parasitaire était transformée en hémozoïne [185].

L'hémozoïne est un biocrystal inerte formé de dimères d'hématine et représente ainsi le principal produit de la détoxification du parasite (figure 6.4). Ce cristal est inerte et inoffensif pour le parasite.

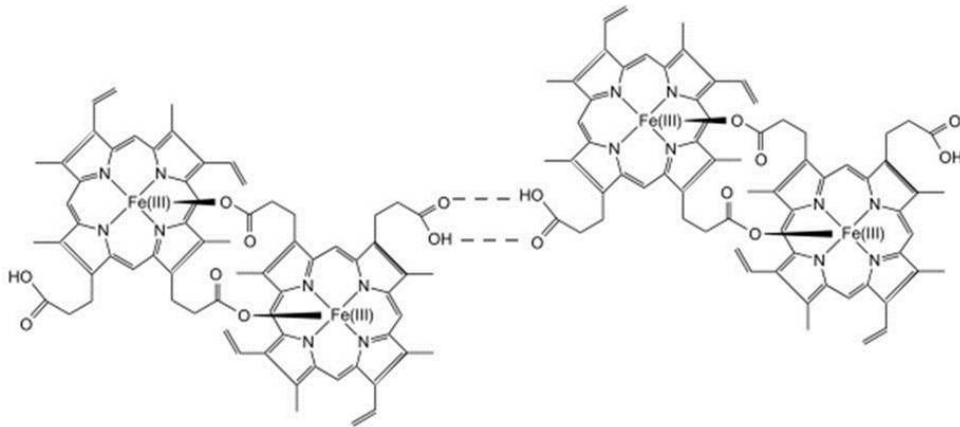


FIGURE 6.4 – Structure chimique de l'hémozoïne.

Le mécanisme de formation de l'hémozoïne est encore incompris. Cependant, deux partenaires probables montrés comme favorisant la formation du cristal ont été identifiés, donnant lieu à deux mécanismes différents :

- La formation de l'hémozoïne serait médiée par des "Neutral Lipid Bodies", comme l'a montré le groupe d'Egan [186]. Selon les résultats de cette étude, l'hématine en solution s'adsorberait sur la surface des "Neutral Lipid Bodies", qui seraient un point de nucléation idéal car leur cœur hydrophobe empêche les molécules d'eau du système d'interagir avec l'atome de fer. À partir de ces résultats, ils ont proposé un mécanisme présenté figure 6.5

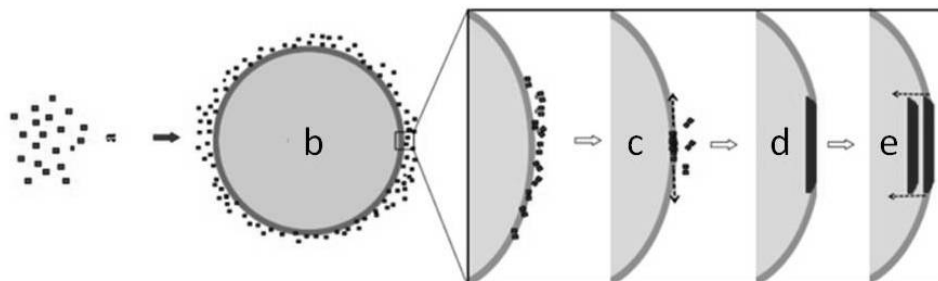


FIGURE 6.5 – Mécanisme de formation de l'hémozoïne *in vitro*. a. hématine monomérique libérée après digestion de l'hémoglobine à l'intérieur de la vacuole digestive. b. accumulation et adsorption de l'hématine sur les NLBs. c. Nucléation et élongation de l'hémozoïne. d. La courbure des NLBs empêche l'allongement supplémentaire du cristal. e. L'hémozoïne migre à l'intérieur des NLBs et les cristaux s'empilent les uns sur les autres.

- La formation de l'hémozoïne serait catalysée par des membranes sacrifiées par le parasite [187]. Le mécanisme de biocristallisation de l'hématine s'effectuerait dans la membrane des vésicules cytosomales, dotées d'une double membrane, impliquées dans le transport de l'hémoglobine. Cette hémoglobine serait digérée dans ces vésicules qui libéreraient l'hémine. L'hémine interagirait aussitôt avec la membrane interne de la vésicule en s'y insérant, à pH 7,4, et servirait de point de nucléation du cristal d'hémozoïne. Ces points de nucléation se situeraient au niveau de défauts dans la membrane vésiculaire. Ces points de défaut seraient localisés notamment au niveau du point d'insertion des protéines dans les membranes. Pour accélérer la digestion de l'hémoglobine, le parasite utiliserait des pompes à protons, acidifiant ainsi le milieu. Ce milieu alcalin provoquerait la transformation de l'hémine en hématine. Le pH intravacuolaire serait alors de 5,2. À ce pH, l'hématine est capable de s'associer en dimères stables, dimères qui participent alors à l'élongation du cristal d'hémozoïne. Tout comme pour les "Neutral Lipid Bodies", l'environnement hydrophobe des membranes favoriserait l'élongation du cristal. Ce mécanisme est reproduit figure 6.6.

Notre équipe a récemment réalisé le suivi de la biocristallisation *in vitro* de l'hématine au sein d'une bicouche lipidique formée de DPPC/DOPC en utilisant AFM [188]. Les résultats obtenus confirment que le phénomène de détoxification de l'hématine produit des fibres au niveau des lignes de défaut des domaines dont la taille et la morphologie sont contrôlées par la membrane plasmique. Aussi, à l'heure actuelle, le mécanisme de biocristallisation proposé par Hempelmann semble être le plus probable.

6.2.4 Les cibles thérapeutiques du parasite durant son cycle érythrocytaire

Des cibles thérapeutiques ont déjà pu être identifiées pour le parasite en phase hépatique. Malheureusement, seuls quelques laboratoires dans le monde ont la logistique et les moyens financiers nécessaires pour produire des parasites en phase extra-érythrocytaire. Les restrictions techniques sont importantes car il est nécessaire de mettre en place un insectarium pour avoir à disposition un grand nombre d'*Anophèles* infectées, puis de générer un grand nombre de parasites dans des hépatocytes *in vitro* ou *in vivo*. Ainsi, la découverte de cibles thérapeutiques au stade extra-érythrocytaire est très lente et peu avancée.

Durant le cycle érythrocytaire, le parasite exhibe de nombreuses cibles thérapeutiques en vue de l'élaboration de nouvelles molécules antipaludiques (figure 6.7).

Les molécules antipaludiques agissent en inhibant des processus ou des voies métaboliques dans différents compartiments subcellulaires. Les 4-aminoquinolines, incluant la

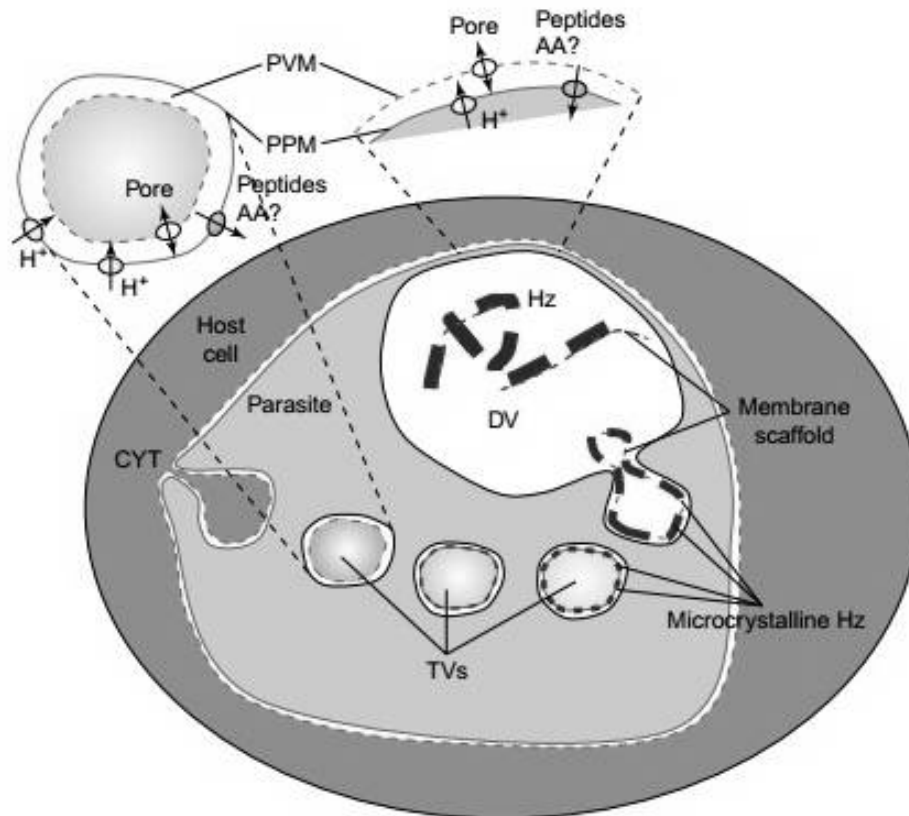


FIGURE 6.6 – Mécanisme proposé de formation de l'hémozoïne [187]. CYT : Cytosome ; TV : Vésicule de Transport ; DV : Vacuole Digestive ; PVM : Membrane de la vacuole parasitophore ; AA : Acides aminés ; PPM : membrane plasmique du parasite. Les membranes interne et externe de la TV proviennent de la PVM et de la membrane plasmique du parasite. La TV est acidifiée sous l'action de pompes à proton. La dégradation de l'hémoglobine se déroule à l'intérieur de la membrane interne, et l'hématine se dépose sur celle-ci. Les peptides et acides aminés sont transportés à travers la TV pour être libérés dans le cytoplasme du parasite. L'augmentation de la concentration en hématine au niveau de la membrane interne de la TV induit la formation de microcristaux d'hémozoïne. La digestion s'achève lorsque la membrane externe de ces vésicules fusionne avec la DV, délivrant les cristaux d'hémozoïnes et le squelette résiduel de la membrane interne à l'intérieur de la DV.

CQ et l'amodiaquine, et les quinoline-méthanol, incluant la Quinine et la MEF², empêche la détoxification des radicaux libres générés par le parasite. Les inhibiteurs de falcipaine ciblent les protéases à cystéine qui dégradent l'hémoglobine, principale source en acide-aminé du parasite. Les antibiotiques comme l'azithromycine, la doxycycline et la clindamycine inhibent la traduction protéique, ce qui provoque la mort de la progéniture des parasites. L'atovaquone et d'autres composants inhibent la chaîne respiratoire au sein de la mitochondrie, tandis que les antifolates empêchent la biosynthèse *de novo* des folates dans le cytosol.

Au cours de cette étude, nous avons choisi de nous intéresser à l'inhibition de la formation du cristal d'hémozoïne, entrant dans le processus de détoxification du parasite. Cette cible est idéale puisqu'elle est unique au *Plasmodium*³, qu'elle est la cible de nombreux

2. MEF : Méfloquine

3. Les cellules humaines dégradent l'hème par voie enzymatique en utilisant l'hème oxygénase

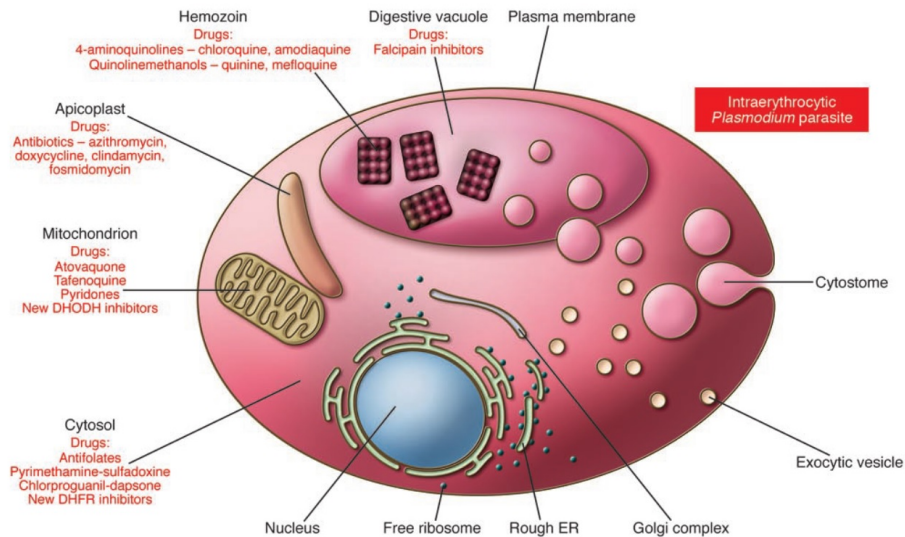


FIGURE 6.7 – Cibles potentielles des molécules antipaludiques identifiées chez *Plasmodium* - d'après [189]

composés et que son inhibition est reproductible en laboratoire. Le fait de cibler le stade érythrocytaire du parasite est cohérent puisqu'il constitue une étape primordiale dans son cycle de vie.

6.3 Les quinoléines, des molécules inhibant la polymérisation de l'hémine

La quinine est un alcaloïde naturel qui est antipyrétique, analgésique et, surtout, antipaludique. Extraite d'un arbuste originaire d'Amérique du Sud connu au dix-huitième siècle sous le nom de quinquina, elle était utilisée pour la prévention du paludisme. À cause de la grande variation de ses effets, principalement due à la variation de la qualité de l'écorce dont est tirée la molécule, mais aussi à cause de l'augmentation du besoin en molécules antipaludiques, de nombreux efforts de recherches ont été consentis pour obtenir de nouvelles molécules antipaludiques par voie de synthèse.

6.3.1 La Chloroquine

C'est en 1943 que la première molécule antipaludique non toxique pour l'homme dérivée de la quinine a été synthétisée. Cette molécule, la CQ, est une amino-4-quinoléine (figure 6.8).

Afin de synthétiser des molécules plus efficaces, son mécanisme d'action a été largement étudié dans la littérature scientifique.

Il a été observé que la CQ était uniquement efficace contre les parasites au cours de leur cycle érythrocytaire, particulièrement lors des cycles où le parasite dégrade activement

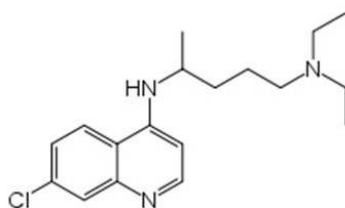


FIGURE 6.8 – Structure de la CQ

l'hémoglobine [190]. De ce fait, il a été suggéré que la CQ interférerait avec le métabolisme du parasite. Des études ont montré qu'elle provoque un gonflement de la vacuole digestive du parasite et une accumulation d'hémoglobine non digérée [191, 192, 193, 194]. Par ailleurs, cette activité serait renforcée par le fait que la CQ est capable de s'accumuler dans cette vacuole. En effet, la CQ est une base faible, capable de diffuser librement à travers la membrane de la vacuole digestive en raison de sa différence de pH par rapport au cytosol (pH respectifs de 5,2 et 7,4) [195]. Mais cette diffusion passive ne peut expliquer à elle seule la forte concentration de CQ retrouvée dans la vacuole (plus de 1000 fois concentrée par rapport au milieu externe). L'Amodiaquine, une molécule identique à la CQ si ce n'est qu'elle possède un cycle aromatique de type p-hydroxyanilino, est, comme la CQ, une base faible mais avec des pKa plus faibles. Si la diffusion passive était le seul mécanisme en jeu, la concentration intra-vacuolaire d'Amodiaquine devrait être plus faible que celle de la CQ. Pourtant, cette molécule s'accumule plus que la CQ [196], ce qui suggère la participation d'un mécanisme tiers.

Une première hypothèse suggère qu'il existerait un transporteur de type échangeur Na^+/H^+ pouvant être impliqué dans le transport de la CQ dans la vacuole digestive. Ce transporteur échangerait une CQ extra-vacuolaire contre un proton. Cette hypothèse a été suggérée à la suite d'une étude montrant l'inhibition dépendante de la concentration de l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive par le 5-(N-éthyl-N-isopropyl)amiloride, qui est connu pour se fixer sur la partie Na^+ de ce type d'échangeur [197, 198]. Une autre hypothèse suggère que cette accumulation serait liée à la séquestration de la CQ dans la vacuole digestive, qui interagirait avec l'hématine [199]. Les auteurs de l'étude ont montré en effet que l'inhibition des protéases hydrolysant l'hémoglobine faisait diminuer l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive.

L'interaction entre la CQ et l'hème est un processus largement étudié aujourd'hui et toujours sujet à controverses. Cependant, l'existence de cette interaction est établie puisque de nombreuses études ont pu la démontrer, que ce soit de manière directe ou indirecte. Le K_d de cette interaction a été calculé ($K_d = 3,5 \times 10^{-9} M$) et la stœchiométrie de la réaction a été établi à un rapport de 2 : 1, soit 2 molécules d'hème pour une molécule de

CQ [200, 201, 202]. De plus, il a été montré que l'ajout de CQ dans un milieu contenant de l'hémine provoquait des changements significatifs de la zone d'absorbance de la bande de Soret⁴, ce qui, selon les auteurs, serait lié à un empilement $\pi - \pi$ entre l'hématine et la CQ [203]. Casabianca et ses collaborateurs ont montré que les monomères et dimères d'hémine sont naturellement en équilibre, mais que la CQ perturbe cet équilibre vers la formation de dimère μ -oxo [204]. La CQ empêcherait ainsi la formation du cristal d'hémozoïne.

Toujours concernant les effets de la CQ, il a été suggéré que cette molécule modifierait le pH vacuolaire, ce qui empêcherait la dégradation de l'hémoglobine et entraînerait la mort du parasite [205, 206]. Cette hypothèse a cependant été en partie infirmée puisqu'il a été montré que le pH des vacuoles digestives des parasites résistants à la CQ est identique au pH des vacuoles digestives des souches sensibles [207]. Ce résultat suggère qu'une telle variation de pH ne diminuerait pas les chances de survie du parasite. Il a été aussi suggéré que la CQ pourrait masquer la membrane plasmique, empêchant ainsi la détoxification de l'hémine [208].

Une étude récente effectuée au laboratoire a montré que l'association entre la CQ et l'hématine entraînait une diminution du pouvoir membranotrope de l'hématine (thèse de S. Azouzi). Une caractérisation par spectroscopie de masse du complexe formé a montré que la CQ formait un dimère μ -oxo avec l'hématine. La diminution du pouvoir membranotrope de l'hématine a été montrée comme proportionnelle à la concentration en CQ dans le milieu. Il existe par ailleurs une forte corrélation entre la formation de ce dimère μ -oxo et l'inhibition de la formation du cristal d'hémozoïne. Ces résultats suggèrent que la CQ empêcherait la formation de l'hémozoïne par le parasite en se fixant sur l'hématine libérée après digestion de l'hémoglobine. Prenant en compte le modèle de formation de l'hémozoïne par Hempelmann, cette interaction empêcherait la formation du point de nucléation dans les membranes, essentiel à la formation du cristal d'hémozoïne. De plus, l'hémozoïne ne formerait jamais de dimère stable, essentiels pour l'accroissement de ce cristal. La concentration en hématine, ou encore le dimère lui-même, pourraient alors être responsables de la mort du parasite.

Jusque dans les années 60, la CQ a été la molécule de choix pour traiter le paludisme. Mais sa trop large utilisation pour éradiquer la maladie⁵ a favorisé la rapide apparition de résistance chez le parasite dès le début des années 60, moins de 20 ans après sa première utilisation. Aujourd'hui, la CQ est inutilisable du fait de la résistance quasi ubiquitaire des parasites à cette molécule. Du fait qu'elle a été largement étudiée, elle reste cependant une molécule modèle pour comprendre les interactions entre les molécules antipaludiques et l'inhibition de la formation de l'hémozoïne.

4. La bande de Soret correspond à une zone d'absorption intense dans la partie bleu-violet du spectre visible provenant d'un mouvement de dipôle électronique des porphyrines qui permet une transition π - π

5. L'OMS est allé jusqu'à l'intégrer dans du sel de cuisine dans certains pays pour accélérer la lutte contre le paludisme.

6.3.2 La Méfloquine

Dans les années 60, de très nombreuses molécules ont été synthétisées afin de répondre à la demande toujours croissante en molécules antipaludéennes, notamment à cause de la guerre du Vietnam. À cette époque, les États-Unis dépensaient pas moins de 6,5 millions \$ par an pour tester 25 000 composés potentiellement intéressants. À la fin des années 80, plus de 300 000 molécules différentes avaient été testées. De ces recherches, quelques molécules ont émergé, notamment la famille des quinolineméthanol, dont la MEF est le plus célèbre représentant (figure 6.9).

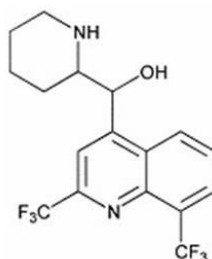


FIGURE 6.9 – Structure de la MEF

La MEF est un antipaludique montré comme étant actif contre les souches de *Plasmodium* résistantes à la CQ. Si elle est généralement bien tolérée, elle présente parfois une certaine toxicité, provoquant des nausées, vomissements, diarrhées, maux de tête, étourdissements, éruptions cutanées, prurit et douleurs abdominales. Plus rarement, des troubles plus indésirables se manifestent : cardio-vasculaires (bradycardie), ou neuropsychiatriques. Des troubles psychologiques peuvent affecter le patient, cela même plusieurs années après l'arrêt du traitement.

La MEF est capable de se lier fortement aux lipoprotéines du sérum et aux membranes plasmiques [209, 210, 211]. Cette propriété est sans doute responsable de sa longue demi-vie dans l'organisme, d'environ 14 jours [212].

Le mécanisme d'action de la MEF a longtemps été considéré comme semblable à celui de la CQ [213]. En, effet, tout comme la CQ, elle modifie la morphologie de la vacuole digestive du parasite [213]. Elle est capable d'inhiber la croissance des fibres d'hémozoïnes en se fixant spécifiquement sur l'hémimine libre. Cette inhibition a été montré comme étant égale [213] ou inférieure [214] à la CQ. Le Kd de l'association MEF/hémimine est relativement élevé par rapport à celui de la CQ ; il serait compris entre 3×10^{-7} et $1,6 \times 10^{-5}$ M [210, 201], soit supérieur de 2 à 4 ordres de grandeur.

La MEF est capable d'inhiber l'accumulation de la CQ dans la vacuole digestive, et vice-versa [215, 216]. Cela sous-entend que ces deux composés partageraient le même mécanisme d'insertion dans la vacuole. Cependant, du fait des propriétés physico-chimiques de la MEF, il a été montré que son accumulation dans la vacuole digestive est théorique-

ment 5 fois inférieure à celle de la CQ. Pourtant, la MEF est un meilleur inhibiteur de la croissance du parasite *P. falciparum* que ne l'est la CQ [190, 217]. Il paraît donc probable que cet antipaludique possède une autre cible moléculaire.

La MEF possède deux carbones asymétriques. Commercialement, elle est disponible sous forme de mélanges racémiques.

Il a été montré que les énantiomères de cette molécule pourraient avoir des activités et des toxicités différentes. Une étude a montré par exemple une nette différence d'activité entre les énantiomères +(-) et -(-) sur deux souches de *Plasmodium*, montrant que les énantiomères -(-) étaient plus actifs [218]. Il a par ailleurs été montré que l'énantiomère +(-) bloquait aussi les récepteurs à adénosine du Système Nerveux Central, tandis que le -(-) n'avait aucun effet sur ce récepteur [219]. Ce blocage est considéré comme responsable des troubles psychologiques engendrés par la molécule. Cependant, l'importance de la stéréosélectivité dans le mécanisme d'action de la MEF reste peu comprise mais aussi peu étudiée dans la littérature scientifique.

6.3.3 Synthèse de nouveaux dérivés énantiopurs de la Méfloquine

Pour comprendre le mécanisme d'action de la MEF, et notamment la potentielle implication de ses propriétés énantiomériques, l'équipe THERA, dirigée par le Pr. Pascal Sonnet du laboratoire Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agrosources à Amiens a synthétisé des analogues de la MEF. Les analogues synthétisés sont des énantiomères purs (*R*) ou (*S*) [217]. Ces molécules comportent différents groupements fonctionnels, montrés figure 6.10.

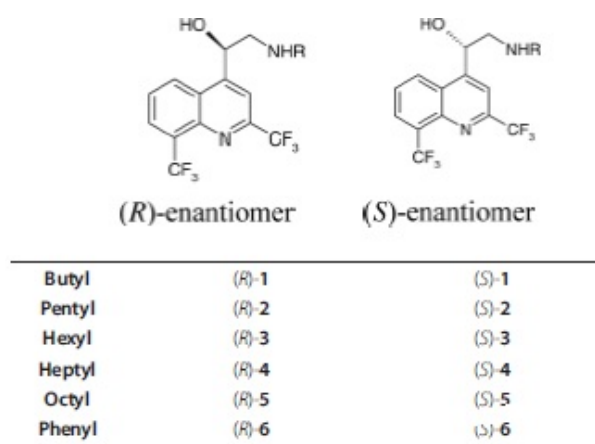


FIGURE 6.10 – Analogues synthétisés de la MEF par l'équipe du Pr. Pascal Sonnet

Des tests d'activité de ces molécules sur deux souches de *Plasmodium*, une étant résistante à la CQ, l'autre non, ont montré une différence d'effet considérable entre les composés (*R*) et (*S*) [217]. Les ratios R/S des IC₅₀ des molécules testées sont toujours supérieurs à 1, signe que les composés (*S*) sont plus efficaces que les composés (*R*). Ce ratio est

même de 15 pour les composés (*R*) et (*S*) synthétisés avec le groupement Hexyl. Les IC₅₀ de certains composés de conformation (*S*), notamment ceux possédant les groupements Hexyl et Heptyl, ont des IC₅₀ inférieurs à ceux de la CQ ou de la MEF, signe que ces molécules sont plus efficaces.

Lorsque le groupement fonctionnel du dérivé de la MEF est un -H, le LogP de la molécule est de 2,366. Cette molécule est donc lipophile. Les composés que nous utiliserons durant ces travaux sont les composés AJPS0130, AJPS0131 AJPS0132 et AJPS0133. AJPS0130 (*R*) et AJPS0131 (*S*) sont des composés avec un groupement hexyl. L'ajout de ce groupement fonctionnel fait passer le LogP à 5,754. Les composés AJPS0132 (*R*) et AJPS0133 (*S*) sont des composés avec un groupement heptyl, faisant passer le LogP à 6,259. Ces groupements fonctionnels rendent donc la molécule plus lipophile. Cette propriété nous permet de penser que ces molécules interagissent avec les membranes.

L'étude de ces composés, de la CQ et de la MEF en interaction avec les membranes modèles nous permettra de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules, mais aussi de déterminer l'impact de la lipophilicité et de l'énantiométrie sur le mécanisme d'action de la MEF.

Objectifs des différentes études

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes focalisés sur la compréhension des mécanismes d'interaction entre des molécules d'intérêt pharmacologique et des membranes. L'objectif général est de mieux comprendre ces mécanismes pour faciliter la synthèse de nouveaux composés antimicrobiens plus efficaces tout en étant moins toxiques pour l'Homme.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'interaction des polyènes avec des membranes modèles. Il a été montré dans la littérature scientifique que les stérols ont une place prédominante dans l'interaction avec les polyènes. Cependant, le rôle précis de ces lipides n'est pas complètement défini. Aussi, nous avons étudié la capacité de deux polyènes de grande taille possédant une structure chimique proche, l'AmB et la Nys, à interagir avec des modèles membranaires. Nous étudierons l'effet de ces molécules sur différents lipides et sur des mimes de ces feuilletts. Cette étude vise à déterminer de nouveaux partenaires d'interaction potentiels et à mieux comprendre l'impact de ces partenaires sur le mécanisme d'action des molécules antifongiques polyéniques. L'étude de ces effets en utilisant deux polyènes de structures proches mais d'efficacité différente nous permettra de mieux comprendre leurs interactions avec les stérols et à dégager un mécanisme général de l'action des polyènes sur les membranes.

Dans la deuxième partie de ces travaux, nous nous sommes intéressés à la compréhension des phénomènes d'inhibition de dérivés énantiopurs de la MEF. Comme vu précédemment, la formation du cristal d'hémozoïne impliquerait une interaction de l'hématine avec des membranes lipidiques. Une étude menée au laboratoire a montré que l'inhibition de la formation de la β -hématine était corrélée à l'inhibition de l'insertion de l'hématine dans des membranes de PC par la CQ.

Tout comme la CQ, la MEF est capable d'inhiber la formation de l'hémozoïne. Nous souhaitons utiliser cette propriété afin de déterminer la capacité d'inhibition de l'insertion de l'hémine dans des membranes lipidiques par des composés de synthèse dérivés de la MEF. Nous chercherons à comprendre l'impact de la stéréochimie de la MEF sur cette inhibition, cela dans le but d'orienter les synthèses de nouvelles molécules antipaludiques vers l'élabo-

ration de composés énantiopurs plutôt que racémiques. Pour cette étude, nous utiliserons une nouvelle méthodologie concernant la caractérisation des paramètres d'inhibition de l'insertion de l'hématine par ces molécules antipaludéennes. Des tests de faisabilité de cette méthodologie seront effectués en utilisant la CQ comme antipaludique modèle.

Troisième partie

Matériel et Méthodes

Molécules utilisées

8.1 Lipides

Tous les lipides utilisés dans ce travail sont purs à 99%. Ils sont commercialisés par Sigma Aldrich, sauf la POPE¹, commercialisée par Avanti Polar Lipids. Les solutions mères sont préparées à une concentration finale de 5 mM. Les lipides sont solubilisés dans du chloroforme (utilisés pour la préparation de liposomes) ou un mélange hexane/EtOH 9 : 1 (utilisés pour la formation de monocouches) et stockés à -20°C. Différents profils en acides gras ont été utilisés. Les différents profils représentés figure 8.1

L'influence de différentes têtes polaires sur le mécanisme des molécules d'intérêt a été étudiée. La structure de ces différentes têtes polaires est représentée figure 8.2

Enfin, deux stérols différents, le Chol et l'Ergo ont été utilisés. Le Chol est le stérol retrouvé dans les cellules de mammifère, tandis que l'Ergo est le principale stérol des cellules fongiques. Leur structure a été présentée figure 2.7 page 27.

8.2 Molécules d'intérêt

La Nys et l'AmB sont commercialisées par Sigma Aldrich. Le schéma de leur structure a été montré figure 5.1 page 53. Les solutions mères ont été préparées à des concentrations de 5 mM et conservées à -20°C à l'abri de la lumière. Pour les études d'insertion de molécules dans des monocouches lipidiques, la Nys et l'AmB ont été solubilisées dans du Méthanol. Pour les isothermes de compression, elles ont été solubilisées dans un mélange de DMF²/Ethanol 9 : 1 (vol/vol).

La CQ, l'hémine et la MEF sont commercialisées sous forme de poudre par Sigma Aldrich. L'hémine est solubilisée dans une solution de NaOH à 0,1 M. La concentration des solutions d'hémine est corrigée par lecture de l'absorbance à une longueur d'onde de 385 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire décrit par Ginsburg *et al.* [220]. Il

1. 1-Palmitoyl 2-Oleoyl Phosphatidyléthanolamine
2. Diméthylformamide

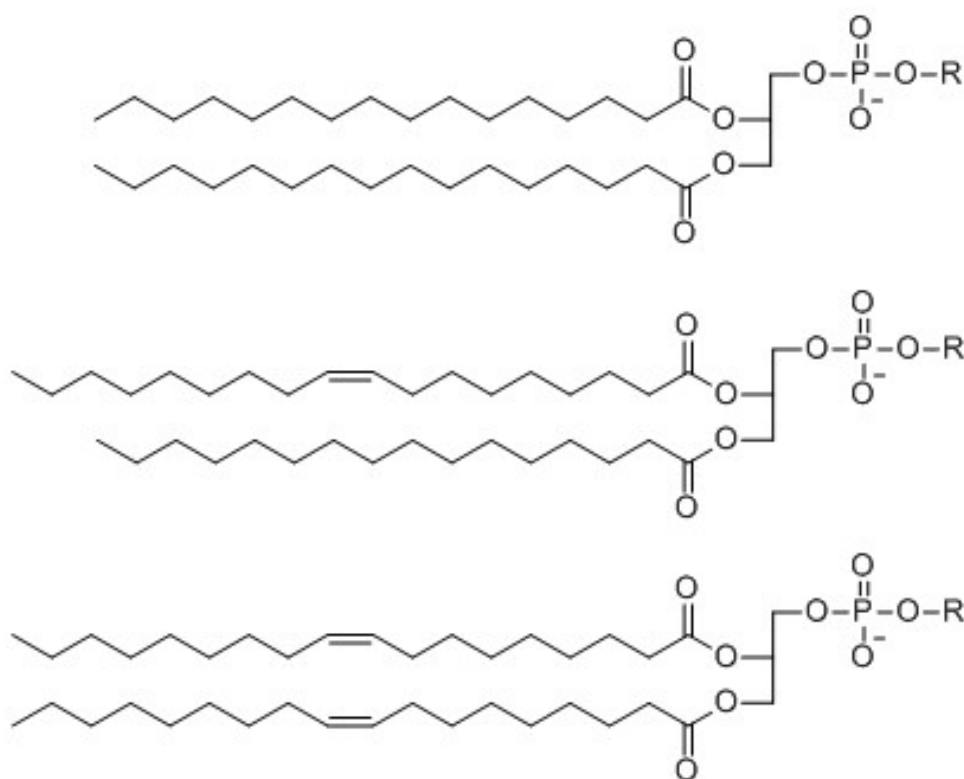


FIGURE 8.1 – **Structure des phospholipides utilisés.** De bas en haut : Dipalmitoyl Phosphatidyl-R, Palmitoyl Oleoyl Phosphatidyl-R et DiOleoyl Phosphatidyl-R

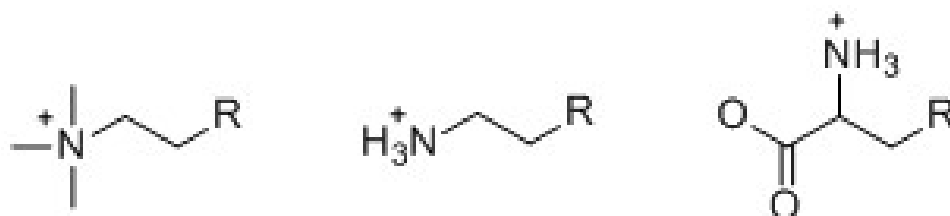


FIGURE 8.2 – **Structure des têtes polaires utilisées.** De gauche à droite : Choline, Ethanolamine, Sérine

est égal à $6,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La CQ est solubilisée dans de l'eau ultra pure et préparée à une concentration de 50 mM. Elle est conservée à 4°C.

La MEF est solubilisée dans du méthanol et est préparée à une concentration de 50 mM. Elle est conservée à -20°C.

Les composés antipaludiques AJPS0130-0133 ont été synthétisés par Alexia Jonet au sein de l'équipe du Pr Pascal Sonnet (Laboratoire de Glycochimie, des Antimicrobiens et des Agroressources-FRE-CNRS 3517). Ces composés sont purs à 94%. Ils ont été solubilisés dans du méthanol à une concentration finale de 50 mM puis stockés à l'abri de la lumière à -20°C.

8.3 Préparation des tampons

Les différents tampons utilisés ont été préparés dans de l'eau ultra de qualité Milli-Q®. Cette eau a une résistivité de 18,2 MΩ.cm. Voici la liste des tampons utilisés et leur composition :

- Tampon Tris 10 mM : 10 mM Tris, 150 mM NaCl - pH 7,4
- Tampon Tris 100 mM : 100 mM Tris, 150 mM NaCl - pH 7,4
- Tampon Acétate : 100 mM CH₃COONa, 150 mM NaCl - pH 5,2

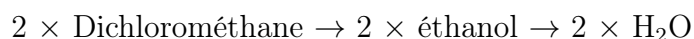
Préparation des modèles membranaires

9.1 Les monocouches de Langmuir

9.1.1 Principe de la technique

Les monocouches de Langmuir miment le feuillet externe des membranes biologiques. Elles sont souvent constituées d'un seul lipide, mais des mélanges plus élaborés peuvent être utilisés. D'une manière générale, une solution de lipide est déposée à l'interface air/eau d'une cuve ou d'un puits, le plus souvent en téflonTM.

Pour obtenir une bonne reproductibilité des expériences, la cuve et la lamelle utilisées pour la mesure doivent être nettoyées et calibrées régulièrement. Le nettoyage du matériel est effectué par des lavages successifs :



Le choix des solvants des solutions de lipides est basé sur leur capacité à solubiliser la molécule, mais aussi en fonction de sa capacité d'étalement. L'hexane/éthanol 9 : 1 (v/v) a, par exemple, un très bon coefficient d'étalement, supérieur à celui du chloroforme [43]. Ce mélange a donc été utilisé pour préparer les différentes solutions de lipides. Ces solutions sont préparées extemporanément à partir des solutions mères décrites précédemment.

9.1.2 Etude de l'insertion de molécules exogènes

Pour effectuer les études d'insertion de molécules dans des monocouches, nous avons utilisé un puits circulaire en téflonTM de 64 cm³. Les lipides sont déposés à l'interface air/eau jusqu'à une pression initiale définie. Après évaporation du solvant et stabilisation de la pression (de 10 à 15 minutes), la molécule d'intérêt est injectée en sous-phase à une concentration définie. Un orifice permet d'injecter les molécules en sous-phase sans traverser la monocouche. L'insertion de la molécule d'intérêt dans les monocouches est suivie par l'étude de la variation de la pression interfaciale en fonction du temps. Pour déterminer une PIM, au moins 5 pressions initiales différentes sont étudiées. La PIM

est déterminée par extrapolation de la droite de régression linéaire de la fonction 3.13 présentée page 42 :

$$\Delta\pi = f(\pi^{ini}) \quad (9.1)$$

La PIM correspond alors au point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses.

9.1.3 Étude de l'inhibition de l'insertion de l'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC

Nous avons déterminé la capacité de molécules antipaludiques à inhiber l'insertion de l'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). Pour reproduire les conditions retrouvées *in vivo*, l'hémine est incubée dans un tampon de polymérisation décrit par Egan et Ncokazi [221]. Ce tampon permet de transformer l'hémine en hématine. Une solution mère d'hémine (3,5mM) est préparée comme décrit page 79. Le milieu réactionnel de polymérisation est composé de 2 μL HCl à 1M, 6 μL de solution inhibitrice à des concentrations différentes, 11,7 μL d'acétate de sodium à 12,9 M pH 5 et 20,3 μL d'hématine à 3,5mM, pour un volume total de 40 μL . Le pH de la solution est alors égal à 4,5. Les solutions sont incubées à 60°C pendant 5 min. L'étude de l'insertion de l'hématine dans une monocouche de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol) est suivie pendant 45 min à aire constante. Les paramètres et méthodes d'utilisation du puits ont déjà été décrits section 9.1. La pression initiale de chaque expérience est de 20 ± 2 mN/m. Le suivi de l'inhibition de l'insertion de l'hémine dans les monocouches de DPPC/DOPC est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{PourcentageInhibition} = \left(1 - \frac{V_n}{V_0}\right) \times 100 \quad (9.2)$$

avec V_0 et V_n correspondant respectivement aux vitesses d'insertion dans les monocouches de l'hématine incubée sans et avec une concentration c de molécules antipaludiques.

9.1.4 Isothermes de compression

La cuve utilisée pour les isothermes de compression est une cuve commerciale en téflonTM de marque KSV (Minitrough 2, KSV Instruments Ltd). La cuve mesure 7,5 cm x 28 cm pour un volume total de 198 cm³. Elle est munie de barrières mobiles et d'une balance de Wilhelmy. Un dispositif de régulation de la température permet de thermostatier la sous-phase aqueuse et maintenir la température à 21°C, température choisie pour l'ensemble des expériences. Un volume précis d'une solution lipidique de concentration connue est déposé à l'interface air/eau. Ce dépôt se fait à l'aide d'une microsiringue. Après dépôt, un délai de 15 minutes est respecté afin de permettre l'évaporation complète du solvant. La compression est réalisée à une vitesse de fermeture des barrières de 10

cm²/min jusqu'à une pression maximale définie¹. L'enregistrement de l'isotherme π -A est ensuite lancé. L'aire moléculaire est donnée par l'équation :

$$Aire_{mol.} = \frac{Aire_{totale}}{N.c.V} \quad (9.3)$$

où N est le nombre d'Avogadro (6,02.10²³ molécules/mole), c la concentration molaire de la molécule et V le volume déposé à l'interface.

Les isothermes de compression sont obtenues par la représentation des droites de fonction

$$\pi = f(A_{(mol.)}) \quad (9.4)$$

À partir de ces isothermes sont calculés les Ks, grâce à l'équation 3.7 page 37 :

$$C_s = \frac{-1}{A} \times \frac{dA}{d\pi} \quad (9.5)$$

Nous avons aussi déterminé le ΔG_{ex} de l'interaction entre la POPE et la Nys. Ce paramètre a été calculé en utilisant l'équation 3.11 page 40 :

$$\Delta G_{ex} = \int_0^\pi A_{1-2} d\pi - \int_0^\pi A_1.X_1 d\pi - \int_0^\pi A_2.X_2 d\pi \quad (9.6)$$

9.1.5 Transfert de monocouches

9.1.5.1 Principe

Le transfert de "Langmuir-Blodgett" est une technique de transfert de monocouches sur un support solide. Ce transfert permet notamment de visualiser, à l'échelle nanométrique, les interactions molécules/lipides et les éventuelles structures tridimensionnelles résultant de ces interactions.

9.1.5.2 Méthode

Préalablement, du mica collé sur du verre est fraîchement clivée. Elle est ensuite installée sur le dispositif de transfert de la cuve de Langmuir². Le tampon est ajouté, pour un volume total de 198 cm³. La monocouche est composée d'un ou de plusieurs lipide(s) pur(s) ou mélangé(s) avec la molécule d'intérêt (5% molaire). Les molécules sont déposées à l'interface air/eau de la cuve. La compression est lancée avec une consigne de maintien de la pression cible³. Une fois la pression cible atteinte et stabilisée, la monocouche est transférée par remontée verticale du mica à une vitesse de 5 mm/min. La pression cible est maintenue tout le long du transfert par un réajustement de la position des barrières,

1. En général, cette pression est définie à 70 mN/m

2. La cuve utilisée pour les transferts est identique à celle utilisée pour les isothermes

3. Pour les mélanges contenant de la Nys, nous avons paramétré la consigne à 18 ou 35 mN/m

compensant la perte de matériel à l'interface. Le taux de recouvrement Tr est défini par :

$$Tr = \frac{Aire_{prv}}{Aire_{img}} \quad (9.7)$$

avec $Aire_{prv}$ l'aire de lipide prélevée à l'interface air/eau et $Aire_{img}$ l'aire du substrat immergée dans la sous-phase. Plus ce rapport est proche de 1 et plus le transfert est de bonne qualité. Pour toutes nos expériences, le Tr a toujours été autour de 1.

9.2 Les liposomes

9.2.1 Principe

Les liposomes sont des vésicules contenant une ou plusieurs bicouches lipidiques. Ils ont une architecture et une taille qui dépendent du mode de préparation et des lipides utilisés. Ces modèles miment le double feuillet lipidique des membranes biologiques et permettent, entre autres, l'étude des interactions avec des molécules d'intérêt et des perturbations engendrées par ces interactions sur ces membranes.

9.2.2 Méthode générale

Les lipides utilisés pour préparer les liposomes sont solubilisés dans du chloroforme puis séchés sous un flux d'azote. Les films secs obtenus sont placés dans un dessiccateur sous vide pendant 2 heures à température ambiante. Le film sec est ensuite remis en suspension dans du tampon tris 10 mM puis la solution est agitée vigoureusement pour former des MLVs.

9.2.3 Liposomes unilamellaires obtenus par sonication

La sonication de la solutions de MLVs permet d'obtenir des vésicules unilamellaires de petite taille (inférieure à 100 nm de diamètre), appelées SUVs. Le sonicateur utilisé est de marque Fisher Block Scientific. Il a une puissance de 500 W et une sonde en titane de 13 mm de diamètre. La solution de MLV subit 3 cycles de sonication de 2'30" à une amplitude de 33% à 4°C. Afin de supprimer les particules de titane générées durant la sonication, les vésicules obtenues sont filtrées. Le filtre utilisé est de marque Acrodisc® avec des pores de 0,2 μ m de diamètre.

9.2.4 Liposomes unilamellaires obtenus par extrusion

L'extrusion de MLVs permet d'obtenir des liposomes de tailles dépendantes de la membrane d'extrusion. Ces liposomes sont des bicouches sphériques d'un diamètre supérieur à 100 nm et sont appelés LUVs. Pour les obtenir, les MLVs sont extrudées à plusieurs

reprises à une température supérieure à la température de transition des lipides à travers une membrane de polycarbonate ayant des nanopores calibrés. Pour les études présentées, deux tailles de pores ont été utilisées : 200 nm et 400 nm. Les MLVs ont été extrudées 21 fois à l'aide d'un extrudeur de marque Liposofast (Aventin Inc.). Les extrusions ont été réalisées à 60°C.

9.3 Dosage des lipides par la méthode de Stewart

9.3.1 Principe

Le principe de ce dosage repose sur la formation d'un complexe entre le ferrothiocyanate d'ammonium et le groupement phosphate des phospholipides. Le réactif, appelé réactif de Stewart, est un tampon contenant :

- 30,4 g de NH_4SCN ,
- 27,03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

9.3.2 Méthodes

Pour chaque échantillon, 40 μl sont prélevés et déposés dans un tube à essai en verre. 2 mL de chloroforme, puis 1 mL de la solution de Stewart sont ajoutés. Le mélange est vigoureusement vortexé pendant une minute. L'hypophase chloroformique est récupérée et son absorbance est mesurée à l'aide d'une cuve en quartz à 488 nm. Les concentrations en lipides sont déterminées par extrapolation des valeurs d'absorbance sur une droite étalon obtenue à partir de concentrations connues de lécithine de jaune d'œuf.

Techniques de caractérisation

10.1 Microscopie à l'Angle de Brewster

10.1.1 Principe

Le BAM¹ est une méthode de microscopie permettant d'observer les interfaces à une échelle microscopique. Cette technique de microscopie permet notamment de visualiser les effets d'un agent externe sur l'organisation des lipides au sein d'une monocouche. Cette technique ne nécessite pas d'utilisation de sonde, ce qui diminue le risque d'artefacts expérimentaux. Elle a été développée de manière indépendante par deux équipes de recherche, le groupe français de Hénon et Meunier, et le groupe Allemand de Höning et Möbius [222, 223]. Cette technique repose sur les propriétés de réflectivité d'une interface, comme représenté figure 10.1.

Si on considère une interface de Fresnel, c'est à dire une interface parfaitement plane et infiniment mince, séparant deux milieux transparents et optiquement inactifs d'indice de réfraction n_1 et n_2 . Si on éclaire cette interface avec un faisceau de lumière parallèle polarisée, il existe alors un angle α pour lequel il n'y aura aucune réflexion. Cet angle est appelé *angle de Brewster*. Cet angle est défini par la relation :

$$\tan \alpha = \frac{n_2}{n_1} \quad (10.1)$$

Si nous appliquons cette propriété à notre système, nous considérons alors une interface entre l'air et l'eau. L'eau a un indice $n_1 = 1,33$ tandis que l'air a un indice $n_2 = 1$; ces deux milieux sont transparents. Selon l'équation 10.1, à un angle incident de $53,1^\circ$, l'interface air/eau ne renvoie aucune lumière et apparaît donc noire. L'ajout d'un film lipidique à cette interface va modifier les propriétés du système. Son indice de réfraction est en général plus grand que celui de l'eau, essentiellement dû aux chaînes aliphatiques des lipides. La réflectivité (en intensité) d'une monocouche est donc plus grande que celle

1. BAM : "Brewster Angle Microscopie", ou Microscopie à l'angle de Brewster

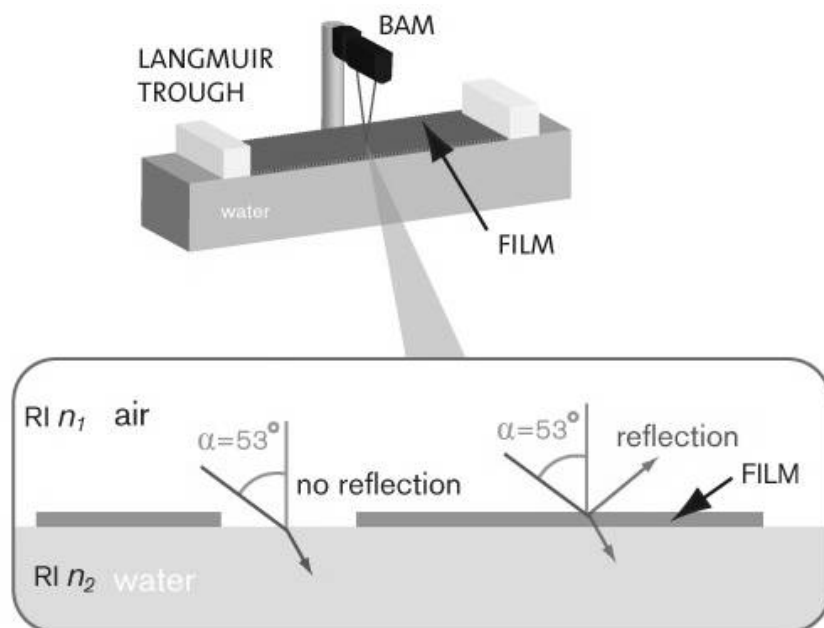


FIGURE 10.1 – **Principe de fonctionnement du BAM.** Adaptée de www.ksvnima.com

de l'eau pure, et augmente avec la densité de la monocouche. Ainsi, si le film est une monocouche en transition de phase LE/LC, les deux phases en coexistence, qui n'ont pas la même densité, n'ont pas les mêmes coefficients de réflexion. Il est donc possible par ce moyen de visualiser la coexistence de deux phases lipidiques dans un film lipidique pur. Ces phases auront alors un niveau de gris différent sur les images enregistrées.

10.1.2 Matériel et Méthodes

Le BAM (NFT iElli-2000) est équipé d'un laser émettant une lumière polarisée à 532 nm, un analyseur et un polariseur. La lumière est projetée sur l'interface air/tampon à l'angle α ($53,1^\circ$). Elle est récupérée par l'analyseur couplé à une caméra CCD². La résolution latérale du microscope est de $2 \mu\text{m}$.

Une cuve de marque Nima (BAM LB Deposition trough) dédiée au BAM est utilisée. Elle mesure $74 \text{ cm} \times 13 \text{ cm}$ pour un volume total de 760 cm^3 . La cuve et les barrières sont nettoyées comme décrit précédemment.

La sous-phase est composée d'un tampon tris 10 mM. Les lipides purs ainsi que les différents mélanges lipides/molécules y sont déposés à l'interface. La compression de la monocouche est réalisée à $20 \text{ cm}^2/\text{min}$. La vitesse d'obturation de la caméra est de $1/25 \text{ s}$.

2. CCD : Charge Coupled Device

10.2 Microscopie à Force Atomique

L'AFM est une technique de microscopie fine où la surface d'un échantillon est balayée par une pointe à faible rayon de courbure. La résultante des forces d'interaction entre la pointe et la surface de l'échantillon est enregistrée et, par traitement mathématique, donne une topologie précise de cette surface, avec une résolution latérale de l'ordre du nanomètre.

10.2.1 Principe

L'AFM a pour élément de base une pointe souple dont l'extrémité a un rayon de courbure de quelques dizaines de nanomètres (20-40 nm). Cette pointe est montée sur un levier flexible et est en contact avec l'échantillon, lui même fixé sur un scanneur à céramiques piézoélectriques. Quand elles sont soumises à une tension, ces céramiques sont capables de se dilater et se contracter, ce qui permet de déplacer l'échantillon dans les trois dimensions de l'espace. Les mouvements de la pointe sont suivis par les déplacements de la réflexion d'un laser projeté sur elle et captée par une photodiode. La déflexion de la pointe due à un élément topologique modifiera la position de la réflexion du laser sur la photodiode. Une boucle de rétroaction permet également de contrôler la force d'appui de la pointe sur l'échantillon.

Les leviers AFM sont photolithographiés et sont composées de Si_3N_4 ³. Ils sont souvent recouverts d'une fine couche d'or ou d'aluminium afin de rendre les pointes réfléchissantes et permettre la réflexion du laser. La résolution de la force est limitée à l'agitation thermique du cantilever, ce bruit étant caractérisé par la constante de raideur du levier.

10.2.2 Les modes d'acquisition

Il existe différents modes d'acquisition des images, dépendant de la façon dont la pointe interagit avec l'échantillon.

— Mode contact

L'acquisition d'images topographiques en mode contact se caractérise par le contact physique établi entre la pointe et l'échantillon à analyser. Ce mode contact consiste à utiliser les forces répulsives : la pointe appuie sur la surface, elle est donc repoussée du fait du principe de Pauli, et le levier est dévié, provoquant un déplacement de la réflexion du laser sur la photodiode. La rétroaction s'effectue sur la mesure de la direction de la déviation. Cette méthode peut s'avérer destructrice pour les échantillons biologiques si la force appliquée sur l'échantillon est trop importante, ou si le temps de scan est trop long.

Des erreurs dans la régulation de la force sont inévitables dans ce mode car la

3. Si_3N_4 : Nitrure de Silicium

boucle de rétroaction ne réagit qu'aux déflexions de la pointe.

— **Mode non contact**

Le mode non contact utilise les forces attractives entre la pointe et l'échantillon. Il est très peu utilisé en pratique car ces forces d'attraction sont très faibles et nécessitent d'isoler le microscope des bruits environnants. De plus, cette méthode nécessite souvent de faire le vide pour obtenir une résolution suffisamment importante. La rétroaction s'effectue soit sur la déviation, soit sur l'amplitude de la déviation.

— **Mode Tapping**

Pour réduire la déformation de l'échantillon étudié, il est possible de réduire le temps de contact avec la pointe en utilisant un mode d'imagerie dynamique. L'AFM en mode Tapping[®] consiste à faire vibrer le levier à sa fréquence propre de résonance (typiquement de l'ordre de la centaine de kHz), avec une certaine amplitude. Une interaction avec la surface fera décroître l'amplitude d'oscillation du fait du changement de la fréquence de résonance. Dans ce mode, la rétroaction se fait au niveau de l'amplitude d'oscillation du levier.

10.2.3 Matériel et méthodes

L'appareil utilisé dans ce travail est un microscope Multimode piloté par un contrôleur Nanoscope III (Digital Instrument, Veeco). Il est équipé d'un scanner J ($125 \mu\text{m} \times 125 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$). Les images topographiques ($256 \text{ pixels} \times 256 \text{ pixels}$) sont réalisées avec des pointes AFM ayant des leviers "en V" en Nitrure de Silicium (Si_3N_4) de type Microlevers et commercialisées par Bruker. Elles possèdent une force de raideur théorique comprise entre 0,01 et 0,1 N/m et un rayon de courbure d'environ 20 nm.

Les monocouches sont imagées à l'air immédiatement après leur transfert sur mica par Langmuir-Blodgett. Les images topographiques sont obtenues en mode contact avec une force d'appui inférieure à 200 pN. La vitesse de scan est de 3 Hz.

10.3 Spectroscopie de fluorescence

Le spectromètre de fluorescence utilisé pour toutes les expériences décrites ci-après est un Varian Cary Eclipse.

10.3.1 Étude de perméabilité membranaire

10.3.1.1 Principe

Il est possible de suivre les modifications de l'intégrité membranaire engendrées par des molécules exogènes. La calcéine (figure 10.2) est un composé fluorescent avec des longueurs d'onde d'émission et d'excitation respectivement de 490 et 520 nm. La fluorescence de la calcéine subit une auto-extinction lorsqu'elle est très concentrée. Elle émet alors une fluorescence résiduelle.

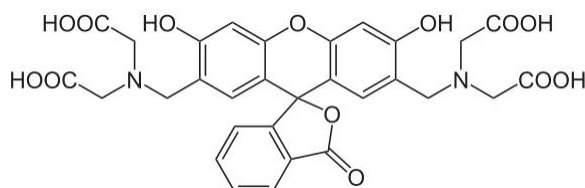


FIGURE 10.2 – Structure de la calcéine

La calcéine est utilisée pour étudier la perméabilisation de modèles membranaires par des molécules exogènes. Elle est encapsulée dans des liposomes à une concentration très importante et subit donc une extinction de fluorescence. Si la molécule étudiée provoque une perméabilisation de la membrane, la calcéine est libérée dans le milieu extra-liposomal. Cette libération engendre une diminution de la concentration locale en calcéine et donc une augmentation de sa fluorescence (figure 10.3).

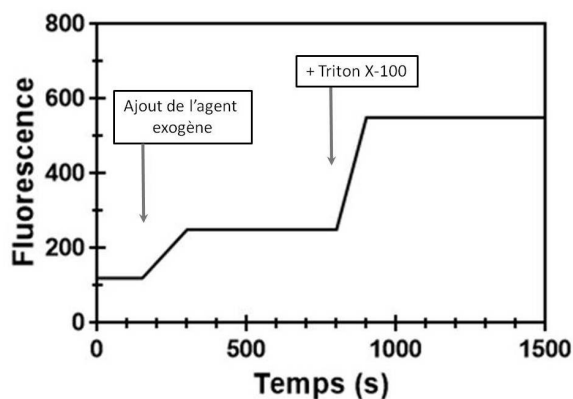


FIGURE 10.3 – Cinétique théorique de la variation de la fluorescence de la calcéine encapsulée dans des liposomes sous l'effet de molécules perméabilisant les membranes.

Il est ainsi possible d'étudier le pourcentage de libération de la calcéine, qui est corrélé au pouvoir perméabilisant de la molécule étudiée. Ce pourcentage a pour formule :

$$\%_{age\ lib.} = \left(\frac{F_t - F_0}{F_{tot} - F_0} \right) \times 100 \quad (10.2)$$

avec F_T l'intensité de fluorescence après ajout de la molécule, F_0 la fluorescence initiale et F_{tot} la fluorescence totale de l'échantillon. Cette valeur F_{tot} est obtenue par solubilisation complète des membranes à l'aide d'un détergent, par exemple le Triton X-100.

Cette technique a été largement utilisée dans la littérature scientifique pour déterminer le pouvoir perméabilisant de molécules membranotropes. C'est le cas des terpènes, que nous avons déjà cité en exemple dans le chapitre sur les modèles membranaires [70]. La calcéine a aussi été utilisée dans des études visant à mieux comprendre le mécanisme d'action de la mélitine et la nysine [83, 77].

10.3.1.2 Méthodes

La méthode est similaire à celle permettant d'obtenir des LUVs. Le film sec est placé sous-vide puis réhydraté avec un tampon tris 10 mM à pH 7,4 contenant 35 mM de calcéine. Après réhydratation, la concentration en lipides doit être égale à 1 mM. Les MLVs sont ensuite extrudées 21 fois à 60°C à travers une membrane nanoporeuse (taille des pores : 200 nm de diamètre). Les LUVs obtenues sont séparées de la calcéine libre par chromatographie d'exclusion sur une colonne de gel Sepharose 4B. Un tampon Tris 10 mM est utilisé comme éluant et les différentes fractions sont collectées. La colonne est régénérée par deux passages successifs de 1,5 volumes de colonne d'une solution de NaOH et 1,5 volumes de colonne d'une solution de HCl. La colonne est ensuite équilibrée par 2 volumes de colonne de tampon Tris 10mM.

La quantité de lipides contenue dans chaque fraction est dosée par la méthode de Stewart vue page 86. Les LUVs sont ensuite diluées à une concentration finale de 10 μ M dans du tampon Tris 10 mM et sont incubées avec différentes concentrations de la molécule d'intérêt. La mesure de la fluorescence est réalisée à 21°C. Les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont respectivement de 520 et 490 nm.

10.3.2 Étude de l'ordre des membranes

10.3.2.1 Principe

L'état de la fluidité membranaire des vésicules lipidiques (SUVs et LUVs) formées en présence ou en absence de la molécule d'intérêt a été évalué en utilisant deux sondes fluorescentes : le Laurdan et le Prodan.

Le Laurdan⁴ est un composé inorganique fluorescent utilisé pour étudier l'ordre des membranes. Sa caractéristique la plus importante est que sa fluorescence est sensible à la fluidité des membranes et aux altérations de cette fluidité par l'environnement de la membrane [224]. Cette molécule a été pour la première fois synthétisée en 1979 par Gregorio Weber pour remplacer les molécules déjà existantes à l'époque mais qui interagissaient avec certains composants des membranes lipidiques.

4. 6-Dodecanoyl-2-Dimethylaminonaphthalene

Le Laurdan possède un groupement naphthalène, responsable de la fluorescence, sur lequel est greffé une chaîne acyle de 10 carbones (figure 10.4-a). Cette chaîne acyle s'insère dans les bicouches lipidiques, ce qui permet l'ancrage du Laurdan dans les membranes de manière homogène dans les phases gel et fluide. Les propriétés de fluorescence du Laurdan associées à cet ancrage profond permettent d'étudier la fluidité membranaire au niveau des chaînes acyles des membranes lipidiques.

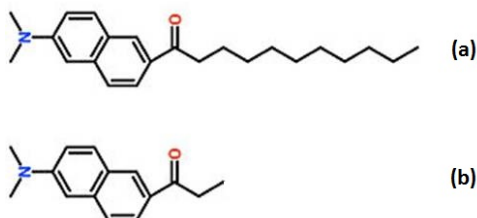


FIGURE 10.4 – Représentation des sondes Laurdan (a) et Prodan (b)

Pour étudier les perturbations engendrées par des molécules au niveau des têtes polaires des membranes, il est possible d'étudier l'évolution de la fluorescence d'une molécule similaire, le Prodan. Le Prodan est aussi une molécule avec un groupement naphthalène, mais possédant une chaîne acyle plus courte, contenant deux carbones (figure 10.4-b).

Le résidu naphthalène de ces deux sondes possède un moment dipolaire dû à une séparation partielle de charge entre les groupements diméthylamine et carbonyle. Lors de l'excitation de ces molécules, ce dipôle s'accroît et entraîne une réorientation des dipôles des molécules d'eau autour de ce groupement naphthalène. Cela se traduit par un red-shift dans le spectre d'émission de la sonde. Ce shift est d'autant plus important que l'accessibilité au solvant est grande, le spectre se déplaçant de plus en plus vers le rouge.

Lorsqu'elles sont excitées à 360 nm, le Laurdan et le Prodan possèdent deux longueurs d'ondes maximales d'émission (435 nm et 490 nm pour le Laurdan, 440 nm et 480 nm pour le Prodan) correspondant respectivement à une organisation en phase gel et en phase fluide de la membrane étudiée. À partir de ces bandes, Parasassi et ses collaborateurs ont défini un paramètre appelé "GP" pour *Generalized Polymerisation* [225] dont la formule est la suivante :

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (10.3)$$

avec I_B et I_R les intensités de fluorescence dans le rouge et le bleu respectivement. Le GP varie d'une valeur maximale positive dépendante du modèle utilisé (pas d'effet de solvant, membrane en phase gel et très ordonnée) à une valeur négative minimale (exposition complète à l'eau de l'environnement, membrane fluide, peu ordonnée) [226].

10.3.2.2 Matériel et Méthodes

Les GP du Laurdan et du Prodan ont été mesurés dans des SUVs et des LUVs de différentes compositions lipidiques à une concentration de 110 μM . Les polyènes solubilisés

dans le méthanol ont été ajoutés avant formation du film sec. La proportion de polyène dans le film sec est de 0% ; 2,5% ; 5% ou 10% molaire. Les deux sondes sont solubilisées dans l'éthanol. Les concentrations finales en Laurdan et Prodan dans les liposomes sont respectivement 1 μM et 3 μM .

10.4 Diffusion dynamique de la lumière

10.4.1 Principe

Une lumière monochromatique issue d'un laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) est émise afin de détecter des fluctuations de l'intensité diffusée, dépendantes du temps, résultant du mouvement Brownien des particules⁵. La lumière est diffusée à un angle de 90° , angle pour lequel l'intensité est maximale. L'analyse de la dépendance en fonction du temps de la fluctuation d'intensité peut donc être rapportée au mouvement des particules et à leur coefficient de diffusion. Par traitement mathématique, il est possible de déterminer la distribution en taille des particules en solution.

10.4.2 Matériel et Méthodes

La taille des SUVs et LUVs de différentes compositions lipidiques a été mesurée en absence et en présence de molécules d'intérêt, à différents temps d'incubation. L'appareil utilisé est un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument). Les différentes mesures ont été réalisées dans un tampon Tris 10 mM à 21°C . La concentration en lipides est de 1 mM.

5. Mouvement thermique aléatoire des particules provoqué par les impacts du solvant sur leur surface

Quatrième partie

Résultats

Interaction de la Nystatine avec des modèles membranaires

Comme nous l'avons mentionné dans la section 5 page 52, la Nys¹ est un macrolide possédant 4 doubles liaisons conjuguées. C'est une molécule qui ressemble beaucoup à l'AmB², qui possède elle 7 doubles liaisons conjuguées. Cette différence confère à l'AmB une meilleure efficacité, mais aussi une plus grande toxicité [142]. Ces molécules sont connues pour perméabiliser les membranes biologiques en créant des pores [158]. Les pores obtenus par l'action des polyènes dépendent de la composition lipidique de la membrane, mais aussi de la concentration en Nys [158]. Aussi, il est possible que les autres lipides des membranes biologiques, tels que les phospholipides, puissent jouer un rôle dans le mécanisme d'action des polyènes. Une étude a d'ailleurs montré qu'un phospholipide, la DPPC, pourrait avoir un rôle dans ce mécanisme [45].

À notre connaissance, une seule étude s'est intéressée à l'insertion des polyènes dans des membranes modèles constituées d'autres lipides que la PC [49]. Cependant, cette étude n'utilisait pas de longueurs de chaînes acyles biomimétiques. Par ailleurs, la notion même de toxicité *via* la création de pores membranaires est aujourd'hui remise en question [167, 170]. Malgré les récents progrès de la recherche scientifique sur le sujet, le mécanisme d'action des polyènes n'a toujours pas été complètement élucidé. Par ailleurs, considérant la faible variation de structure entre l'AmB et la Nys, la différence de toxicité entre ces deux molécules reste toujours mal expliquée.

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'interaction de la Nys avec des membranes biomimétiques afin de caractériser le mécanisme d'action de cette molécule. Afin de combler le manque d'information sur le sujet, nous nous sommes intéressés aux potentielles interactions avec différents types de lipides. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles membranaires :

- Des monocouches de Langmuir,

1. Nys : Nystatine

2. AmB : Amphotéricine B

— Des liposomes de tailles différentes.

Nous avons, dans un premier temps, considéré les propriétés interfaciales de la Nys. Nous avons caractérisé la capacité de la Nys à former des monocouches et à s'adsorber à l'interface air/eau. Nous avons, par la suite, étudié la capacité de la Nys à s'insérer et à perturber des membranes modèles. Nous avons ainsi pu suivre les modifications générées par la Nys sur les propriétés biophysiques de monocouches, notamment en déterminant les isothermes de compression ($\pi - A$) de mélanges lipides/Nys. Puis, nous avons étudié la capacité de la Nys à déstabiliser des bicouches lipidiques en utilisant des molécules fluorescentes. Ces molécules nous ont permis d'étudier la perméabilisation de liposomes générée par la Nys en fonction de leur composition lipidique. Nous avons pu aussi étudier les perturbations de l'ordre membranaire et l'enfouissement de la Nys en fonction de la composition, mais aussi de la taille de ces vésicules. Le but de ce travail est de caractériser de nouveaux partenaires d'interaction de la Nys et d'établir dans quelle mesure ils interagissent avec les membranes.

11.1 Interactions de la Nys avec des monocouches de Langmuir

11.1.1 Propriétés interfaciales de la Nys

Dans un premier temps, nous avons étudié la capacité de la Nys à former un film moléculaire à l'interface air/eau en réalisant son isotherme de compression ($\pi - A$). Ces expériences sont préliminaires à l'étude des propriétés membranotropes et interfaciales de la Nys et nous permettent d'étudier ses propriétés à cette interface. La figure 11.1 montre l'isotherme de compression de la Nys.

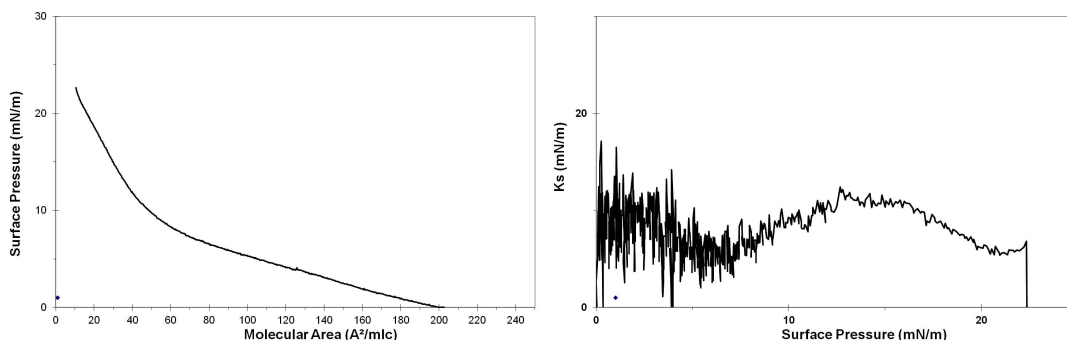


FIGURE 11.1 – **Isotherme de compression et module d'élasticité d'une monocouche de Nys.** Gauche : Isotherme de compression de la Nys. Droite : Module d'élasticité. La sous-phase est un tampon Tris à 10 mM et à pH 7,4. L'expérience a été réalisée à 21°C.

Après la phase gaz, la pression de surface augmente continuellement jusqu'à une pression d'environ 7 mN/m. Ensuite, un plateau apparaît dans la région comprise entre 7 et 12

mN/m. Pour une aire moléculaire de $60 \text{ \AA}^2/\text{mlc}^3$, nous observons une augmentation plus importante de la pression, jusqu'au collapse de la monocouche autour de 20 mN/m. Sur la courbe de K_s , nous pouvons observer deux maxima, un premier à 4 mN/m, le second autour de 17 mN/m. Les valeurs de K_s associées sont faibles, inférieures à 20 mN/m, correspondant à une phase LE. Il a été proposé dans la littérature scientifique que ces pics correspondraient au passage d'une orientation horizontale à une orientation verticale de la Nys à l'interface [227]. Le plateau de l'isotherme correspondrait au moment où la molécule effectuerait cette réorientation. L'isotherme de compression obtenue est conforme à la littérature scientifique [227].

Pour caractériser l'arrangement de la Nys à cette interface, des images de BAM ont été enregistrées durant la compression de la monocouche. Elles sont présentées figure 11.2.

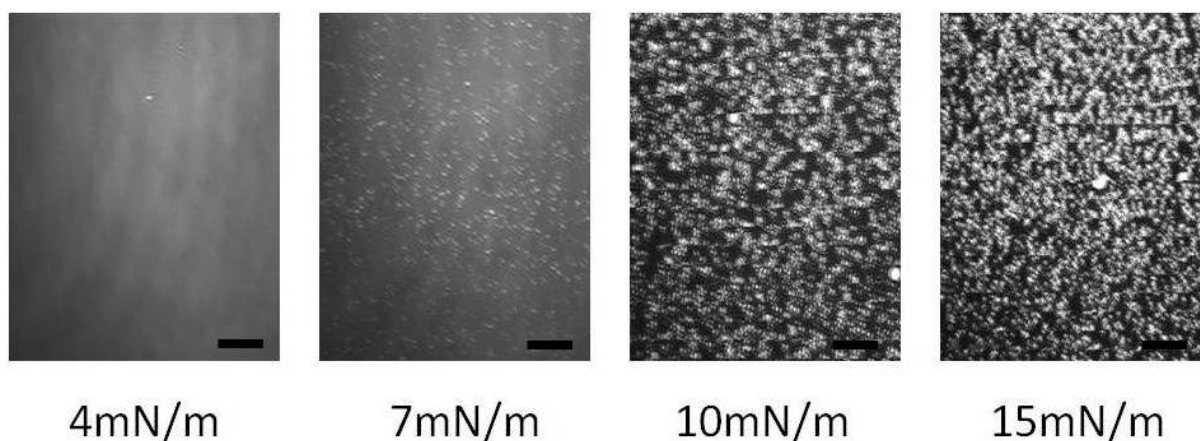


FIGURE 11.2 – Suivi de la compression de la Nys par imagerie BAM. La sous-phase est un tampon Tris à 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Les barres d'échelle représentent 50 μm .

Ces images montrent l'apparition de nombreuses structures compactes à partir de 7 mN/m. Cette pression correspond à la première transition observée sur l'isotherme de compression de la Nys. Ces structures deviennent de plus en plus nombreuses et de plus en plus compactes au fur et à mesure de la compression de la monocouche (10 mN/m et 15 mN/m). Ces domaines pourraient donc être formés de Nys en position verticale, qui serait alors capable de faire du stacking. L'avancée de la compression rapprocherait les molécules de Nys entre elles, ce qui provoquerait l'augmentation de la taille de ces domaines. Ainsi, la Nys formerait de nombreux agrégats à l'interface air/tampon.

Nous avons ensuite déterminé la capacité de la Nys à s'adsorber à l'interface air/tampon. La molécule, solubilisée dans du méthanol, a été injectée en sous-phase à différentes concentrations et à pression de surface nulle, dépourvue de lipide. La figure 11.3 représente la variation de la pression de surface en fonction de la concentration finale de Nys injectée.

3. Angstrom² par molécule

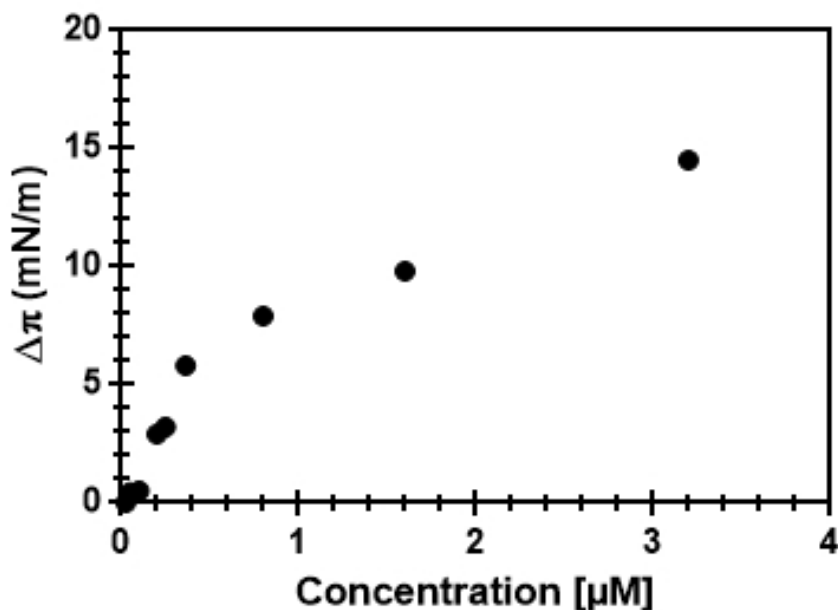


FIGURE 11.3 – **Adsorption de la Nys à l’interface air/tampon.** Le tampon utilisé est un tampon Tris 10 mM à pH 7,4. L’expérience a été réalisée à 21°C. La pression de surface a été mesurée en fonction du temps.

L’injection de la Nys dans la sous-phase provoque son adsorption sur une interface nue, dépourvue de lipide. Cette adsorption est spontanée et est dépendante de la concentration injectée en sous-phase. Cela montre que la Nys est capable de remonter à l’interface air/eau et de former un film moléculaire. Cette propriété permet d’envisager des études d’insertion de la Nys dans des monocouches lipidiques.

Nous obtenons un $\Delta\pi$ de 10 mN/m pour une concentration en Nys de 1,6 μM . Ce $\Delta\pi$ étant suffisamment important pour ne pas être considéré comme une erreur de mesure, nous avons choisi d’injecter la Nys à cette concentration pour les études de ses propriétés membranotropes.

11.1.2 La Nys s’insère préférentiellement dans des monocouches de stérols et de POPE

Nous avons étudié le pouvoir membranotrope de la Nys pour différentes monocouches lipidiques. Ce travail a pour but de caractériser d’éventuels partenaires d’interaction. Ce travail a été réalisé avec du Chol (stérol des membranes des cellules de mammifères) et de l’Ergo (stérol des membranes des cellules fongiques), mais aussi avec divers phospholipides possédant des têtes polaires et des profils en acides gras différents.

11.1.2.1 Étude du pouvoir membranotrope dans des monocouches de phospholipides

Les cinétiques d'insertion de la Nys dans les monocouches de lipides utilisés sont présentées figure 11.4.

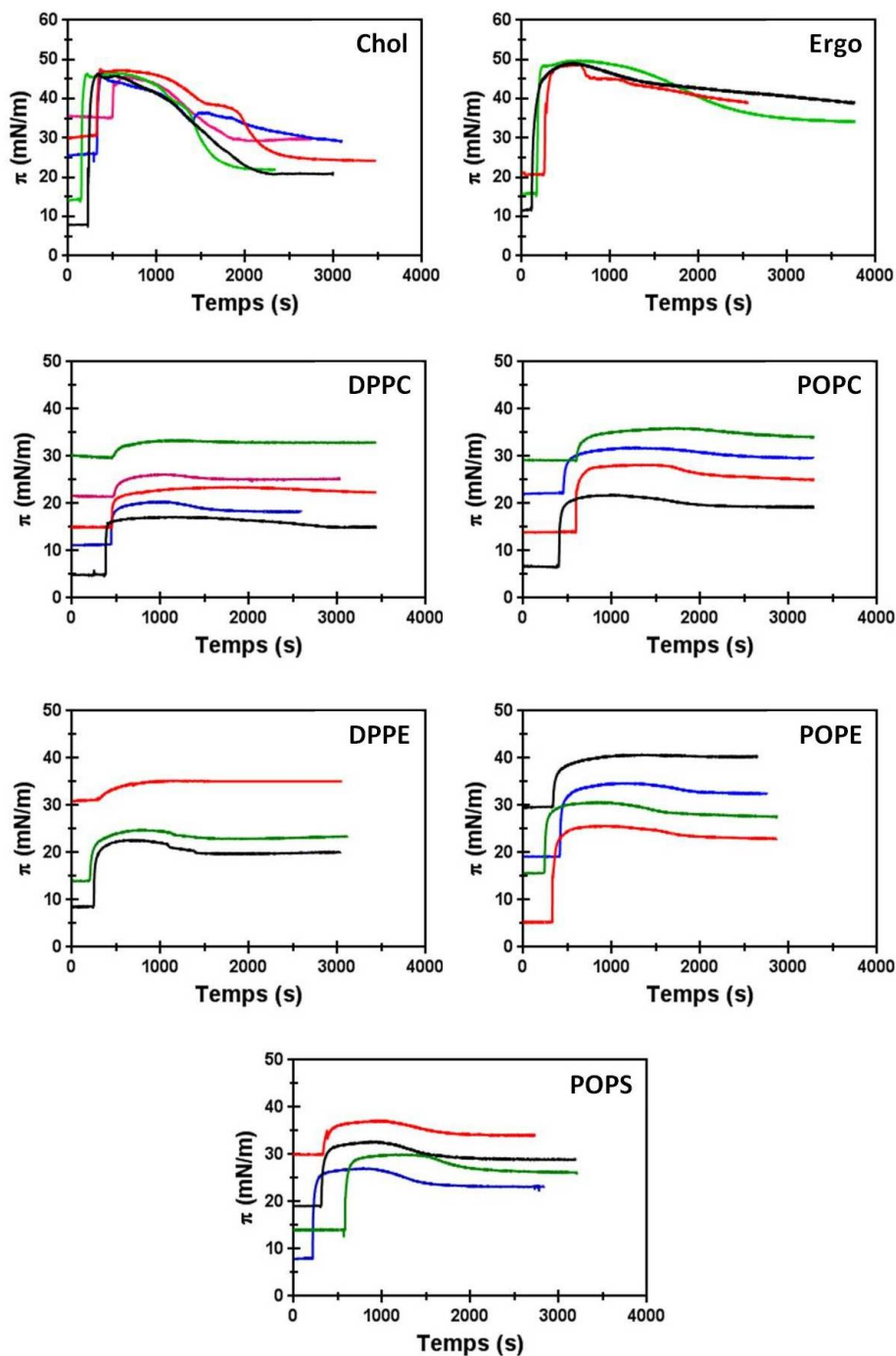


FIGURE 11.4 – Cinétiques d'insertion de la Nys dans des monocouches de différents lipides. Les expériences ont été réalisées en utilisant un tampon Tris 10 mM à pH 7,4 et à 21°C. La concentration finale de Nys injectée dans la sous-phase est de 1,6 μ M. Chaque courbe correspond à une expérience indépendante.

Nous pouvons observer sur ces différentes cinétiques une rapide augmentation de la pres-

sion de surface π suivie d'un plateau pour tous les lipides. Ce plateau est suivi d'une diminution, particulièrement marquée pour les phospholipides contenant une insaturation (POPC, POPE et POPS) et le Chol. Après cette diminution, un deuxième plateau est atteint, après lequel la pression n'évolue plus. L'augmentation de la pression correspond à l'interaction de la Nys avec la monocouche. La diminution, elle, peut correspondre à deux phénomènes différents :

- Soit d'un réarrangement des molécules à l'interface, les molécules passant allant dans une conformation plus favorable thermodynamiquement parlant. Dans ce cas, les molécules possèderaient des interactions favorables, ce qui les rapprocheraient et ferait diminuer l'air moléculaire.
- Soit d'une solubilisation partielle de la monocouche à l'interface. La Nys serait ainsi capable d'entraîner dans la sous-phase une partie des lipides.

Uniquement pour le Chol, cette diminution est telle que la différence de pression entre le plateau final et les pressions initiales autour de 30 mN/m est négative. Le fait que la différence entre les valeurs maximales et les valeurs finales de ces monocouches soit importante plaide plutôt pour une solubilisation des lipides à l'interface. Cependant, des réarrangement au sein de la monocouche de Chol ne sont pas à exclure.

Un tout autre effet est observable pour l'Ergo. Les pressions maximales sont identiques pour toutes les cinétiques. Ainsi, la Nys s'insère dans les monocouches d'Ergo jusqu'à atteindre un maximum autour de 50 N/m, quelle que soit la pression initiale de la monocouche. Cette pression pourrait correspondre à la pression maximale jusque laquelle la Nys pourrait interagir avec ces monocouches. Après cette pression, il se pourrait qu'il existe un équilibre dynamique entre la concentration en Nys en solution et la Nys insérée dans la monocouche d'Ergo.

Nous nous sommes ensuite intéressés à deux paramètres : la Pression d'Insertion Maximale, ou PIM, et le $\Delta\pi_{30}$. La PIM correspond à la capacité d'une molécule à s'insérer dans une membrane donnée. Cependant, cette valeur n'est souvent pas suffisante pour traduire les phénomènes d'interaction observés [47]. Aussi, le $\Delta\pi_{30}$ apporte des informations complémentaires en permettant de quantifier qualitativement ces interactions. Ces valeurs sont obtenues à partir des cinétiques d'insertion en représentant la fonction ayant pour équation :

$$\Delta\pi^{max} = f(\pi^{ini}) \quad (11.1)$$

avec $\Delta\pi^{max}$ le différentiel de pression de surface obtenu après interaction de la molécule avec la monocouche. Les courbes de détermination des PIMs sont présentées figure 11.5. La pente de toutes les représentations graphiques est négative, traduisant d'une insertion de la Nys dans les monocouches de lipides étudiées [47]. Ainsi, la Nys s'insère dans les monocouches des lipides étudiés. Sur les courbes, la valeur des PIMs est symbolisée par une flèche. Pour une meilleure lecture, l'ensemble de ces valeurs sont reprises dans le

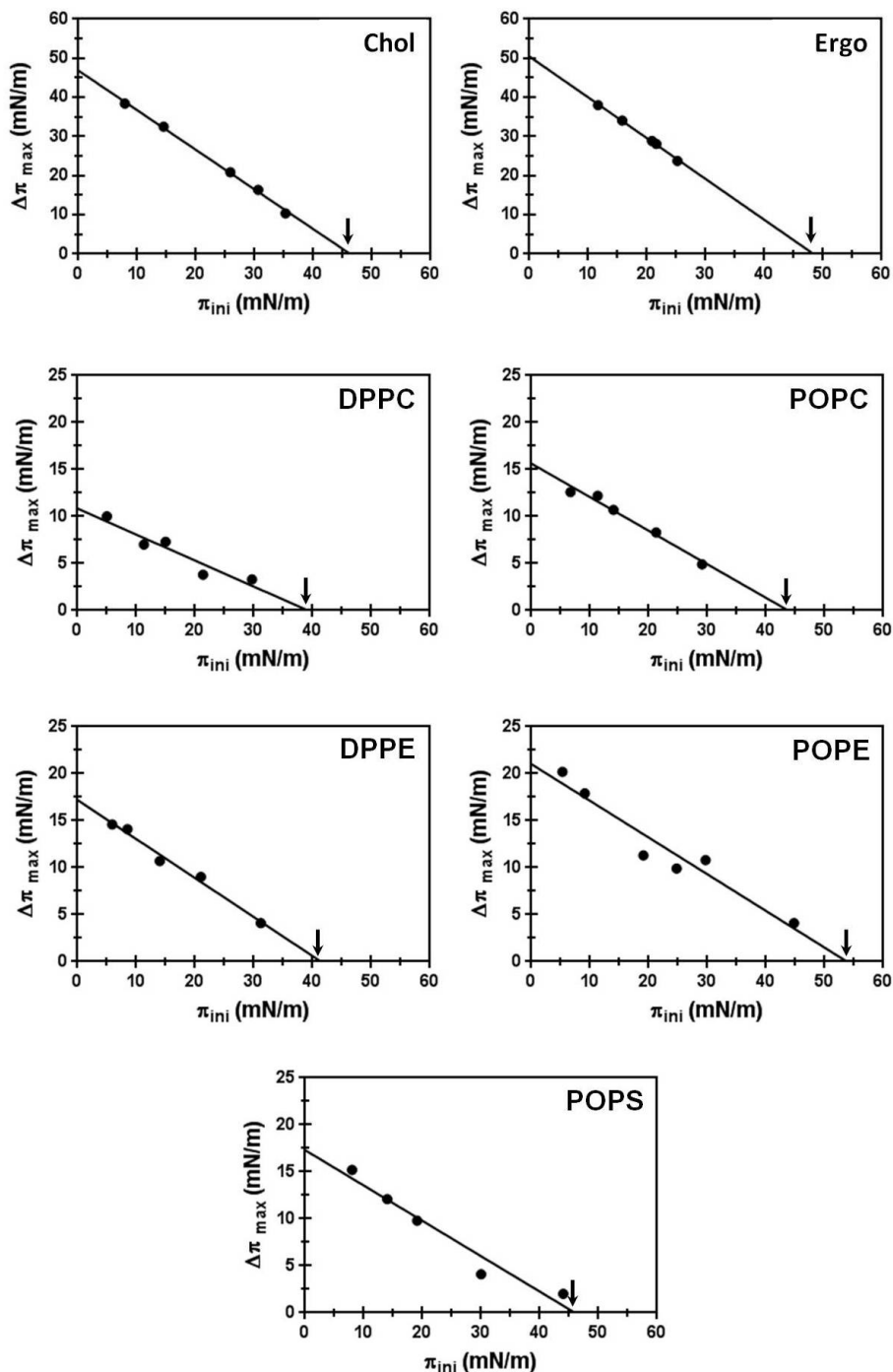


FIGURE 11.5 – Détermination de la PIM de la Nys dans des monocouches de lipides. Les PIMs ont été déterminées à partir des cinétiques d'interaction de la Nys avec les monocouches présentées figure 11.4. Les flèches pointent vers les PIMs.

tableau 11.1.

Toutes les PIMs obtenues sont supérieures à 30 mN/m. La Nys est donc capable de s'insérer dans les membranes constituées de tous les phospholipides étudiés à la pression latérale estimée des membranes naturelles⁴.

4. Pour rappel, selon [47], la pression latérale des membranes biologiques est estimée entre 30 mN/m et 35 mN/m

Lipides	$\Delta\pi_{30}$	PIM
Chol	16,5	$46 \pm 0,7$
Ergo	18,6	$49 \pm 0,6$
DPPC	2,7	$37 \pm 0,9$
POPC	4,9	$43 \pm 0,6$
DPPE	4,7	$41 \pm 0,5$
POPE	10,5	$55 \pm 1,3$
POPS	5,8	$41 \pm 1,3$

TABLE 11.1 – Valeurs de PIM et de $\Delta\pi_{30}$ de la Nys pour les différents lipides testés. Toutes les valeurs sont exprimées en mN/m.

Concernant les phospholipides, les valeurs de PIM les plus fortes sont obtenues avec la PE. De plus, nous pouvons constater que la présence d'une insaturation dans les chaînes aliphatiques⁵ provoque une augmentation de la PIM. Elle passe par exemple de 37 à 43 mN/m pour la PC. Mais la valeur la plus importante est celle de la POPE : elle est de 41 mN/m pour la DPPE et de 55 mN/m pour la POPE. Cette valeur de PIM est la plus élevée de tous les lipides testés (stérois compris) et est équivalente à la pression de collapse de la monocouche de POPE [228]. Le $\Delta\pi_{30}$ de la POPE est supérieur à 10. Il est deux fois plus élevé que celui obtenu pour la POPC, le deuxième $\Delta\pi_{30}$ le plus élevé pour les phospholipides. Ainsi, la quantité de Nys insérée dans les monocouches de POPE serait au moins deux fois supérieure à celle pour tous les autres phospholipides testés. La capacité de la Nys à s'insérer dans les monocouches de POPE est donc plus importante que pour n'importe quel autre phospholipide étudié.

Pour les stérois, des PIMs de 49 mN/m pour l'Ergo et de 46 mN/m pour le Chol ont été obtenues. La Nys est donc capable de s'insérer dans des membranes préformées d'Ergo et de Chol à la pression latérale estimée des membranes biologiques.

Les $\Delta\pi_{30}$ de ces deux lipides sont de 18,6 mN/m pour l'Ergo et 16,5 mN/m pour le Chol. Comparées à celles obtenues pour les phospholipides, ces valeurs sont particulièrement élevées, traduisant une insertion plus massive de la Nys dans les monocouches de stérois que dans les monocouches de phospholipides à cette pression. Ce résultat est probablement une des raisons pour lesquelles les polyènes interagissent plus efficacement avec les membranes enrichies en stérois [158], ces membranes permettant ainsi une insertion plus massive de la Nys que celles n'en contenant pas. Cependant, la différence de $\Delta\pi_{30}$ entre le Chol et l'Ergo est peu significative, inférieure à 2 mN/m. Cette faible différence ne peut expliquer à elle seule l'interaction ciblée de la Nys avec les membranes fongiques.

5. Insaturation dans l'acide oléoyl de la POPC et de la POPE

11.1.2.2 Conclusion des études du pouvoir membranotrope de la Nys dans des monocouches de lipides

Au cours de ces expériences, nous avons montré que la seule interaction de la Nys avec les stérols n'expliquait pas l'affinité particulière de cette molécule pour les membranes fongiques. À la vue de ces résultats, une implication des phospholipides dans le mécanisme d'interaction de la Nys avec les membranes semble être possible. Les forts PIMs et $\Delta\pi_{30}$ obtenus pour la PE font de ce lipide un candidat de choix à une éventuelle implication.

Même si les PIMs obtenues traduisent d'une insertion de la Nys dans les monocouches, il se pourrait que les résultats observés lors de ces expériences soient sensiblement différents de ceux observés dans des systèmes plus complexes. En effet, les modèles utilisés ici font interagir la Nys avec des hémi-membranes constituées que d'un lipide à la fois, dans des systèmes à l'équilibre, donc très éloignés des membranes biologiques. Cependant, ces expériences sont un excellent moyen de déterminer de potentiels partenaires d'interaction. La POPE semble être un de ces nouveaux partenaires. Il est primordial de compléter ces résultats par d'autres études en utilisant d'autres techniques et/ou des systèmes membranaires plus complexes. Il serait par exemple intéressant de déterminer les modifications des propriétés physico-chimiques des lipides étudiés engendrées par la Nys, ou encore l'implication des phospholipides dans l'interaction de la Nys avec les stérols. De plus, il est nécessaire de déterminer la profondeur de l'insertion de la Nys dans les monocouches, principalement pour déterminer si cette molécule interagit avec les têtes polaires ou les chaînes acyles des lipides.

11.1.3 La Nys modifie les propriétés biophysiques des lipides

Les expériences d'insertion de la Nys ont montré que cette molécule est capable d'interagir avec les monocouches formées de tous les lipides testés. Afin de caractériser les modifications que provoque la Nys sur les propriétés biophysiques des lipides et la nature des interactions mises en jeu, nous avons tracé les isothermes de compression de certains lipides mélangés à différentes concentrations en Nys, de 2,5 à 10%.

Cinq lipides ont été étudiés : la DPPC, lipide témoin, récemment montré comme ayant un rôle potentiel dans le mécanisme d'action de la Nys [45], la DPPE et la POPE, phospholipides montrés comme potentiellement intéressants lors des études des propriétés membranotropes de la Nys, ainsi que le Chol et l'Ergo. Par ailleurs, nous avons tracé les modules d'élasticité K_s ⁶ afin de déterminer l'état de phase des différents mélanges Nys/lipides. Des images de BAM ont été enregistrées durant la compression des monocouches pour visualiser ces phases lipidiques. Enfin, pour caractériser les interactions lipide/Nys plus fi-

6. Pour plus de détails, voir section 3.1.3.1 page 37.

nement, des images AFM⁷ de monocouches transférées sur support solide ont été réalisées. Ces images ont été réalisées avec le Chol, l'Ergo, la DPPC et la POPE.

11.1.3.1 Interactions avec les monocouches de DPPC

La DPPC est un lipide intéressant dans l'étude des interactions avec des molécules d'intérêt pharmacologique car il présente une transition de phase LE/LC marquée. Il est donc possible d'étudier l'impact de molécules d'intérêt sur ses différentes phases lipidiques, et sur cette transition. De plus, ce lipide a été proposé comme étant un partenaire d'interaction potentiel de la Nys en raison d'un ΔG_{ex} plus négatifs que pour les stérols, signe d'interactions très favorables entre les deux molécules [45]. Nous avons étudié les interactions entre la DPPC et la Nys en traçant les isothermes et les courbes de Ks du lipide pur et de différents mélanges. Ces courbes sont présentées figure 11.6.

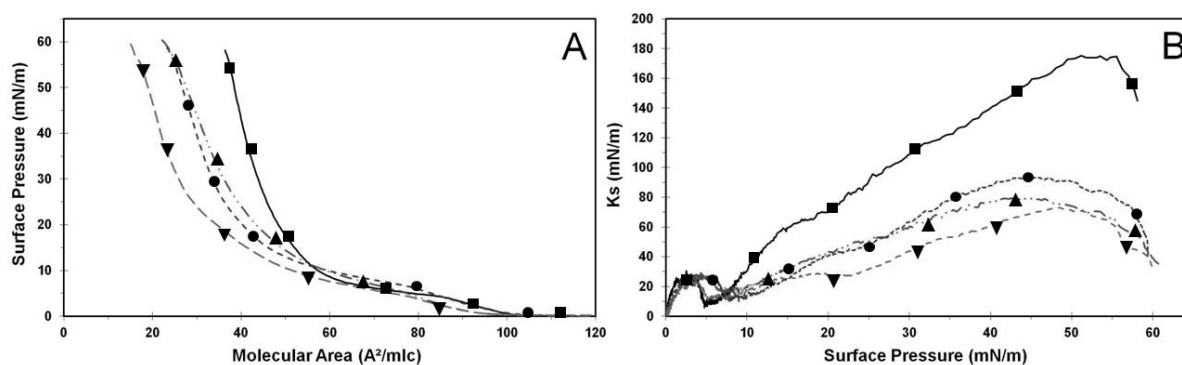


FIGURE 11.6 – **Isothermes de compression et modules d'élasticité de monocouches de DPPC/Nys** A : Isothermes de compression des monocouches de DPPC contenant 0% (carrés); 2.5% (cercles); 5% (triangles) et 10% (triangles inversés) Nys. B : Module d'élasticité des monocouches. La sous phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Chaque courbe est représentative de trois expériences indépendantes.

L'isotherme de la DPPC pure obtenue montre une transition de phase, identifiée sur la courbe de Ks comme une transition LE/LC, commençant à 4 mN/m et se terminant à 7 mN/m. Après cette transition, la monocouche passe en phase LC. L'aire moléculaire obtenue est de $55 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$. La pression de collapse de la monocouche se situe autour de 60 mN/m. Les profils de l'isotherme et de la courbe de Ks sont conformes à la littérature scientifique [229].

L'ajout de Nys provoque une disparition progressive de la transition LE/LC : plus la concentration en Nys est importante et moins cette transition est marquée. Nous observons par ailleurs une diminution de l'aire moléculaire des lipides : elle est de $52 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$ pour le mélange DPPC/Nys 2,5% (mol/mol), $46 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$ pour le mélange DPPC/Nys 5% (mol/mol) et $37 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$ pour le mélange DPPC/Nys 10% (mol/mol). Elle provoque aussi une forte diminution du Ks, d'une manière dépendante de la concentration. Autour de 20 mN/m, soit la pression de collapse de la Nys pure, à des pourcentages de 5% et 10%

7. Le principe de l'AFM a été discuté section 10.2 page 89

Nys, nous observons une légère évolution négative des K_s . Cela peut être le signe d'une expulsion partielle ou du collapse de la Nys.

Pour visualiser les différentes phases lipidiques de ces isothermes, nous avons enregistré des images de BAM à différentes pressions de surface au cours de la compression des monocouches. Elles sont montrées figure 11.7.

Pour la DPPC pure, les premières structures sont observables à partir de 4-5 mN/m, pression à laquelle commence la transition de phase LE/LC. Ces structures, apparaissant en niveaux de gris sur les images, sont des domaines lipidiques plus compacts que le reste de la monocouche : ils correspondent à des domaines LC. Ils sont petits et circulaires. Ils deviennent trilobés à 7 mN/m, lorsque la transition LE/LC est terminée. Ces domaines coalescent à partir de 14 mN/m pour devenir une monocouche compacte en phase LC à 20 mN/m.

L'ajout de Nys provoque un retard de l'apparition des domaines LC obtenus normalement à 5 mN/m. Par ailleurs, ces domaines deviennent circulaires, cela pour toutes les concentrations étudiées. Contrairement au lipide pur, les domaines des mélanges ne commencent pas leur coalescence à 14 mN/m. Ce retard de fusion est associé à une diminution de la taille des domaines LC. La Nys favoriserait donc la présence de domaines de plus faible compaction. La diminution du K_s des monocouches de DPPC induit par l'ajout de Nys observée précédemment va aussi dans ce sens.

À 20 mN/m, la fusion des domaines en phase LC reste incomplète pour tous les mélanges DPPC/Nys. Cependant, des structures plus compactes (plus blanches que le reste de la monocouche) apparaissent. Le nombre de ces structures augmente en fonction de la concentration en Nys. Ces domaines peuvent correspondre, comme proposé précédemment, à de la Nys partiellement expulsée ou collapsé, avec ou sans molécules de DPPC. À 35 mN/m, les domaines LC de tous les mélanges ont complètement fusionné mais les structures compactes observées à 20 mN/m persistent.

La Nys favoriserait donc la formation de domaines de faible compaction aux faibles pressions. Lorsque la pression augmente, elle serait partiellement expulsée de la monocouche.

Afin de visualiser plus finement les structures générées par la Nys, des images AFM de monocouches de DPPC ont été enregistrées. Elles sont présentées figure 11.8.

Pour la DPPC pure, à 18 mN/m, la monocouche présente une ségrégation de phase LC/LE montrée par une différence de hauteur entre les phases lipidiques de $1,1 \pm 0,1$ nm (figure 11.8- 18 mN/m). Cette différence de hauteur est en conformité avec la littérature scientifique [87]. Le recouvrement de la phase LC est de 77%. L'ajout de Nys diminue l'état de compaction de la monocouche, avec un recouvrement de la phase LC passant à 55% (figure 11.8-18 mN/m ; 5% Nys). Ce résultat confirme la capacité de la Nys à favoriser les domaines de faible compaction.

Lorsque le transfert se fait à 35 mN/m, le recouvrement de la phase LC diminue de manière moins importante, avec un recouvrement de 94% avec Nys contre 97% sans. Des

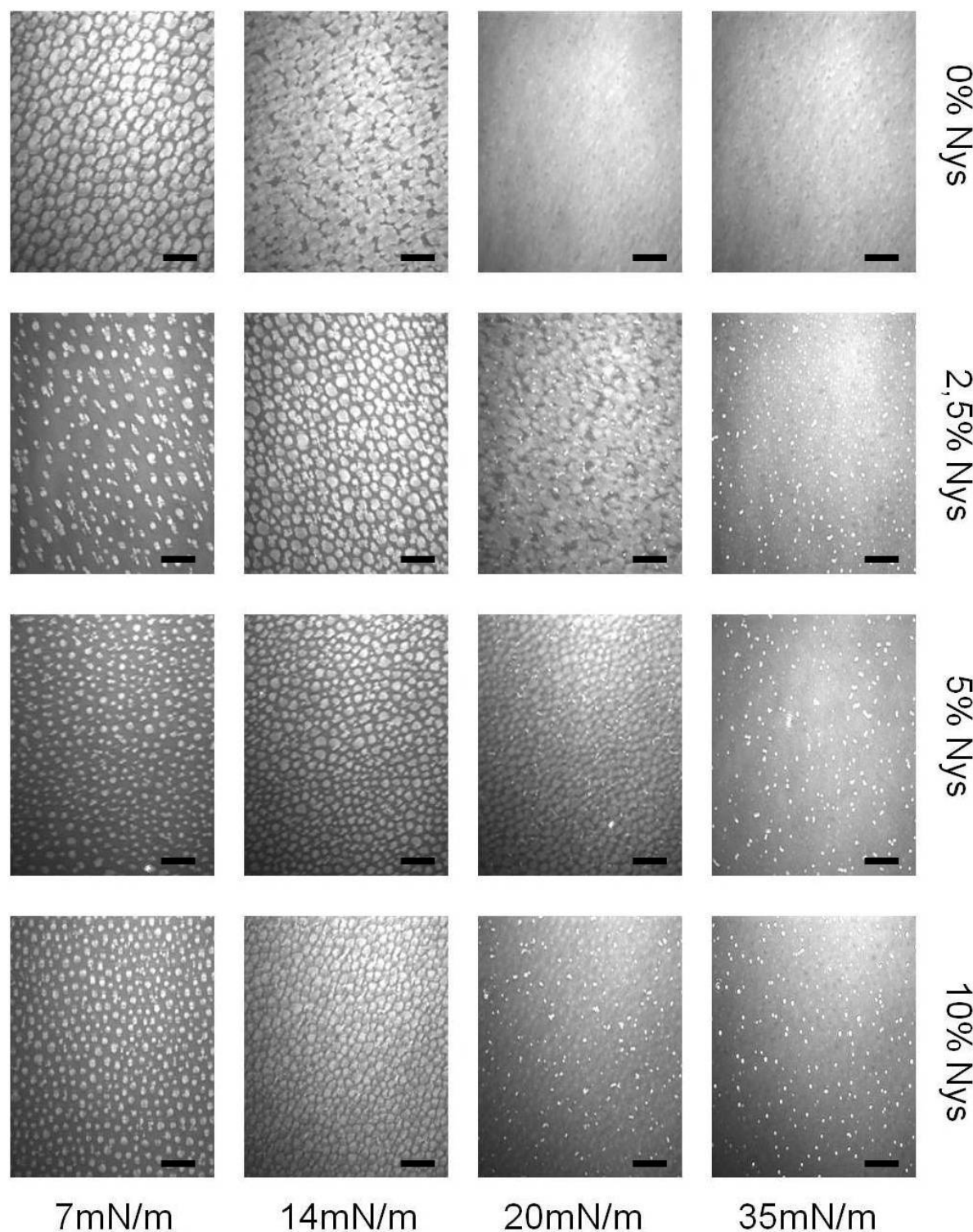


FIGURE 11.7 – Images de BAM des monocouches de DPPC/Nys à différentes pressions de surface. La sous phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Les barres d'échelle représentent 50 μm .

structures tridimensionnelles de tailles variables apparaissent, présentes uniquement dans la phase LE de la monocouche. Ainsi, les structures compactes apparaissant en BAM à partir de 20 mN/m sont identifiées ici comme étant des agrégats. Comme dit précédemment, ces agrégats sont probablement de la Nys expulsée de la monocouche. Cependant,

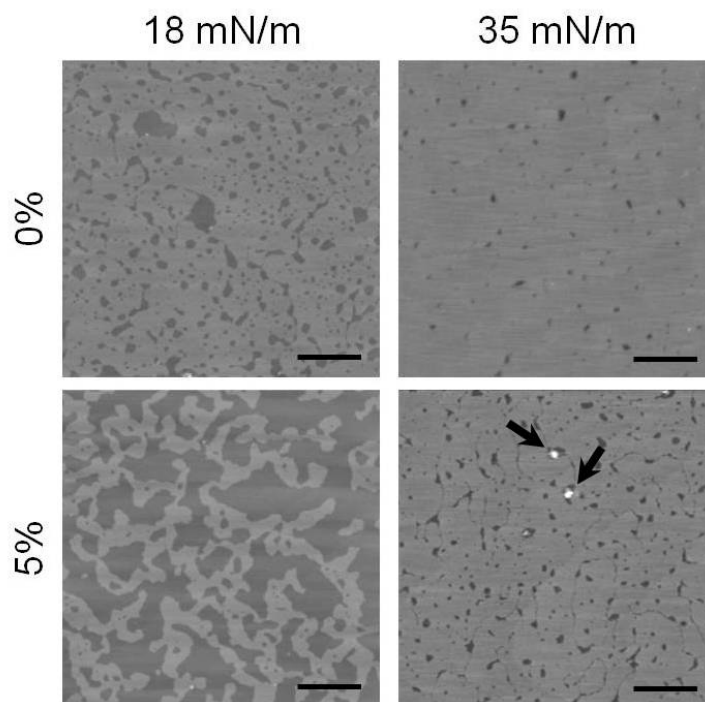


FIGURE 11.8 – Images AFM de hauteur de monocouches de DPPC contenant 0% et 5% Nys à 18 mN/m et 35 mN/m. L'échelle en z est de 10 nm. Chaque barre d'échelle représente 1 μm . Les flèches pointent vers des structures tridimensionnelles.

aucune indication ne permet de vérifier que ces agrégats contiennent ou non de la DPPC.

Les expériences menées avec la DPPC ont montré que la Nys provoque une diminution du K_s de la monocouche, associée à une modification du recouvrement LE/LC en faveur de la LE. À des pressions supérieures à la pression de collapse de la monocouche de Nys (20 mN/m), elle serait au moins partiellement expulsée de la monocouche et formerait des agrégats. Le fait que la Nys favorise la présence de domaines de faible compaction et formerait des structures compactes à partir de ces domaines tendrait à montrer qu'elle s'y localise préférentiellement.

11.1.3.2 Interactions avec les monocouches de PE

La PE est un phospholipide similaire à la PC, si ce n'est que sa tête polaire est plus petite : les trois groupements méthyles de la phosphocholine sont absents de la phosphoéthanolamine. Comme montré précédemment, la PE est le phospholipide le plus favorable à l'insertion de la Nys dans des monocouches. Nous avons donc étudié la manière dont ces deux molécules interagissent en utilisant les mêmes techniques que pour la DPPC. Nous avons étudié les modifications des propriétés physico-chimiques induite par la Nys sur la DPPE et la POPE. Les isothermes et les courbes de K_s sont présentées figure 11.9.

L'isotherme de la monocouche de DPPE montre une augmentation continue de la pression de surface. Le K_s de la DPPE seule augmente jusqu'à un 1er maximum obtenu autour

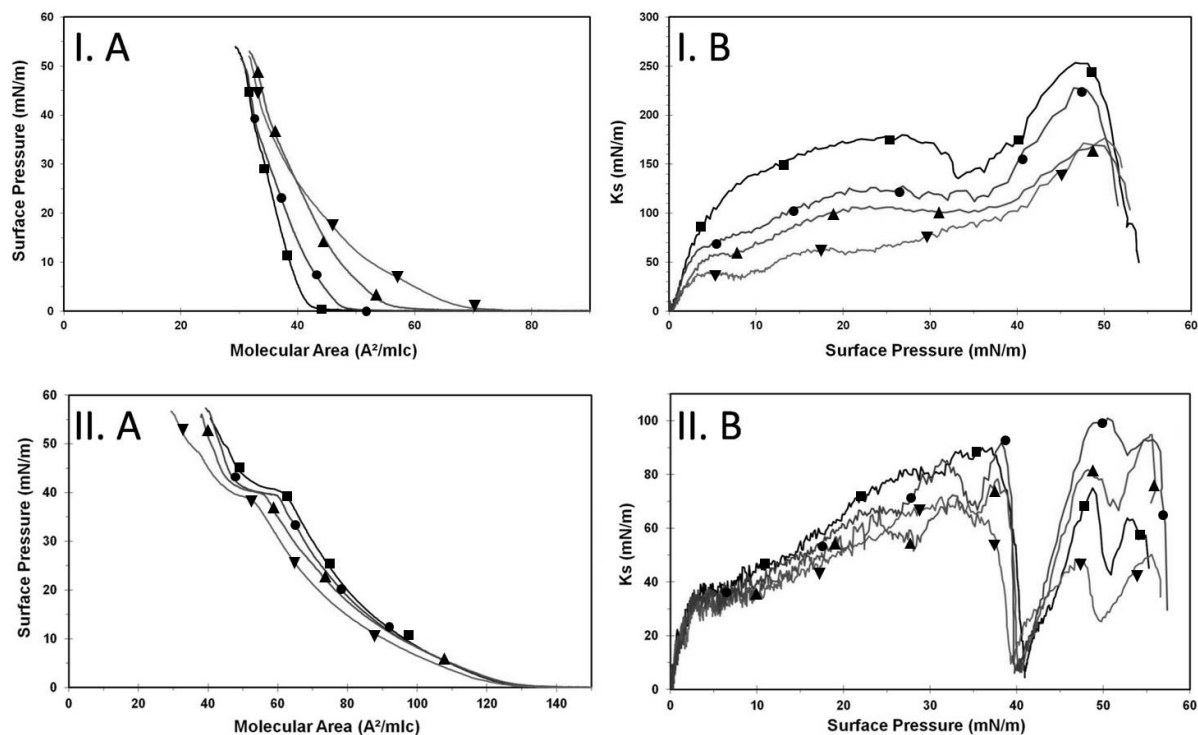


FIGURE 11.9 – Isothermes de compression et modules d'élasticité de mélanges DPPE/Nys et POPE/Nys. I : DPPE/Nys; II : POPE/Nys. A : Isothermes de compression des monocouches de PE contenant 0% (carrés); 2.5% (cercles); 5% (triangles) et 10% (triangles inversés) Nys. B : Module d'élasticité des monocouches. La sous phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Chaque courbe est représentative de trois expériences indépendantes.

de 30 mN/m. Avec un K_s supérieur à 100 mN/m, la monocouche est alors en phase LC. Puis, après atteinte d'un minimum autour de 38 mN/m, il ré-augmente jusqu'à atteinte de la pression de collapse à 49 mN/m et un K_s légèrement supérieur à 250 mN/m : la monocouche passe en phase solide juste avant son collapse. L'aire moléculaire obtenue pour ce lipide est de $38 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$. L'isotherme est conforme à la littérature scientifique [230].

L'ajout de Nys modifie l'aire moléculaire de la DPPE : pour les mélanges DPPE/Nys 5% et DPPE/Nys 10%, l'aire moléculaire se situe autour de $45 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$. Elle provoque aussi une diminution globale du K_s , comme observée avec la DPPC. Par ailleurs, la transition observée entre 30 et 38 mN/m est de moins en moins marquée lorsque la concentration en Nys augmente. La Nys provoque une légère augmentation de la pression de collapse en fonction de la concentration. Elle passe de 48 mN/m pour le lipide seul à 52 mN/m pour le mélange DPPE/Nys 10% (mol/mol). Sur la courbe du K_s du mélange DPPE/Nys 10%, à une pression de 23 mN/m, nous pouvons observer une légèrement chute du K_s , provoquée probablement par une expulsion partielle ou par le collapse de la Nys.

Pour la POPE, l'isotherme du lipide pur montre deux transitions de phase : une première à partir de 36 mN/m et se finissant autour de 40 mN/m, une deuxième à 47

mN/m, juste avant le collapse de la monocouche à 51 mN/m. L'allure du Ks de la POPE et les phases lipidiques associées sont toujours en discussion [228]. Cependant, Domenech et ses collaborateurs ont défini que la POPE était en phase LE/LC de 26 à 45 mN/m, malgré un Ks maximal inférieur à 100 mN/m. Puis, autour de 47 mN/m, il existerait une deuxième transition de phase LC/LC', juste avant le collapse de la monocouche à 53 mN/m. L'aire moléculaire obtenue est de $100 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$. L'isotherme du lipide pur et la courbe de Ks sont conformes à la littérature scientifique [228].

Les isothermes des mélanges POPE/Nys montrent une légère diminution de l'aire moléculaire, passant à $93 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$ pour le mélange POPE/Nys 2,5%, $92 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$ pour le mélange POPE/Nys 5% et $89 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$ pour le mélange POPE/Nys 10%. Entre 0 et 45 mN/m, la Nys ne modifie que très peu le Ks de la POPE. La pression à laquelle apparaissent les deux transitions de phases n'évolue pas non plus. Le Ks de la première transition de phase est identique pour toutes les monocouches. Pour la deuxième transition de phase, située autour de 45 mN/m, nous observons quelques variations : le Ks du lipide pur est de 70 mN/m, tandis qu'il passe à 96 mN/m pour le mélange POPE/Nys 2,5%. Cette valeur diminue ensuite, passant de 74 mN/m pour le mélange POPE/Nys 5% à 43 mN/m pour le mélange POPE/Nys 10%. Les pressions de collapse évoluent légèrement à la hausse, avec des pressions de collapses pour le lipide pur de 53 mN/m et pour les mélanges légèrement supérieures à 55 mN/m. Pour les concentrations étudiées, aucun nouveau plateau ou chute de Ks est à reporter, signe que la Nys n'est jamais expulsée de la monocouche. D'une manière générale, la Nys modifie donc que très peu les isothermes et les Ks des monocouches de POPE.

L'interaction de la Nys avec la PE montre ici deux comportements différents. Pour la DPPE, lipide ne possédant pas d'insaturation, la Nys provoque, comme pour la DPPC, une forte diminution du Ks associée à une progressive disparition de la transition de phase. Elle aurait donc tendance à fluidifier les membranes. Pour la POPE, aucune forte modification de ses propriétés physico-chimiques n'a été observée. Ce lipide forme des monocouches moins compactes que la DPPE, ce qui pourrait favoriser l'insertion de la Nys.

Afin de visualiser les différentes transitions de phase des monocouches, des images de BAM, montrées figure 11.10 et 11.11, ont été enregistrées.

Pour la DPPE, nous pouvons observer que dès les faibles pressions (0,4 mN/m), la monocouche de lipide pur ne présente qu'un seul niveau de gris. Il en est de même pour toutes les autres pressions montrées (6 mN/m, 20 mN/m et 35 mN/m). La monocouche est alors en phase LC.

L'ajout de Nys provoque l'apparition d'un deuxième niveau de gris (0,4 et 6 mN/m) correspondant à des domaines moins compactes : la surface occupée par les domaines LC diminue en fonction de la concentration en Nys. Tout comme pour la DPPC, la Nys fa-

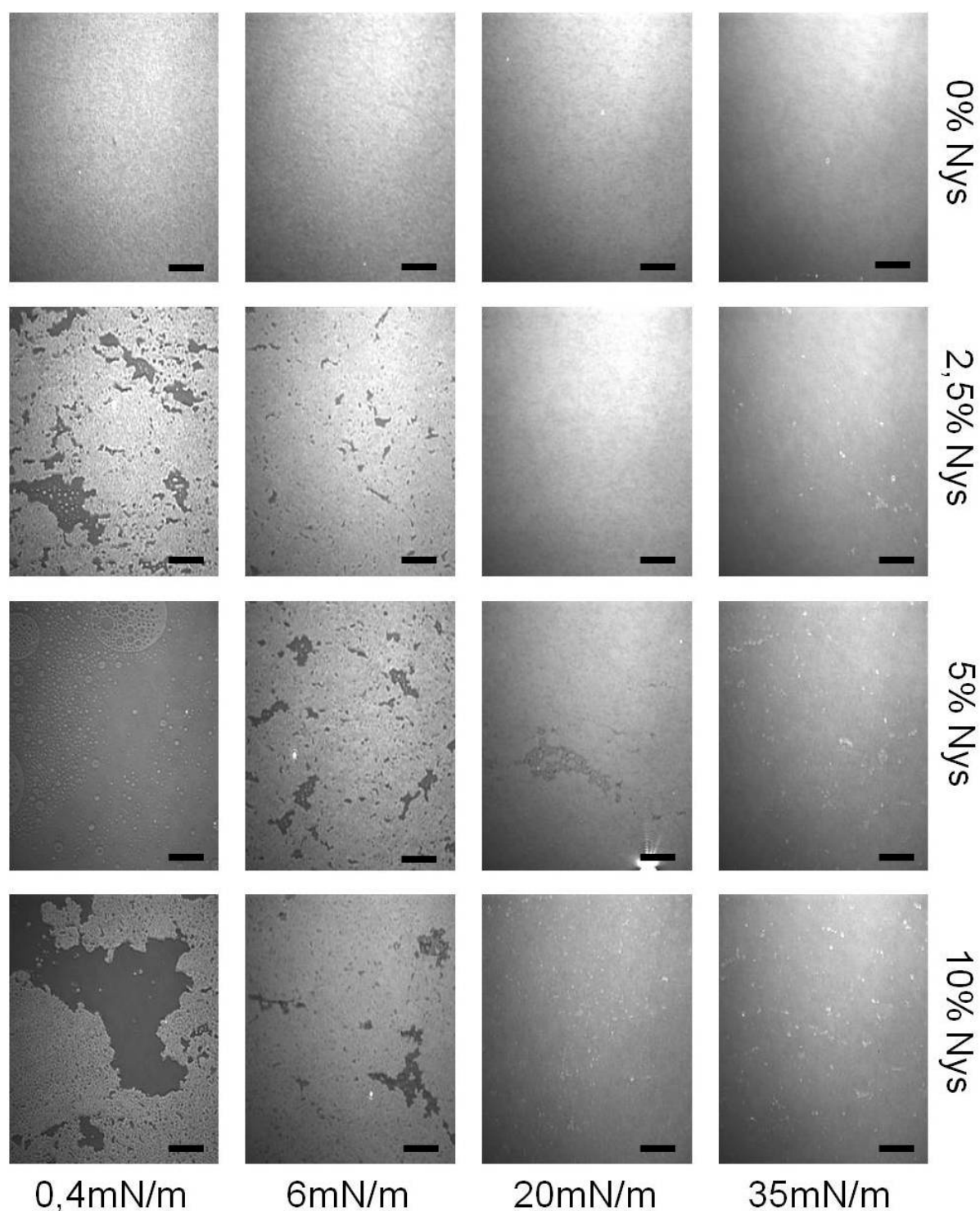


FIGURE 11.10 – Images de BAM des monocouches de DPPE à différentes pressions. La sous phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Les barres d'échelle représentent 50 μm .

voriserait donc la formation de domaines de faible compaction. À 20 mN/m, des défauts sont observables dans les monocouches pour les concentrations en Nys de 5 et 10%. Par ailleurs, des structures compactes apparaissent sur les images du mélange DPPE/Nys 10%. Ces structures rappellent celles observées avec la DPPC. Combinées à la chute du K_s de ce mélange à cette pression, il se pourrait que ces structures soient des agrégats

de Nys collapsée ou partiellement expulsée. À 35 mN/m, la présence de ces agrégats est observable sur toutes les images des mélanges.

Pour la monocouche de POPE pur, aucune forme particulière n'est visible avant 27 mN/m (figure 11.11), pression à laquelle la transition LC/LE commencerait [228].

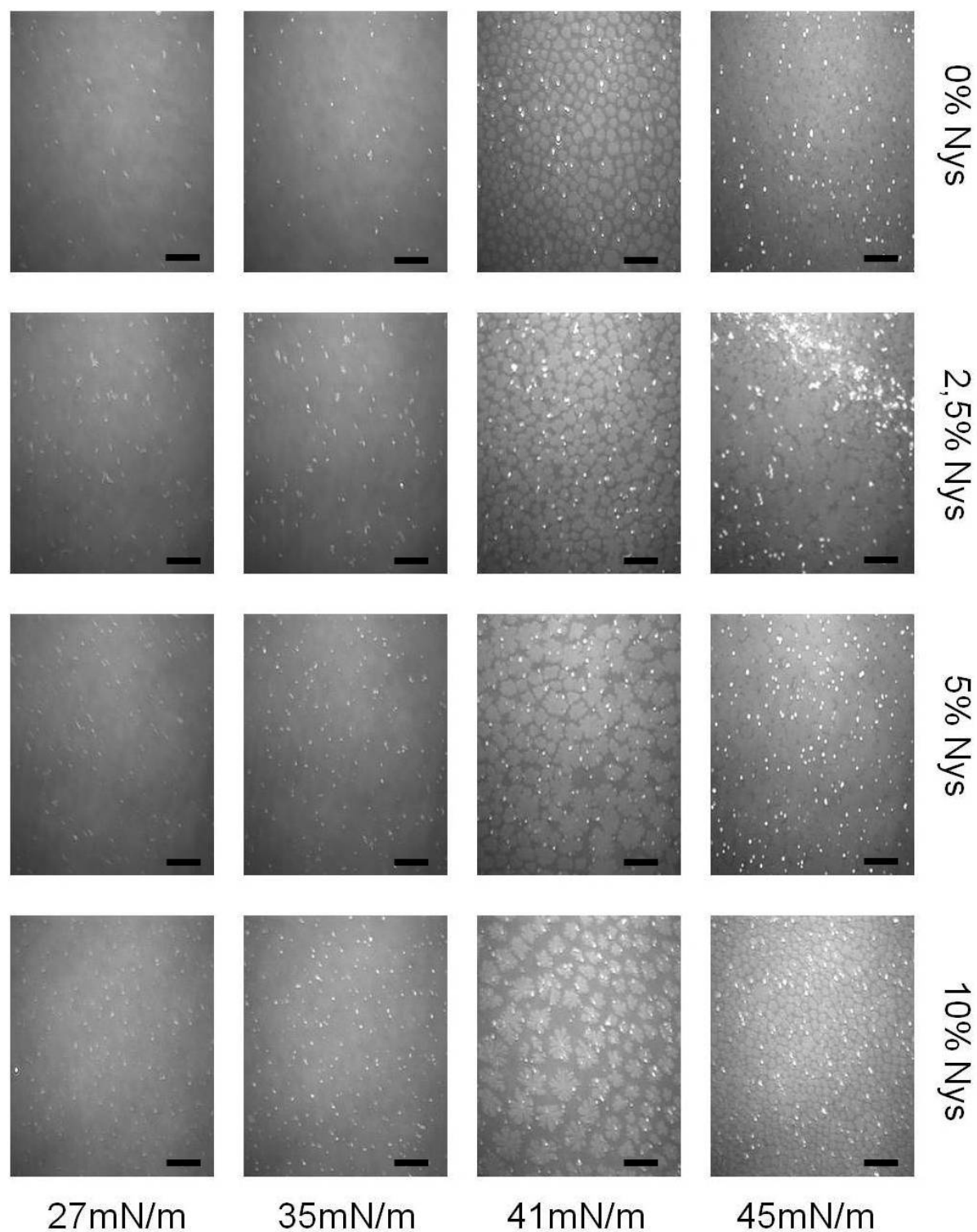


FIGURE 11.11 – Images de BAM des monocouches de POPE à différentes pressions. La sous-phase est constituée de tampon Tris 10 mM. L'expérience est réalisée à 21°C. Les barres d'échelle représentent 50 μm

Des domaines, probablement en phase LC, vont augmenter en taille avec la pression (35 mN/m). Le recouvrement de la phase LC va augmenter au fur et à mesure de l'avancée de la compression (41 mN/m) jusqu'à fusion des domaines LC (45 mN/m). Les images sont en adéquation avec ce qui a été observé précédemment [228].

L'ajout de Nys ne provoque aucun changement d'aspect visible par BAM de la monocouche jusqu'à 40 mN/m. À 41 mN/m, la forme des domaines LC est modifiée : ils passent d'une forme circulaire (0% Nys) à une forme en fleur (10% Nys). Ces formes sont le signe d'une répulsion des molécules de Nys et de POPE et donc d'une augmentation de la ligne de tension à l'interface air-eau [231, 232]. Une diminution du recouvrement de la phase LC est aussi observée ; cette diminution est dépendante de la concentration en Nys. Elle provoque un retard de fusion des domaines LC à 45 mN/m. La Nys favorise donc la formation de domaines de faible compaction. Ce résultat suggère, comme pour la DPPC et la DPPE, une localisation préférentielle de la Nys dans les domaines en phase LE.

Afin de caractériser plus finement les interactions POPE/Nys, des images AFM de transferts de monocouches ont été effectuées. Elles sont présentées figure 11.12.

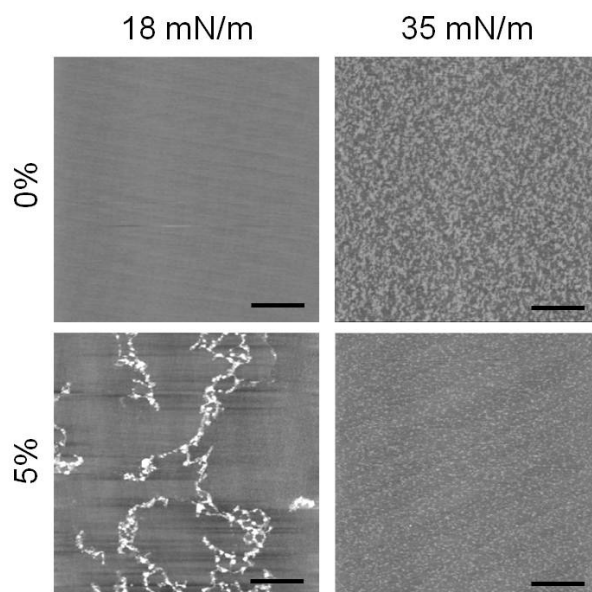


FIGURE 11.12 – Image AFM de hauteur de monocouches de POPE avec 0% et 5% Nys à 18 mN/m et 35 mN/m. L'échelle en z est de 10 nm. Chaque barre d'échelle représente 1 μ m.

Pour la POPE, à 18 mN/m, rien n'est visible pour le lipide seul. Nous observons en revanche l'apparition de petites structures de hauteurs variables, très dispersées (figure 11.12 - 18 mN/M - 5%). Il est toutefois difficile de conclure quoi que ce soit à partir de ces images car, du fait que la faible compaction de la monocouche, il est possible que le transfert ait altéré son intégrité. Les images du transfert à 35 mN/m ne montrent aucune structure particulière. En revanche, nous observons une ségrégation de phase sur le lipide pur, qui s'apparente à une ségrégation de phase LE/LC puisque la différence de hauteur

est de $1,1 \pm 0,1$ nm (figure 11.12 - 35 mN/m). L'ajout de Nys diminue le recouvrement de la phase LC : il passe de 31% pour le lipide pur à 15% pour le mélange Nys/POPE. La Nys favoriserait donc l'apparition de domaines de faible compaction et s'y insérerait. En revanche, contrairement à la DPPC, aucune structure particulière n'a été formellement identifiée. Ainsi, dans les monocouches de POPE, à pression physiologique, la Nys ne formerait jamais d'agrégats et resterait dans des domaines de faible compaction.

Tout comme pour la DPPC, la Nys provoque la formation de domaines de faible compaction, tant pour les monocouches de DPPE que de POPE. Cependant, la Nys modifie plus fortement les propriétés physico-chimiques de la DPPE. De plus, dans les monocouches de DPPE, comme observée sur les images de BAM, autour de la pression de collapse de la Nys, des structures compactes apparaissent. Ces structures sont très probablement enrichies en Nys. En revanche, le nombre de ces structures est quantitativement plus faible pour la DPPE que pour la DPPC. Ces structures sont absentes des monocouches de POPE, comme montré tant sur les images de BAM que celles d'AFM. Le fait que la POPE soit dans un état de compaction faible, même à des pressions latérales importantes (K_s inférieur à 100mN/m), peut expliquer ce phénomène.

Contrairement à la DPPC, la DPPE et aux stérols, le ΔG_{ex} de l'interaction entre la POPE et la Nys n'a jamais été étudié dans la littérature scientifique. Pour déterminer si l'interaction POPE/Nys est favorable d'un point de vue thermodynamique, nous avons étudié les isothermes de compression de la POPE mélangée à des concentrations croissantes en Nys afin de déterminer ce ΔG_{ex} à différentes pressions de surface. Ce calcul a été réalisé à partir de la formule 3.11 page 40. Les isothermes et les courbes de ΔG_{ex} sont présentées figure 11.13.

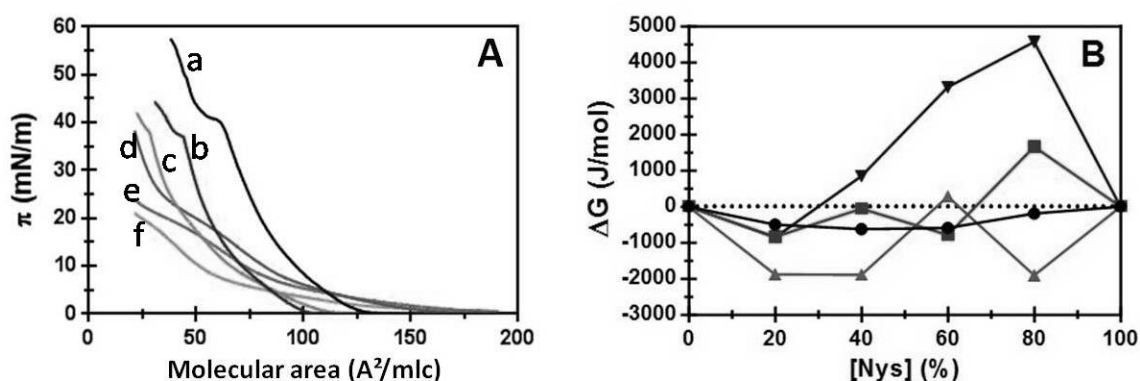


FIGURE 11.13 – Détermination du ΔG_{ex} de l'interaction POPE/Nys. A : Isothermes de compression. a : 0% Nys ; b : 20% Nys ; c : 40% ; d : 60% Nys ; e : 80% Nys ; f : 100% Nys. B : ΔG de l'interaction POPE/Nys. Cercles : 2,5 mN/m ; Carrés : 5 mN/m ; Triangles : 10 mN/m ; Triangles inversés : 20 mN/m. Les mélanges ont été déposés sur un tampon Tris 10 mM. Les isothermes de compression ont été réalisés à 21°C, pH 7,4. Chaque courbe est représentative de 3 expériences indépendantes.

Les isothermes montrent pour le mélange POPE/Nys 20% un décalage vers la gauche,

signe d'une diminution de l'aire moléculaire. La transition de phase à 41 mN/m est conservée, tout comme celle à 47 mN/mn, mais cette dernière est moins marquée. Pour le mélange POPE/Nys 40%, le décalage de l'isotherme vers la gauche est accentué. La transition LC/LC' disparaît. L'isotherme de compression du mélange POPE/Nys 60% montre l'apparition d'une deuxième pente dans la zone comprise entre 7 et 25 mN/m. Après 25 mN/m, la pression augmente de manière plus importante. La pression de collapse de la monocouche devient inférieure à 40 mN/m. Enfin, pour l'isotherme du mélange POPE/Nys 80%, nous observons une diminution importante de la pression de collapse, autour de 25 mN/m, se rapprochant fortement de la pression de collapse de la Nys seule (21mN/m). L'allure de cette isotherme est proche de celle de la Nys pure.

Ces isothermes nous ont permis de mesurer les ΔG_{ex} de l'interaction Nys/POPE. Nous avons fait ces calculs à 2,5 mN/m, 5 mN/m, 10 mN/m et 20 mN/m. Les pressions de collapse de 21 mN/m de la monocouche de Nys et de 25 mN/m du mélange POPE/Nys 80% ne nous permettent pas de faire ces calculs à tous les ratios POPE/Nys pour des pressions de surface plus importantes.

Nous observons, pour une pression de 2,5 mN/m, un ΔG_{ex} faiblement favorable, avec une valeur minimale de -500 J/mol pour le mélange POPC/Nys 40%. La courbe à 5 mN/m montre un comportement similaire, avec un minimum autour de -800 J/mol. La courbe à 10 mN/m montre les ΔG_{ex} les plus favorables, avec une valeur minimale à -2000 J/mol, ce qui dénote une interaction significativement favorable entre la Nys et la POPE. L'augmentation de la pression de surface va modifier ce comportement, puisque le ΔG_{ex} de l'interaction devient très significativement positif à 20 mN/m, avec notamment un ΔG supérieur à 3000 J/mol pour le mélange POPE/Nys 60%. Le ΔG_{ex} devient même supérieur à 4000 J/mol pour le mélange POPE/Nys 80%. Ces valeurs sont le signe d'une répulsion entre les deux molécules pour des pressions de surface plus élevées et de fortes concentrations en Nys. Aux faibles pressions, pour les concentrations en Nys inférieures à 40%, l'interaction est cependant toujours thermodynamiquement favorable. Comme suspecté sur les images de BAM, l'augmentation de la compression et de la concentration en Nys amène à des ΔG_{ex} positif, donc d'une interaction défavorable d'un point de vue thermodynamique. Cette interaction provoquerait ainsi une augmentation de la ligne de tension, elle-même responsable de la déformation des domaines de POPE observée.

La Nys est une molécule administrée principalement administrée sous forme de crème pour un usage topique [233]. Aussi, localement, la concentration en Nys peut être très élevée. Il est donc raisonnable de penser que la Nys peut être présente localement à des concentrations jusqu'à 10 à 20% (20 Nys pour 100 lipides). Á ces concentrations et aux faible pressions, ils existent de forts phénomènes d'attraction entre la Nys et la POPE. Aussi, *in vivo*, il pourrait exister de fortes interactions entre ces deux molécules, faisant de la POPE un partenaire d'interaction potentiel.

11.1.3.3 Interaction avec des monocouches de stérols

Après l'étude sur les propriétés des monocouches de phospholipides en interaction avec la Nys, nous nous sommes intéressés aux interactions stérols/Nys. Cette interaction est reportée comme étant primordiale dans l'interaction de la Nys avec les membranes [136, 165]. Cependant, nous avons montré que la Nys s'insère en grande quantité, tant dans les monocouches d'Ergo que de Chol. Aussi, pour mieux étudier ce phénomène, nous nous sommes intéressés aux modifications des propriétés biophysiques de ces monocouches provoquées par la Nys. Nous avons tracé les isothermes et calculé les Ks de mélanges Chol/Nys et Ergo/Nys. Ces courbes sont présentées figure 11.14.

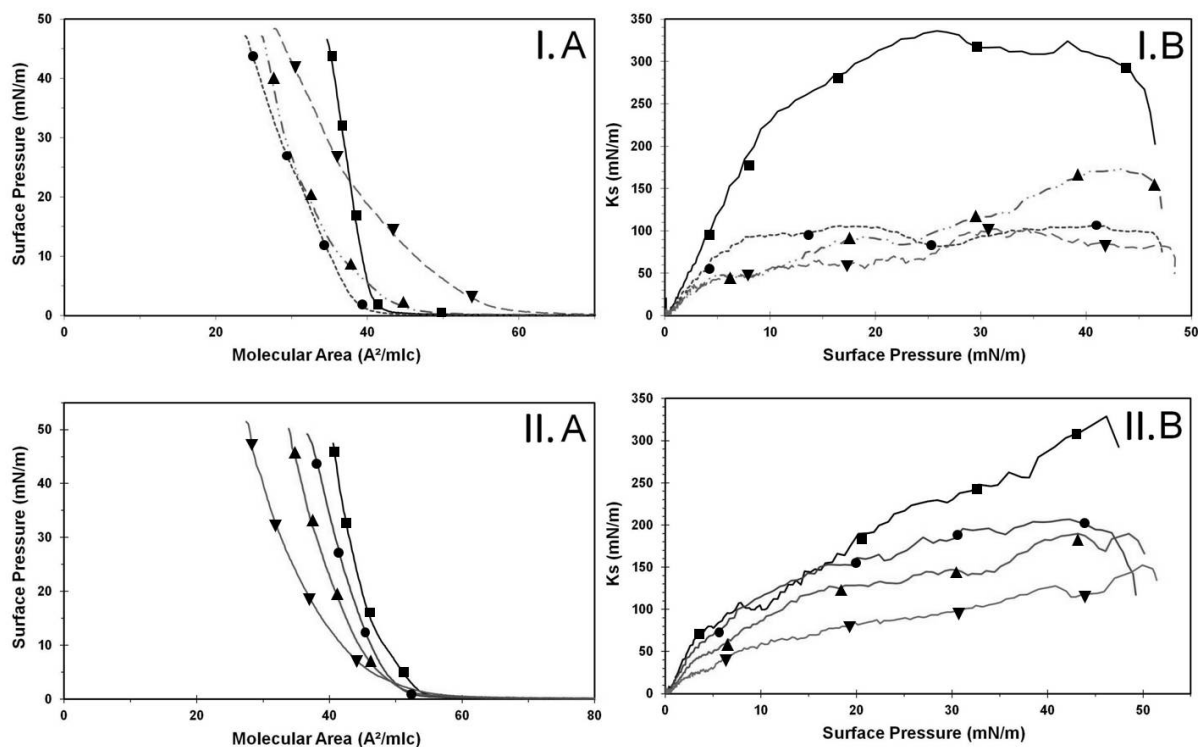


FIGURE 11.14 – **Isothermes de compression et modules d'élasticité des mélanges stérols/Nys.** I : mélanges Chol/Nys; II : mélanges Ergo/Nys. A : Isothermes de compression des monocouches de stérols contenant 0% (carrés); 2.5% (cercles); 5% (triangles) et 10% Nys (triangles inversés). B : Module d'élasticité des monocouches des mélanges. La sous phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Les courbes sont représentatives de trois expériences indépendantes.

L'isotherme de compression du Chol donne une aire molécule de $40 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$. Le module de compression montre une organisation en phase solide de la monocouche avec des valeurs importantes de Ks, supérieures à 300 mN/m . La pression de collapse de la monocouche se situe à 46 mN/m . Ces résultats sont en conformité avec la littérature scientifique [45]. L'ajout de Nys dans les monocouches de Chol fait évoluer l'aire moléculaire du mélange Chol/Nys 10% : elle passe de 40 à $50 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$. La Nys provoque aussi une diminution du Ks, cela pour tous les mélanges. À 20 mN/m , celui-ci passe de 300 mN/m pour le lipide pur à 100 , 85 et 50 mN/m pour Chol/Nys 2,5%, 5% et 10%, respectivement. Nous pouvons

observer, comme pour les isothermes de DPPC et DPPE, une légère évolution négative du K_s entre 20 et 25 mN/m, qui peut correspondre à un collapse ou une expulsion partielle de la Nys de la monocouche.

L'isotherme de la monocouche d'Ergo montre une aire moléculaire de $48 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$. Le K_s de la monocouche d'Ergo pur augmente rapidement, jusqu'à un maximum de 320 mN/m, obtenu à 47 mN/m, la pression de collapse de la monocouche. Ainsi, la monocouche d'Ergo s'organise très tôt en phase solide, comme le Chol. Ces constatations sont en conformité avec la littérature scientifique [45].

L'ajout de Nys provoque un décalage vers la gauche des isothermes, avec une diminution de l'aire moléculaire pour tous les mélanges. Les K_s des mélanges Ergo/Nys sont tous plus faibles que celui de la monocouche seule. Cette diminution est dépendante de la concentration en Nys. Par exemple, à 20 mN/m, le K_s de la monocouche d'Ergo pur est de 180 mN/m. Il passe à 145 mN/m pour Ergo/Nys 2,5%, 115 mN/m pour Ergo/Nys 5% et est même plus de 2 fois inférieur pour Ergo/Nys 10% (80 mN/m). La pression de collapse est aussi légèrement modifiée : elle est de 47 mN/m pour le lipide seul et le mélange Ergo/Nys 2,5%, tandis qu'elle est de 50 mN/m pour les mélanges Ergo/Nys 5 et 10%. Aucune nouvelle transition n'est cependant observée sur les courbes de K_s .

L'interaction de la Nys avec les monocouches de stérol provoque, tant pour le Chol que l'Ergo, une sévère chute de K_s , plus importante que pour tous les autres lipides testés. Ces diminutions correspondent à une perte de compaction de ces monocouches, avec probablement, dans le cas du Chol, une expulsion partielle ou un collapse de la Nys autour de 20 mN/m. Pour caractériser les modifications de la morphologie des monocouches de stérols provoquées par la Nys, des images de BAM ont été enregistrées. Ces images sont Les images de BAM des monocouches de Chol sont montrées figure 11.15.

Les images de BAM du Chol pur montrent que la monocouche s'organise très rapidement en phase solide (6 mN/m). Les images ne montrent plus aucune évolution après cette pression (20 mN/m et 35 mN/m).

L'ajout de Nys provoque une diminution de la surface occupée par la phase solide. À 6 mN/m, pour les mélanges Chol/Nys 5% et 10%, 3 niveaux de gris sont observables, correspondant à trois niveaux de compaction différents. Ces trois niveaux de gris correspondent probablement à des domaines plus ou moins enrichis en Nys. Par ailleurs, nous pouvons observer l'apparition de petites structures plus compactes que le reste de la monocouche dans les domaines de faible compaction. L'évolution de la compression (20 mN/m) provoque la fusion des domaines compacts. La Nys, probablement localisée dans des domaines de faible compaction, se retrouverait piégée au niveau des lignes de fusion de ces domaines et les entoureraient. Au fur et à mesure de la compression, ces structures vont devenir de plus en plus compactes (35 mN/m) et plus denses pour toutes les concentrations en Nys. Ces images montrent donc que la Nys favoriserait les phases lipidiques moins denses et s'y insérerait. L'avancée de la compression provoquerait l'ex-

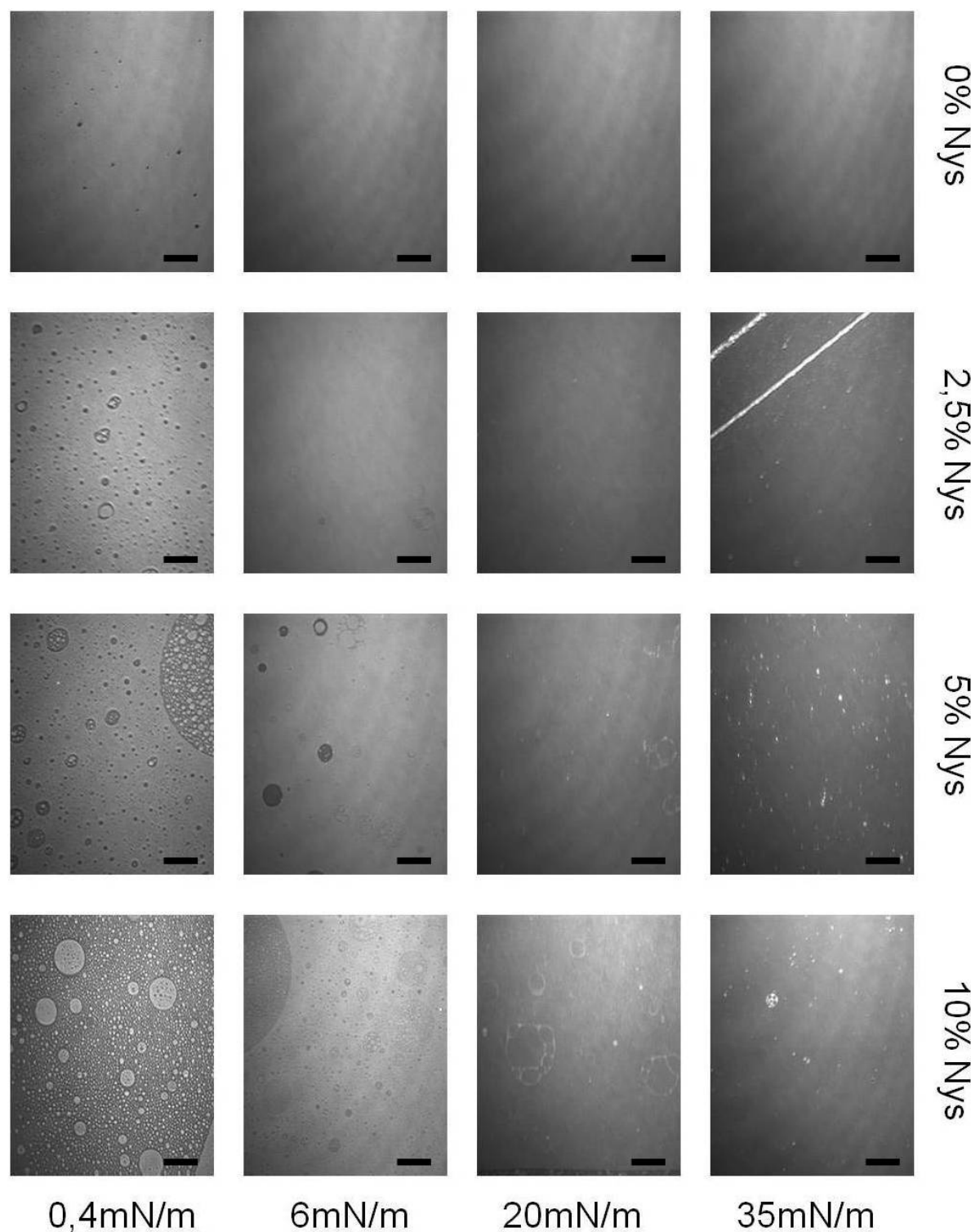


FIGURE 11.15 – Images de BAM des monocouches de Chol à différentes pressions de surface. La sous phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Sur les images de BAM, les barres d'échelle représentent 50 μm.

pulsion partielle ou le collapse de la Nys.

Des images AFM des monocouches de Chol, présentées figure 11.16, montrent de manière plus fine l'état des monocouches à 18 et 35 mN/m.

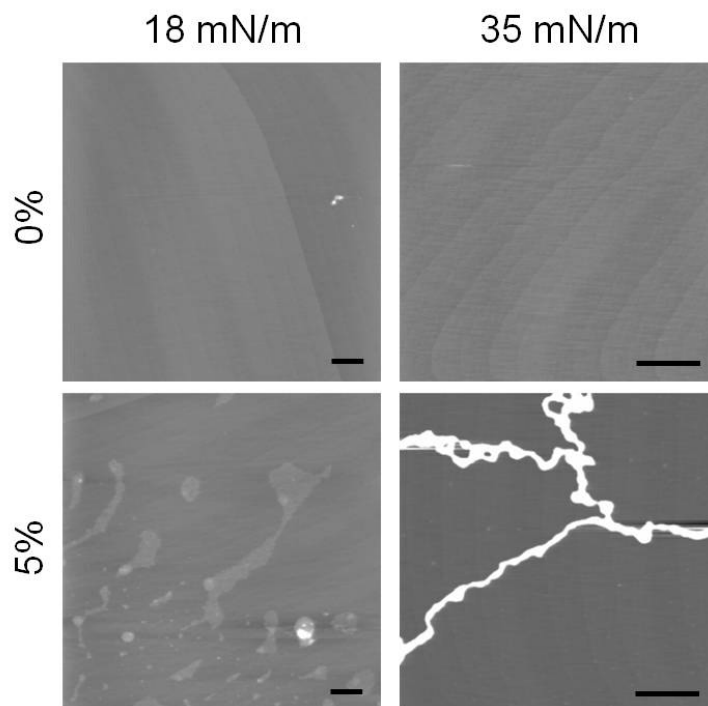


FIGURE 11.16 – Images AFM de hauteur de monocouches de Chol avec 0% et 5% Nys à 18 mN/m et 35 mN/m. L'échelle en z est de 10 nm. Chaque barre d'échelle représente 1 micromètre.

À ces pressions, aucune structure n'est visible sur les images de Chol pur, la monocouche étant en phase solide.

L'ajout de 5% Nys provoque l'apparition de structures tridimensionnelles. La monocouche transférée à 35 mN/m (figure 11.16-35 mN/m) montre des structures tridimensionnelles de tailles variables, de l'ordre de la centaine de nanomètres. Elles correspondraient à de la Nys expulsée et agrégée à la surface de la monocouche, ce qui confirme les observations faites en BAM. Des constatations similaires avaient été faites pour les monocouches de DPPC.

Les images de BAM des monocouches d'Ergo sont présentées figure 11.17.

Pour les images du lipide pur, dès 0,4 mN/m, nous observons la présence d'un seul niveau de gris. Les images de 6, 20 et 35 mN/m ne montrent ensuite aucune évolution particulière. À ces pressions, la monocouche est en phase solide.

Pour les monocouches contenant de la Nys, une diminution de la compaction de la monocouche est constatée, cela dès les faibles pressions (0,4 mN/m) et dès les faibles concentrations (2,5% Nys). Ici encore, la Nys provoque l'apparition de domaines de faible compaction, toujours visible à 6 mN/m. À 20 mN/m, de nombreuses structures compactes apparaissent sur les images de toutes les monocouches. Ces structures compactes observées sur les images de BAM ne seraient pas de la Nys expulsée puisqu'aucune nouvelle transition n'est apparente sur les courbes de Ks. Il se pourrait que l'Ergo et la Nys interagissent ensemble pour former de telles structures. L'augmentation de la pression interfaciale, mais aussi l'augmentation de la concentration provoque un grossissement de ces structures (35

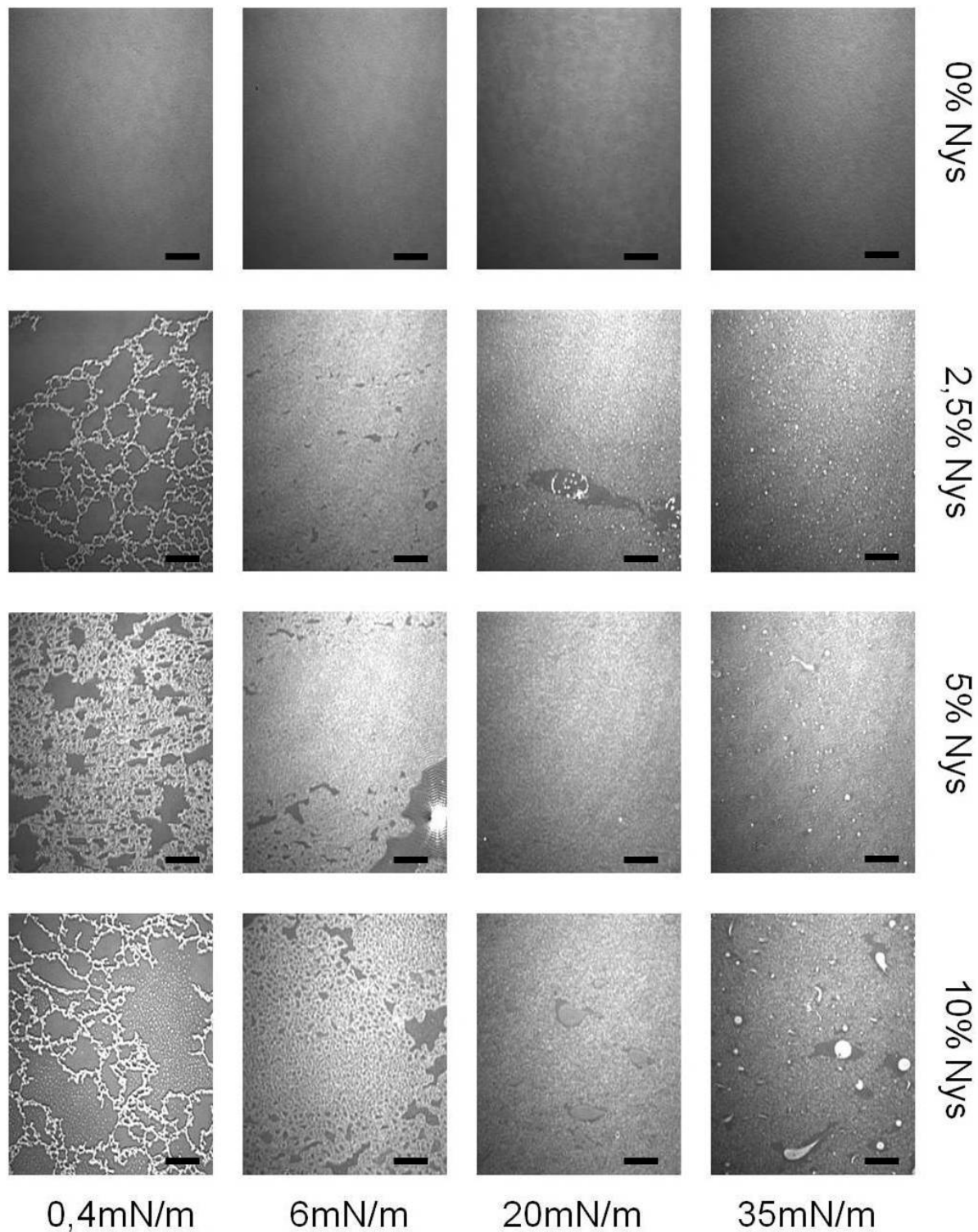


FIGURE 11.17 – Images de BAM des monocouches d'Ergo à différentes pressions de surface. La sous phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Les barres d'échelle représentent 50 μm .

mN/m), qui semblent être localisées dans des domaines de faibles compactions. Ce constat confirmerait que la Nys est localisée préférentiellement dans les zones à faible compaction, et que l'augmentation de la pression favoriserait son agrégation.

Des images AFM des monocouches d'Ergo à 18 et 35 mN/m sont proposées figure

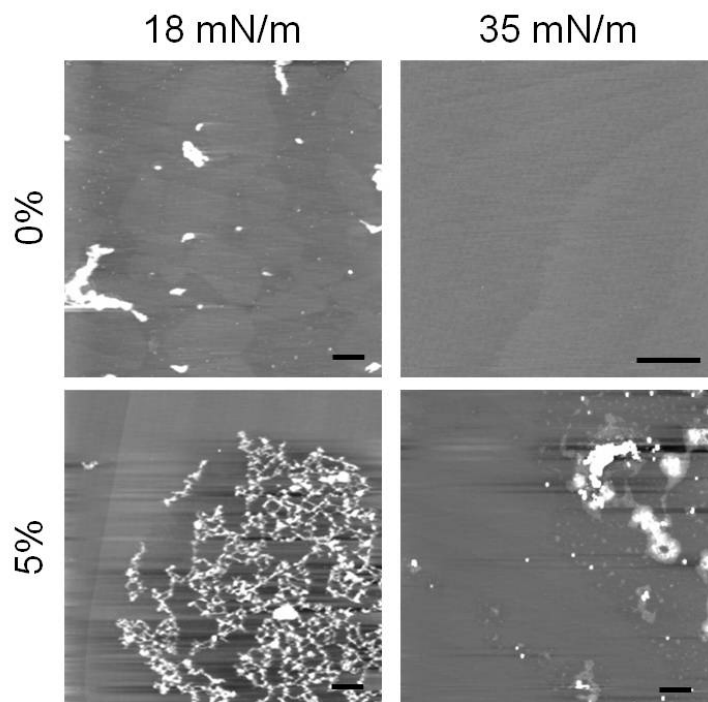


FIGURE 11.18 – **Images AFM de hauteur de monocouches d’Ergo avec 0% et 5% Nys à 18 mN/m et 35 mN/m.** L’échelle en z est de 10 nm. Chaque barre d’échelle représente 1 μm .

11.18.

Les images des monocouches d’Ergo pur ne présentent aucune structure particulière, l’Ergo étant, comme le Chol, en phase solide aux pressions étudiées. L’ajout de Nys provoque l’apparition, dès 18 mN/m, de nombreuses structures tridimensionnelles, comme observées sur les images de BAM à une pression de 20 mN/m. Ces structures ne ressemblent cependant pas à celles observées avec les monocouches de DPPC ou de Chol. Elles sont donc probablement différentes et pourraient être composées de Nys et d’Ergo.

L’interaction de la Nys avec les monocouches de stérols provoque une perte de Ks, soit une fluidification des monocouches. La Nys favoriserait, comme pour les autres lipides étudiés, la formation de domaines de faible compaction, et s’y localiserait. Si elle semble être expulsée des monocouches de Chol, la Nys reste à l’interface air/lipide des monocouches d’Ergo. Cette différence de comportement semble être primordiale pour comprendre la différence d’interaction de la Nys avec les différentes membranes biologiques.

11.1.3.4 Conclusion des isothermes de compression

D’une manière générale, la Nys provoque une diminution du Ks de l’ensemble des lipides : la compaction des membranes diminue. Elle favoriserait l’apparition de domaines de faible compaction et se localiserait préférentiellement dans ces domaines. L’augmentation de la pression latérale de la monocouche diminuant l’espace disponible pour ces

domaines, la Nys y provoquerait la formation de structures compactes. Pour toutes les monocouches testées, elle provoque donc l'apparition de structures tridimensionnelles, localisées à la surface de la monocouche, hormis dans les monocouches de POPE, pour lesquelles aucun agrégat n'a été montré. Dans ces dernières, l'interaction entre la Nys et la POPE a été montrée comme thermodynamiquement favorable à des concentrations en Nys inférieures à 40%. Par ailleurs, nous avons montré que malgré sa faible pression de collapse, la Nys n'était pas expulsée des monocouches de POPE et d'Ergo. Ces lipides seraient donc capable de la maintenir à l'interface air/eau à des pressions importantes. En revanche, elle semble être expulsée des monocouches de DPPC, DPPE et Chol autour de 20 mN/m, sa pression de collapse.

Des valeurs de ΔG_{ex} très négatives ont aussi été rapportées entre la DPPC et la Nys [45]. Ces valeurs (jusqu'à -4000 J/mol) laisseraient entendre que l'interaction entre la DPPC et la Nys serait plus favorable. Cependant, comme montré durant les expériences d'insertion, la Nys

11.1.4 La Nys provoque la solubilisation des monocouches de POPE/Ergo

Nous avons, dans les paragraphes précédents, étudié l'interaction entre la Nys et des modèles membranaires constitués que d'un seul lipide. Ces études nous ont permis de discriminer les meilleurs candidats potentiels à une participation au mécanisme d'interaction de la Nys avec les membranes biologiques.

Dans cette partie de l'étude, nous avons étudié l'insertion de la Nys dans des modèles représentant les feuillettes internes et externes des membranes de cellules animales et fongiques. Comme vu section 2.3.1 page 30, le feuillet externe est principalement constitué de PC, tandis que le feuillet interne est principalement constitué de PE. De plus, les phospholipides des membranes biologiques possèdent des chaînes acyles d'au moins 16 carbones, avec une chaîne en *sn*-1 saturée et une chaîne en *sn*-2 insaturée (voir section 2.1.1 page 22). Enfin, la pression latérale des membranes biologiques a été estimée entre 30 et 35 mN/m [47].

En tenant compte de tous ces éléments, nous avons choisi d'utiliser des monocouches de Langmuir constituées de POPC contenant des concentrations croissantes en Chol ou en Ergo, qui représentera le feuillet externe des membranes, et de POPE contenant des concentrations croissantes en stérol qui représentera le feuillet interne. La pression initiale de chaque monocouche est définie à 30 ± 2 mN/m. Ces modèles ne sont pas à proprement parlé des mimes des feuillettes des membranes biologiques, puisque leur composition est trop simplifiée : pas de SM pour la formation de domaines raft, pas de protéines, ... Cependant, ils nous permettent, dans une certaine mesure, d'extrapoler les effets de la Nys observés sur ces modèles aux membranes naturelles.

Nous avons représenté les cinétiques d'insertion de la Nys dans des mélanges binaires

phospholipides/stérols, jusqu'à un ratio lipide/stérol 1 : 1 (mol/mol). Elles sont présentées figure 11.19.

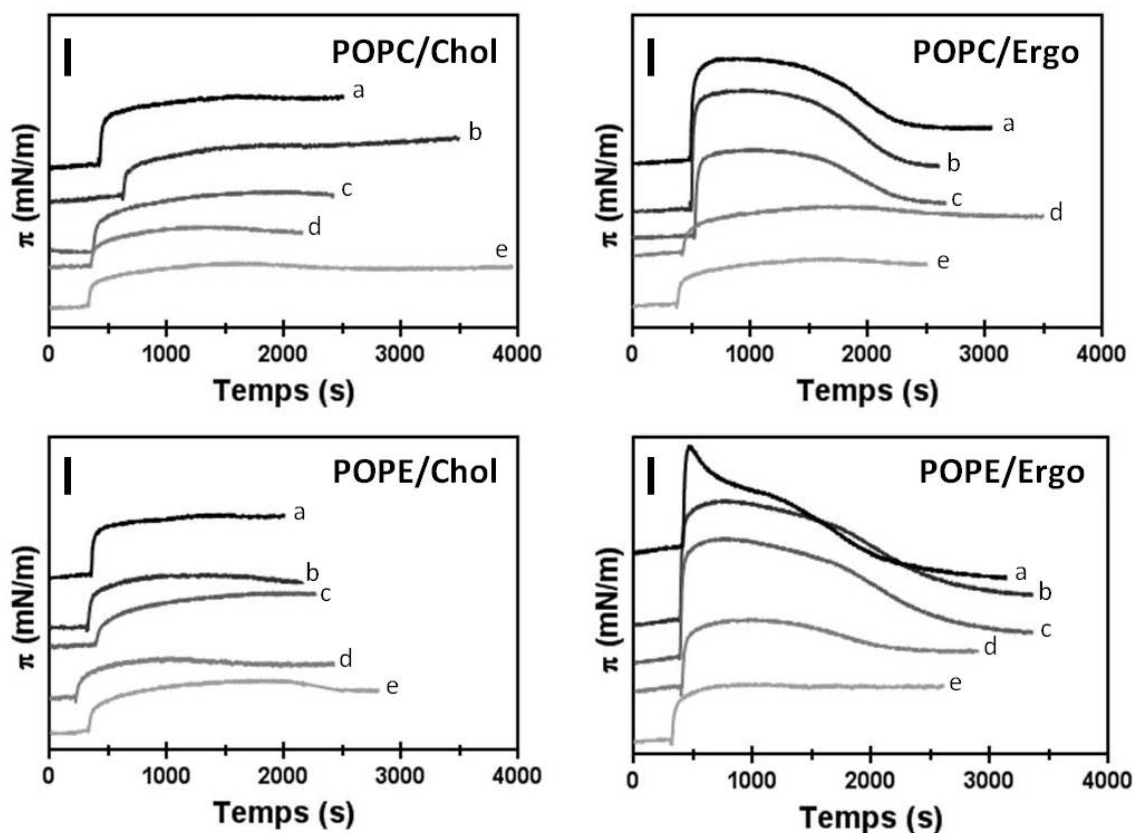


FIGURE 11.19 – Cinétiques d'insertion de la Nys dans des mélanges phospholipides/stérols. a-e : ratios molaires phospholipide/stérol. a. 1 : 1 ; b. 3 : 2 ; c. 7 : 3 ; d. 4 : 1 ; e. 5 : 1. La barre d'échelle en haut à gauche représente 5 mN/m. Chaque courbe est représentative de trois expériences indépendantes. Les expériences ont été réalisées à une pression initiale de 30 ± 2 mN/m. Les lipides ont été déposés sur une sous-phase composée d'un tampon Tris 10 mM à pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. La concentration finale en Nys est de $1,6 \mu\text{M}$.

L'injection de la Nys dans la sous-phase provoque une forte augmentation de la pression de surface. Suite à cette augmentation de pression, deux comportements sont observés :

- Pour les monocouches contenant du Chol, après atteinte d'un maximum, un plateau apparaît ; la pression n'évolue plus.
- Pour les monocouches contenant de l'Ergo, après atteinte d'un premier maximum, une diminution de la pression de surface est observée pour tous les ratio phospholipides/Ergo. Plus la concentration en Nys est importante et plus la diminution de pression est importante et rapide. Pour les ratios phospholipides/Ergo supérieurs ou égaux à 7 : 3 (mol/mol), cette diminution se fait en deux temps : une première phase lente se terminant par un plateau, suivie d'une seconde plus rapide. Dans tous les cas, cette diminution atteint ensuite une valeur seuil après laquelle la pression n'évolue plus.

Pour mieux comprendre l'influence de la Nys sur ces monocouches, nous avons déterminé le différentiel maximal de pression engendré par la Nys en fonction de la concentration en

stérol à partir de ces cinétiques. Nous appellerons ce paramètre le $\Delta\pi_{30}^{max}$, d'équation

$$\Delta\pi_{30}^{max} = \pi_{30}^{max} - \pi^{ini} \quad (11.2)$$

avec π^{ini} la pression initiale de la monocouche et π_{max} la pression maximale après injection de la Nys. Cette valeur correspond à la pression maximale engendrée par l'insertion de la Nys dans les monocouches. Ces courbes sont présentées figure 11.20.

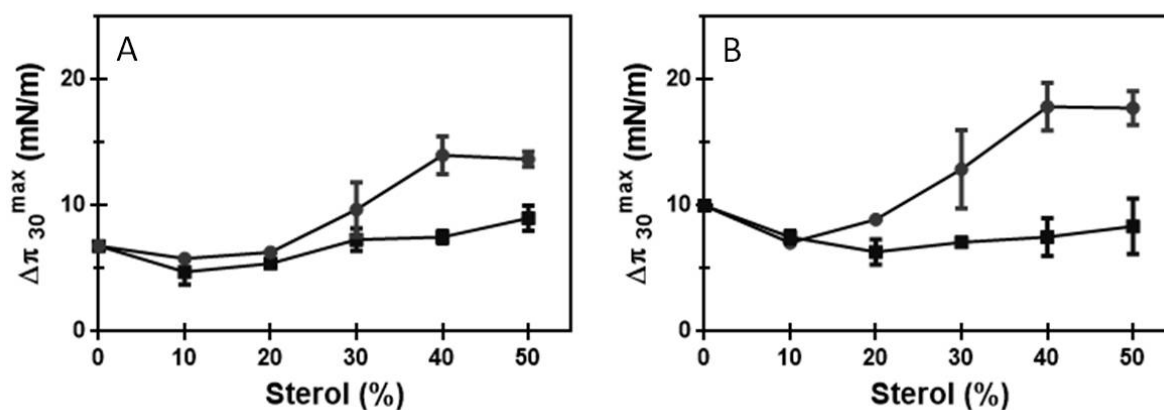


FIGURE 11.20 – Évolution du $\Delta\pi_{30}^{max}$ dans des monocouches de POPC ou POPE mélangées avec différentes concentrations en stérols. A : POPC; B : POPE. Chol : carrés; Ergo : cercles. Chaque point représente la moyenne de 3 répétitions indépendantes.

Le $\Delta\pi_{30}^{max}$ varie très peu pour les mélanges contenant du Chol : la différence entre le $\Delta\pi_{30}^{max}$ pour POPC seul et la valeur de $\Delta\pi_{30}^{max}$ la plus élevée est inférieure à 2 mN/m, tant pour les monocouches de POPC/Chol que pour celles de POPE/Chol.

Les profils de $\Delta\pi_{30}^{max}$ obtenus pour les mélanges contenant de l'Ergo sont différents : l'augmentation de la concentration en Ergo provoque une augmentation continue jusqu'à atteindre un plateau à un ratio phospholipide/stérol de 3 : 2 (mol/mol). L'Ergo potentialise donc l'insertion de la Nys dans les monocouches lipidiques.

Lors de l'étude d'insertion de la Nys dans des monocouches de lipides purs, nous n'avons montré aucune différence de comportement entre les monocouches de Chol et d'Ergo. Ce nouveau résultat montre cependant que dans des systèmes plus complexes, il existe une différence importante d'interaction entre la Nys et les stérols. L'insertion de la Nys dans des monocouches contenant de l'Ergo est beaucoup plus importante que dans celles contenant du Chol. L'Ergo potentialise l'insertion de la Nys dans les monocouches, tandis que le Chol ne semble n'avoir aucun effet. Cette différence d'interaction peut être à l'origine de l'insertion préférentielle de la Nys dans les membranes fongiques.

Concernant uniquement les mélanges contenant de l'Ergo, nous pouvons remarquer que les $\Delta\pi_{30}^{max}$ les plus élevés sont obtenus pour les mélanges POPE/Ergo, avec un $\Delta\pi_{30}^{max}$

de $17,7 \pm 1,3$ mN/m pour POPE/Ergo 1 : 1 (mol/mol) contre $13,7 \pm 0,6$ mN/m pour la POPC avec le même ratio d'Ergo. Ce résultat montre que l'association entre la POPE et l'Ergo permet une insertion de la Nys plus importante que lorsque la POPC est utilisée. Il est possible que la POPE et l'Ergo aient un effet synergique sur l'insertion de la Nys dans les membranes.

Comme remarqué figure 11.19, pour les monocouches contenant de l'Ergo, il existe toujours une phase de diminution de la pression, jusqu'à l'atteinte d'un plateau. Cette allure de courbe peut traduire un phénomène d'insertion massive (augmentation rapide), puis de réorientation des molécules au sein de la monocouche ou d'une solubilisation partielle de la membrane (diminution) jusqu'à atteindre une conformation plus favorable (plateau). Pour caractériser la vitesse de réarrangement des lipides de la monocouche, nous nous sommes donc intéressés au temps nécessaire au système pour atteindre une perte de 5% du $\Delta\pi_{30}^{max}$, perte que nous pensons être suffisamment significative pour être attribuée à un phénomène de réarrangement de la configuration moléculaire au sein de la monocouche et non à des bruits de fond de l'appareil de mesure. Nous appellerons ce paramètre le $T_{30}^{-5\%}$.

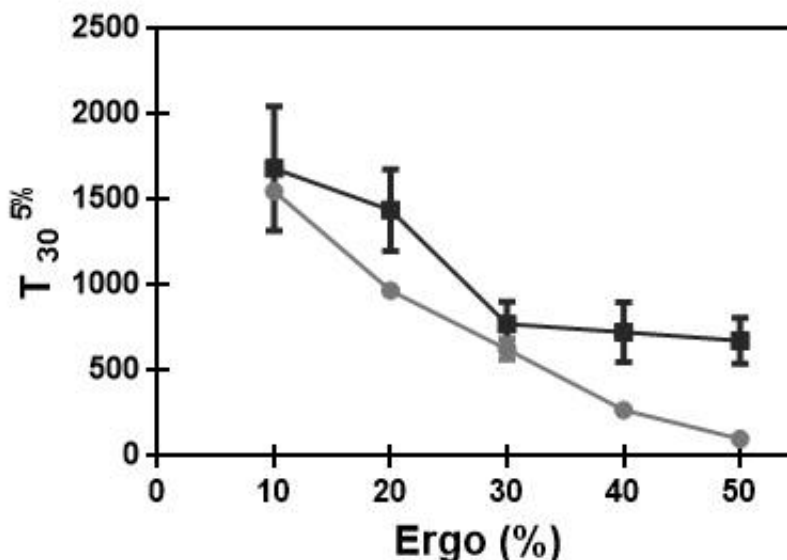


FIGURE 11.21 – Évolution du $T_{30}^{-5\%}$ en fonction de la concentration en Ergo. Carrés : POPC ; Cercles : POPE.

Les courbes présentées figure 11.21 ont une évolution décroissante. Pour les mélanges POPC/Ergo, un plateau est atteint à un ratio molaire de 7 : 3, avec une valeur de $T_{30}^{-5\%}$ autour de 600s. Pour les mélanges POPE/Ergo, la décroissance est plus forte ; la courbe tend vers 0. La valeur minimale obtenue est de 100s pour le ratio molaire 1 : 1 (mol/mol). L'augmentation de la concentration en Ergo provoque ainsi une augmentation de la vitesse de réorganisation intermoléculaire des monocouches. Cette réorganisation est

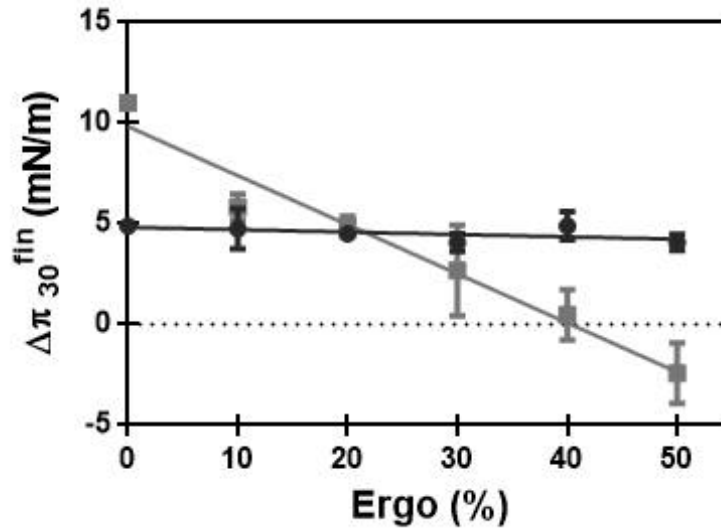


FIGURE 11.22 – Évolution du $\Delta\pi_{30}^{fin}$ en fonction de la concentration en stérol. Carrés : POPE; Cercles : POPC.

beaucoup plus rapide pour le mélange POPE/Ergo. Ce résultat montre encore une fois un comportement particulier entre la POPE et l'Ergo.

Pour comprendre la finalité de ces phénomènes de réorganisation sur les monocouches, nous nous sommes intéressés à la différence de pression entre la π^{ini} et la π après 45 minutes d'expérience, la π_{30}^{fin} , en fonction de la concentration :

$$\Delta\pi_{30}^{fin} = \pi_{30}^{fin} - \pi^{ini} \quad (11.3)$$

Ce paramètre nous permet d'étudier l'état final du système. Les courbes d'évolution de ce paramètre en fonction de la concentration en stérol dans la monocouche sont présentées figure 11.22.

Pour les mélanges POPC/Ergo, aucune évolution du $\Delta\pi_{30}^{fin}$ est observable, et cela quelle que soit la proportion d'Ergo. La pression finale est toujours positive et stagne autour de 5 mN/m. La Nys s'insère donc fortement dans les membranes de POPC/Ergo, sans modifier la pression latérale finale de la monocouche.

Les mélanges contenant la POPE montrent, quant à eux, une baisse continue de ce $\Delta\pi_{30}^{fin}$, jusqu'à devenir négatif à partir d'un ratio molaire PE/Ergo de 3 : 2. Comme dit plus haut, une valeur négative de $\Delta\pi_{30}^{fin}$ peut correspondre à une perte de matériel à l'interface air/eau. La Nys provoquerait donc une solubilisation partielle des monocouches de POPE/Ergo.

Ces expériences apportent de nouveaux éléments par rapport aux études d'insertion faites avec les lipides seuls et les isothermes de compression des mélanges lipides/Nys. Le Chol ne potentialiserait pas l'insertion de la Nys dans les monocouches. De ce fait, la

Nys interagirait préférentiellement avec les monocouches contenant de l'Ergo. Par ailleurs, il existerait un effet coopératif entre la POPE et l'Ergo, qui faciliterait l'insertion de la Nys dans ce type de monocouches, mais aussi leur réorganisation. Ces phénomènes de réorganisation conduisent à une solubilisation partielle des monocouches de POPE/Ergo. Sachant que les membranes fongiques sont enrichies en PE (la PE est le lipide majoritaire de nombreuses cellules fongiques - [7]) et qu'elles contiennent de l'Ergo, il est envisageable que la Nys provoque une solubilisation partielle de domaines de PE/Ergo. La PE étant majoritairement localisée dans le feuillet interne des membranes, elle pourrait être capable de le solubiliser, ce qui perturberait la stabilité de ces membranes.

11.2 Interaction de la Nys avec des bicouches lipidiques

L'utilisation des monocouches de Langmuir permet d'étudier l'interaction de molécules avec un lipide particulier, ou encore avec des mimes de feuillets de membranes. La principale limitation des monocouches réside dans leur essence même : elles ne miment qu'un seul des deux feuillets des membranes. Hors, de nombreuses macromolécules, comme les protéines transmembranaires, nécessitent les deux feuillets des membranes pour s'y insérer.

Dans cette section, nous avons donc utilisé des bicouches lipidiques. Ce modèle nous permet d'étudier les interactions entre la Nys et un modèle membranaire mimant une membrane cellulaire complète. Nous étudierons la capacité de la Nys à perméabiliser les membranes, mais aussi les modifications qu'elle engendre sur leur fluidité. Cette dernière technique nous renseignera entre autres sur la localisation préférentielle de la Nys dans les membranes utilisées.

11.2.1 La Nys ne perméabilise pas les liposomes enrichis en POPE mais provoque l'augmentation de leur diamètre

Dans le but de déterminer la capacité de la Nys à perméabiliser des membranes enrichies en POPE, nous avons réalisé des liposomes contenant des proportions variables de ce lipide. Nous avons pour cela utilisé les propriétés de fluorescence de la calcéine. La structure de cette macromolécule a été montrée section 10.3, figure 10.2 page 91. L'utilisation de cette molécule permet d'étudier la perméation des membranes aux macromolécules. La POPE étant un lipide cylindrique et non conique tronqué comme la POPC ou la DPPC, il est impossible d'obtenir des liposomes à partir de ce lipide seul au pH étudié. Nous avons donc décidé d'incorporer ce lipide dans des liposomes contenant 70% de POPC. Nous avons comparé la perméabilisation obtenue en présence de POPE à celles obtenues avec la POPC et l'Ergo. Ces expériences sont présentées figure 11.23.

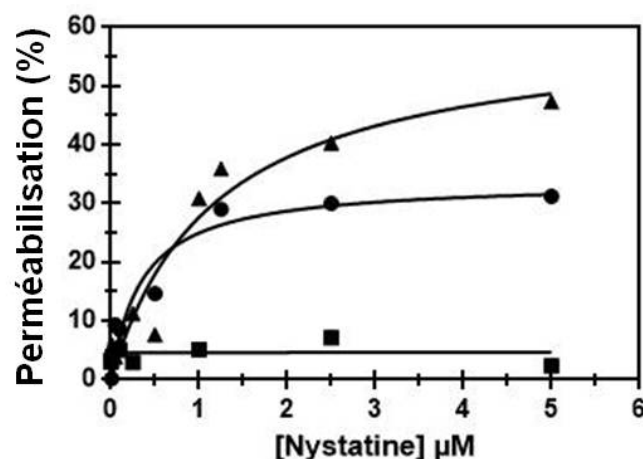


FIGURE 11.23 – Suivi de la perméabilisation de liposomes de différentes compositions par la Nystatine. Triangle : POPC/Ergo 7 : 3 (mol/mol); Cercle : POPC; Carré : POPC/POPE 7 : 3 (mol/mol). La concentration en LUVs est de 10 μ M. Le tampon utilisé est un tampon Tris 10 mM à pH 7,4. Toutes les expériences sont réalisées à 21°C.

Nous observons une augmentation progressive de la libération de la calcéine des liposomes de POPC/Ergo 7 :3 (mol/mol) dépendante de la concentration en Nys. Cette libération atteint un plateau autour de 50% de la calcéine totale. L'augmentation de la libération de la calcéine des liposomes de POPC est elle aussi continue, jusqu'à atteindre un plateau autour de 30% de libération de la calcéine totale. La perméabilisation des liposomes contenant de l'Ergo est donc plus importante que celle des liposomes ne contenant pas d'Ergo, ce qui est conforme à la littérature scientifique [234].

Pour les liposomes de POPC/POPE 7 : 3 (mol/mol), nous pouvons constater une très faible libération de calcéine. Cette faible libération témoigne d'une perte de l'activité de perméabilisation de la Nys. Nous avons aussi étudié cette perméabilisation dans des liposomes de composition POPC/POPE 4 : 3 (mol/mol) contenant différentes concentrations d'Ergo (20 et 40%). Ces résultats sont montrés figure 11.24.

Ces mélanges montrent exactement le même profil de libération de la calcéine que les liposomes de POPE/Ergo 7 : 3 (mol/mol). Ainsi, l'ajout de POPE empêche la Nys de rendre la membrane perméante à la calcéine, et cela même dans des liposomes contenant de fortes proportions de stérols. Il est possible que la Nys crée dans ces membranes des pores de taille plus petite, laissant par exemple passer les ions. Il s'agirait alors de pore de type I, comme présenté section 5.2.2 page 58. Il est cependant à noter que ce lipide entraîne une forte modification de l'effet de la Nys sur les membranes.

Nous l'avons montré précédemment, la Nys s'insère fortement dans les membranes de POPE. Pour vérifier qu'il existe bien un effet de la Nys sur de tels liposomes, nous avons déterminé leurs tailles par DLS avant et après insertion de la Nys. Les résultats sont repris figure 11.25.

La Nys ne provoque pas de modification de la taille des liposomes de POPC/Ergo, tandis

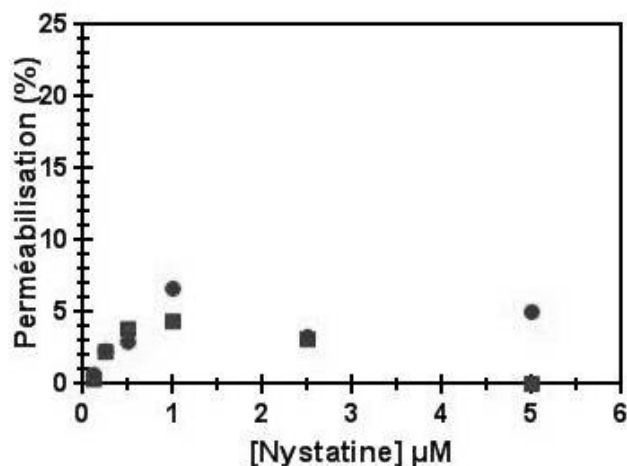


FIGURE 11.24 – Suivi de la perméabilisation de liposomes de POPC/POPE/Ergo par la Nystatine. Cercle : POPC/POPE 4 : 3 (mol/mol) + 20% molaire Ergo ; Carré : POPC/POPE 4 : 3 (mol/mol) + 40% molaire Ergo. La concentration en LUVs est de 10 μ M. Le tampon utilisé est un tampon Tris 10 mM à pH 7,4. Toutes les expériences sont réalisées à 21°C.

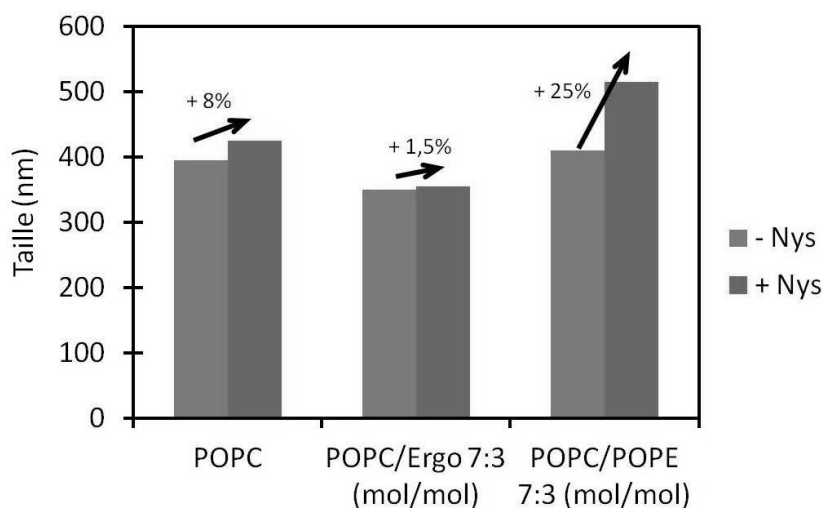


FIGURE 11.25 – Étude de la modification du diamètre de liposomes incubés avec de la Nys. La concentration en lipide est de 1 mM, celle de la Nys est de 25 μ M. La taille des liposomes a été déterminée juste avant (- Nys) et 5 min après (+ Nys) l'ajout de Nys.

que la modification de la taille des liposomes de POPC est faible, inférieure à 10%. En revanche, ces résultats montrent une augmentation considérable de plus de 25% du diamètre des liposomes contenant de la POPE. Pour expliquer cette augmentation de taille et la perte de l'activité de perméabilisation de la Nys, deux possibilités peuvent être avancées. Tout d'abord, l'ajout de POPE dans les membranes, en interaction avec la Nys, pourrait être responsable d'une coalescence des liposomes. La Nys serait alors impliquée dans des interactions de fusion des membranes. Ce phénomène a déjà été observé auparavant avec des SUVs en interaction avec l'AmB [235]. La Nys pourrait être aussi directement responsable de cette augmentation de taille par insertion massive dans la membrane au niveau des têtes polaires des lipides. Une telle insertion pourrait influencer directement

sur le diamètre apparant des vésicules, sans pour autant provoquer de perméabilisation de la calcéine.

11.2.2 La perturbation de l'ordre des membranes est plus importante dans les vésicules contenant de l'Ergo que dans celles contenant du Chol

Selon la littérature scientifique, l'interaction de la Nys avec les membranes fongiques peut se faire deux manières : entre le groupement hydroxyle des stérols (leur tête polaire) et le groupement mycosamine de la Nys et par empilement au sein de la partie hydrophobe de la membrane (au niveau des chaînes acyles) [136, 165]. Lors des études précédentes, nous avons mesuré une insertion de la Nys dans les membranes, mais nous nous étions pas intéressé à la profondeur de cette insertion. Cette étude nécessite l'utilisation d'un modèle membranaire possédant une bicouche lipidique. Les liposomes sont idéales pour mener ce genre d'étude. Cependant, ce modèle ne peut être formé à partir de PE seule. Nous nous sommes donc intéressés à l'insertion de la Nys dans des liposomes de POPC contenant soit de l'Ergo (pour représenter les membranes de cellules fongiques), soit du Chol (pour représenter les membranes de cellules animales). Ces modèles nous permettront d'extrapoler les interactions se produisant à l'échelle cellulaire entre le feuillet externe des membranes et la Nys. Pour mener cette étude, nous avons utilisé la fluorescence du Laurdan et du Prodan⁸.

11.2.2.1 Interactions de la Nys avec des SUVs

Nous avons utilisé des SUVs de POPC/Chol 7 :3 (mol/mol) et POPC/Ergo 7 :3 (mol/mol) contenant 0%, 2,5%, 5% ou 10% Nys. La figure 11.26 reprend les mesures de GP obtenus.

Les mesures de DLS ont montré que ces vésicules ont toutes un diamètre inférieur à 80 nm et que l'ajout de 10% Nys ne modifie pas ce diamètre. Cette remarque est importante puisque le GP est dépendant de l'ordre des lipides, mais aussi de la taille des liposomes [225, 236].

Les courbes des mélanges POPC/stérols 7 : 3 (mol/mol) montrent une diminution progressive du GP. L'ajout de Nys dans la composition des liposomes ne modifie pas l'allure des courbes : aucune modification de GP n'est observable, quelle que soit la composition lipidique. La Nys ne modifie donc pas la fluidité des membranes des SUVs de POPC/stérols, quel que soit le type de stérol utilisé.

Ces premiers résultats sont à priori contradictoires avec ceux obtenus en monocouche. En effet, nous avons observé une insertion de la Nys dans les monocouches de POPC, de Chol, d'Ergo, mais aussi dans les différents mélanges POPC/stérol. Par ailleurs, comme

8. Pour plus de détails sur le Laurdan et le Prodan, voir section 10.3.2 page 92

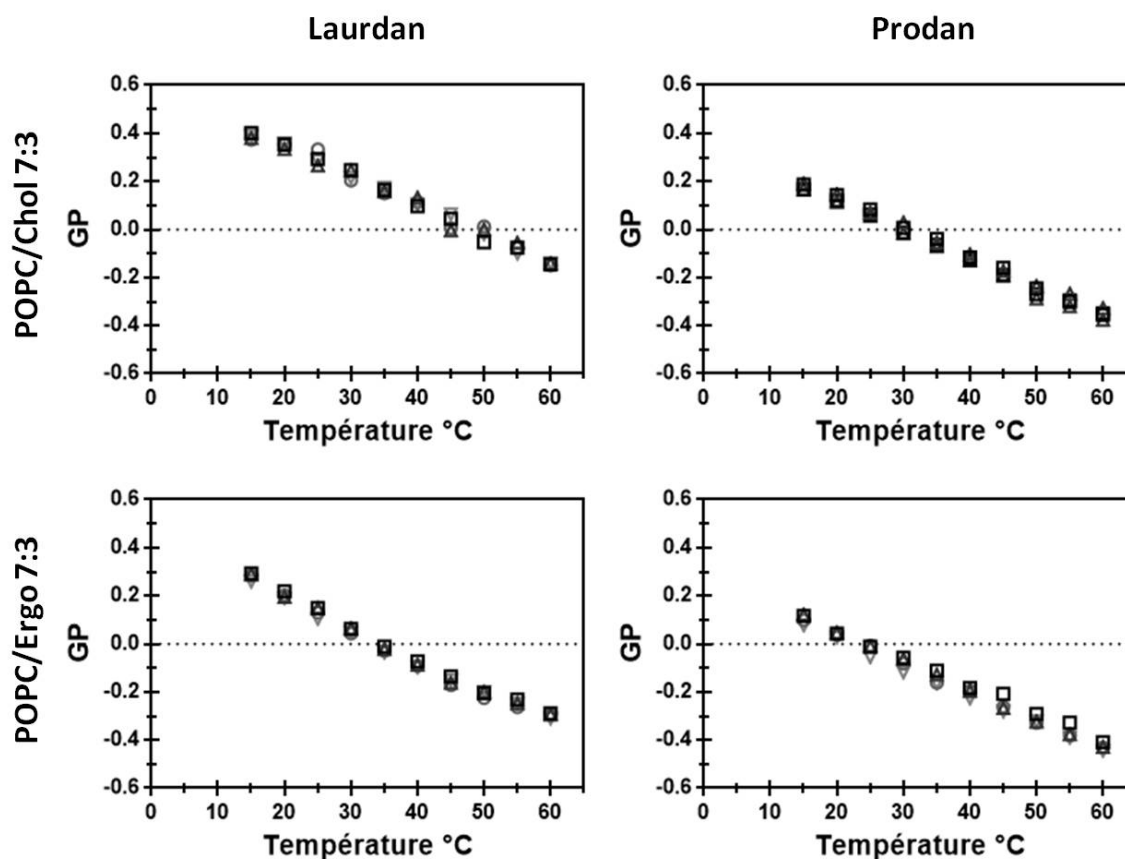


FIGURE 11.26 – Effet de la température sur le GP du Laurdan et du Prodan de la Nys dans des SUVs de POPC/Ergo et POPC/Chol Carrés : Lipide seul ; triangles : +2,5% Nys ; cercles : +5% Nys ; triangles inverses : +10% Nys. La concentration en SUVs est de $110 \mu\text{M}$. Les concentrations en Laurdan et Prodan sont respectivement de 1 et $3 \mu\text{M}$. Le tampon utilisé est un tampon Tris 10 mM. L'expérience est réalisée de 15 à 60°C à l'obscurité.

montré lors des expériences de calcéine, la Nys est capable de perméabiliser les membranes de POPC et de POPC/Ergo 7 : 3 (mol/mol). Bolard et ses collaborateurs ont montré que l'interaction de l'AmB, un polyène similaire à la Nys, était beaucoup plus forte avec des SUVs qu'avec des LUVs [237, 235]. Tous ces éléments font que nous aurions pu attendre une modification du GP significative, à défaut d'être importante. Notre résultat n'est en revanche pas isolé, puisqu'il a été rapporté qu'un autre groupe de recherche utilisant la diffraction des rayons X n'a observé aucune différence dans l'arrangement des lipides de SUVs traitées ou non avec de la Nys [149].

Le faible rayon de courbure du modèle membranaire utilisé peut être une des raisons pour laquelle nous n'avons observé aucune modification du GP des SUVs. Nous avons donc décidé de travailler avec des LUVs, plus biomimétiques que les SUVs.

11.2.2.2 Interactions de la Nys avec des LUVs de 200 nm

Nous avons préparé des LUVs de 200 nm avec des compositions lipidiques identiques à celles que nous avons utilisées pour les SUVs. L'évolution du GP du Laurdan et du

Prodan de ces vésicules est présentée figure 11.27.

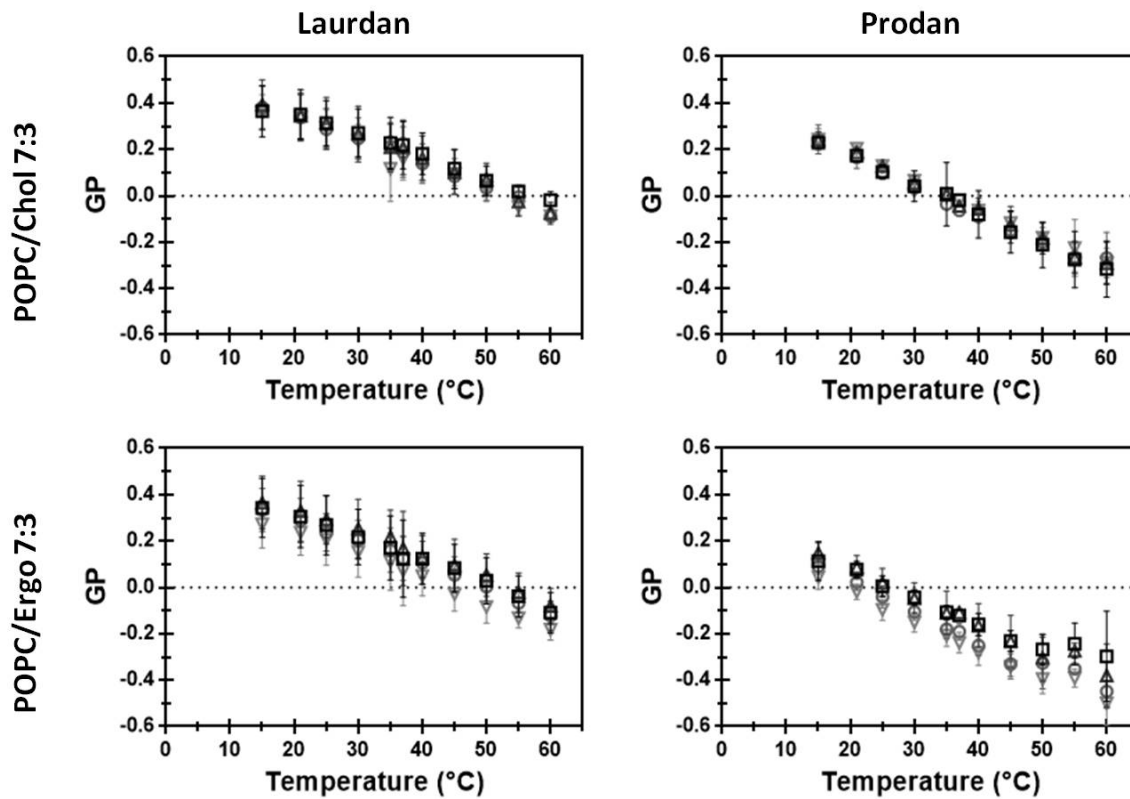


FIGURE 11.27 – Effets de la température et de la concentration en Nys sur le GP du Laurdan et du Prodan insérés dans des LUVs de 200 nm. Carrés : Lipide seul; triangles : +2,5% Nys; cercles : +5% Nys; triangles inversés : +10% Nys. La concentration en LUVs est de 110 μM . Les concentrations en Laurdan et Prodan sont respectivement de 1 et 3 μM . Le tampon utilisé est un tampon Tris 10 mM. L'expérience est réalisée de 15 à 60°C à l'obscurité.

L'évolution du GP des mélanges POPC/stérol 7 : 3 (mol/mol) sans Nys est identique à celle obtenue pour les SUVs. L'ajout de Nys dans les liposomes contenant du Chol provoque une légère déstabilisation du GP_L ⁹ et du GP_P ¹⁰.

L'ajout de Nys dans les liposomes contenant de l'Ergo provoque une modification tant du GP_L que du GP_P . Pour une lecture simplifiée, nous avons représenté les valeurs de ΔGP . Le ΔGP a pour formule :

$$\Delta\text{GP} = \text{GP}_n - \text{GP}_{ini} \quad (11.4)$$

avec GP_n le GP obtenu pour une concentration en Nys et une température données et GP_{ini} le GP du mélange lipidique sans Nys et à la même température.

Un ΔGP négatif traduit une augmentation de l'exposition à l'eau de la membrane, ce qui correspond aussi à une perte d'ordre ou encore à une fluidification des lipides cette membrane [226].

Un ΔGP positif traduit une diminution de l'exposition à l'eau de la membrane, ce qui correspond à une augmentation de l'ordre ou encore à une rigidification de ses lipides

9. GP_L = GP du Laurdan

10. GP_P = GP du Prodan

[226].

Les valeurs sont reportées figure 11.28.

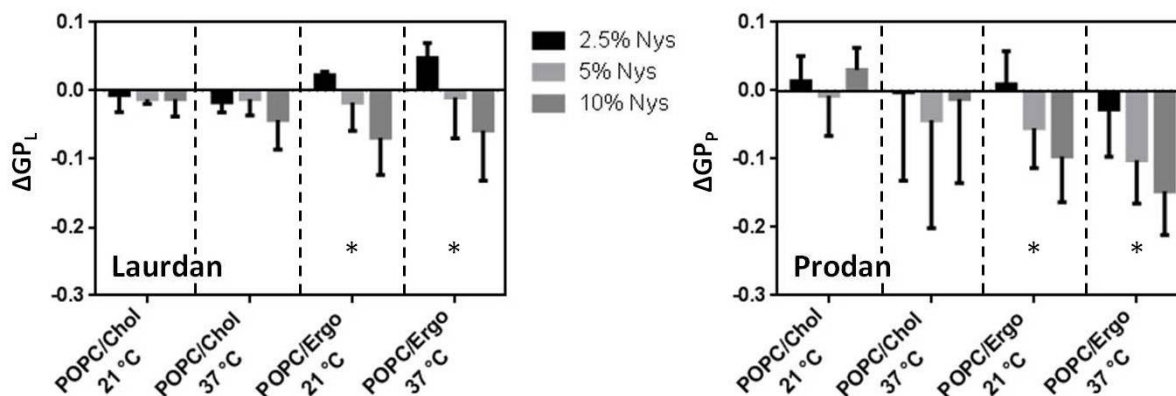


FIGURE 11.28 – ΔGP s engendrés par la Nys sur des liposomes de 200 nm à 21°C et 37°C. Les ΔGP sont déterminés en utilisant les valeurs de GP de la figure 11.27. Les tests statistiques ont été effectués entre les valeurs obtenues pour 2,5 et 10% Nys. * : p-value inférieure à 0,1. ** : p-value inférieure à 0,01.

L'histogramme montre une légère déstabilisation du GP_L , signe d'une fluidification au niveau des chaînes acyles des lipides, pour les liposomes de POPC/Chol 7 :3 (mol/mol), avec une valeur de ΔGP_L supérieure à -0,1 à 37°C et pour une concentration en Nys de 10%. En revanche, l'importance de l'amplitude des barres d'erreur des valeurs de GP_P obtenues rendent cette modification non significative, tant à 21°C qu'à 37°C.

Pour les liposomes de POPC/Ergo 7 :3 (mol/mol), le GP du Laurdan subit des modifications significatives. Pour une concentration de 2,5% en Nys, le ΔGP_L est faiblement positif, tant à 21°C qu'à 37°C. Ce ΔGP_L devient négatif à 21°C et à 37°C pour les mélanges contenant 5 et 10% Nys : il est de -0,07 à 21°C et de -0,06 à 37°C (10% Nys). Le ΔGP_P subit, lui, une plus forte modification. Il diminue en fonction de la concentration en Nys et de la température. Ainsi, à 21°C, il est de 0,09 et passe à 0,15 à 37°C (10% Nys). La Nys augmente l'accès au solvant des membranes contenant de l'Ergo, ou encore les fluidifie, tant au niveau des chaînes (indiqué par le ΔGP_L) qu'au niveau des têtes polaires (indiqué par le ΔGP_P), avec une déstabilisation plus importante au niveau des têtes polaires.

La perturbation de l'ordre des membranes par la Nys donne des valeurs négatives de ΔGP . La diminution du GP constatée correspond à une augmentation de l'hydratation, tant au niveau des chaînes acyles que des têtes polaires. Cette augmentation de l'hydratation traduit une perte d'ordre provoquée par la Nys, ce qui fluidifierait les membranes lipidiques. Ce résultat fait écho à ce que nous avons obtenu précédemment lors des expériences en monocouches, où nous constatons que la Nys diminuait l'état de compaction des lipides.

La déstabilisation se fait uniquement au niveau des chaînes acyles pour les liposomes contenant du Chol, tandis qu'elle se fait tant au niveau des chaînes acyles que des têtes polaires pour les liposomes contenant de l'Ergo. Cependant, notons que la déstabilisation est plus forte au niveau des têtes polaires.

11.2.2.3 Interactions de la Nys avec des LUVs de 400 nm

Afin de mieux caractériser l'effet de la taille des LUVs sur le mécanisme d'action de la Nys, nous avons étudié les modifications de l'ordre des membranes de LUVs de POPC/Ergo et POPC/Chol de 400 nm. Les résultats de ces expériences sont montrés figure 11.29.

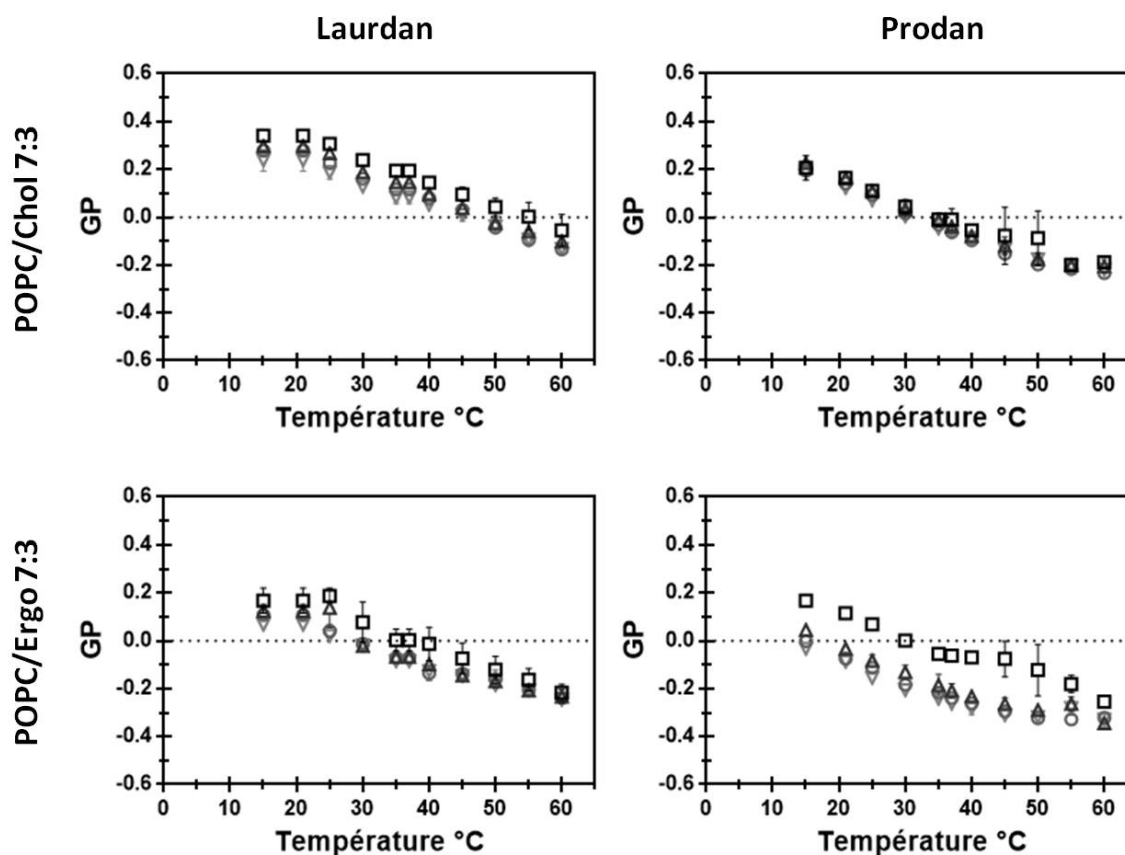


FIGURE 11.29 – Effets de la température et de la concentration en Nys sur le GP du Laurdan et du Prodan insérés dans des LUVs de 400 nm. Carrés : Lipide seul ; triangles : +2,5% Nys ; cercles : +5% Nys ; triangles inversés : +10% Nys. La concentration en LUVs est de 110 μM . Les concentrations en Laurdan et Prodan sont respectivement de 1 et 3 μM . Le tampon utilisé est un tampon Tris 10 mM. L'expérience est réalisée de 15 à 60°C à l'obscurité.

L'évolution des courbes de GP du Laurdan et du Prodan des liposomes de POPC/Ergo et POPC/Chol 7 : 3 (mol/mol) ne contenant pas de Nys est identique à celle obtenue pour les SUVs et les liposomes de 200 nm.

L'ajout de Nys dans les liposomes de POPC/stérol de 400 nm provoque une diminution

du GP du Laurdan et du Prodan, plus marquée pour les liposomes contenant de l'Ergo, mais aussi une légère diminution du GP du Laurdan des liposomes contenant du Chol. Les valeurs de ΔGP sont reprises figure 11.30.

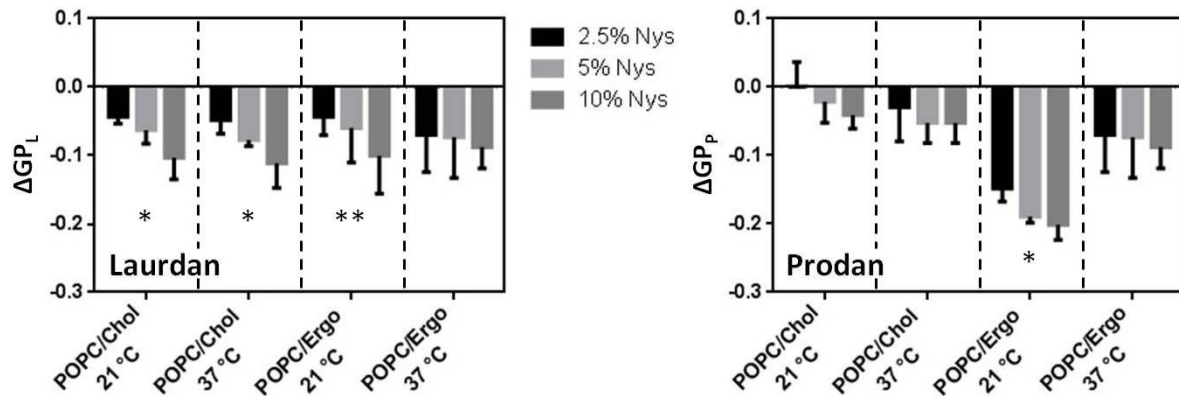


FIGURE 11.30 – ΔGP s engendrés par la Nys sur des liposomes de 400 nm à 21°C et 37°C. Les ΔGP s sont déterminés en utilisant les valeurs de GP de la figure 11.29. Les tests statistiques ont été effectués entre les valeurs obtenues pour 2,5 et 10% Nys. * : p-value inférieure à 0,1. ** : p-value inférieure à 0,01.

Pour ce diamètre, pour les liposomes de POPC/Chol 7 : 3 (mol/mol), les ΔGP s tant du Laurdan que du Prodan sont négatifs. Dans les deux cas, la température ne modifie pas ces ΔGP s : seule la concentration en Nys a un effet sur ces valeurs. Pour le Laurdan par exemple, le ΔGP_L passe de -0,04 pour une concentration en Nys de 2,5% à -0,11 pour une concentration en Nys de 10%. La modification du GP est plus importante pour le Laurdan que pour le Prodan.

Les ΔGP_L et ΔGP_P obtenus dans les liposomes contenant de l'Ergo sont plus négatifs que ceux des liposomes contenant du Chol. Dans le cas du Laurdan, plus la concentration est importante et plus le ΔGP_L est négatif. La température n'a pas d'incidence sur ces valeurs, situées autour de -0,08. Les valeurs de ΔGP_P POPC/Ergo sont beaucoup plus négatives : elles sont inférieures à -0,2 pour les liposomes contenant 10% Nys et ce quelle que soit la température.

Le fait que les ΔGP soit négatifs montre une augmentation du taux d'hydratation, traduisant d'une déstabilisation engendrée par la Nys sur l'ordre des lipides des vésicules contenant de l'Ergo et du Chol, tant au niveau des têtes polaires qu'au niveau des chaînes acyles : dans les deux cas, la Nys les fluidifie. La déstabilisation de l'ordre de toutes les vésicules étudiées est similaire au niveau des chaînes acyles. Elle est en revanche plus forte au niveau des têtes polaires pour les vésicules contenant de l'Ergo.

11.2.2.4 Conclusion des expériences sur l'enfouissement de la Nys

Nous avons comparé les valeurs de ΔGP obtenues pour les LUVs POPC/stérol de 200 et 400 nm contenant 10% Nys. Cette analyse est reportée figure 11.31.

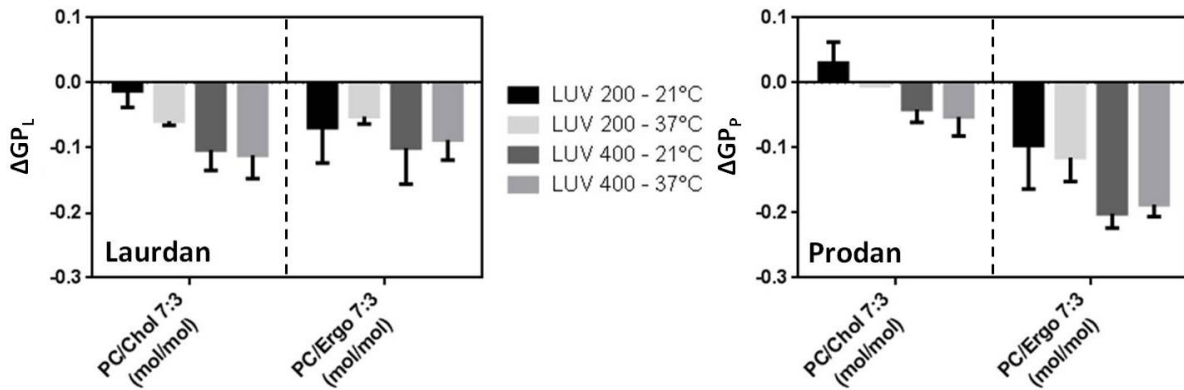


FIGURE 11.31 – Comparaison des ΔGPs engendrés par la Nys sur des liposomes de 200 nm et 400 nm à 21°C et 37°C. Les comparaisons sont faites entre les mélanges POPC/Stérol 7 : 3 (mol/mol) + 10% Nys.

Les vésicules contenant du Chol voient leur GP_L et GP_P diminuer avec l'augmentation de la taille des vésicules : la Nys perturbe plus l'ordre des lipides lorsque le diamètre des liposomes augmente.

Concernant les vésicules contenant de l'Ergo, l'augmentation de la taille des vésicules fait aussi augmenter les valeurs de ΔGP_P : il est égal à 0,13 et 0,22 pour des LUVs de 200 et de 400 nm, respectivement. L'augmentation de la taille des LUVs augmente donc les interactions entre la Nys et les têtes polaires des membranes des liposomes. La déstabilisation du GP_L est en revanche identique aux deux tailles.

Globalement, nous pouvons donc constater que les ΔGPs sont plus négatifs lorsque la taille des liposomes augmente, et ce quelle que soit la composition des vésicules (que ce soient celles contenant de l'Ergo ou du Chol).

Si nous considérons uniquement l'effet de la Nys sur les LUVs de 400 nm, quel que soit le stérol utilisé, les ΔGP_L sont équivalents. En revanche, le ΔGP_P des vésicules contenant de l'Ergo est plus négatif. La Nys déstabilise donc plus fortement l'ordre, mais aussi le taux d'hydratation des têtes polaires de ces liposomes. Il est possible d'imaginer qu'à faible concentration, la Nys se déposerait à la surface de la membrane, ce qui perturberait l'ordre des têtes polaires et formerait des pores de type I [165]. Le fort taux d'hydratation de la membrane confirmerait aussi que la Nys peut interagir avec les têtes polaires *via* une molécule d'eau [136]. Lorsque la concentration est suffisamment importante, elle serait plus enfouie dans la bicouche, ce qui perturberait alors l'ordre des chaînes acyles et provoquerait la formation de pores de type II [165]. Le fait que la Nys soit capable de perturber de manière plus importante l'ordre des membranes contenant de l'Ergo pourrait expliquer la meilleure toxicité de cette molécule pour les membranes fongiques.

11.3 Conclusions des expériences sur la Nys

Au cours de ces expériences, nous nous sommes concentrés sur la découverte de nouveaux partenaires d'interaction de la Nys dans les membranes cellulaires et sur la manière dont ces partenaires modulent l'interaction de la Nys avec les membranes. Les expériences d'insertion dans les monocouches de lipides ont montré qu'elle interagit préférentiellement avec les stéroïdes, mais aussi avec la PE.

L'insertion de la Nys dans les monocouches étudiées provoque une diminution de leur état de compaction. Pour les monocouches de DPPC, DPPE et de Chol, nous avons montré que la Nys serait au moins partiellement expulsée des monocouches, formant des agrégats de Nys ou enrichis en Nys. Des structures tridimensionnelles sont observées dans les monocouches d'Ergo mais elles ne correspondent pas à une expulsion de la Nys puisque rien n'est visible sur les courbes de Ks. Aucune structure n'est observée en revanche dans les monocouches de POPE. Tout comme pour l'Ergo, la Nys n'est jamais expulsée de ce type de monocouche. La faible compaction de la monocouche de POPE pourrait être la raison de ce phénomène.

Des mimes des feuillettes externes et internes de membranes biologiques ont montré une meilleure insertion de la Nys dans les monocouches mimant les membranes fongiques. Par ailleurs, ces expériences ont montré que cette molécule pourrait solubiliser le feuillet interne des membranes fongiques. La POPE empêcherait cependant la perméabilisation des macromolécules par la Nys.

La perturbation de l'ordre lipidique des bicouches par la Nys dépend de la taille des vésicules, mais aussi du type de stérol utilisé. La perturbation par la Nys de l'ordre lipidique de vésicules contenant de l'Ergo est plus importante que celle des vésicules contenant du Chol et se produit principalement au niveau des têtes polaires.

Interactions de l'Amphotéricine B avec des modèles membranaires

L'AmB est un polyène du deuxième groupe. Elle ne diffère que très peu de la Nys : elle possède 7 double liaisons conjuguées, tandis que la Nys possède 4 + 2 doubles liaisons conjuguées¹. Malgré cette ressemblance structurale, le fait que l'AmB soit plus efficace que la Nys pourrait être dû à des mécanismes d'action différents.

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme d'action général des polyènes, nous avons étudié les effets de l'AmB sur des modèles membranaires afin de les comparer avec ceux de la Nys. Comme pour cette dernière, nous avons d'abord étudié l'insertion de l'AmB dans des monocouches de lipides purs afin de déterminer d'éventuels partenaires membranaires. Nous avons ensuite étudié les perturbations provoquées par l'AmB sur les propriétés physiques des partenaires potentiels, afin de comparer ces perturbations avec celles provoquées par la Nys. L'étude de l'insertion de l'AmB dans des modèles mimant les feuillettes externes et internes des membranes a aussi été réalisée. Enfin, nous avons suivi la modification de l'ordre lipidique afin de comprendre quels sont les paramètres physico-chimiques favorisant l'action de l'AmB.

12.1 Interactions de l'AmB avec des monocouches de Langmuir

12.1.1 Propriétés interfaciales de l'AmB

Comme pour la Nys, nous avons étudié les propriétés tensioactives de l'AmB. La molécule, solubilisée dans du méthanol, a été injectée en sous-phase d'une interface sans lipide à différentes concentrations. La figure 12.1 représente la variation de la pression de surface en fonction de la concentration finale d'AmB dans le puits.

1. Les structures de la Nys et de l'AmB ont été montrées figure 5.1 page 53

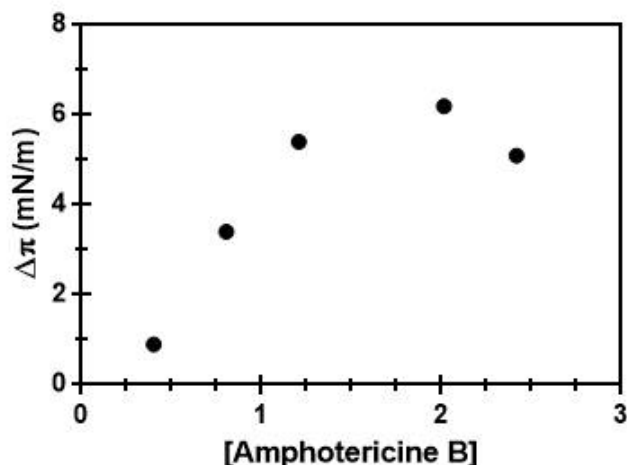


FIGURE 12.1 – **Variation de la pression de surface en fonction de la concentration d'AmB injectée.** Le tampon utilisé est un tampon Tris 10 mM à pH 7,4. L'expérience a été réalisée à 21°C. La pression de surface a été relevée 45 minutes après l'injection de la Nys dans la sous-phase.

L'injection de l'AmB dans la sous-phase provoque son adsorption sur une interface nue jusqu'à un maximum obtenu pour une concentration en AmB de 2 μM et un $\Delta\pi$ maximal de 6 mN/m. Ces valeurs sont du même ordre que celles obtenues précédemment pour la Nys. L'AmB, tout comme la Nys, est donc capable de remonter à l'interface air/eau. Elle modifie ainsi la tension de surface de l'eau. L'étude de monocouches d'AmB et de ses propriétés membranotropes est donc possible.

Nous avons, comme pour la Nys, déterminé l'isotherme de compression (π -A) de l'AmB, montrée figure 12.2.

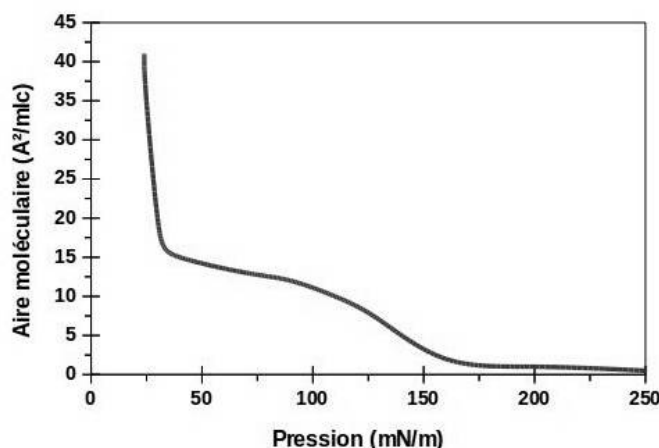


FIGURE 12.2 – **Isotherme de compression d'une monocouche d'AmB.** La sous-phase est un tampon Tris à 10 mM et à pH 7,4. L'expérience a été réalisée à 21°C.

Trois régions différentes sont visibles sur l'isotherme d'AmB. Tout d'abord, une première région durant laquelle la pression de surface augmente. Un plateau fait suite à cette phase ; durant ce plateau, la pression interfaciale évolue très peu. Des études sur l'AmB ont montré que ce plateau correspond à une réorientation de la molécule à l'interface air/eau,

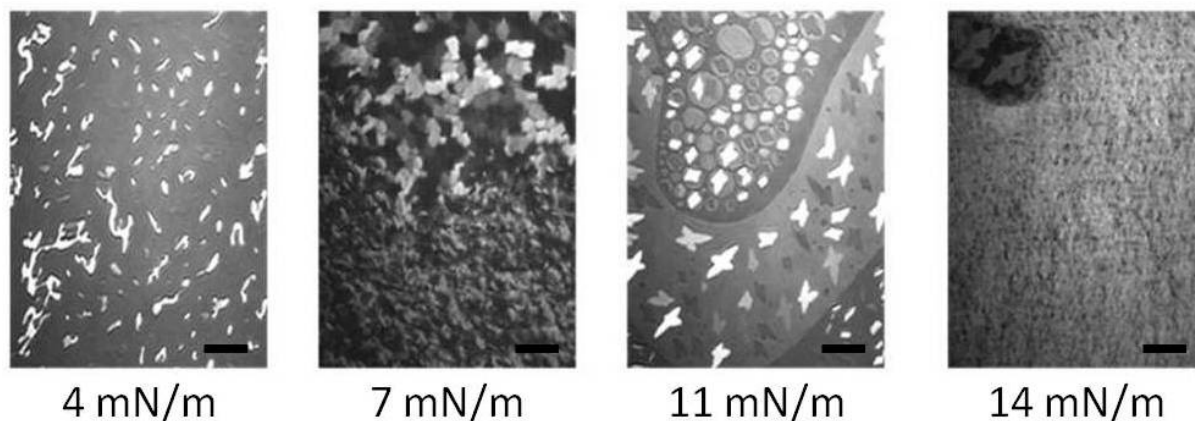


FIGURE 12.3 – **Images de BAM de l'AmB.** Le tampon utilisé est un tampon Tris 10 mM. La température est de 21°C. Les barres d'échelle représentent 50 μm .

passant d'une orientation horizontale à verticale [238]. La troisième région montre une forte augmentation de la pression de surface. Elle correspond à la compression de l'AmB lorsque toutes les molécules de la monocouche sont dans une conformation verticale. L'isotherme de compression est conforme à la littérature scientifique [134].

Afin d'étudier l'aspect de cette monocouche, des images de BAM ont été enregistrées durant sa compression. Elles sont présentées figures 12.3.

L'AmB possède différents niveaux d'organisation en fonction de la pression de surface. Elle se présente, à 4 mN/m, sous forme de structures très blanches, en forme de bâtonnets. À 7 mN/m, juste avant la transition de phase, les bâtonnets deviennent des structures plus larges mais avec des niveaux de gris différents. À 11 mN/m, durant la transition de phase, la monocouche d'AmB possède toujours différents de gris, mais avec des domaines en forme de croix. Ces images correspondraient à une réorientation de l'AmB à l'interface air/eau, les différents niveaux de gris correspondant à l'AmB en position allongée ou redressée [238]. Après la transition de phase, la monocouche apparaît sans forme particulière (14 mN/m) jusqu'à son collapse à 40 mN/m. Les images enregistrées sont conformes à la littérature scientifique [238].

12.1.2 L'AmB s'insère uniquement dans des monocouches enrichies en stérols

L'insertion de l'AmB dans des monocouches de lipides a été étudiée. Le but de cette étude est de déterminer si, comme pour la Nys, l'AmB est capable de s'insérer dans tous les types de membranes préformées.

L'AmB a été injectée en sous-phase à une concentration finale de 1,6 μM . Cette concentration correspond à celle utilisée lors des expériences d'insertion de la Nys dans les monocouches. Nous avons utilisé les deux mêmes stérols, c'est à dire l'Ergo et le Chol, et les mêmes phospholipiques que lors de l'étude avec la Nys.

12.1.2.1 Étude de l'insertion dans des monocouches de lipides

Nous avons tout d'abord étudié l'insertion de l'AmB dans des monocouches de phospholipides, les mêmes que ceux utilisés lors de l'étude de la Nys. Les cinétiques d'insertion de l'AmB dans les monocouches de DPPC, POPC, DPPE, POPE, DPPS et POPS sont présentées figure 12.4.

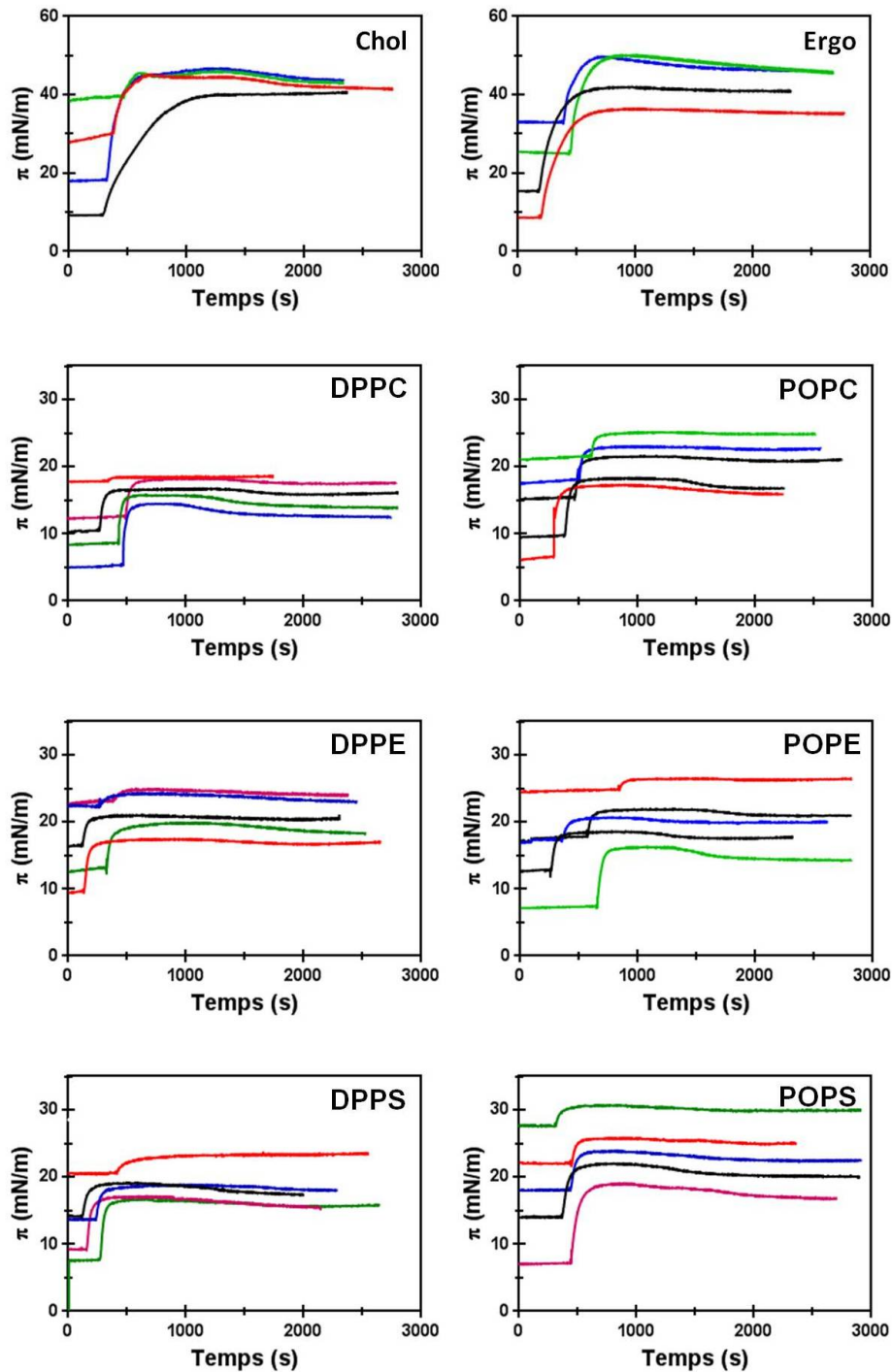


FIGURE 12.4 – Cinétiques d'insertion de l'AmB dans des monocouches de lipides. Le tampon utilisé est un tampon Tris 10 mM. Les expériences ont été réalisées à 21°C. La concentration finale en AmB injectée en sous-phase est de 1,6 μM .

Ces cinétiques montrent, tant pour le Chol que pour l'Ergo, une augmentation rapide et importante de la pression de surface. Cette augmentation atteint ensuite un plateau, stable dans le temps. Le profil de l'insertion de l'AmB dans ce type de monocouches est différent de ce qui a été obtenu pour la Nys. En effet, nous avons noté pour les monocouches de Chol une augmentation suivie d'une forte diminution de la pression de surface, jusqu'à obtenir, pour des pressions initiales autour de 30 mN/m, des $\Delta\pi$ négatifs (figure ?? page ??). Contrairement à la Nys, l'insertion de l'AmB dans les monocouches de Chol ne provoque pas la solubilisation à l'interface des monocouches de lipides.

Concernant les phospholipides, nous constatons une rapide augmentation de la pression jusqu'à atteinte d'une valeur maximale $\Delta\pi^{max}$, suivi d'un plateau. Comparées à celle obtenues pour la Nys pour les mêmes phospholipides, ces courbes ont une amplitude plus faible.

Nous avons ensuite représenté la fonction $\Delta\pi^{max} = f(\pi^{ini})$. Les courbes sont présentées figure 12.5.

Les droites de régression linéaire pour chacune des courbes est négative, signe d'une insertion de l'AmB dans les monocouches. Aussi, il est possible de déterminer les PIM et $\Delta\pi_{30}$ de chaque lipide. Ces valeurs sont reprises tableau 12.1.

Lipides	$\Delta\pi_{30}$	PIM	Écart-type
DPPC	-	20	1,1
POPC	0,2	31	0,6
DPPE	-	24	0,3
POPE	-	28	0,5
DPPE	-	26	1
POPS	1,5	32	1,1
Chol	12	43	1,8
Ergo	16	58	2,5

TABLE 12.1 – Valeurs de PIM et de $\Delta\pi_{30}$ obtenues pour l'AmB injectée sous différentes monocouches de lipides. Toutes les valeurs sont exprimées en mN/m.

Des PIMs de 58 mN/m pour Ergo et de 43 mN/m pour Chol ont été obtenues. L'AmB est donc capable de s'insérer dans des membranes d'Ergo et de Chol à des pressions supérieures à la pression estimée des membranes naturelles. Les $\Delta\pi_{30}$ sont de 16,2 mN/m pour Ergo et 12,7 mN/m pour Chol. Ces valeurs sont particulièrement élevées, traduisant une insertion massive de l'AmB dans ces monocouches à pression physiologique. En revanche, ces valeurs sont significativement différentes. L'AmB pénètre plus massivement dans des monocouches enrichies en Ergo qu'en Chol. Autrement dit, l'AmB s'insère dans les monocouches constituées de stérol des cellules de mammifère (le Chol) et de levures (l'Ergo) mais avec une préférence marquée pour le stérol des cellules de levures. Concernant les phospholipides, nous remarquons que des PIMs plus élevées ont été obtenues pour les phospholipides possédant une insaturation par rapport à ceux complètement saturés. La

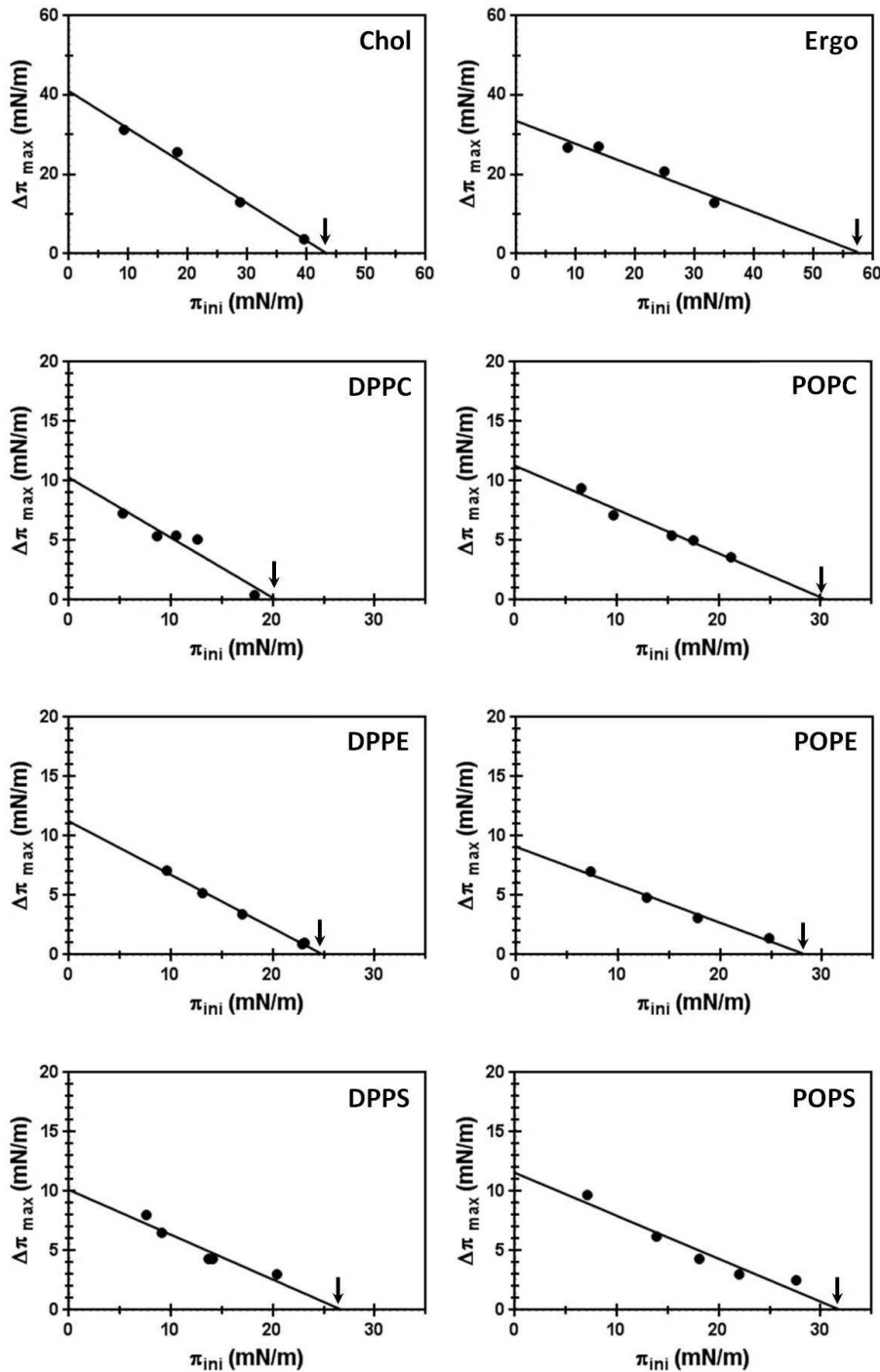


FIGURE 12.5 – Détermination de la PIM de l'AmB dans des monocouches de lipides. Les PIMs sont déterminées à partir des cinétiques d'insertion de l'AmB présentées figure 12.4. Les flèches pointent vers les PIMs.

PS, par exemple, affiche une PIM de 26 mN/m pour la DPPS contre 32 mN/m pour la POPS. Une telle augmentation avait déjà été observée avec la Nys. Cependant, quelle que soit la nature de la tête polaire ou le nombre d'insaturation dans les chaînes aliphatiques, les PIMs de l'AmB sont inférieures à 30 mN/m pour presque toutes les membranes préformées. Seules la POPC et la POPS possèdent une PIM supérieure à 30 mN/m : elles

sont respectivement de 31 mN/m et 32 mN/m. Cependant, leur $\Delta\pi_{30}$ est peu significatif : il est de 0,2 mN/m pour la POPC et de 1,5 mN/m pour la POPS. L'AmB est donc incapable de s'insérer à pression latérale physiologique dans les membranes préformées des phospholipides étudiés. Ce résultat est très différent de ce qui avait été obtenu pour la Nys, qui a été montrée comme capable de s'insérer dans tous les types de membranes phospholipidiques préformées étudiées.

12.1.2.2 Conclusions sur les propriétés membranotropes de l'AmB

Au cours de ces expériences, nous avons étudié le pouvoir membranotrope de l'AmB. Ces différentes expériences montrent un profil d'interaction de l'AmB avec les lipides très différent de ce qui avait été constaté pour la Nys. Pour les phospholipides, aucune valeur de PIM et de $\Delta\pi_{30}$ n'est significativement supérieure à 30 mN/m. L'AmB n'est donc pas capable de s'insérer à pression physiologique dans ces monocouches. Cependant, sachant que cette molécule est capable de perméabiliser les liposomes de PC [234], voire même de provoquer leur fusion [237], il est très probable que l'AmB interagissent tout de même avec des membranes dépourvues de stérol. Il est probable que cette insertion ne soit possible que dans des bicouches lipidiques.

L'insertion de l'AmB dans les monocouches de stérol est en revanche importante. Par ailleurs, comme montré tableau 12.1, il existe une différence significative de $\Delta\pi_{30}$ entre l'Ergo et le Chol : ce polyène s'insère préférentiellement dans les membranes d'Ergo. Ce phénomène pourrait en partie être responsable de l'interaction préférentielle de l'AmB avec les membranes fongiques.

12.1.3 L'AmB modifie les propriétés biophysiques des monocouches de stérols

Afin de caractériser les modifications apportées par l'AmB sur les propriétés biophysiques des lipides, nous avons tracé les isothermes de compression et calculé les Ks de mélanges stérols/AmB à différentes concentrations, de 0 à 10%. Des images de BAM ont été enregistrées durant la compression. Comme montré précédemment, l'AmB s'insère uniquement dans les monocouches de stérols. De ce fait, nous n'avons pas étudié les isothermes d'autres monocouches de lipides.

Les courbes d'isothermes et de Ks de mélanges stérols/AmB sont présentées figure 12.6.

Les profils de l'isotherme et du Ks du Chol et de l'Ergo ont été discutés section 11.1.3.3 page 116. Brièvement, le Chol et l'Ergo ont une aire moléculaire de 40 et 48 Å²/mlc et s'organisent en phase solide.

Les isothermes de compression des mélanges Chol/AmB possèdent toutes des aires molé-

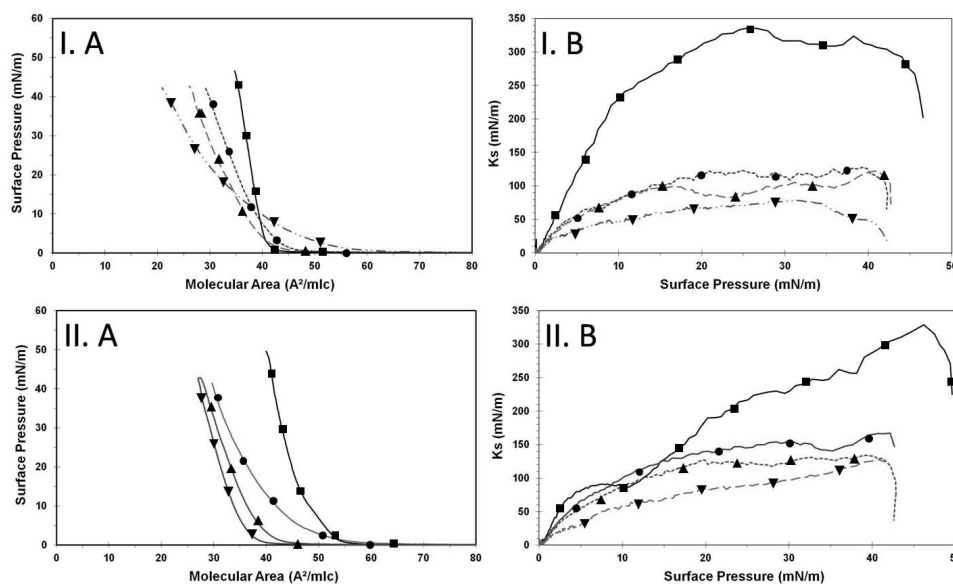


FIGURE 12.6 – Isothermes de compression de mélanges stérols/AmB I : Chol; II : Ergo. A : Isothermes de compression des monocouches de stérols contenant 0% (carrés) ; 2.5% (cercles) ; 5% (triangles) et 10% (triangles inversés) AmB. B : Module d'élasticité des monocouches. La sous-phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Les courbes sont représentatives de trois expériences indépendantes.

culaires autour de $40 \text{ \AA}^2/\text{mlc}$. Cependant, l'AmB provoque une diminution importante des K_s du Chol et de l'Ergo. Pour le Chol, à 20 mN/m , il est de 300 mN/m pour le lipide seul, contre 100 mN/m pour le mélange Chol/AmB 2,5% et de 85 mN/m pour les mélanges Chol/AmB 5 et 10%. Pour l'Ergo, à 20 mN/m , le K_s de la monocouche du lipide pur est de 180 mN/m . Dès 2,5% en AmB, ce K_s devient inférieur à 100 mN/m . L'AmB diminue donc très fortement la compaction des monocouches de stérol dès les faibles concentrations. Nous pouvons aussi remarquer une diminution de la pression de collapse. Pour le Chol, elle passe de 47 mN/m pour le lipide pur contre 42 mN/m pour tous les mélanges. Pour l'Ergo, elle passe de 50 mN/m à 42 mN/m pour tous les mélanges. Ces valeurs sont proches de la pression de collapse de l'AmB seule, autour de 41 mN/m . Tout comme la Nys, l'AmB diminue la compaction des monocouches de stérol. Elle modifie aussi la pression de collapse des monocouches vers une valeur proche de sa propre pression de collapse.

Pour suivre l'évolution des différentes phases lipidiques, des images de BAM ont été enregistrées durant la compression des monocouches de Chol/AmB et Ergo/AmB et sont présentées figure 12.7 et 12.8.

Les images de la monocouche de Chol pur ont été commentées section 11.1.3.3. Brièvement, ces images montrent une organisation rapide de la monocouche de Cholestérol en phase solide avec la présence d'un seul niveau de gris.

Les images des mélanges Chol/AmB montrent une diminution du recouvrement de la phase solide, et cela dès les faibles pressions ($0,4 \text{ mN/m}$) et les faibles concentrations (2,5%) d'AmB. Cette diminution de recouvrement est dépendante de la concentration

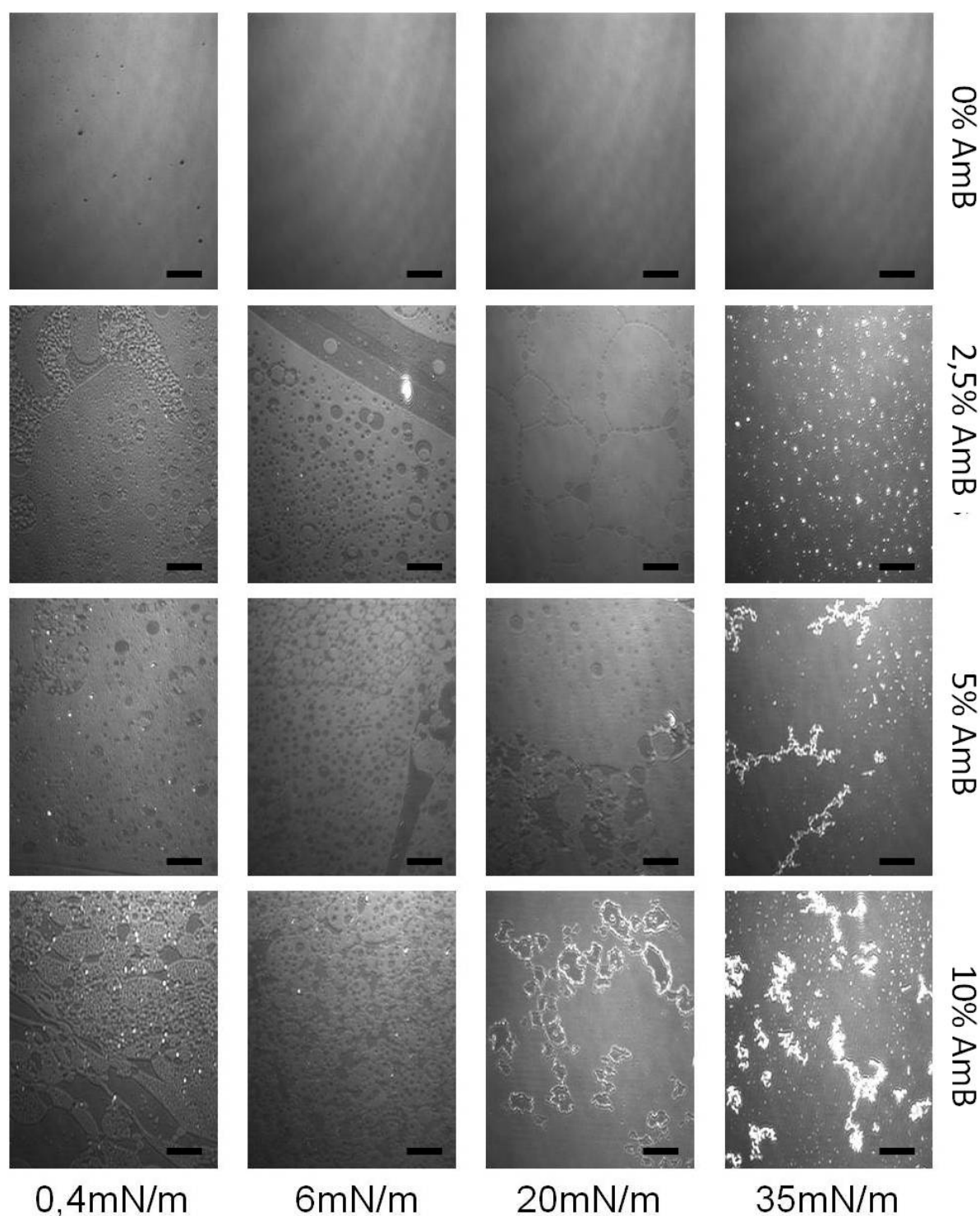


FIGURE 12.7 – Images de BAM des monocouches de Chol/AmB La sous phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Sur les images de BAM, les barres d'échelle représentent 50 μm

en AmB. Par ailleurs, pour des concentrations de 5 et 10%, des structures compactes font leur apparition. Ces structures ont tendance à disparaître à 6 mN/m : elles sont moins nombreuses. Ce phénomène pourrait être dû à une réorientation des molécules d'AmB à l'interface. De plus, contrairement à la monocouche de lipide pur, les mélanges

Chol/AmB ne sont toujours pas complètement organisés en phase solide. À 20 mN/m, pour le mélange Chol/AmB 2,5%, la monocouche est presque complètement en phase solide. Ce n'est pas le cas pour les autres mélanges, le recouvrement de la phase solide n'étant pas totale. Pour ces concentrations (5 et 10% AmB), des structures compactes réapparaissent et sont localisées au niveau des lignes de défauts des domaines lipidiques. Pour une concentration de 10% AmB, ces structures entourent complètement des domaines moins denses. L'avancée de la compression de la monocouche (35 mN/m) va provoquer l'apparition de structures compactes à 2,5%. Elle entraîne aussi une compaction des domaines moins denses, qui deviennent par la suite des structures beaucoup plus compactes que le reste de la monocouche. D'ailleurs, à 10%, la forme de ces structures n'est pas sans rappeler la forme des domaines de faible compaction observés à 20 mN/m. Ces domaines moins denses sont très probablement enrichies en AmB. Il est donc tout aussi probable que les structures compactes engendrées par ces domaines soient enrichies en AmB.

Ces expériences montrent que l'AmB provoque une diminution importante de l'état de compaction des monocouches de Chol. L'AmB, tout comme la Nys, favoriserait donc la formation de domaines lipidiques peu compacts et se localiserait préférentiellement dans ces domaines. Lorsque la pression latérale de la monocouche augmente, l'AmB provoque la formation de structures de taille importante. Il est très probable que ces structures soient tridimensionnelles, tout comme elles le sont pour la Nys. En revanche, aucune chute de K_s n'a été observée, ce qui montre que l'AmB n'est pas expulsée des monocouches de Chol.

Des images de BAM des mélanges Ergo/AmB ont aussi été enregistrées durant la compression des monocouches et sont présentées figure 12.8.

Les images de l'Ergo seul ont été commentées section 11.1.3.3. Brièvement, ces images montrent une organisation rapide de la monocouche d'Ergo en phase solide.

L'ajout d'AmB dans la monocouche d'Ergo provoque une diminution du recouvrement de la phase solide, plus blanche sur les images, cela dès les faibles pressions (0,4 mN/m) et pour toutes les concentrations. Cette diminution dépend par ailleurs de la concentration en AmB dans la monocouche. L'augmentation de la pression (6 et 20 mN/m) ne modifie que peu l'aspect de la monocouche : seul le recouvrement de la phase solide a l'air d'être modifié. En revanche, à 35 mN/m, de nombreuses structures compactes circulaires de tailles différentes apparaissent. Le nombre de ces structures est beaucoup plus important lorsque la concentration en AmB augmente. Ces structures sont visiblement plus nombreuses que sur les images obtenues avec le Chol.

L'AmB diminue donc l'état de compaction des monocouches d'Ergo. Il favorise la formation de domaines de faible compaction, dans lesquels elle se localiserait préférentiel-

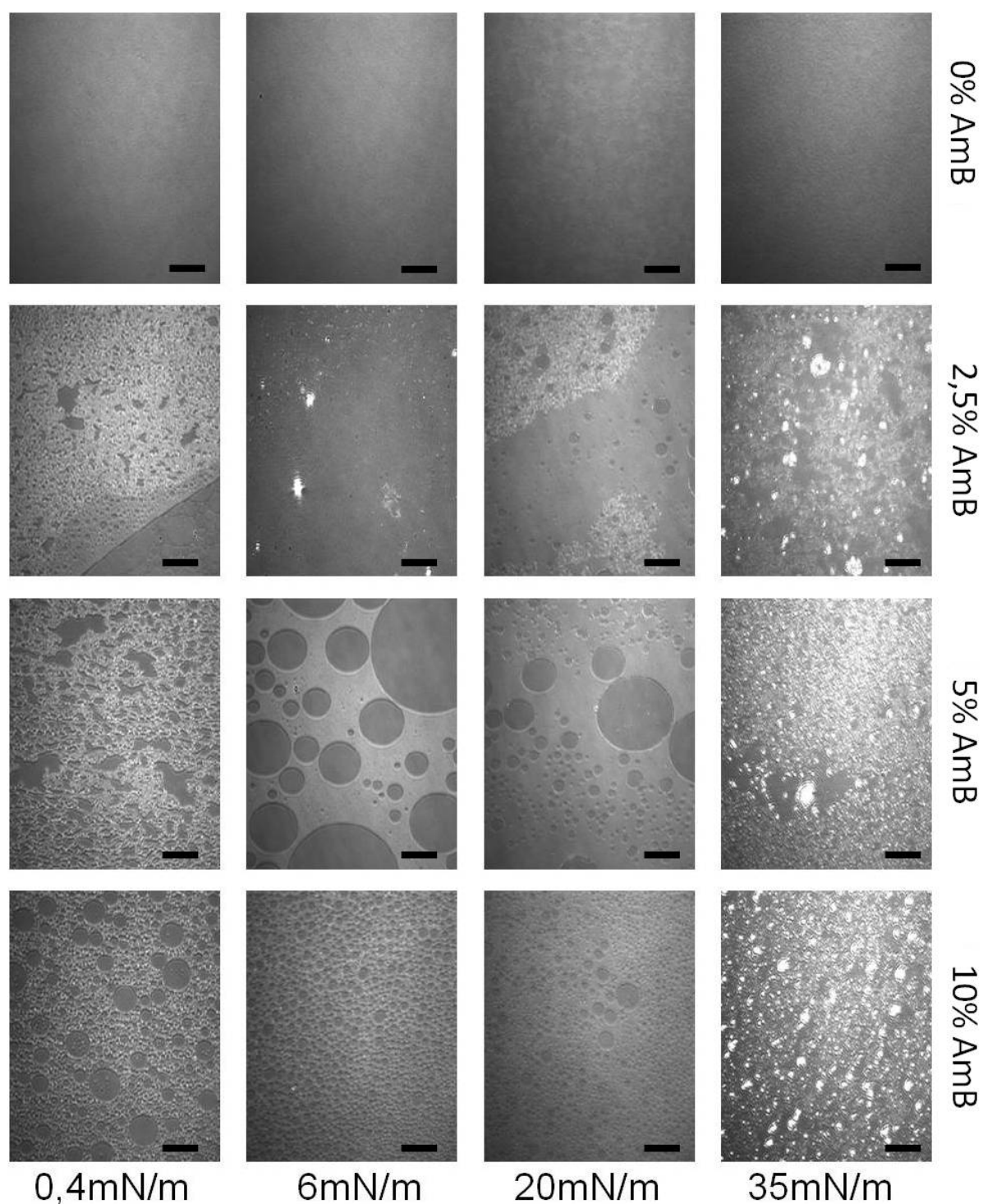


FIGURE 12.8 – Images de BAM des monocouches d'Ergo/AmB La sous phase est un tampon Tris 10 mM, pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C. Sur les images de BAM, les barres d'échelle représentent 50 μm.

lement. Par ailleurs, l'AmB participe à la formation de nombreuses structures compactes dans la monocouche. Tout comme pour le Chol, aucune chute de Ks n'a été observée, ce qui montre que l'AmB n'est pas expulsée des monocouches d'Ergo.

12.1.4 La POPE est plus favorable à l'insertion de l'AmB dans les monocouches enrichies en Ergo que la POPC

Nous avons étudié les propriétés membranotropes de l'AmB pour des monocouches représentant les feuillettes externes et internes de membranes de cellules animales (mélanges POPC/Chol et POPE/Chol) et fongiques (mélanges POPC/Ergo et POPE/Ergo). Ces expériences nous permettent de déterminer la capacité de l'AmB à interagir avec des monocouches contenant les lipides majoritaires de ces différents feuillettes, mais aussi de déterminer si l'environnement phospholipide joue un rôle dans l'interaction membrane/AmB, comme cela a été montré pour la Nys.

Nous avons utilisé des mélanges lipidiques contenant un pourcentage croissant d'Ergo ou de Chol avec de la POPC ou de la POPE. Comme pour les études avec la Nys, nous avons fixé la pression initiale à 30 ± 2 mN/m. Les cinétiques d'insertion de l'AmB pour les différents mélanges utilisés sont montrées figure 12.9.

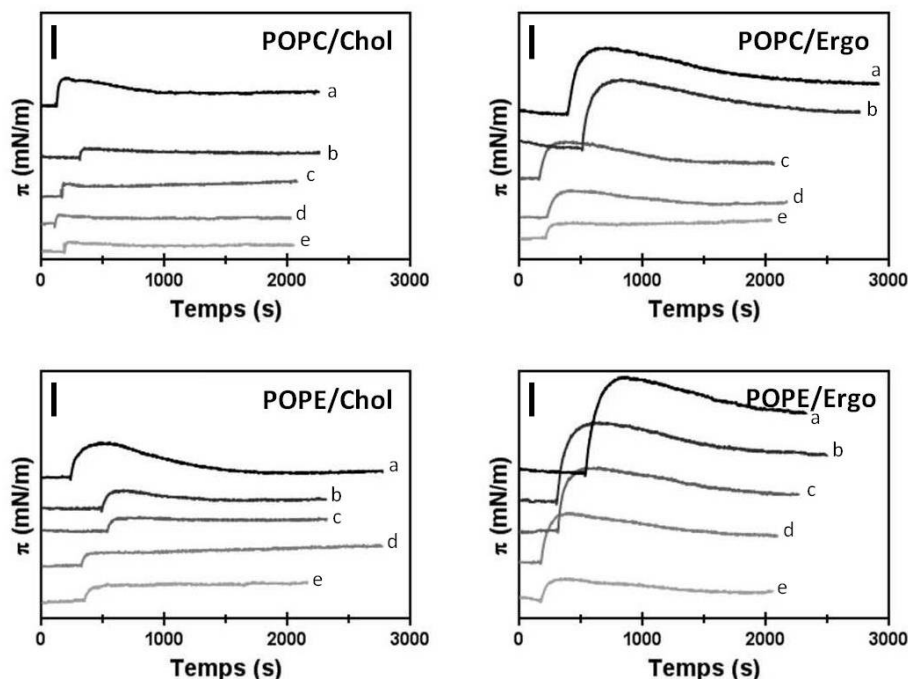


FIGURE 12.9 – Cinétiques d'insertion de l'AmB dans des mélanges phospholipides/stérois. a-e : ratios molaires phospholipide/stérol. a : 1 : 1 ; b : 3 : 2 ; c : 7 : 3 ; d : 4 : 1 ; e : 5 : 1. La barre d'échelle en haut à gauche représente 5 mN/m. Chaque courbe est représentative de trois expériences indépendantes. Les expériences ont été réalisées à une pression initiale de 30 ± 2 mN/m. Les lipides ont été déposés sur un tampon Tris 10 mM à pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C.

Pour tous les mélanges étudiés, l'injection d'AmB provoque une augmentation de la pression latérale jusqu'à une valeur seuil. Puis, la pression diminue jusqu'à atteindre d'un plateau après lequel la pression n'évolue plus. Les augmentations de pression sont à première vue plus marquées pour les mélanges contenant l'Ergo que pour les mélanges contenant le Chol. Par ailleurs, les diminutions de pression après atteinte de la π_{max} semblent moins marquées que celles observées pour la Nys, figure 11.19 page 123, notamment pour les

mélanges contenant l'Ergo.

À partir de ces cinétiques, nous avons déterminé le $\Delta\pi_{30}^{max}$ engendré par l'AmB en fonction de la concentration en stérol. L'équation de la fonction a été décrite lors de l'étude de la Nys (équation 11.2 page 124). Les courbes obtenues sont présentées figure 12.10.

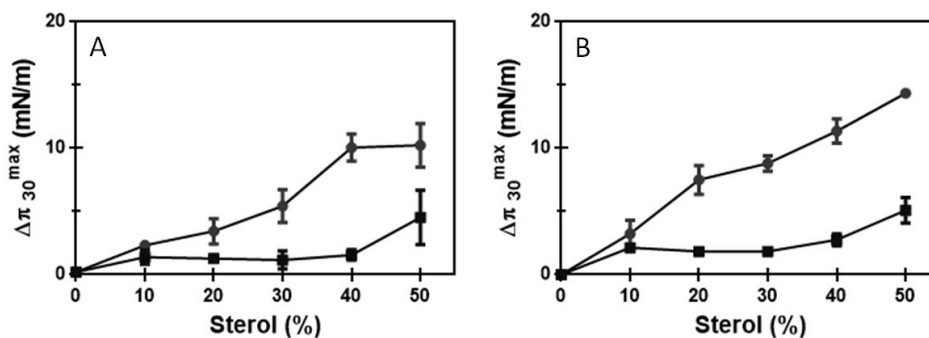


FIGURE 12.10 – Évolution du $\Delta\pi_{30}^{max}$ de l'AmB dans des monocouches de POPE ou POPC mélangées avec différentes concentrations en stérol. A : Mélanges POPC/stérols. B : Mélanges POPE/stérols. Carrés : Chol; Cercles : Ergo. Chaque point représente la moyenne de 3 répétitions indépendantes.

L'évolution du $\Delta\pi_{30}^{max}$ est différente selon le mélange utilisé. Pour les mélanges contenant du Chol, quel que soit le phospholipide associé, la pression ne varie qu'à partir de 40% de Chol. L'AmB engendre cependant une augmentation de la pression dans les mélanges contenant le l'Ergo. Cette augmentation atteint une valeur seuil à 40% Ergo pour POPC/Ergo, tandis qu'elle est en constante évolution pour POPE/Ergo. À 40% stérol, les $\Delta\pi_{30}^{max}$ sont de 10 et 14 mN/m pour POPC/Ergo et POPE/Ergo, respectivement. Ainsi, l'AmB est capable de modifier plus fortement la tension de surface des mélanges POPE/Ergo, ce qui pourrait correspondre à une interaction plus importante avec ces monocouches. Notons que l'insertion de l'AmB dans des monocouches contenant de l'Ergo est beaucoup plus importante que dans les monocouches contenant du Chol, comme le montrent les $\Delta\pi_{30}^{max}$ obtenus. Par exemple, la différence de pression observée pour les monocouches de POPE avec un pourcentage d'Ergo de 40% est 4 fois supérieure à celle observée pour le même mélange contenant du Chol, soit respectivement 11,3 mN/m contre 2,7 mN/m. Les $\Delta\pi_{30}^{max}$ sont aussi plus importants dans les monocouches contenant de la POPE par rapport à celle contenant de la POPC. En effet, comme dit plus haut, pour 50% d'Ergo, le $\Delta\pi_{30}^{max}$ est de 14,3 mN/m pour POPE contre 10,2 mN/m pour POPC. L'AmB s'insérerait donc plus massivement dans des monocouches enrichies en PE et en Ergo.

Comme remarqué figure 12.9, les cinétiques d'insertion possèdent une phase de diminution de la pression, jusqu'à obtention d'un plateau. Comme pour la Nys, ces phases de diminution peuvent correspondre à des réarrangements structuraux au sein de la monocouche (diminution) jusqu'à atteindre une conformation plus favorable (plateau). En revanche, ces variations ont à première vue une amplitude plus faible que ce qui avait été

obtenue pour la Nys. Afin de comparer ces valeurs, nous nous sommes intéressés à l'évolution du $T_{30}^{-5\%}$ de l'AmB dans les monocouches de phospholipides/Ergo. Les courbes sont présentées figure 12.11.

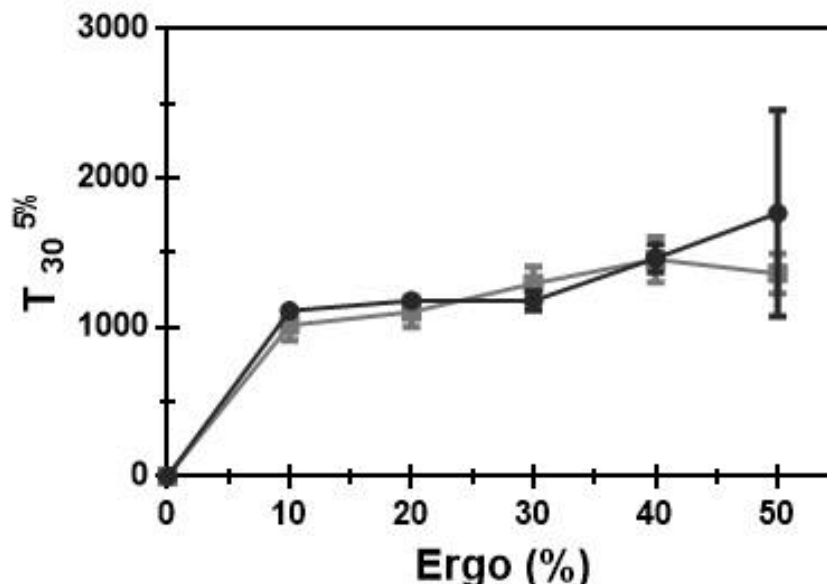


FIGURE 12.11 – Évolution du $T_{30}^{-5\%}$ de l'AmB dans des monocouches de POPC/Ergo et POPE/Ergo. Carrés : POPE; cercles : POPC. Chaque valeur de $T_{30}^{-5\%}$ représente la moyenne de trois expériences différentes.

L'analyse de ces courbes montre une augmentation rapide du $T_{30}^{-5\%}$ dès 10% stérols, suivi d'une faible évolution. Ce temps est toujours compris entre 1000 et 1800s, que ce soit pour POPC ou POPE. Le pourcentage en stérol de la monocouche ne modifie donc pas le temps nécessaire à l'AmB pour adopter une conformation plus favorable. Ce résultat est différent de ce qui avait été précédemment obtenue avec la Nys, figure 11.21 page 125, pour laquelle nous avons observé une diminution de la vitesse de réarrangement de la monocouche en fonction de la concentration en Ergo et en Chol.

Pour déterminer l'impact de ces réarrangements sur les monocouches, nous nous sommes enfin intéressés à la variation du $\Delta\pi_{30}^{fin}$ des mélanges POPC/Ergo et POPE/Ergo. Ces valeurs correspondent à la variation de pression entre l'état initial de la monocouche et l'état final, lorsque la pression n'évolue plus. Les courbes sont présentées figure 12.12. La variation du $\Delta\pi_{30}^{fin}$ semble suivre la même évolution que les courbes représentant l'évolution du $\Delta\pi_{30}^{max}$ présentées précédemment : il augmente de manière continue en fonction de la concentration en stérol. Ainsi, plus il y a de stérol et plus l'AmB s'insère dans les monocouches. De plus, les valeurs de $\Delta\pi_{30}^{fin}$ sont plus importantes pour les mélanges POPE/Ergo que pour les mélanges POPC/Ergo : l'insertion de l'AmB dans ce

2. Pour rappel, cette valeur correspond au temps nécessaire pour obtenir une perte de 5% du $\Delta\pi^{max}$. Nous considérons ce pourcentage suffisamment important pour qu'il ne s'agisse pas de bruit de fond venant de l'appareil de mesure.

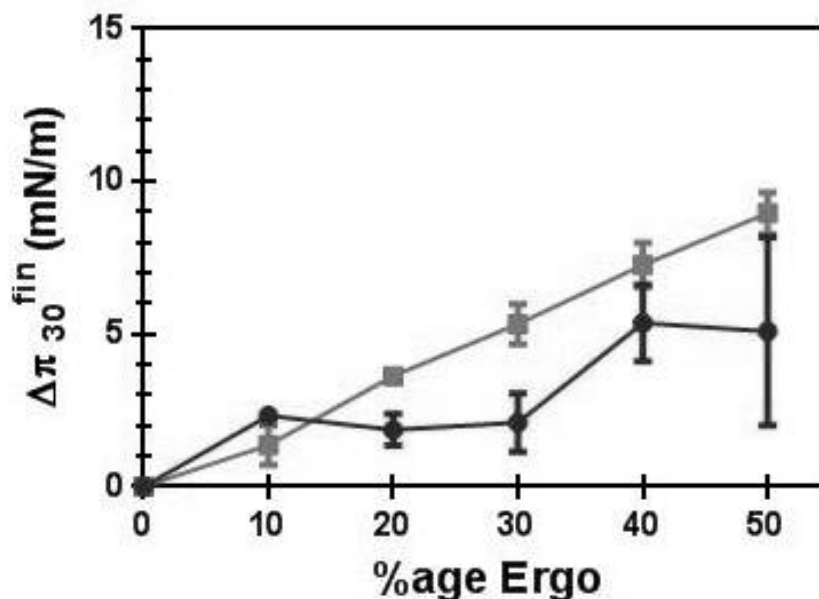


FIGURE 12.12 – Évolution du $\Delta\pi_{30}^{fin}$ en fonction de la concentration en Ergo. Carrés : POPE; cercles : POPC. Chaque point représente la moyenne de trois expériences différentes.

type de monocouche est plus importante.

De ces expériences, nous pouvons conclure que l'insertion de l'AmB dans les monocouches contenant du Chol est beaucoup moins importante que dans les monocouches contenant de l'Ergo. Cette différence s'ajoute à la différence d'insertion de l'AmB constatée entre les monocouches d'Ergo et de Chol lors de l'étude des propriétés membranotropes de cette molécule. Ainsi, le type de stérol modulerait l'insertion de l'AmB dans les monocouches.

Les stérols ne seraient pas les seules molécules à moduler l'insertion de l'AmB dans les monocouches. En effet, les résultats montrent que l'AmB s'insère plus facilement dans les monocouches contenant de la POPE que dans celles contenant de la POPC. Autrement dit, le modèle membranaire utilisé pour mimer le feuillet interne de la membrane est plus favorable à l'insertion de l'AmB que celui utilisé pour mimer le feuillet externe des membranes fongiques. Ce résultat est similaire à celui obtenu pour la Nys.

Cependant, il existe dans le mécanisme d'action de la Nys et de l'AmB une différence de taille, mise en avant par l'étude du $\Delta\pi_{30}^{fin}$. Pour l'AmB, nous avons montré que l'augmentation de la concentration en stérol provoquait une augmentation de cette valeur. Ce résultat est complètement différent de ce qui avait été obtenu pour la Nys figure 11.22 page 126. Nous avons montré alors que la Nys provoquait des $\Delta\pi_{30}^{fin}$ négatifs, signe qu'elle solubilisait les lipides à l'interface des monocouches de POPE/Ergo. Cela montre que la Nys posséderait un mécanisme d'interaction avec les membranes que ne possède pas l'AmB : elle serait capable de solubiliser spécifiquement certains types de membranes,

contrairement à l'AmB. Ce résultat tendrait à montrer que ces deux polyènes, pourtant de structure très proche, ne partageraient pas le même mécanisme d'interaction avec les membranes.

12.2 L'AmB modifie très fortement l'ordre des membranes

Comme pour la Nys, nous avons utilisé deux sondes fluorescentes, le Laurdan et le Prodan, afin de caractériser l'influence de l'AmB sur l'ordre des lipides au sein de liposomes. Nous nous sommes focalisés sur l'effet des stérols, de la température et de la taille des vésicules. Nous avons utilisé pour cela deux compositions lipidiques différentes : POPC/Ergo 7 : 3 (mol/mol) et POPC/Chol 7 : 3 (mol/mol), représentant respectivement les membranes des cellules fongiques et de mammifères. Nous avons pour cela utilisé deux tailles différentes de LUVs, 200 nm et 400 nm, ce qui nous permettra de déterminer l'impact du rayon de courbure des liposomes sur l'insertion de l'AmB dans les monocouches.

12.2.0.1 Interactions de l'AmB avec des liposomes de 200 nm

La figure 12.13 reprend les résultats obtenus pour des liposomes de 200 nm de diamètre.

Concernant l'effet de l'AmB sur les liposomes contenant du Chol, une forte diminution du GP_L est obtenue, quelle que soit la température. Cet effet est dépendant de la concentration. Le GP_P est quant à lui très peu modifié.

Concernant les LUVs contenant de l'Ergo, il existe une modification du GP tant au niveau du Laurdan que du Prodan et ce tout au long de l'expérience, quelle que soit la température. La diminution du GP est dépendante de la concentration en AmB.

Pour faciliter la lecture de ces courbes, nous avons représenté les valeurs de ΔGP à 21°C et à 37°C (figure 12.14).

D'une manière générale, l'ajout de l'AmB dans les membranes des LUVs provoque une diminution des GPs. Ce résultat traduit d'une augmentation de l'hydratation tant au niveau des chaînes acyles que des têtes polaires. L'AmB diminue donc l'ordre des lipides et fluidifie les membranes. Ce résultat rappelle celui obtenu avec les isothermes de compression des lipides, qui montraient que l'AmB favorisait l'apparition de domaines de faible compaction.

Concernant les liposomes contenant du Chol, l'AmB modifie fortement les ΔGP_L , avec par exemple une valeur de -0,23 pour les vésicules contenant 10% Nys, à 21 et 37°. Cette modification est dépendante de la concentration en AmB mais indépendante de la température. Les ΔGP_P , eux, varient très faiblement au regard des ΔGP_L , avec des valeurs inférieures à -0,05. Ces valeurs suggèrent une localisation profonde de l'AmB, qui

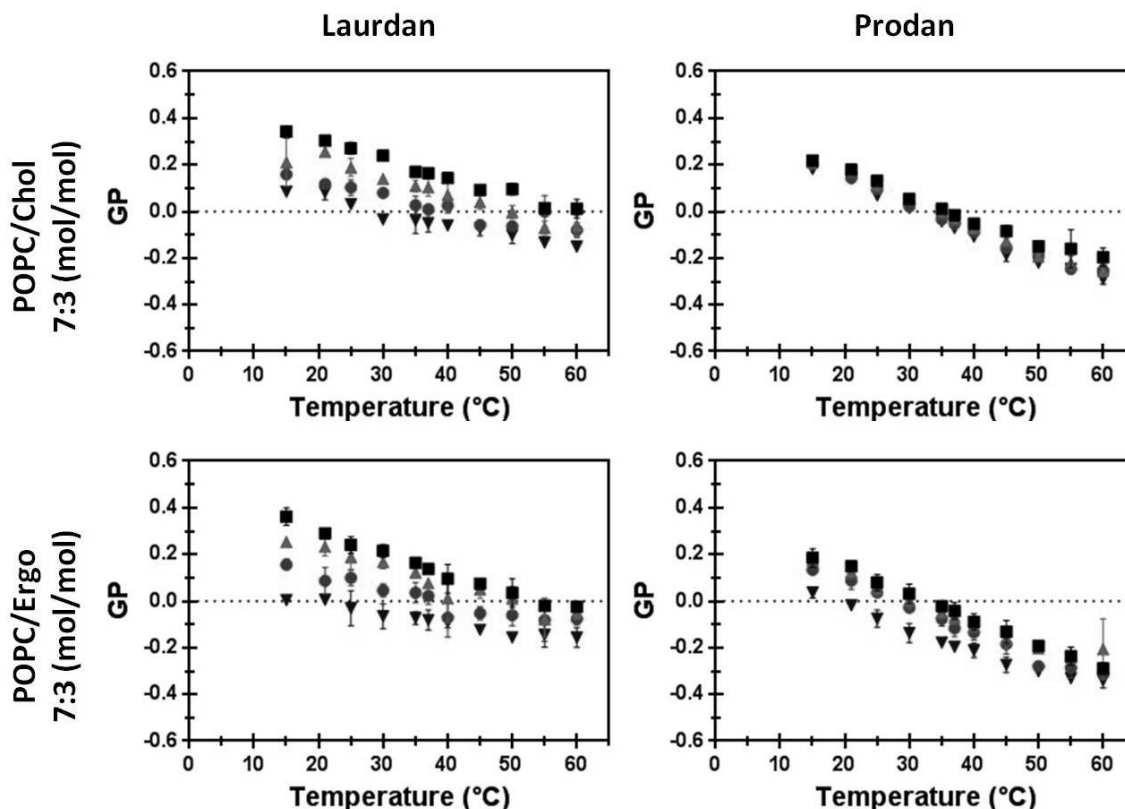


FIGURE 12.13 – Effet de l’AmB sur le GP du Laurdan et du Prodan dans des LUVs de 200 nm de différentes compositions. Cercle : Lipide seul ; Carré : +2,5% AmB ; triangle : +5% AmB ; triangle inversé : +10% AmB. L’expérience a été réalisée à des températures variant de 15°C à 60°C dans un tampon Tris 10 mM, pH 7,4.

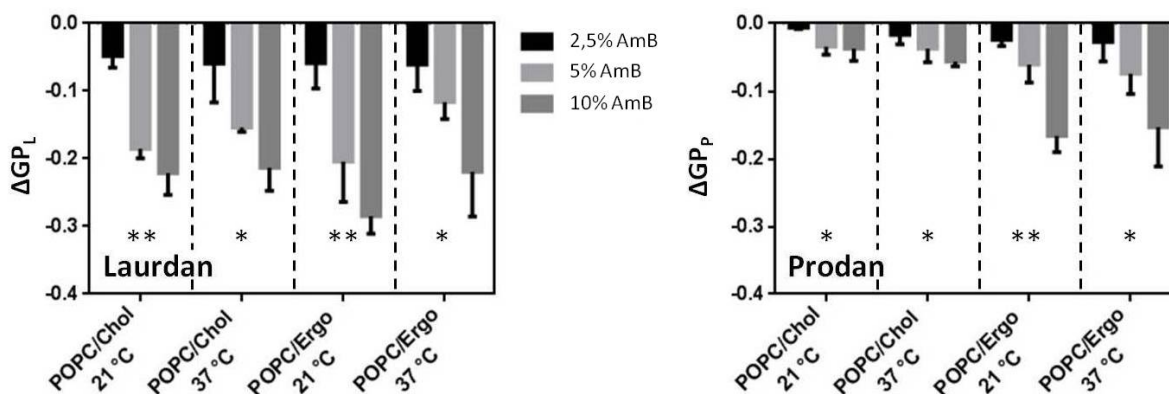


FIGURE 12.14 – ΔGPs engendrés par l’AmB sur des liposomes de 200 nm à 21°C et 37°C. Les ΔGPs sont déterminés en utilisant les valeurs de GP montrées figure 12.13. Les tests statistiques ont été effectués entre les valeurs obtenues pour 2,5 et 10% AmB. * : p-value inférieure à 0,1. ** : p-value inférieure à 0,01.

se situerait au niveau des chaînes acyles des lipides pour cette composition et cette taille de LUV.

Concernant les liposomes contenant de l’Ergo, le GP_L et le GP_P varient uniquement en

fonction de la concentration en AmB : plus la concentration est importante et plus les ΔGPs deviennent négatifs. Les ΔGP_L sont équivalents à ceux obtenus pour les vésicules contenant du Chol. En revanche, les ΔGP_P de l'Ergo sont plus négatifs : la modification de l'ordre lipidique généré par l'AmB sur les vésicules contenant de l'Ergo est donc plus importante. Ainsi, l'AmB interagirait plus fortement avec les têtes polaires des vésicules contenant de l'Ergo que celles contenant du Chol.

12.2.0.2 Interactions de l'AmB avec des liposomes de 400 nm

Nous avons ensuite étudié l'importance de la taille des vésicules dans l'interaction AmB/membranes en utilisant des LUVs de 400 nm. Les résultats sont présentés figure 12.15.

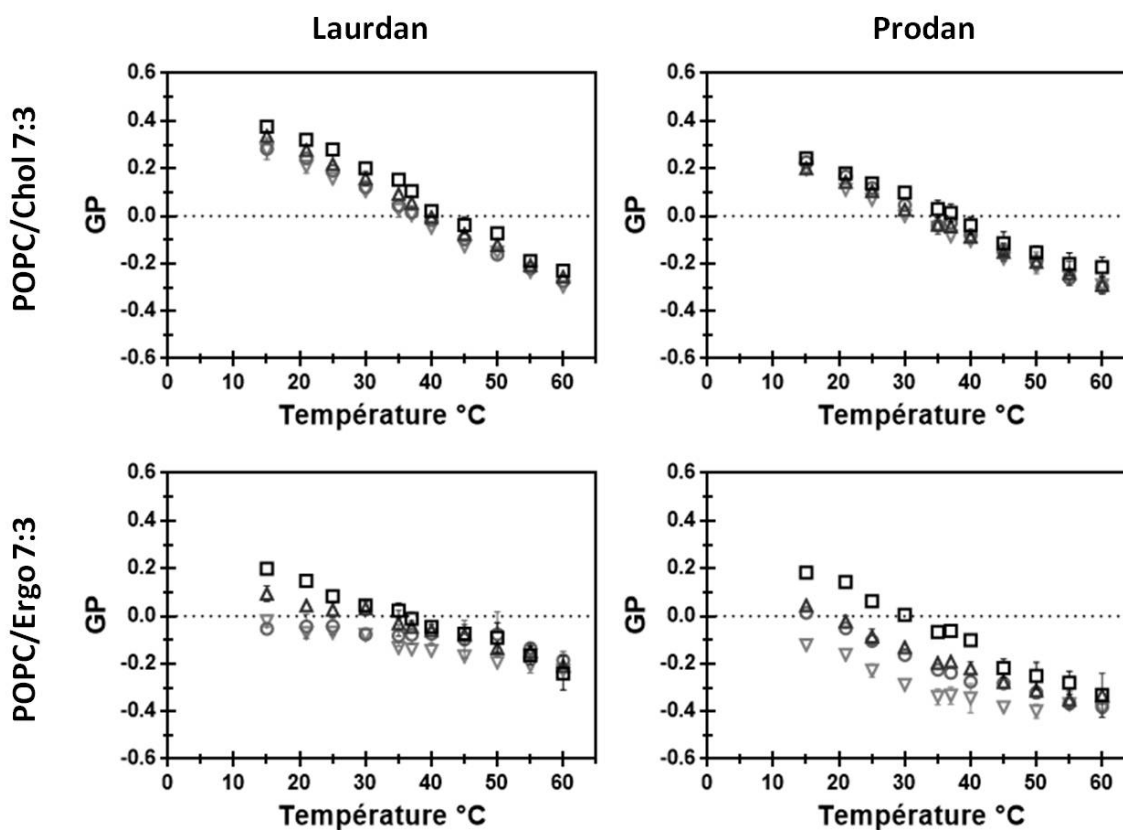


FIGURE 12.15 – Effet de l'AmB sur le GP du Laurdan et du Prodan dans des LUVs de 400 nm de différentes compositions lipidiques. Cercle : Lipide seul ; Carré : +2,5% AmB ; triangle : +5% AmB ; triangle inversé : +10% AmB. L'expérience a été réalisée à des températures allant de 15°C à 60°C dans un tampon Tris 10 mM, pH 7,4.

Comme observé pour les LUVs de 200 nm, l'ajout d'AmB provoque une diminution des GPs, ce qui traduit une augmentation de l'hydratation tant au niveau des chaînes acyles que des têtes polaires. L'AmB fluidifie donc les membranes. Les liposomes contenant du Chol subissent une déstabilisation de l'ordre lipidique du même type que ce qui a été montré précédemment pour les LUVs de 200 nm. En effet, la perturbation tant du GP

du Laurdan que de celui du Prodan donnent des ΔGPs négatifs, signe d'une diminution d'ordre. L'AmB fluidifierait donc les membranes des vésicules.

Pour les LUVs contenant de l'Ergo, l'allure des courbes de GP est similaire à ce qui avait été obtenu pour les LUVs de 200 nm, c'est à dire des ΔGPs qui deviennent de plus en plus négatifs au fur et à mesure de l'augmentation de la température. Cette diminution est aussi dépendante de la concentration en AmB : plus la concentration en AmB est importante et plus les ΔGPs sont négatifs.

Les valeurs de ΔGP sont reprises figure 12.16.

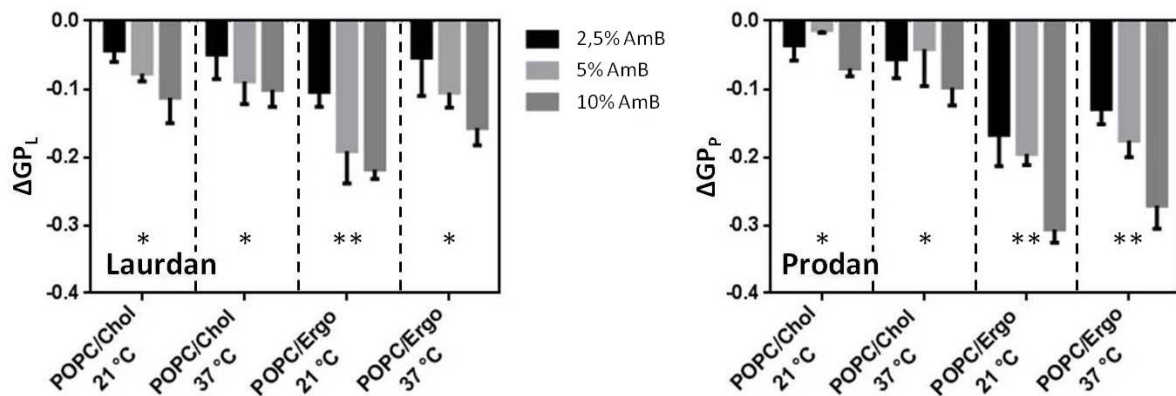


FIGURE 12.16 – ΔGPs engendrés par l'AmB sur des liposomes de 400 nm à 21°C et 37°C. Les ΔGPs sont déterminés en utilisant les valeurs de GP montrées figure 12.15. Les tests statistiques ont été effectués entre les valeurs obtenues pour 2,5 et 10% AmB. * : p-value inférieure à 0,1. ** : p-value inférieure à 0,01.

Concernant les vésicules contenant du Chol, le ΔGP_L et le ΔGP_P évoluent uniquement en fonction de la concentration en AmB. Les valeurs de ΔGP_L et ΔGP_P sont du même ordre, autour de -0,1, signe que pour ce type de liposome, l'AmB augmente le taux d'hydratation des lipides, ce qui modifie l'ordre des lipides tant au niveau des têtes polaires que des chaînes acyles : les membranes se fluidifient.

Concernant les vésicules contenant de l'Ergo, les valeurs de ΔGP_L et de ΔGP_P diminuent en fonction de la concentration en AmB. Cependant, la température a un effet sur le ΔGP_L , le rendant moins négatif. Ainsi, pour des vésicules contenant 10% AmB, le ΔGP_L est de -0,24 à 21°C, contre -0,17 à 37°C. Pour cette taille de liposome, nous remarquons que l'AmB déstabilise plus le GP_P que le GP_L . Ce résultat suggère une plus forte modification du taux d'hydratation des têtes polaires, correspondant à une plus forte déstabilisation des membranes au niveau des têtes polaires que des chaînes acyles.

12.2.0.3 Conclusions des expériences de GP

Au cours de cette étude, nous avons montré que l'AmB diminuerait l'ordre des membranes, ce qui les fluidifierait. Ce résultat confirme les observations faites lors de l'étude des isothermes de compression, pour lesquelles nous avons, entre autre, observé une diminution de l'état de compaction des monocouches.

Afin de comparer les effets de l'AmB sur les différentes vésicules utilisées lors de cette étude, nous avons représenté les ΔGPs obtenus pour les vésicules de 200 et 400 nm contenant une concentration en AmB de 10% à 21°C et 37°C. Ces résultats sont montrés figure 12.17.

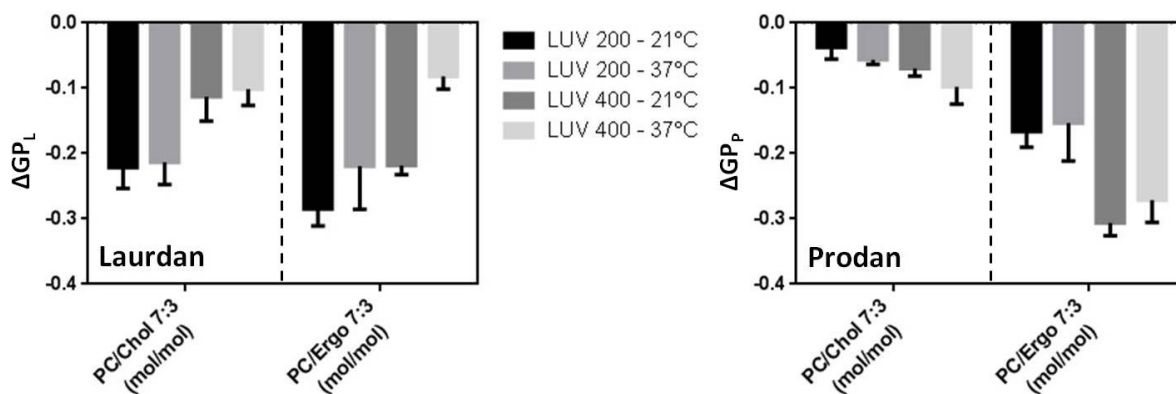


FIGURE 12.17 – Comparaison des ΔGPs engendrés par l'AmB sur des liposomes de 200 nm et 400 nm à 21°C et 37°C. Les comparaisons sont faites entre les mélanges POPC/Stérol 7 : 3 (mol/mol) + 10% Nys.

Concernant les vésicules contenant du Chol, les valeurs de ΔGP_L sont plus importantes pour des LUVs de 200 nm que pour des LUVs de 400 nm. L'AmB perturbe donc moins l'ordre lipidique des chaînes acyles des vésicules de Chol lorsque leur taille augmente. Le GP_P suit la tendance inverse, avec des ΔGP_P plus négatifs lorsque la taille des vésicules augmente. Ainsi, le ΔGP_P est de 0,04 pour un diamètre de 200 nm et à 21°C et passe à 0,1 pour des vésicules de 400 nm à 37°C. L'augmentation de la taille change donc l'interaction AmB/membranes : lorsque la vésicule est petite, l'AmB perturbe principalement les chaînes acyles. Lorsqu'elle augmente, cet effet a tendance à s'inverser. Aussi, à température physiologique, dans les vésicules à grand rayon de courbure contenant du Chol, l'AmB serait inséré tant au niveau des chaînes acyles que des têtes polaires. presque autant avec les chaînes acyles qu'avec les têtes polaires.

Pour les bicouches contenant de l'Ergo, l'AmB déstabilise tant le GP du Laurdan que celui du Prodan. Cependant, ni l'augmentation de la taille des vésicules, ni l'augmentation de la température ne modifient le ΔGP_L . La valeur de ΔGP_L reste toujours autour de 0,2, sauf pour les liposomes de 400 nm à 37°. Le Prodan, lui, augmente avec l'augmentation de la taille, passant de 0,15 (vésicules de 200 nm) à 0,3 (vésicules de 400 nm), augmentant d'un facteur 2. Ainsi, à température physiologique, l'AmB interagit tant avec les chaînes

acyles qu'avec les têtes polaires des vésicules à grand rayon de courbure contenant de l'Ergo.

12.3 Conclusions

Ces expériences ont montré de nombreuses différences dans le mécanisme d'action potentiel de l'AmB et de la Nys. L'AmB ne s'insère que dans les membranes préformées de stérols. Par ailleurs, elle possède une affinité plus marquée que la Nys pour l'Ergo, même si cette différence ne peut totalement expliquer à elle seule le ciblage particulier des membranes fongiques.

L'AmB perturbe les propriétés biophysiques des monocouches de stérols. Les isothermes de compression ($\pi - A$) des deux stérols utilisés durant cette étude ont montré une forte diminution du K_s provoquée par l'AmB. Par ailleurs, l'AmB forme des structures compactes au sein de ces monocouches, comme visualisé en imagerie BAM. Ces structures ont un aspect et une taille différents, fonction du type de stérol utilisé. Cette différence de comportement pourrait traduire d'une différence d'interaction entre l'AmB et ces deux stérols.

Les études d'insertion de l'AmB dans des mélanges lipidiques ont montré que ce polyène s'insérerait préférentiellement dans les mélanges contenant de l'Ergo par rapport à ceux contenant du Chol. Cette même différence d'insertion a pu être observée lors de l'étude de la Nys. Par ailleurs, nous avons montré que l'AmB s'insérerait de manière plus importante dans les monocouches contenant de la POPE. En revanche, aucune solubilisation de lipide à l'interface n'a pu être constatée. Contrairement à la Nys, l'augmentation de la concentration en stérol provoque une augmentation de la pression de surface, traduisant une augmentation de l'insertion d'AmB dans les monocouches.

Par ailleurs, il a été montré que la perturbation des membranes lipidiques dépendait du rayon de courbure de la vésicule, de la nature du stérol utilisé, de la température d'étude et de la concentration en AmB. L'AmB perturbe plus l'ordre des membranes contenant de l'Ergo que celle contenant du Chol. Pour des conditions se rapprochant des conditions physiologiques, la déstabilisation de l'ordre des bicouches est identique au niveau des chaînes acyles, quelque soit le stérol utilisé. Cependant, la déstabilisation au niveau des têtes polaires des vésicules contenant de l'Ergo est globalement plus importante, ce qui montre, comme cela a été montré durant les expériences du pouvoir membranotrope de l'AmB dans des monocouches contenant des lipides purs ou des mélanges lipidiques, une plus forte interaction de l'AmB avec ce type de membranes.

Inhibition de l'insertion de l'hématine dans des modèles membranaires par des dérivés énantiopurs de la MEF

La digestion de l'hémoglobine par *Plasmodium* dans sa vacuole digestive libère de l'hémine, qui, du fait des conditions de pH du milieu, est rapidement transformée en hématine. Cette molécule possède de fortes propriétés membranotropes qui entraînent la lyse des membranes du parasite. Pour lutter contre les effets néfastes de l'hématine, le parasite a su mettre en place des stratégies de détoxification de cette molécule. Le mécanisme de neutralisation de l'hémine par la formation d'un cristal inerte, l'hémozoïne, ferait intervenir des membranes lipidiques.

Les quinoléines, dont le plus célèbre représentant est la CQ, sont des molécules connues pour stopper le développement parasitaire en inhibant la formation de l'hémozoïne. Dans une étude précédente menée au laboratoire [188], il avait été montré que cette inhibition provoquait une perte du pouvoir membranotrope de l'hématine. La MEF a aussi été identifiée comme pouvant inhiber la formation de l'hémozoïne, mais avec une efficacité moins importante que la CQ. Pourtant, le pouvoir antiparasitaire de cette molécule est supérieur à la CQ. Elle provoque néanmoins des risques secondaires non négligeables sur l'Homme.

La MEF possède 2 carbone asymétriques. Il a été proposé que ses différents énantiomères pouvaient être responsables d'une meilleure réponse antiparasitaire, mais aussi de ses effets secondaires. Pour montrer l'impact de l'énantiométrie dans le mécanisme d'action de la MEF, mais aussi dans le but de mieux comprendre le mécanisme général de cette molécule, l'équipe du Pr. Pascal Sonnet a synthétisé différents dérivés énantiopurs de cette molécule. Ici, le but de notre étude est d'utiliser ces analogues afin de comprendre l'impact de leur énantiométrie sur leur interactions avec l'hémine et des membranes modèles. Nous souhaitons notamment déterminer si l'énantiométrie a un impact sur l'inhibition de l'insertion de l'hémine dans les membranes.

Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, étudié les propriétés d'insertion de l'hémine dans une monocouche de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol)¹. Puis, nous avons étudié les propriétés membranotropes et l'influence de la CQ, la MEF et 4 dérivés énantiopurs de la MEF sur l'insertion de l'hémine dans des modèles membranaires. Compte-tenu que le mécanisme d'inhibition de la formation de l'hémozoïne serait la principale cause du pouvoir antiparasitaire de la CQ, les résultats obtenus avec cette molécule nous serviront d'élément de comparaison pour l'étude de l'efficacité des dérivés de la MEF.

13.1 Insertion et inhibition de l'hémine dans les monocouches de Langmuir par la CQ

Nous avons, dans un premier temps, étudié les propriétés membranotropes de l'hémine. Pour cela, nous avons déterminé les cinétiques d'insertion de cette molécule dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). L'hémine a été injectée sous des monocouches à différentes pressions initiales, à une concentration finale de 1 μM . Pour se replacer dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude précédente, le tampon utilisé est un tampon Tris 100 mM pH 7,4. Les cinétiques d'insertion de l'hémine sont présentées figure 13.1.

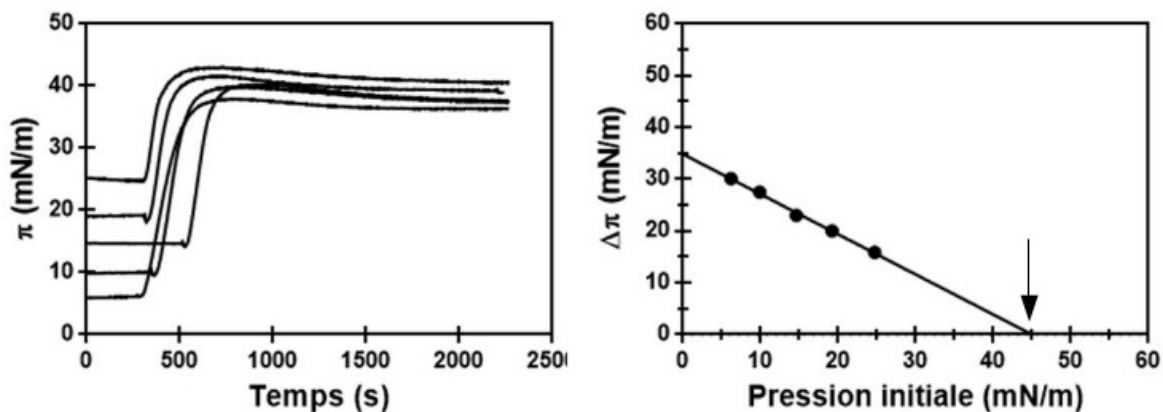


FIGURE 13.1 – Cinétiques d'insertion de l'hémine (gauche) et détermination de la PIM (droite) dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). La température des expériences est de 21°C. Le tampon utilisé est un tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La concentration finale en hémine injectée dans la sous-phase est de 1 μM . La flèche pointe vers la PIM.

Nous observons sur les cinétiques d'insertion une rapide et importante augmentation de la pression de surface, signe que l'hémine est capable de s'insérer en grande quantité dans

1. Les travaux de thèse de S. Azouzi ont mis en évidence que le point de nucléation du cristal d'hémozoïne se situerait dans les lignes de défaut des membranes [188]. La formation de fibres de β -hématine au niveau des lignes de défaut d'une bicouche de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol) a pu être suivi *via* l'AFM. Nous avons utilisé systématiquement ce modèle afin de se placer dans les mêmes conditions que l'étude précédente.

les monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). La PIM est déterminée à 45 mN/m. Le $\Delta\pi_{30}$ est lui de 12 mN/m. L'hémine possède donc un pouvoir membranotrope important.

Nous avons dans un second temps comparé le pouvoir membranotrope de l'hémine avec la protoporphyrine. Ces deux molécules ont la même structure chimique que l'hémine mais la protoporphyrine ne possède pas d'hème ferreux. Les études d'insertion de cette molécule dans des membranes de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol) sont présentées figure 13.2.

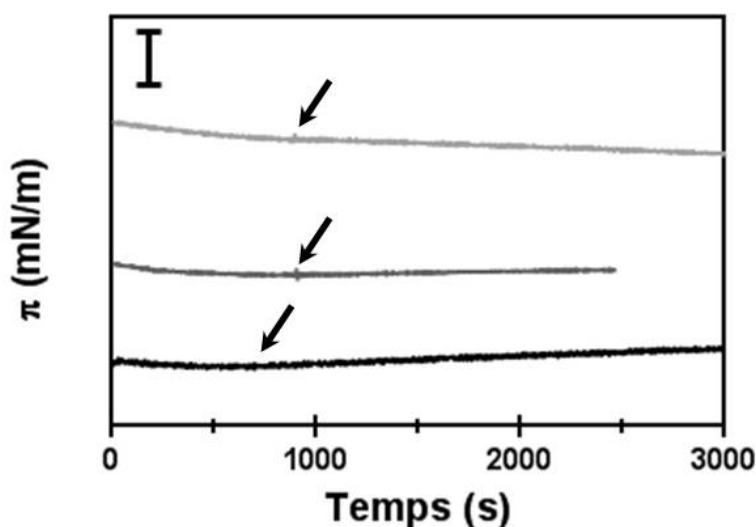


FIGURE 13.2 – **Cinétiques d'insertion de la protoporphyrine dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol)**. Noir : Concentration finale injectée de 1,6 μM . Gris foncé : Concentration finale injectée de 3,2 μM . Gris clair : Concentration finale injectée de 6,4 μM . Chaque flèche pointe vers le moment de l'injection de la protoporphyrine dans la sous-phase. La sous-phase est un tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La température de l'expérience est de 21°C. La pression initiale des monocouches est comprise entre 15 et 20 mN/m. La barre d'échelle en haut à droite représente 5 mN/m.

Les cinétiques d'insertion de la protoporphyrine n'indique aucune augmentation de pression, quelle que soit la concentration finale injectée en sous-phase. Ce résultat montre qu'aux concentrations étudiées, cette molécule est incapable de s'insérer dans les monocouches de PC. Comme dit plus haut, la seule différence entre la protoporphyrine et l'hémine est la présence d'un hème ferreux chez cette dernière. Ainsi, cet hème ferreux serait un élément essentiel à l'insertion de l'hémine dans les monocouches de PC.

Nous avons ensuite étudié la capacité de la CQ à inhiber l'insertion de l'hématine² dans les membranes. Selon le mécanisme d'action proposé par Egan et ses collaborateurs, la CQ stabiliserait la formation de dimère μ -oxo (REF), ce qui empêcherait la formation

2. Pour rappel, l'hématine contient un Fe^{2+} tandis que l'hématine contient un Fe^{3+} . Le passage de l'hémine à l'hématine est dû aux conditions de pH de la vacuole digestive.

de dimères stables et donc l'élongation du cristal d'hémozoïne. La CQ seule ne s'insère pas dans les membranes biologiques. Elle possède cependant une forte affinité pour l'hématine puisque son Kd est évalué à $3,5 \times 10^{-9} M$ (REF).

Pour réaliser cette étude, nous avons mimé les conditions de la vacuole digestive, particulièrement les conditions de pH. L'hémine a été ainsi incubée 5 minutes dans un tampon de polymérisation à pH 5,2³ (cf section matériel et méthode), qui va transformer l'hémine en hématine. Nous avons par ailleurs utilisé des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol) à une pression initiale de 20 ± 2 mN/m. Des cinétiques de l'inhibition de l'insertion de la CQ sont présentées figure 13.3

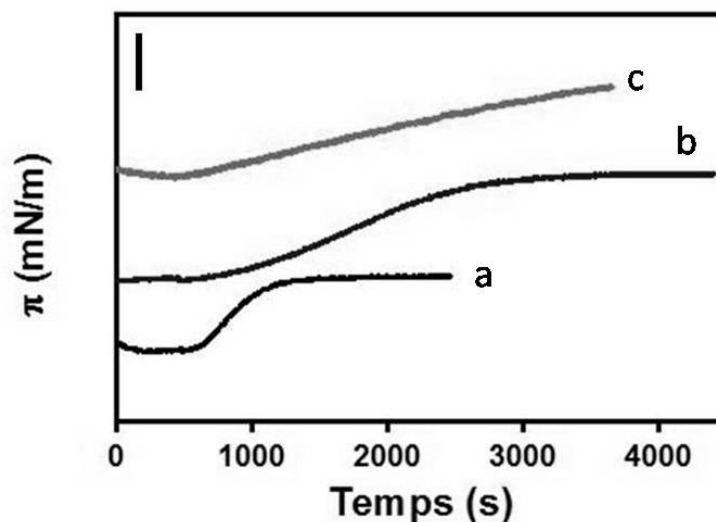


FIGURE 13.3 – Cinétiques d'insertion de l'hématine incubée avec la CQ dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol) à 20 mN/m. a : hématine seul ; b : $[CQ]/[hématine] = 0,1$; c : $[CQ]/[hématine] = 0,5$. La sous-phase est un tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La température de l'expérience est de 21°C.

La courbe de l'hématine seule montre une augmentation rapide de la pression de surface jusqu'à atteindre un plateau. Le $\Delta\pi$ obtenu est d'environ 7 mN/m. L'ajout de CQ provoque une diminution progressive de la vitesse d'insertion de l'hématine dans les monocouches. Ce phénomène est dépendant de la concentration en CQ. En revanche, le $\Delta\pi^{fin}$ n'est pas significativement modifié. Aussi, la CQ ralentirait l'insertion de l'hématine dans les monocouches sans complètement inhiber son insertion. À partir de ces courbes, nous avons donc déterminé la courbe d'inhibition de la vitesse d'insertion de l'hématine en fonction du ration $[CQ]/[Hématine]$. Nous avons représenté la fonction d'équation :

$$\frac{V_n}{V_0} \times 100 = f\left(\frac{CQ}{Hématine}\right) \quad (13.1)$$

avec V_n la vitesse d'insertion de l'hématine incubée avec une concentration n de CQ et V_0 la vitesse d'insertion de l'hématine seule. Cette courbe d'inhibition est représentée figure

3. pH 5,2 : pH présumé de la vacuole digestive du parasite

13.4

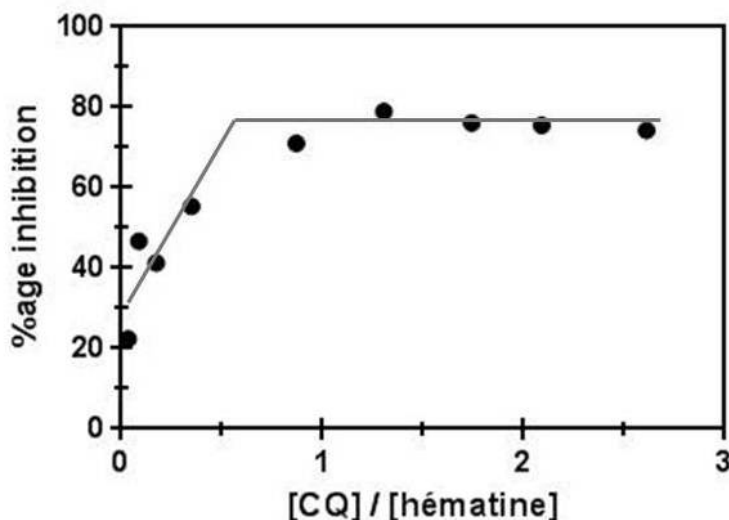


FIGURE 13.4 – Suivi de l'inhibition de l'insertion de l'hématine en fonction du ratio CQ/hématine. La courbe d'inhibition a été réalisée à partir des cinétiques d'insertion montrées figure 13.3.

Nous obtenons une courbe de saturation de l'inhibition. L'inhibition maximale de la vitesse d'insertion obtenue est légèrement inférieure à 80%. Comme supposé précédemment, la CQ n'inhibe donc pas complètement l'insertion de l'hématine dans les monocouches lipidiques, le complexe hématine/CQ étant probablement membranotrope. Cette insertion modifiée pourrait être une des raisons de la toxicité du complexe hématine/CQ.

Cette représentation nous permet d'avoir accès à la stœchiométrie pour laquelle l'inhibition de l'insertion de la CQ dans les monocouches est maximale. Pour cela, nous avons tracé les tangentes des phases croissantes et stationnaires sur le graphe d'inhibition. Nous remarquons ainsi que l'effet d'inhibition maximal de l'insertion de l'hématine par la CQ est atteint lorsque le ratio CQ/hématine est de 0,5, soit une molécule de CQ pour deux molécules d'hématine. Ce ratio correspond au ratio réactionnel de la CQ proposé dans la littérature scientifique [199]. L'IC₅₀ de l'inhibition de l'insertion de l'hématine dans les monocouches de PC a été déterminé avec le logiciel Prism 6, développé par GraphPad. Elle est de 0,4 μ M.

À partir de cette courbe d'inhibition, nous avons effectué une linéarisation de Scatchard afin de déterminer la constante d'affinité de la réaction. Ce coefficient se rapproche de la définition d'un Kd, sans en être un puisqu'il mesure l'affinité entre deux molécules dans un système complexe. Cependant, il donne une indication sur l'affinité relative de la CQ pour l'hématine. Nous appellerons donc ce coefficient "K". Pour faire cette linéarisation de Scatchard, nous avons tracé une courbe de calibration en faisant varier la concentration d'hématine injectée en sous-phase. La monocouche de PC nous sert ainsi de biocapteur afin de mesurer la concentration en hématine libre en solution. La courbe de calibration

est montrée figure 13.5

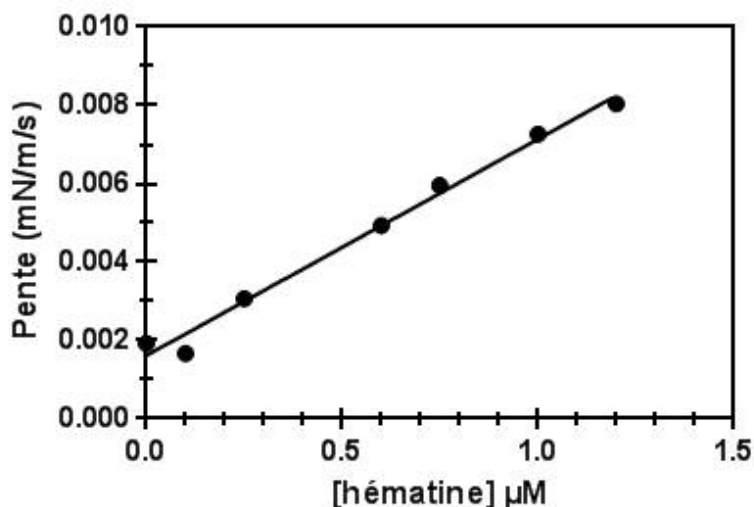


FIGURE 13.5 – Courbe de calibration de l'insertion de l'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC. L'hématine a été incubée dans un tampon de polymérisation afin de la transformer en hématine. Elle a ensuite été injectée sous des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol) à une pression initiale de 20mN/m. La sous-phase est constituée d'un tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La température est de 21°C.

La courbe de calibration obtenue est une droite à pente positive, traduisant un lien entre la concentration en hématine présente dans le milieu et la vitesse d'insertion de l'hématine totale. Cette relation est strictement proportionnelle dans la gamme de concentrations testées. Cette courbe de calibration nous permet donc, par simple extrapolation des pentes obtenues, d'obtenir une estimation de la quantité d'hématine libre dans la sous-phase, c'est-à-dire la concentration d'hématine n'ayant pas interagit avec la CQ. Nous avons ainsi déterminé les concentrations en hématine liée et libre dans la sous-phase. Cela nous a permis d'effectuer une linéarisation de Scatchard, représentée figure 13.6.

À partir de cette représentation, il est possible de déterminer le coefficient K de l'interaction. Comme le Kd, il correspond à l'inverse de la pente de la droite de régression linéaire de la fonction représentée. Nous obtenons un K de 97 nM. Ce K est supérieur à celui décrit dans la littérature scientifique⁴. Cependant, celui-ci prend en compte la forte interaction existant entre l'hématine et les membranes lipidiques. Aussi, il s'approche des conditions *in vivo*. Par ailleurs, cette représentation permet d'obtenir la stœchiométrie de la réaction, qui correspond à l'extrapolation de la droite de régression sur l'axe des abscisses. La valeur obtenue est de 2, ce qui signifie qu'une molécule de CQ interagit avec 2 molécules d'hématine. Ce chiffre est en accord avec la stœchiométrie de l'interaction CQ/hématine proposée dans la littérature scientifique [199].

4. Pour rappel, il est de $3,5 \times 10^{-9}M$.

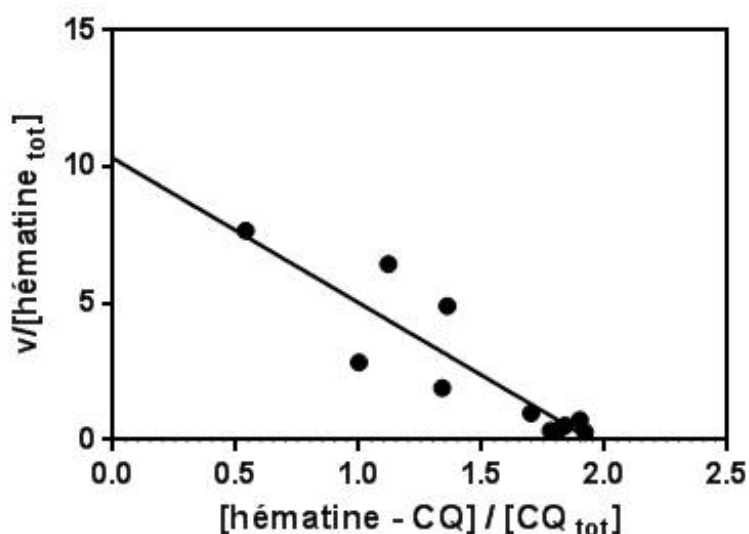


FIGURE 13.6 – Représentation de Scatchard de l'insertion de l'hématine inhibée par la CQ.

13.1.1 Conclusion

Au cours de cette partie de l'étude, nous avons utilisé la CQ comme molécule modèle pour l'étude de l'inhibition de l'hémine dans des monocouches de PC. Nous avons montré que les monocouches peuvent être utilisées afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'insertion de l'hématine dans les monocouches. Nous avons ainsi pu obtenir une IC_{50} de l'inhibition de l'insertion de l'hématine dans les monocouches de PC et un coefficient K de l'interaction hématine/CQ proche des conditions *in vivo*. La stœchiométrie de la réaction a pu être aussi déterminée. Dans la suite de l'étude, nous appliquerons cette méthode aux autres molécules antipaludiques. Les valeurs obtenues avec la CQ nous serviront d'étalon afin de comparer le pouvoir inhibiteur de l'insertion de l'hématine dans les monocouches des différentes molécules testées (calcul de IC_{50}), mais aussi de l'affinité de ces différentes molécules pour l'hématine (calcul de K).

13.2 Les dérivés stéréochimiquement purs de la MEF sont capables d'inhiber l'insertion de l'hémine

La MEF est une molécule antipaludique dont le mécanisme d'action est encore incompris. Il a été montré que l'activité antipaludique de cette molécule incluait, entre autre, une inhibition de la formation du cristal d'hémozoïne (REF). La MEF possédant 2 carbones asymétriques, il a été proposé que l'énantiométrie de cette molécule pourrait jouer un rôle dans son efficacité, mais aussi dans les effets secondaires associées à la molécule (REF).

Dans cette étude, nous avons considéré l'effet de l'énantiométrie sur l'inhibition de l'insertion de l'hématine dans des membranes de PC par la MEF et quatre dérivés énantiopurs. Nous avons étudié l'effet de l'énantiométrie sur leurs propriétés membranotropes et sur leur capacité à inhiber l'insertion de l'hématine dans des monocouches de PC. Dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés membranotropes de la MEF et son pouvoir inhibiteur sur l'insertion de l'hémimine et de l'hématine dans des monocouches de PC. Puis, nous avons comparés ces résultats avec ceux obtenus avec les dérivés énantiopurs.

13.2.1 Inhibition de l'insertion de l'hémimine par la MEF

Nous avons dans un premier temps déterminé la capacité de la MEF à s'insérer dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol). Nous avons ainsi déterminé la PIM et le $\Delta\pi_{30}$ de cette molécule pour ce type de monocouche. Les cinétiques d'insertion et la détermination de la PIM sont présentées figure 13.7.

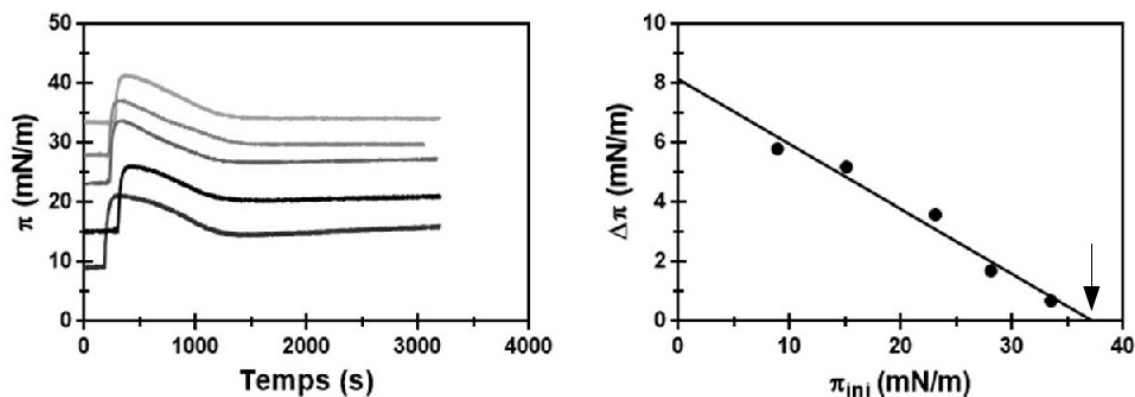


FIGURE 13.7 – Cinétiques d'insertion et détermination de la PIM de la MEF dans des monocouches de DPPC/DOPC. Gauche : Cinétiques d'insertion ; Droite : Détermination de la PIM de la MEF. La MEF a été injectée à une concentration finale de $1 \mu\text{M}$. La température a été fixée à 21°C . La sous-phase est composée d'un tampon Tris 100 mM . La flèche pointe vers la PIM.

Les cinétiques d'insertion de la MEF dans les monocouches de PC présentent toutes un profil identique : augmentation rapide de la pression interfaciale jusqu'à une pression maximale, puis diminution de la pression jusqu'à atteinte d'un plateau (figure 13.7-Gauche). L'augmentation de la pression traduit probablement une insertion massive de la MEF dans la monocouche, tandis que la diminution peut être liée à des phénomènes d'expulsion ou de réarrangement moléculaire de la MEF et/ou des lipides. La PIM de la MEF est de 37 mN/m (figure 13.7-droite) et est supérieure à la pression latérale des membranes biologiques. La MEF est donc capable de s'insérer dans des membranes préformées de PC. Le $\Delta\pi_{30}$ obtenu est de 2 mN/m .

La capacité de la MEF à s'insérer dans les membranes serait en partie responsable de sa longue durée de vie) dans l'organisme (environ 14 jours) [210]. Le faible $\Delta\pi_{30}$ obtenu pourrait être la conséquence d'une réorganisation des constituants de la monocouche après

insertion de la MEF.

Comme vu section 6.3.2 page 73, la MEF est capable d'inhiber la formation de l'hémozoïne. Cette inhibition, comme proposé dans le mécanisme d'action de la CQ développé au laboratoire, peut potentiellement se faire à deux niveaux :

- Elle peut inhiber l'insertion de l'hémine et de l'hématine dans les membranes biologiques, empêchant la formation du point de nucléation du cristal,
- Elle peut empêcher la formation des dimères stables, empêchant la croissance du cristal.

Au cours de ces études, nous avons suivi l'inhibition de l'insertion de l'hémine et de l'hématine dans les monocouches (calcul de l'IC₅₀), mais aussi calculé l'affinité entre la MEF et l'hématine dans des conditions proches de celles retrouvées *in vivo* (calcul de K).

Dans un premier temps, nous avons étudié si la MEF provoquait une diminution de l'insertion de l'hémine dans les monocouches de PC. L'hémine a donc été incubée à pH 7,4 avec de la MEF à un ratio molaire MEF/hémine 3 : 1, ratio suggéré dans la littérature scientifique comme étant suffisant pour inhiber complètement la formation de la β -hématine. Nous avons ensuite injecté ce mélange sous des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol) et suivi les cinétiques d'insertion du mélange, présentées figure 13.8.

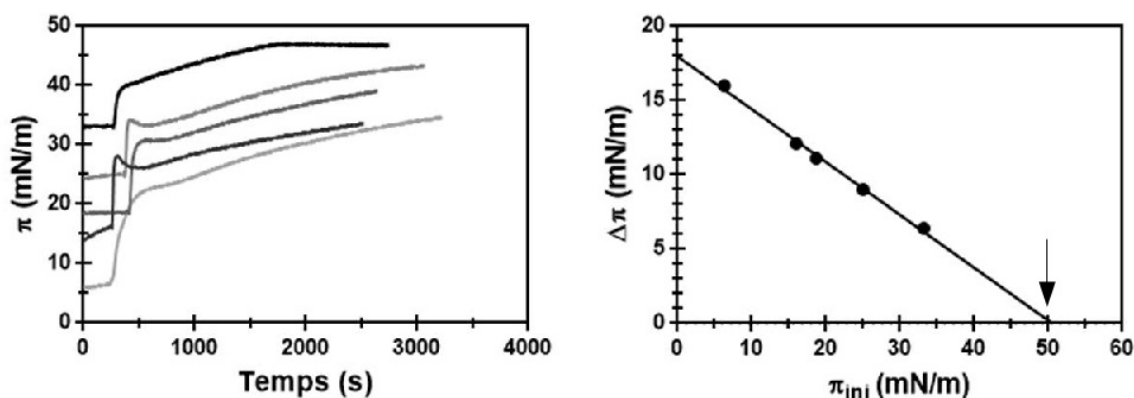


FIGURE 13.8 – Cinétiques d'insertion et détermination de la PIM du mélange MEF/hémine 3 : 1 (mol/mol) dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). Gauche : Cinétiques d'insertion. Droite : Détermination de la PIM. Le mélange MEF/hémine a été injecté à une concentration finale respective de 3 et 1 μ M. La température a été fixée à 21°C. La sous-phase est composée d'un tampon Tris 100 mM pH 7,4. La flèche pointe vers la PIM.

Après injection de la MEF dans la sous-phase, la pression interfaciale augmente très rapidement, jusqu'à une première valeur maximale. Une diminution semblable à celle observée sur les cinétiques de la MEF seule apparaît ensuite. Enfin, après cette diminution, une augmentation plus lente de la pression interfaciale est observable. Si les deux premières phases des cinétiques correspondent vraisemblablement à une insertion de la MEF excédentaire, cette dernière phase pourrait correspondre à l'insertion du complexe MEF/hémine dans la monocouche. Nous avons calculé la PIM de ce mélange dans les monocouches de PC. Nous obtenons une PIM de 50 mN/m, proche de la PIM obtenue pour l'hémine seule pour

la même monocouche. En revanche, l'ajout de la MEF, qui pourtant est membranotrope, fait baisser le $\Delta\pi_{30}$ puisque celui-ci passe de 12 à 8 mN/m. La MEF diminuerait donc la quantité d'hémine capable de s'insérer dans les monocouches de DPPC/DOPC à pression latérale physiologique.

Nous avons ensuite testé la capacité de la MEF à inhiber l'insertion de l'hématine dans les membranes. Différents ratios molaires MEF/hémine ont été incubés dans un tampon de polymérisation pendant 5 minutes à 60°C, ces conditions permettant de convertir l'hémine en hématine. L'étude de l'insertion des mélanges s'est faite en utilisant des monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol) à 20 ± 2 mN/m. Des cinétiques d'insertion de ces mélanges sont présentés figure 13.9.

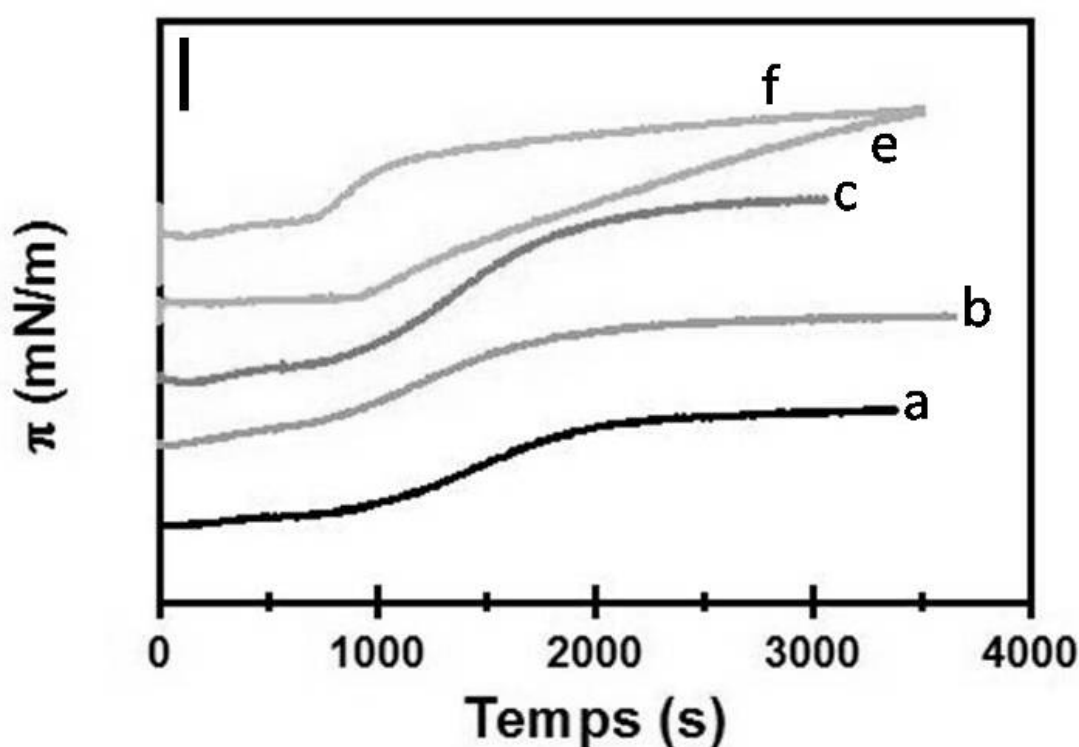


FIGURE 13.9 – Cinétiques d'insertion des mélanges MEF/hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC à 20 mN/m. Le ratio MEF/hématine augmente du bas vers le haut, avec des ratios molaires respectifs de 0 (a) ; 0,2 (b) ; 0,3 (c) ; 0,5 (d) ; 2,5 (e). La sous-phase est un tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La température de l'expérience est de 21°C.

L'injection du mélange dans la sous-phase provoque une augmentation immédiate de la pression. Pour l'hématine seule, nous pouvons observer une augmentation de la pression rapide, jusqu'à une valeur maximale, après laquelle la pression de surface n'évolue plus. Pour des concentrations de MEF inférieures à 0,5 mM final, soit pour un ratio MEF/hématine égal à 2, nous pouvons observer des allures de cinétiques similaires à celles obtenues pour l'hématine seule, avec une augmentation de la pression puis atteinte d'un maximum et enfin une stabilisation de la pression. L'ajout de MEF lisse progressivement la pente de la cinétique : comme pour la CQ, la vitesse d'insertion est de moins

en moins rapide. Pour des concentrations en MEF supérieures à 0,5 mM final, soit des ratio MEF/hématine supérieurs à 0,5, deux pentes distinctes sont visibles sur les courbes de cinétiques, comme matérialisé figure 13.10.

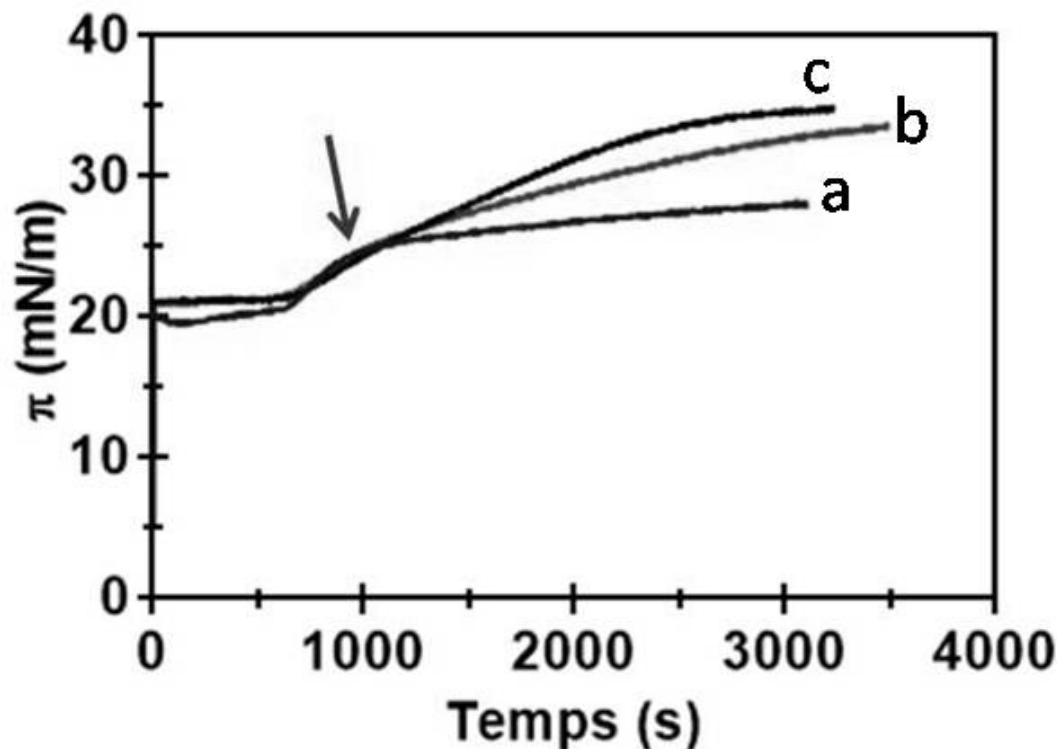


FIGURE 13.10 – Cinétiques d'insertion des mélanges MEF/hématine à des ratios supérieurs à 0,5. a : ratio molaire MEF/hématine de 0,5. b : ratio molaire MEF/hématine de 1,6. c : ratio molaire MEF/hématine de 2,5. La flèche rouge correspond à l'apparition de la deuxième pente sur les cinétiques d'insertion.

Une première pente importante est observable, correspondant probablement à l'insertion rapide d'un premier composé. Cette première pente a une durée bien définie, identique pour toutes les cinétiques (400 s). Après cette première pente, une deuxième pente est observable, correspondant probablement à l'insertion d'un deuxième type de composé dans la monocouche. À la vue des résultats précédents, sachant qu'à partir d'une certaine concentration la MEF se retrouve très probablement en excès dans le milieu, la première pente pourrait correspondre à l'insertion de MEF excédentaire, tandis que la deuxième pente correspondrait à l'insertion du complexe MEF/hématine.

La stœchiométrie de l'inhibition maximale de l'insertion de l'hématine a été déterminée. Pour les ratios MEF/hématine supérieurs à 0,5, nous sommes partis du postulat que la première pente correspondait à l'insertion de la MEF n'ayant pas réagi avec l'hématine. Nous ne tenons donc compte dans cette représentation que de la deuxième pente, correspondant selon notre hypothèse à l'insertion du complexe MEF/hématine. Cette représentation est présentée figure 13.11.

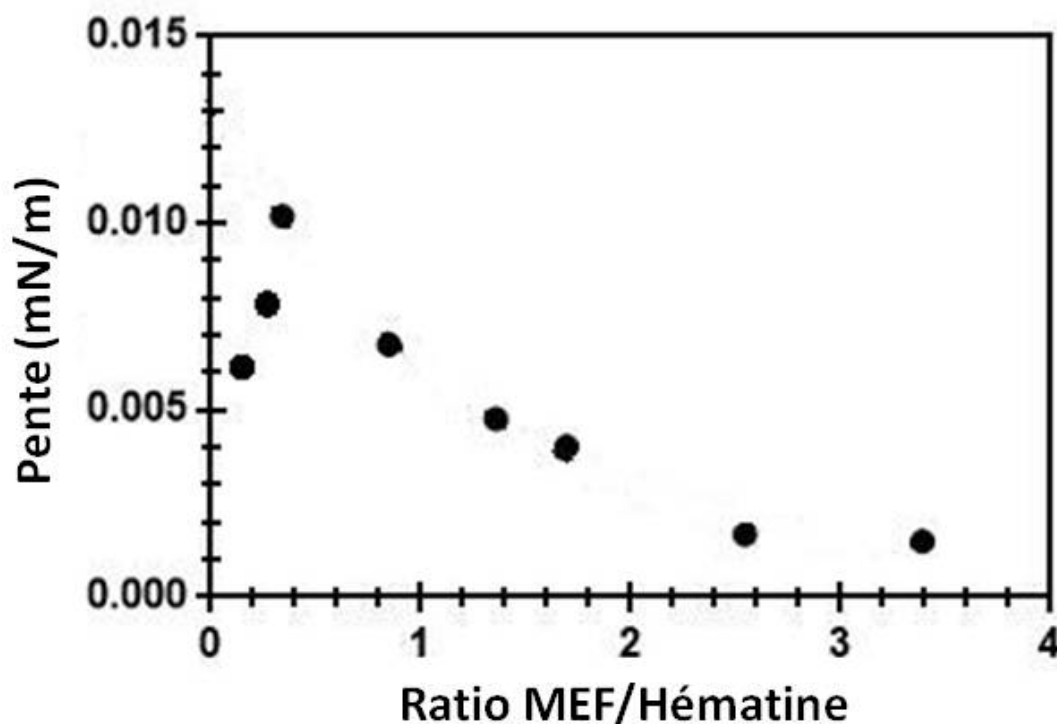


FIGURE 13.11 – Inhibition de la vitesse d'insertion de l'hématine par la MEF dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol). Les mélanges ont été incubés dans un tampon de polymérisation à pH 5,2 comme décrit section matériel et méthode. Chaque mélange MEF/hémine a été incubé 5 minutes à 60°C puis injecté sous une monocouche de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol). La sous-phase est un tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La température de l'expérience est fixée à 21°C.

Nous observons dans un premier temps une augmentation de la vitesse moyenne de l'insertion de l'hématine, avec une pente de plus en plus importante pour des ratios MEF/hématine inférieurs à 0,5. Après atteinte d'un maximum, autour d'un ratio MEF/hématine de 0,5, nous observons une diminution progressive de la vitesse d'insertion, jusqu'à atteinte d'un plateau à un ratio MEF/hématine autour de 2,5. L'augmentation de la vitesse d'insertion des mélanges MEF/hématine peut être due au fait qu'une concentration seuil de MEF serait nécessaire avant qu'elle exerce un pouvoir inhibiteur. En dessous de ce ratio, deux scénarios sont envisageables :

- la MEF et l'hématine n'interagissent pas et s'insèrent dans les membranes, augmentant ainsi la pression de surface,
- la MEF et l'hématine formerait un complexe beaucoup plus membranotrope que l'hémine seul. Il pourrait donc exister deux types d'interactions, une spécifique, permettant d'obtenir une interaction totale jusqu'à un ratio MEF/hémine de 0,5 et une autre non spécifique.

Pour mieux suivre l'inhibition de l'insertion de l'hématine par la MEF, nous avons représenté le pourcentage d'inhibition de l'insertion de l'hématine. Pour prendre en compte

l'augmentation de la pression interfaciale aux faibles ratios molaires, nous avons considéré uniquement les ratios molaires MEF/hématine supérieurs à 0,5. Cette représentation est montrée figure 13.12.

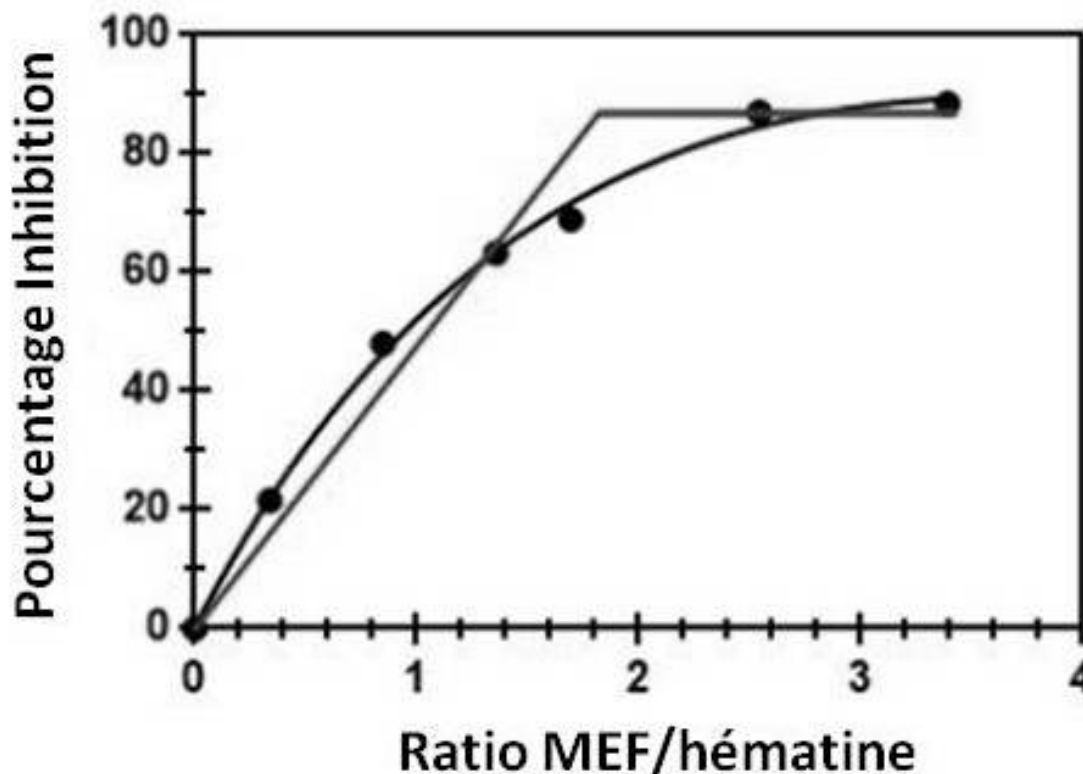


FIGURE 13.12 – Évolution du pourcentage d'inhibition de la vitesse d'insertion de l'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC.

Nous obtenons une courbe logarithmique avec une inhibition maximale de la vitesse d'insertion d'environ 80%, ce qui est similaire à l'inhibition maximale obtenue avec la CQ. Par ailleurs, nous obtenons une inhibition maximale de l'insertion de l'hématine dans les monocouches à un ratio MEF/hémine autour de 2 : 1 (mol/mol). Ce chiffre est très supérieur à celui obtenu pour la CQ, pour laquelle nous avons un ratio de 0,5. L'IC₅₀ est aussi plus élevé, avec une valeur de 1,2 μ M. Ainsi, la MEF inhibe plus faiblement l'insertion de l'hématine dans les monocouches de PC que la CQ.

Comme pour la CQ, nous avons calculé le coefficient K de l'interaction entre la MEF et l'hématine par l'intermédiaire d'une linéarisation de Scatchard, présentée figure 13.13. Cette représentation nous donne une valeur de K de 1,3 mM. Ce K est très élevé par rapport à la CQ. Il traduit une faible affinité de la MEF pour l'hématine, cela malgré une meilleure efficacité de la MEF contre *Plasmodium*. Ce résultat laisse penser que le mécanisme d'action de la MEF pourrait faire intervenir des processus autres que l'inhibition de l'insertion de l'hématine dans les membranes.

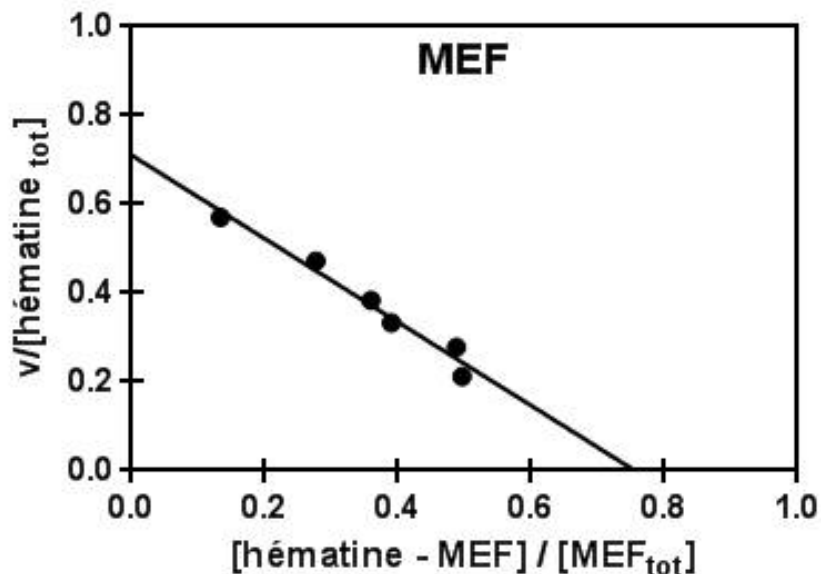


FIGURE 13.13 – Représentation de Scatchard de l'interaction MEF/hématine.

13.2.2 Inhibition de l'insertion de l'hémine par des dérivés énantiopurs de la MEF

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action de la MEF, notre équipe partenaire dans ce projet a synthétisé des composés énantiopurs dérivés de la MEF [217]. Certaines de ces molécules présentent des IC_{50} de l'action antiparasitaire intéressants, supérieurs à ceux obtenus pour la CQ et la MEF. Par ailleurs, ces molécules sont actives sur les souches résistantes à la CQ [217].

Comme vu section 6.1 page 64, les composés AJPS0130 et AJPS0131 sont des dérivés avec un groupement heptyl, tandis que les composés APJS0132 et AJPS0133 sont des dérivés avec un groupement hexyl. Les composés AJPS0130 et AJPS0132 sont des dérivés de conformation (*R*), tandis que les dérivés AJPS0131 et AJPS0133 sont des dérivés de conformation (*S*). Ces différences structurales ouvre l'étude sur la fonction entre la structure et l'efficacité de ces molécules. Peuvent être donc pris en compte la lipophilicité et la conformation spatiale de la molécule dans cette étude.

Dans un premier temps, nous avons étudié le pouvoir membranotrope de ces molécules dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol). Les cinétiques d'insertion sont présentées figure 13.14.

L'allure des cinétiques d'insertion des dérivés de la MEF sont toutes identiques. L'injection des composés en sous-phase provoque, comme pour la MEF, une augmentation rapide de la pression interfaciale, correspondant à une interaction des molécules avec les membranes. À partir de ces cinétiques, nous avons déterminé la PIM et le $\Delta\pi_{30}$ des composés. La courbe de formule $\Delta\pi = f(\pi^{ini})$ de chaque composé antipaludique est présentée figure

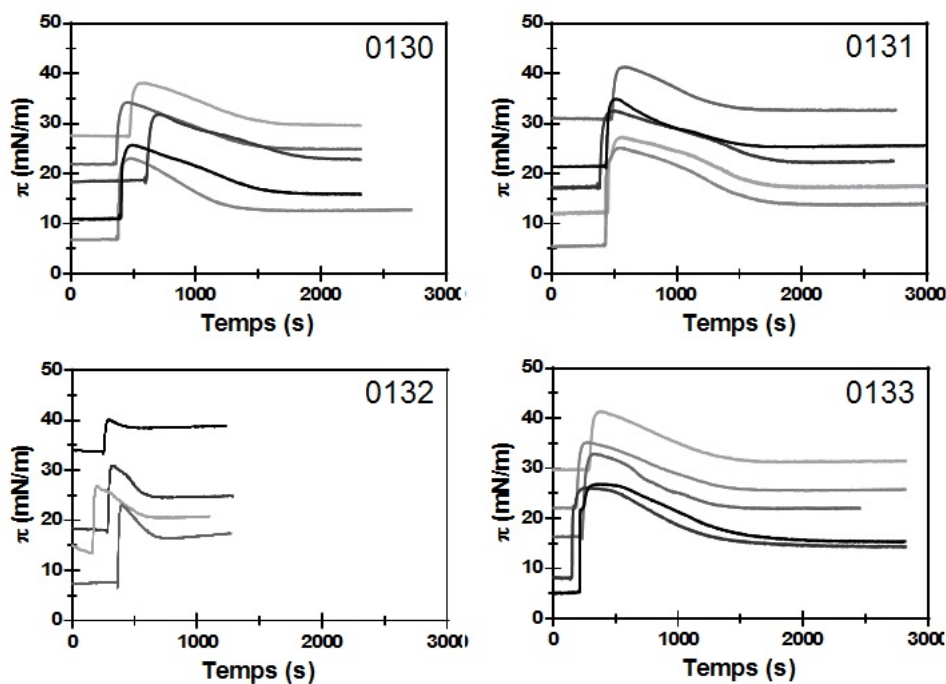


FIGURE 13.14 – Cinétiques d'insertion de dérivés de la MEF dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol). La température a été fixée à 21°C. La sous-phase est composée d'un tampon Tris 100 mM.

13.15.

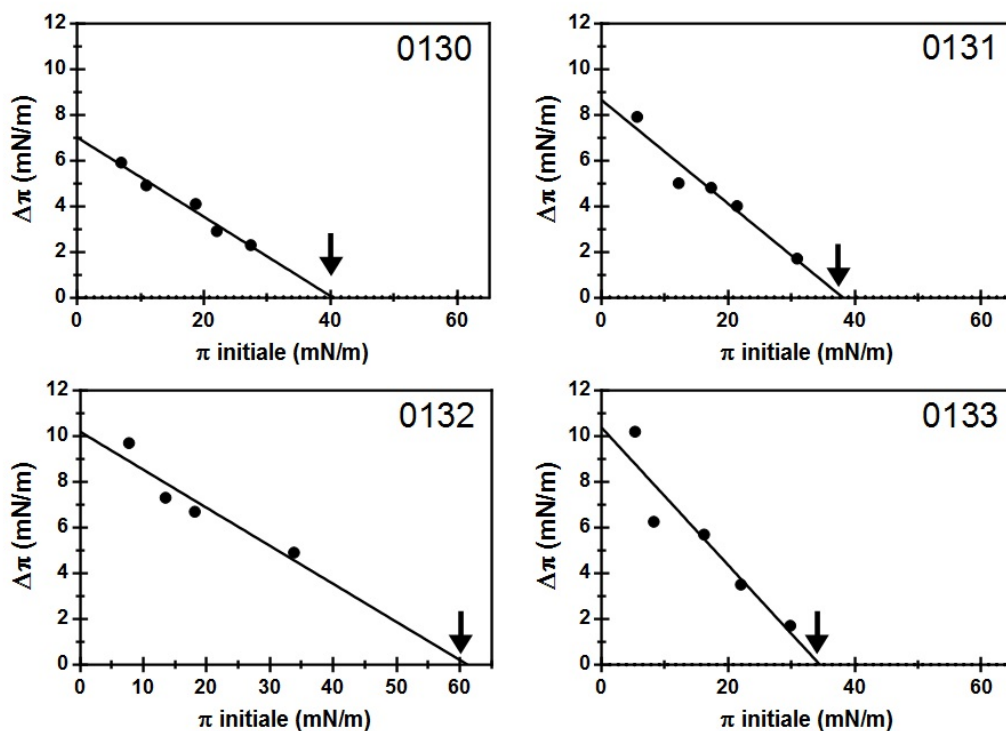


FIGURE 13.15 – Détermination de la PIM et du $\Delta\pi_{30}$ des dérivés de la MEF. Ces représentations ont été déterminées à partir des cinétiques d'insertion présentées figure 13.14. Les flèches pointent vers la PIM.

La droite de régression linéaire des fonctions ont toutes une pente négative, traduisant d'une insertion des molécules dans les membranes. Il nous est donc possible de déterminer la PIM.

Les PIMs des énantiomères (*S*) sont plus faibles que celles des énantiomères (*R*), avec par exemple 33 et 61 mN/m pour AJPS0133 et APJS0132, respectivement.

Toutes ces valeurs étant supérieures à la pression estimée des membranes biologiques, nous avons déterminé les $\Delta\pi_{30}$ de chaque composé. Elles sont de 2 mN/m pour AJPS0130, 1,3 mN/m pour AJPS0131, 5,2 mN/m pour AJPS0132 et 1,2 mN/m pour AJPS0133. Les énantiomères (*S*) ont donc un $\Delta\pi_{30}$ plus faible que les énantiomères (*R*) : ces derniers s'insère légèrement plus dans les membranes de PC. Il se pourrait donc qu'il existe un lien entre l'énantiométrie de ces composés antipaludiques et leur capacité à interagir avec les membranes.

Nous l'avons montré, la MEF inhibe l'insertion de l'hémine et de l'hématine dans les monocouches de DPPC/DOPC. Nous avons dans un premier temps étudié la capacité des dérivés de la MEF à inhiber l'insertion de l'hémine dans les monocouches. Nous avons suivi l'inhibition de l'insertion de l'hémine incubée avec les composés AJPS013X à un ratio AJPS013X/hémine de 3 : 1 à pH 7,4 dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). Les cinétiques d'insertion de ces mélanges sont présentées figure 13.16. Les cinétiques d'insertion obtenues pour les mélanges AJPS013X/hémine sont semblables à celles obtenues pour le mélange MEF/hémine. La pression interfaciale augmente très rapidement jusqu'à une première valeur maximale. S'ensuit l'apparition d'une deuxième pente, correspondant à une augmentation plus lente de la pression interfaciale. Comme pour le mélange MEF/hémine, la première pente correspondrait à l'insertion de molécules antipaludique car il est fort probable que ce soit les molécules AJPS qui soient en excès dans le milieu. La deuxième partie de la cinétique pourrait correspondre à l'insertion du complexe AJPS013X/hémine dans la monocouche.

Nous avons déduit la PIM de chaque mélange. Les figures de détermination des PIMs sont présentées figures 13.17.

Toutes les PIMs obtenues sont supérieures à 30 mN/m, les mélanges AJPS013X/hémine sont donc capables de s'insérer dans des membranes préformées de PC à pression physiologique. Nous pouvons constater que la PIM des mélanges contenant les composés (*S*) est plus importante que celle des composés (*R*). Nous avons regroupé l'ensemble des $\Delta\pi_{30}$ obtenus dans un histogramme, présenté figure 13.18.

Ces résultats montrent une diminution globale du $\Delta\pi_{30}$ de l'hémine lorsqu'elle est incubée avec les différents dérivés. Tout comme la MEF, ces dérivés seraient donc capable de diminuer la quantité d'hémine s'insérant dans les monocouches de PC. Pour ces ratios molaires, nous constatons que les énantiomères (*R*) (AJPS0130 et AJPS0132) diminuent plus le $\Delta\pi_{30}$ de l'hémine que les composés (*S*) (AJPS0131 et AJPS0133). Ainsi, la quantité de complexe hémine/AJPS pouvant s'insérer dans les monocouches de

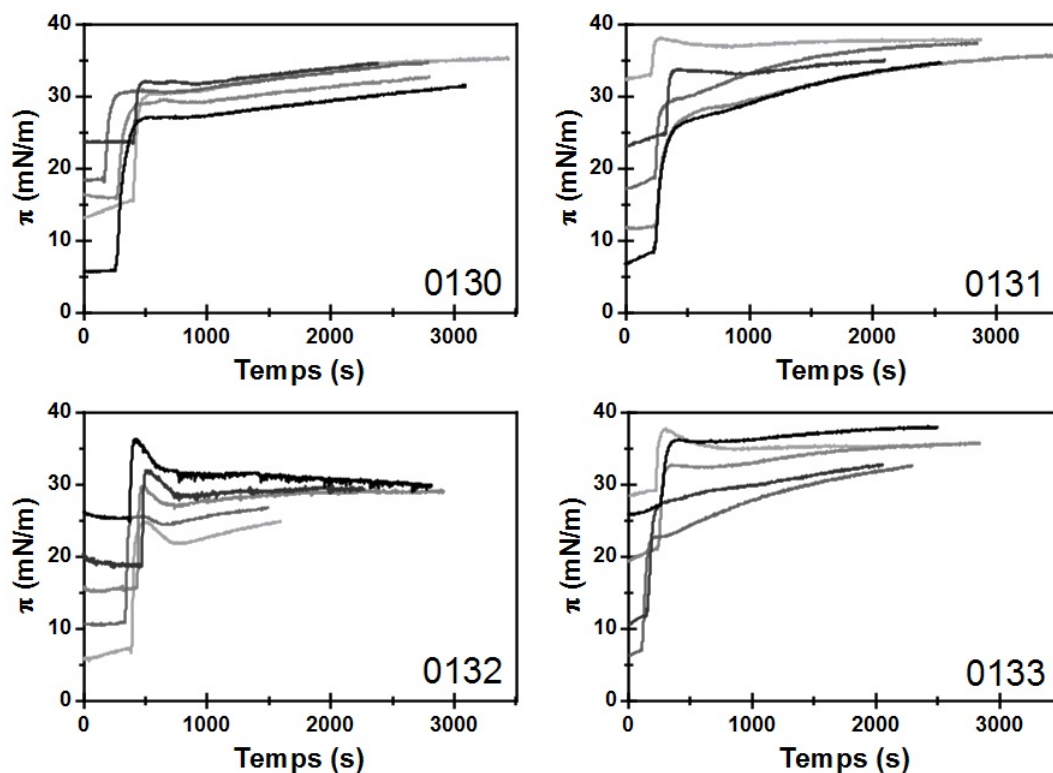


FIGURE 13.16 – Cinétiques d'insertion des mélanges AJPS013X/hémine 3 : 1 (mol/mol) dans des monocouches de DPPC/DOPC. Les mélanges AJPS013X/hémine ont été injectés à des concentrations finales respectives de 3 et 1 μM . Les monocouches sont composées de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). La température a été fixée à 21°C. La sous-phase est composée d'un tampon Tris 100 mM.

DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol) est plus faible lorsqu'elle est traitée avec les énantiomères de type (*S*).

Nous avons ensuite déterminé les paramètres cinétiques de l'interaction entre l'hématine et les dérivés de la MEF. Tout comme pour la MEF et la CQ, nous avons étudié les cinétiques d'insertion de différents mélanges AJPS013X/hématine pour différents ratios molaires. Des cinétiques d'insertion sont présentées figure 13.19.

Les cinétiques d'insertion montrent une augmentation de la pression interfaciale lorsque les mélanges sont injectés en sous-phase. Cette augmentation traduit une interaction entre les composés du mélange et la monocouche. Elle est suivie d'un plateau, après lequel aucune évolution de pression de surface n'est constatée. L'augmentation du ratio molécule antipaludique/hématine provoque une modification des pentes des cinétiques d'insertion des mélanges.

Pour mieux visualiser l'effet des molécules antipaludiques, nous nous sommes intéressés à la variation de la pente, corrélée comme dit plus haut à la vitesse d'insertion des molécules antipaludique dans les monocouches, en fonction du ratio molécule antipaludique/hématine. Ces représentations sont montrées figure 13.20.

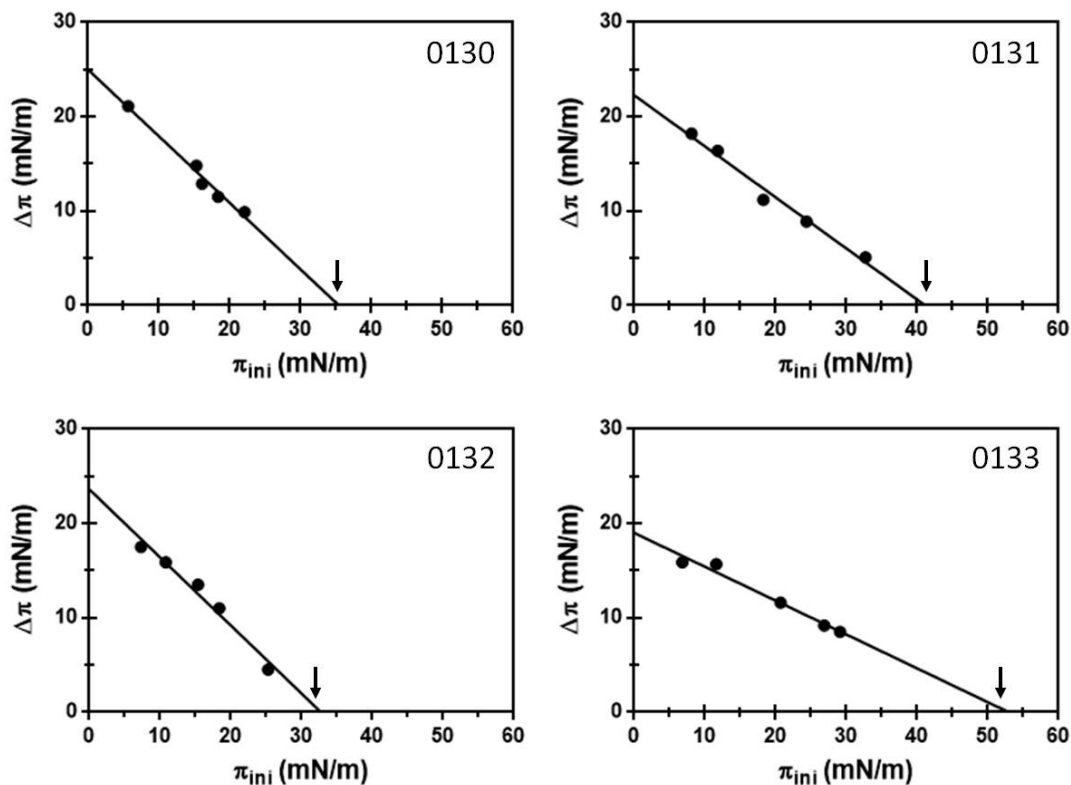


FIGURE 13.17 – Détermination des PIMs des mélanges AJPS013X/hémimine. Les PIMs ont été déterminées à partir des cinétiques d'insertion présentées figure 13.16. Les flèches pointent vers la PIM.

Les énantiomères (*R*) (AJPS0130 et AJPS0132) ont une phase de latence avant laquelle aucune inhibition n'est observée. Cette phase de latence se traduit par un plateau pour AJPS0130, tandis qu'une augmentation de la vitesse d'insertion des mélanges AJPS0132/hématine est observable. Cette augmentation rappelle l'augmentation obtenue pour la MEF aux faibles ratio MEF/hématine. Après atteinte d'une concentration seuil, (0,4 pour AJPS0130, 0,2 pour AJPS0132), nous observons une diminution progressive de la vitesse, dépendante du ratio AJPS013X/hématine, jusqu'à atteindre un plateau. Dans le cas de AJPS0132, ce plateau est atteint à un ratio AJPS0132/hématine supérieur à 1. Il est supérieur à 2 pour le composé AJPS0130.

Les énantiomères (*S*) (AJPS0131 et AJPS0133) provoquent eux une diminution immédiate de la vitesse d'insertion du mélange APJS/hémimine dans les monocouches de DPCC/DOPC. Cette diminution est suivie d'un plateau. Ce profil d'inhibition est similaire à celui que nous avons pu observer pour la CQ interagissant avec l'hémimine.

Pour résumer, nous observons donc que le profil d'inhibition des composés (*R*) se rapproche de la MEF, tandis que celui des composés (*S*) se rapproche de celui de la CQ. Pour obtenir des valeurs chiffrées et ainsi faciliter la lecture de ces données, nous avons représenté le pourcentage d'inhibition de cette vitesse d'insertion en fonction du ratio AJPS013X/hémimine. Pour cela, nous avons appliqué l'équation 13.1 aux cinétiques d'in-

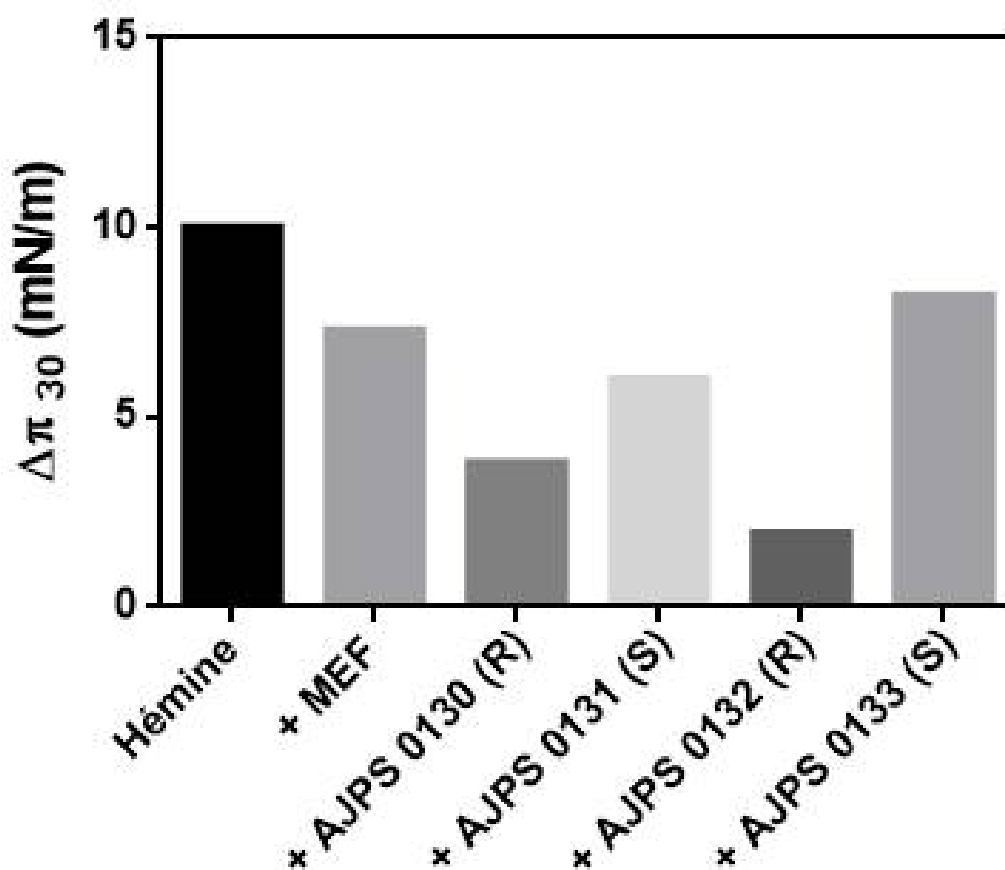


FIGURE 13.18 – $\Delta\pi_{30}$ de l'insertion dans des monocouches de DPPC/DOPC des différents mélanges AJPS013X/hématine 3 : 1.

sertion des mélanges AJPS013X/hématine. Ces résultats sont présentés figure 13.21. Pour tous les composés, le pourcentage d'inhibition maximal se situe entre 75 et 80%. Ce pourcentage, comme montré plus haut, est aussi celui obtenu pour la MEF et la CQ. Comme nous l'avons fait pour la CQ, et la MEF, il est possible d'accéder grâce à ces courbes au ratio AJPS013X/hématine pour lequel une inhibition maximale de l'insertion de l'hématine est obtenue. Pour les composés (*R*), ce ratio est autour de 1 : 1 (mol/mol) pour AJPS0132 et supérieur à 2 : 1 pour AJPS0130. Pour les composés de configuration (*S*), il est autour de 1 : 2 (mol/mol) pour AJPS0131 et AJPS0133. Les ratios des composés (*S*) sont identiques à celui de la CQ, tandis que celui des composés (*R*) se rapproche de celui de la MEF.

À partir de ces cinétiques d'inhibition, nous avons déterminé les IC_{50} de l'inhibition de l'insertion de l'hématine dans les monocouches de PC. Ces IC_{50} sont présentées tableau 13.1.

Nous remarquons que les IC_{50} les plus faibles sont obtenus pour les énantiomères (*S*). Ces IC_{50} sont proches de celles obtenues pour la CQ. En revanche, les énantiomères (*R*)

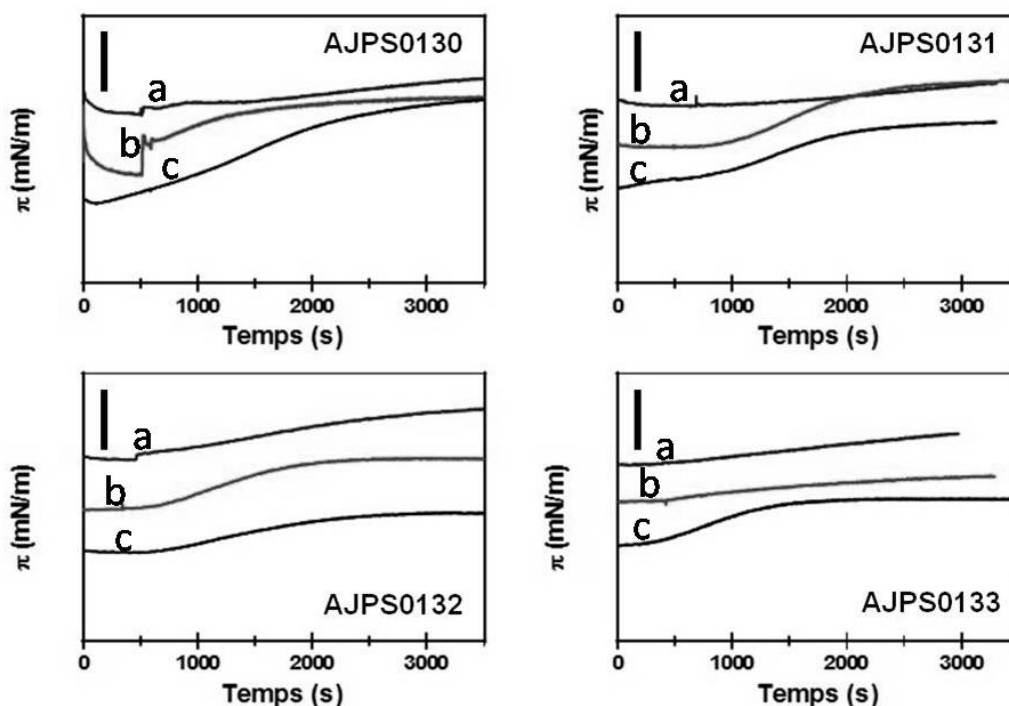


FIGURE 13.19 – Cinétiques d'insertion des mélanges AJPS013X/hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC à pression initiale de 20 mN/m a : ratio molaire AJPS013X/hématine de 0,5 ; b : ratio molaire AJPS013X/hématine de 0,1 c : hématine seule. La barre d'échelle en haut à gauche représente 5 mN/m. Les mélanges ont été incubés dans un tampon de polymérisation à pH 5,2 comme décrit section matériel et méthode. Chaque ratio AJPS013X/hémine a été incubé 5 minutes à 60°C puis injecté à une concentration finale d'hématine de 1 μ M sous des monocouches de DPPC/DOPC. La sous-phase est un tampon Tris 100 mM à pH 7,4. La température de l'expérience est fixée à 21°C.

possèdent une IC_{50} plus proche de celle de la MEF. Ainsi, les énantiomères (*S*) des dérivés de la MEF inhibe de manière plus efficace l'insertion de l'hématine dans les monocouches que les énantiomères (*R*).

Comme pour la CQ et la MEF, nous avons déterminé le K de l'interaction hématine/molécule antipaludique en utilisant des linéarisations de scatchard. Elles sont présentées figure 13.22.

Des K de 1,3 μ M pour AJPS0130, 250 nM pour AJPS0131, 450 nM pour AJPS1032 et 126 nM pour AJPS0133 sont obtenus. Ainsi, les énantiomères (*S*) (AJPS0131 et AJPS0133) possèdent un K du même ordre de grandeur que la CQ, tandis que les énantiomères (*R*) possèdent un K plus proche de celui de la MEF. Les énantiomères (*S*) sont donc plus affins pour l'hématine. Cette affinité est comparable à celle de la CQ pour l'hématine. Par ailleurs, l'affinité des molécules ayant un groupement heptyl sont plus affins que ceux ayant un groupement hexyl. En plus donc de l'énantiométrie, la lipophilicité des composés serait donc un autre élément pouvant améliorer l'inhibition de la formation du cristal d'hémozoïne.

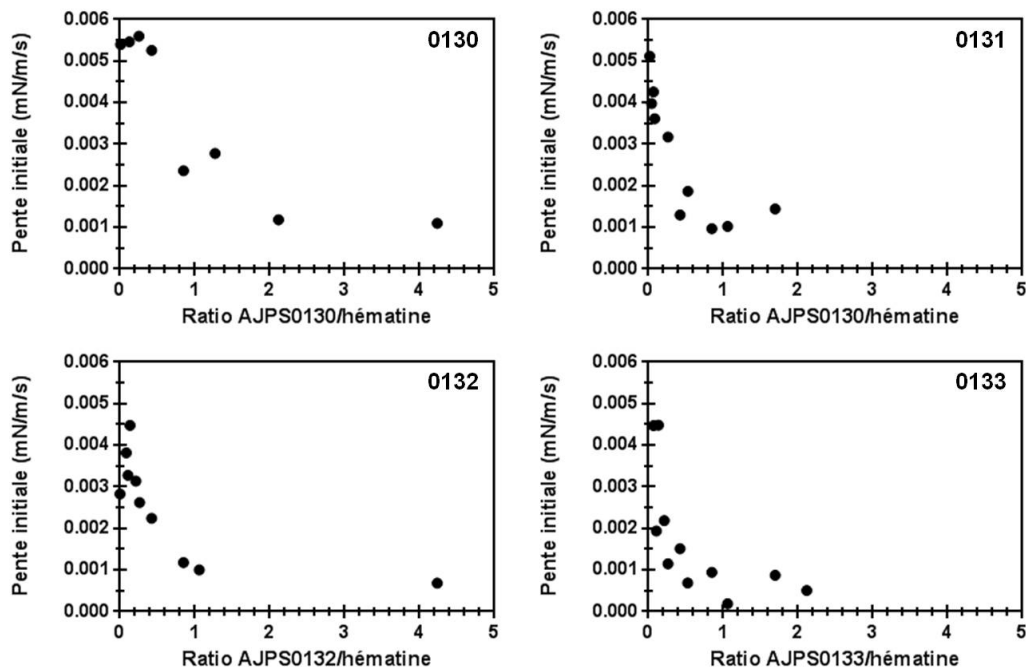


FIGURE 13.20 – Inhibition de la vitesse d’insertion de l’hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC à pression initiale de 20 mN/m.

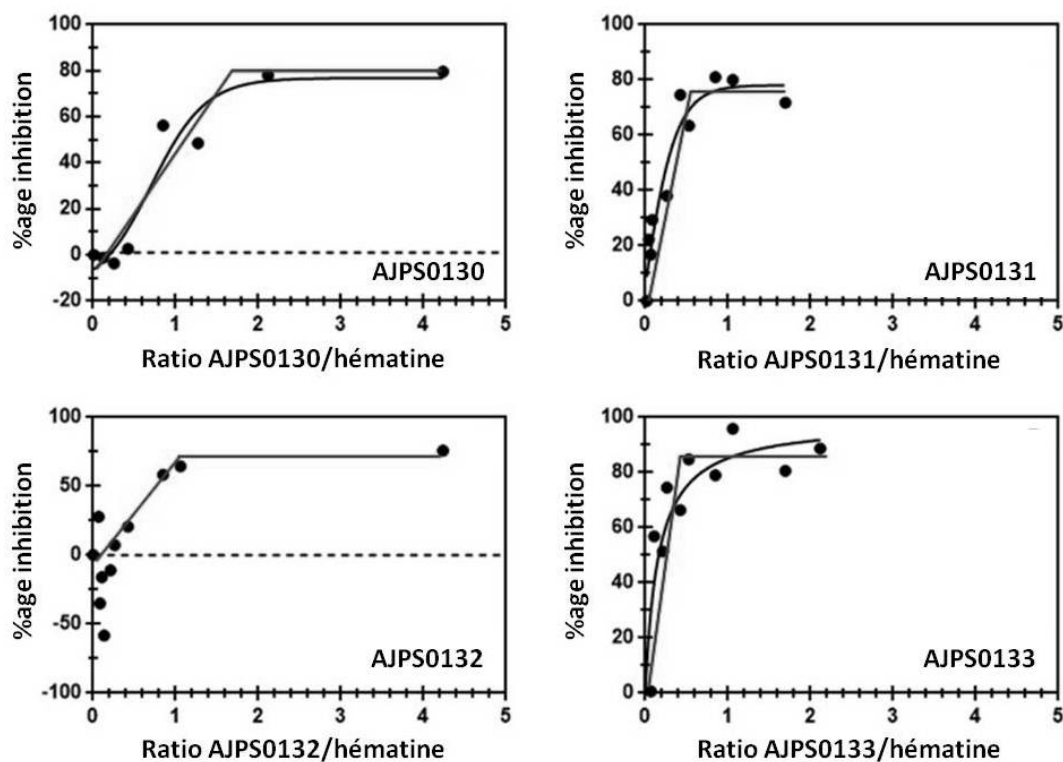


FIGURE 13.21 – Représentation du pourcentage d’inhibition de la vitesse d’insertion de l’hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC à pression initiale de 20 mN/m.

13.3 Conclusion

Dans cette partie de l’étude, nous avons montré qu’il était possible d’utiliser les monocouches de Langmuir comme biocapteur pour suivre l’inhibition de l’insertion de l’hé-

Composés	Énantiomère	IC ₅₀ (μM)
CQ	/	0,4
MEF	Racémique	1,2
AJPS0130	(R)	1
AJPS0131	(S)	0,4
AJPS0132	(R)	0,8
APJS0133	(S)	0,4

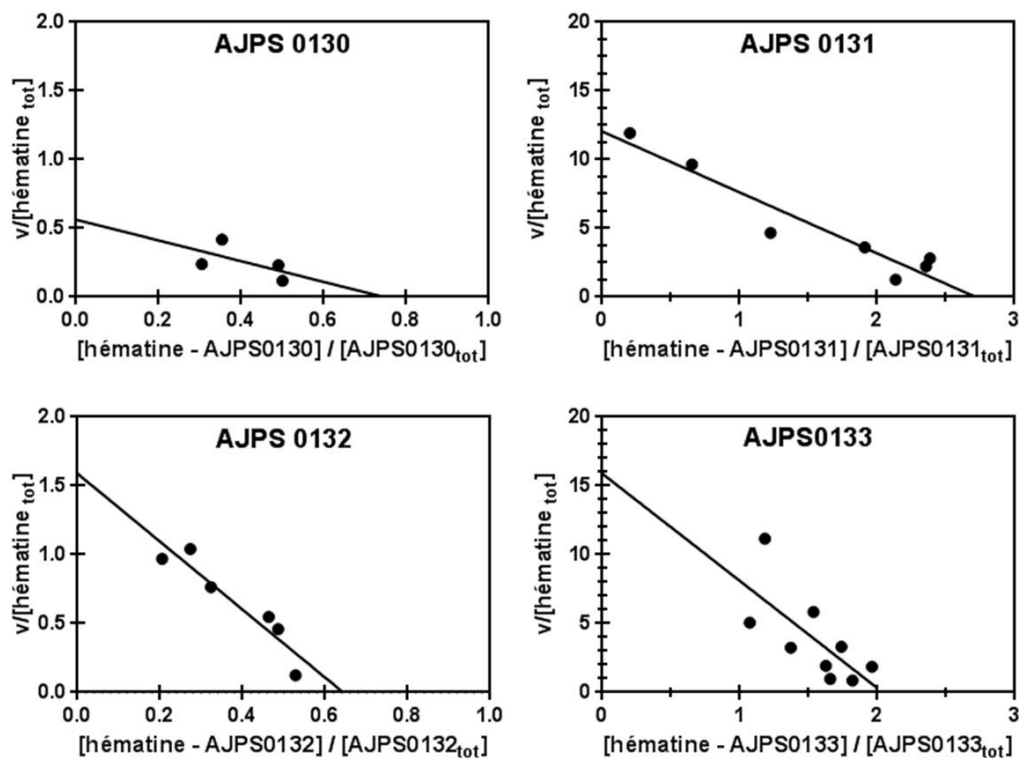
TABLE 13.1 – Valeurs d'IC₅₀ obtenues pour la MEF et les dérivés antipaludiques.

FIGURE 13.22 – Représentation de Scatchard de l'interaction MEF/hématine.

matine. Nous avons utilisé la CQ pour montrer qu'il est possible d'obtenir des paramètres cinétiques conformement à la littérature scientifique.

Concernant maintenant les nouvelles molécules antipaludiques dérivées de la MEF, nous avons montré qu'il existe une différence de comportement entre les énantiomères (*R*) et (*S*). Les énantiomères (*R*) s'insèrent plus massivement dans les monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol) que les composés (*S*). Nous avons aussi observé une meilleure insertion du complexe AJPS/hématine dans les membranes. De plus, nous avons montré que les énantiomères (*R*), pour les ratios AJPS013X/hématine faible, augmentaient la vitesse d'insertion de l'hématine au lieu de l'inhiber. Il se pourrait que pour ces composés, une concentration minimale doit être atteinte avant d'obtenir le moindre effet inhibiteur. Enfin, nous avons montré que la concentration en antipaludique nécessaire pour obtenir l'effet d'inhibition maximal de l'insertion de l'hématine dans les monocouches, les IC₅₀ mais aussi les coefficients *K* de l'interaction AJPS013X/hématine sont plus faibles

pour les énantiomères (*S*), faisant d'eux des composés plus efficaces. Cette inhibition est plus efficace pour le composé contenant le groupement heptyl (AJPS0133), plus lipophile que le composé contenant le groupement hexyl (AJPS0131).

Discussion

14.1 Les polyènes

Les molécules antifongiques comme la Nystatine ou l'Amphotericine B sont des médicaments largement utilisés, notamment pour traiter les mycoses, ou encore en cas de septicémie. Le mécanisme d'action de ces molécules reste globalement incompris. Plusieurs modèles ont été proposés [133, 239, 168, 240, 241, 158, 170], mais ces différents mécanismes ne prenaient jamais totalement en compte tous les paramètres menant à la toxicité des polyènes. Parmi ces paramètres, nous pouvons citer l'interaction préférentielle des polyènes avec les membranes fongiques, ou encore la différence de toxicité montrée par l'AmB et la Nys, deux molécules pourtant de structure chimique très proches.

Au cours de cette étude, nous avons tenté d'apporter une contribution à la compréhension de ce mécanisme d'action. Nous avons utilisé pour cela des modèles membranaires pour caractériser de potentielles cibles moléculaires de la Nys et de l'AmB autres que les stérols.

Nous avons étudié l'insertion de la Nys et de l'AmB dans des monocouches lipidiques à l'interface air/eau. Lors de ces études des propriétés membranotropes des polyènes, nous avons mis en évidence la capacité de la Nys à s'insérer dans tous les types de membranes testées à pression physiologique. Cette insertion s'est avéré particulièrement importante dans les monocouches de PE, un lipide très présent dans les membranes bactériennes et le feuillet interne des cellules eucaryotes [7, 8, 242].

Par ailleurs, nous avons montré que la Nys et l'AmB étaient capables de s'insérer dans les monocouches de stérols. Les valeurs de $\Delta\pi_{30}$ montrent que cette insertion est massive à pression latérale physiologique. L'insertion de la Nys dans les monocouches de stérol ne montre aucune préférence particulière entre l'Ergo et le Chol, tandis que l'AmB a montré une insertion préférentielle dans les monocouches d'Ergo. Cependant, dans les deux cas, la différence d'interaction entre l'Ergo et le Chol montrée lors de ces expériences de monocouches ne peut expliquer complètement le ciblage préférentiel des polyènes pour les membranes fongiques. Aussi, nous avons proposé l'idée que d'autres partenaires d'interac-

tion peuvent être impliqué dans le mécanisme d'interaction avec les polyènes, comme par exemple des phospholipides. Différentes données issues de la littérature viennent nourrir cette idée. Il a été montré par exemple que l'AmB était capable de générer des pores dans des vésicules de PC [234]. Ils seraient capable d'en former dans les membranes bactériennes, pourtant dépourvues de stérols [157]. Le rôle des stérols ne serait pas primordial mais ils serviraient qu'à potentialiser l'insertion des polyènes dans le coeur hydrophobe des membranes [158].

Pour comprendre l'effet des polyènes sur les propriétés biophysiques des lipides, nous avons étudié les isothermes de compression de mélanges lipides/polyènes.

D'une manière générale, l'action des polyènes sur les monocouches de lipides provoquent dans tous les cas une baisse de K_s , signe d'une diminution de leur compaction. Nous avons montré au cours de cette partie de étude trois comportements différents entre les polyènes et les membranes.

Premièrement, l'interaction de la Nys avec les monocouches de DPPC, DPPE et Chol a montré une baisse de K_s associé à une expulsion partielle ou un collapse de la Nys de ces monocouches. Ce polyènes forme des agrégats, très probablement de Nys ou encore enrichis en Nys, à la surface des monocouches.

Deuxièmement, l'action de l'AmB sur les monocouches de stérols et de la Nys sur les monocouches d'Ergo ne montre aucune expulsion des polyènes. Dans le cas de la Nys, ce résultat est intéressant du fait de la faible pression de collapse de ce polyène. Les polyènes forment cependant des agrégats à la surface de ces monocouches, probablement enrichis en Nys et en stérols. La morphologie de ces agrégats dépend du stérol et du polyène utilisés (figure 14.1).

Dans les monocouches d'Ergo, l'AmB génère de nombreux agrégats de tailles moyennes. Ces agrégats sont moins nombreux dans le cas de la Nys, mais sont beaucoup plus gros. Dans les monocouches de Chol, les agrégats générés par l'AmB sont nombreux et de grande taille. Les agrégats générés par la Nys sont eux très peu nombreux et beaucoup plus petits que ceux générés par l'AmB.

Cette différence de morphologie montrent que la Nys perturberait moins les membranes d'Ergo que l'AmB mais serait de même moins active envers les membranes de Chol. Ces effets peuvent être corrélés au fait que l'AmB est plus efficace contre les cellules fongiques (plus forte déstabilisation de la monocouche d'Ergo) mais aussi plus toxique pour les cellules de mammifère (forte déstabilisation des monocouches de Chol par l'AmB) que la Nys [142].

Un troisième comportement a été montré, concernant l'interaction entre la POPE et la Nys. Dans ce type de monocouches, ce polyène ne forme jamais d'agrégat et n'est jamais expulsé. Ce comportement a été observé que pour ce lipide.

Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons formuler deux hypothèses :

- La Nys se localisant préférentiellement dans des domaines de faible compaction,

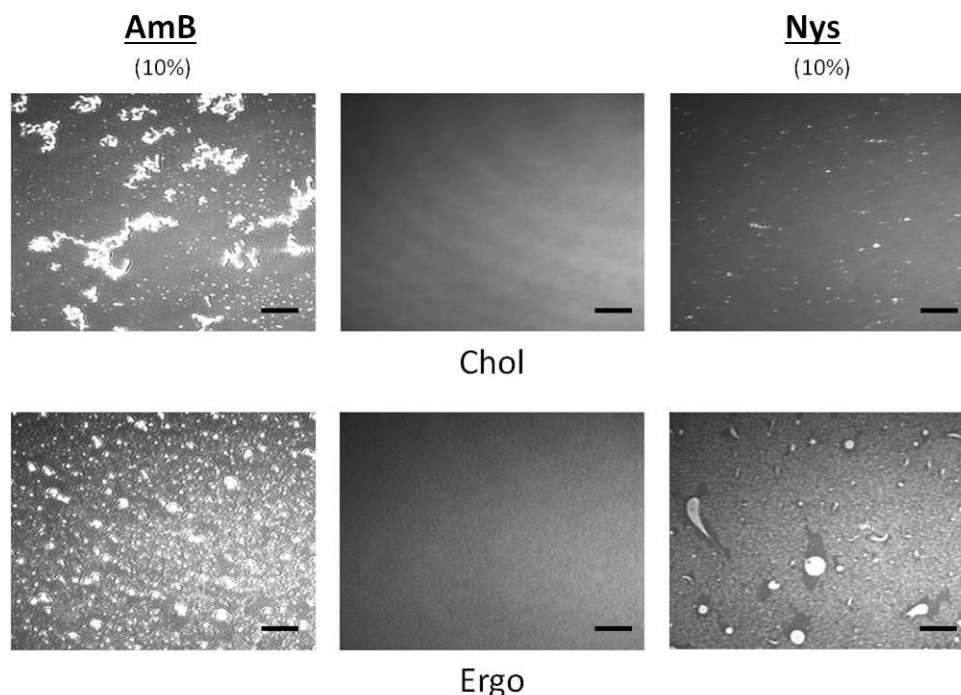


FIGURE 14.1 – Images de BAM des monocouches de Chol et d’Ergo. La sous-phase est un tampon Tris à 10 mM et à pH 7,4. Les expériences ont été réalisées à 21°C.

le faible K_s de la monocouche de POPE favoriserait son maintien au sein de la monocouche. Ce résultat pourrait expliquer l’insertion préférentielle de la Nys dans ce type de monocouche. Cependant, cette hypothèse n’explique pas pourquoi la Nys s’insère préférentiellement dans les monocouches de DPPE par rapport aux monocouches de DPPC puisque leur état de compaction est comparable.

- L’insertion préférentielle de la Nys dans les monocouches de PE pourrait être expliqué par la petite taille de sa tête, ce qui faciliterait l’insertion de la Nys dans le coeur hydrophobe des monocouches. La PE aurait un rôle similaire aux stérols, qui favoriserait eux aussi l’insertion des polyènes dans les membranes.

Dans le but de comprendre l’impact des stérols et de l’environnement lipidique sur l’interaction des polyènes avec les membranes, nous avons étudié l’insertion de la Nys et de l’AmB dans des compositions lipidiques contenant les phospholipides majoritaires des feuillettes externes et internes des membranes biologiques.

Ces modèles ont montré que l’ajout de ces phospholipides provoquait une forte diminution du pouvoir membranotrope de la Nys et de l’AmB pour les monocouches de Chol. Ainsi, l’insertion de l’AmB et de la Nys dans les monocouches contenant le stérol présent dans les cellules animales est beaucoup plus faible que dans celles contenant celui des cellules fongiques. Cette différence d’interaction pourrait expliquer la meilleure efficacité des polyènes envers les cellules fongiques.

Dans les monocouches contenant de l’Ergo, tant l’AmB que la Nys provoquent de fortes augmentations du $\Delta\pi_{30}^{max}$, cela dès les faibles ratios molaires. Cette augmentation est

concentration dépendante. Ces valeurs sont plus fortes dans les mélanges contenant de la POPE, signe que la Nys et l'AmB s'insère plus massivement dans ce type de monocouche. Il est donc possible que l'insertion des polyènes dans le feuillet interne des membranes fongiques soit plus importante que dans le feuillet externe. Cette interaction préférentielle pourrait être expliquée par la seconde hypothèse que nous avons formulé précédemment, à savoir que l'insertion préférentielle de ce polyène dans les monocouches de PE pourrait être due à la petite taille de la tête polaire de ce lipide. Cela pourrait permettre à la Nys de s'insérer plus facilement dans le coeur hydrophobe des membranes. Considérant ces hypothèses, la POPE et l'Ergo pourraient ainsi avoir un effet coopératif sur l'insertion des polyènes (AmB et Nys) au niveau des chaînes acyles des membranes.

Après injection des polyènes dans la sous-phase, nous avons postulé que les monocouches subissent des modifications de leur organisation moléculaire (nous avons étudié ce paramètre par le biais du $T_{30}^{-5\%}$). Pour comprendre la résultante de ces modifications sur les monocouches, nous avons étudié l'évolution du différentiel de pression $\Delta\pi_{30}^{fin}$ en fonction de la concentration en stérol. Nous avons repris les courbes de ce paramètre pour la Nys et l'AmB afin de les comparer (figure 14.2).

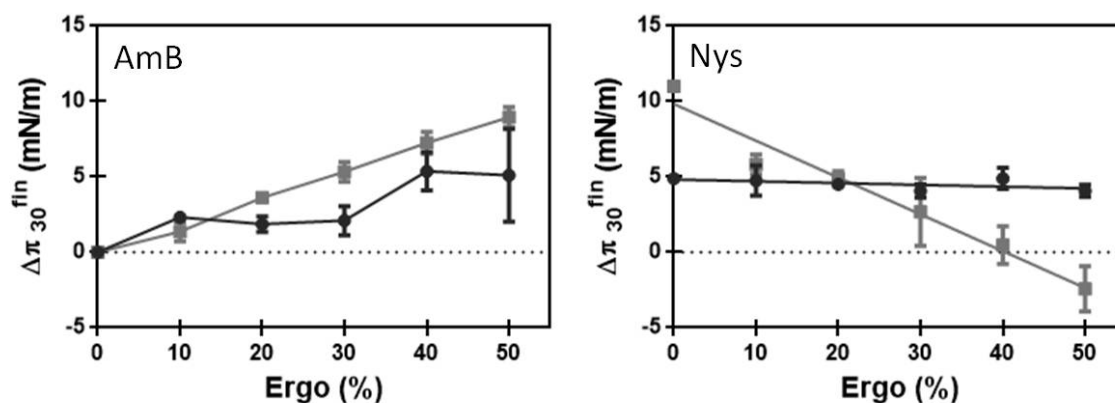


FIGURE 14.2 – Évolution du $\Delta\pi_{30}^{fin}$ en fonction de la concentration en stérol et du polyène utilisé. Cercles : POPE ; Carrés : POPE.

Dans le cas de l'AmB, ce $\Delta\pi_{30}^{fin}$ augmente de manière croissante, tant pour les monocouches contenant de la POPE que de la POPE. Cette augmentation est dépendante de la concentration en AmB.

Les expériences avec la Nys ne montrent aucune évolution de ce $\Delta\pi_{30}^{fin}$ dans le cas de la POPE. En revanche, dans le cas des monocouches de POPE, cette valeur diminue jusqu'à atteindre des $\Delta\pi_{30}^{fin}$ négatifs.

Nous montrons ici pour la première fois une différence très importante dans l'interaction des polyènes avec les membranes. En effet, pour les monocouches de POPE/Ergo, les valeurs négatives peuvent traduire d'une perte de matériel à l'interface. Ainsi, la Nys serait capable de solubiliser la monocouche de POPE/Ergo. Cette solubilisation provoquerait une déstabilisation importante de la membrane fongique. Ce phénomène n'a pas été ob-

servé avec l'AmB et traduit une spécificité du mécanisme d'interaction de la Nys avec les membranes. À notre connaissance, ce phénomène n'a jamais été décrit auparavant dans la littérature scientifique.

Suite aux expériences de monocouches, nous avons utilisé des bicouches lipidiques afin de caractériser l'effet des polyènes sur des mimes plus proche des membranes plasmiques. Pour mieux comprendre le rôle de la POPE dans le mécanisme de perméabilisation des membranes par la Nys, nous avons incorporé ce lipide dans des liposomes de différentes compositions. Nous avons ainsi pu observer que la POPE inhibait la perméabilisation des macromolécules, et ce même quand les vésicules contiennent d'importantes concentrations en stérols (figure 11.23 page 128). Cette inhibition est accompagnée d'une augmentation du diamètre des vésicules (figure 11.25 page 129). Ce résultat suggère que l'action de la Nys est fortement médiée par le contenu en phospholipides et l'arrangement de ces molécules dans la membrane, et non simplement par la concentration absolue en stérol. La POPE aurait un rôle majeur dans son mécanisme d'action.

Lors de l'interaction entre les polyènes et des cellules, le premier partenaire d'interaction est le feuillet externe des membranes, enrichi en PC. L'insertion de ces molécules dans les membranes génère des pores qui perturbent l'ordre des lipides. Nous avons ainsi étudié la perturbation provoquée par les polyènes sur cet ordre. Pour cela, nous avons mesuré le GP (Generalized Polymerization) de deux molécules fluorescentes, le Laurdan et le Prodan.

L'utilisation de LUVs a montré que la Nys et l'AmB provoquaient une déstabilisation en fluidifiant l'ordre des lipides tant au niveau des chaînes acyles qu'au niveau des têtes polaires. Nous avons montré que dans presque tous les cas, les perturbations engendrées diminuaient le GP. Ce résultat montre une fluidification des bicouches (figure 11.28 page 133 et figure 12.14 page 154). Pour les deux polyènes, la déstabilisation des LUVs contenant de l'Ergo était toujours plus importante ou égale à celle des LUVs contenant du Chol.

Pour comparer l'effet des polyènes sur les LUVs, nous avons repris des valeurs de ΔGP obtenues avec des LUVs de 400 nm pour la Nys et l'AmB à 21°C, température à laquelle nous avons fait nos différentes expériences en monocouches (figure 14.3).

Les perturbations générées par l'AmB sont systématiquement plus importantes que celles générées par la Nys, tant pour les vésicules contenant de l'Ergo que celle contenant du Chol. Cette constatation vient appuyer ce que nous avons observé lors des études sur les monocouches de stérol en BAM. Ce résultat confirme que l'interaction de l'AmB avec les membranes riches en stérols est plus importante que celle avec la Nys, ce qui lui permettrait d'être plus efficace contre les cellules fongiques, mais aussi plus toxique pour les cellules animales.

Sur ces graphes, nous remarquons que les deux polyènes augmentent l'accès au solvant des membranes au niveau des chaînes acyles, mais surtout au niveau des têtes polaires.

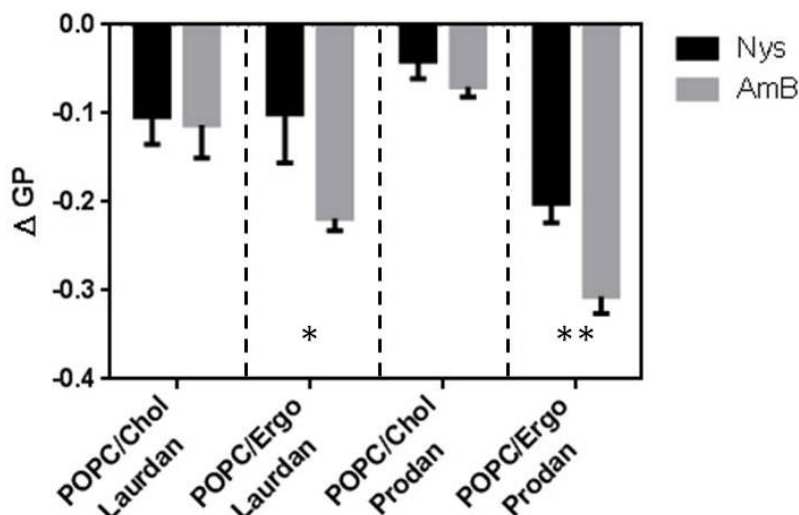


FIGURE 14.3 – Comparaison des ΔGP engendrés par la l'AmB et la Nys sur des liposomes de 400 nm à 21°C. Les comparaisons sont faites entre les mélanges POPC/Stérol 7 :3 (mol/mol) + 10% polyènes. * : p-value inférieure à 0,1. ** : p-value inférieure à 0,01.

L'augmentation du diamètre des vésicules provoque aussi une augmentation globale de l'accès au solvant. Il est intéressant de noter une diminution concomitante du GP_L et du GP_P lorsque ces deux paramètres varient. Normalement, la formation de pores dans les membranes conduit à une diminution du GP_L et une augmentation du GP_P : l'accès au solvant diminue au niveau des têtes polaires, qui sont plus organisées, tandis qu'il augmente dans le coeur hydrophobe de la membrane. Le fait que ces deux valeurs diminuent a tendance à montrer que les polyènes forment bien des structures dans le coeur hydrophobe des membranes, mais continuent aussi à interagir avec les têtes polaires. Selon le modèle de , les polyènes interagiraient avec les têtes polaires *via* une molécule d'eau (REF), ce qui peut expliquer cette diminution du GP_P . Ces résultats sont compatibles avec l'idée que les polyènes interagiraient dans un premier temps avec les têtes polaires des lipides, puis, lorsque la concentration locale est suffisamment importante, s'inséreraient au niveau des chaînes acyles. Ce modèle a d'ailleurs été proposé par Cohen et ses collaborateurs (REF).

Les différents résultats obtenus nous ont conduit à dresser un bilan des expériences, présenté tableau 14.1.

Les différentes données recueillies au cours de cette étude nous ont permis d'élaborer un nouveau modèle de mécanisme d'action des polyènes sur les membranes biologiques. Ce modèle est montré figure 14.4.

Nous avons considéré une bicouche lipidique avec des feuillettes de compositions différentes représentant les membranes naturelles : le feuillet externe est enrichi en POPC, tandis que le feuillet interne est enrichi en POPE. Dans notre mécanisme, les polyènes ont accès aux deux feuillettes de la membrane. Il a été montré que les polyènes étaient capable de

Caractéristique	Nys	AmB
Insertion phospholipides	++++	-
Insertion stérols	++++	++++
Baisse du Ks	++++*	++++
Structures 3D	+++*	++++
Insertion mime membranes animales	+	++
Insertion mime membranes fongiques	++++	++++
Solubilisation POPE/Ergo	+++	-
Perturbation GP membranes animales	+	++
Perturbation GP membranes fongiques	+++	++++

TABLE 14.1 – **Tableau récapitulatif des expériences menées sur la Nys et l'AmB.**
Échelle de valeur : de - = pas observé à ++++ = phénomène important. * sauf pour POPE.

traverser la membrane [149], mais actuellement, le mécanisme de passage fait toujours l'objet de discussions.

Dans toutes les cas, la première interaction des polyènes avec les membranes se ferait au niveau des têtes polaires. Puis, les polyènes pénétreraient dans la membrane et déstabiliseraient l'ordre des chaînes acyles. Les données obtenues lors des études de GP montreraient que la Nys et l'AmB augmentent le taux d'hydratation des têtes polaires, même lorsque ces polyènes déstabilisent les chaînes acyles. Cette augmentation de l'hydratation traduit d'une potentielle interaction entre les têtes polaires et les polyènes *via* une ou plusieurs molécules d'eau. Il se pourrait par ailleurs que ces deux comportements différents (interaction avec les têtes polaires d'un côté, puis insertion dans le cœur hydrophobe des membranes de l'autre) expliquent les deux types de pores générés par les polyènes.

Concernant l'AmB (figure 14.4-A), son insertion dans les membranes contenant de l'Ergo serait plus massive que dans les membranes contenant du Chol. De plus, l'environnement phospholipidique serait important puisque la POPE potentialiserait cette insertion.

Les mêmes constatations peuvent être faites concernant l'insertion de la Nys dans les membranes (figure 14.4-B) : son insertion est plus massive dans les membranes contenant de l'Ergo par rapport à celles contenant du Chol. De plus, la POPE potentialiserait cette insertion. L'interaction de la Nys avec le feuillet interne (riche en PE) des bicouches contenant de l'Ergo provoquerait une solubilisation partielle de ce feuillet, ce qui déstabiliserait la membrane lipidique. Ce phénomène ressemblerait au mécanisme de solubilisation "carpet" décrit dans la littérature scientifique¹. Il est donc possible que l'interaction entre les lipides et les polyènes solubilisent partiellement les feuillets internes des membranes

1. Selon ce mécanisme, une grande concentration de molécule interagirait avec la surface de la membrane. Lorsqu'une concentration seuil est atteinte, la membrane se trouve à des énergies défavorables qui provoquent la perte de son intégrité [243, 244]

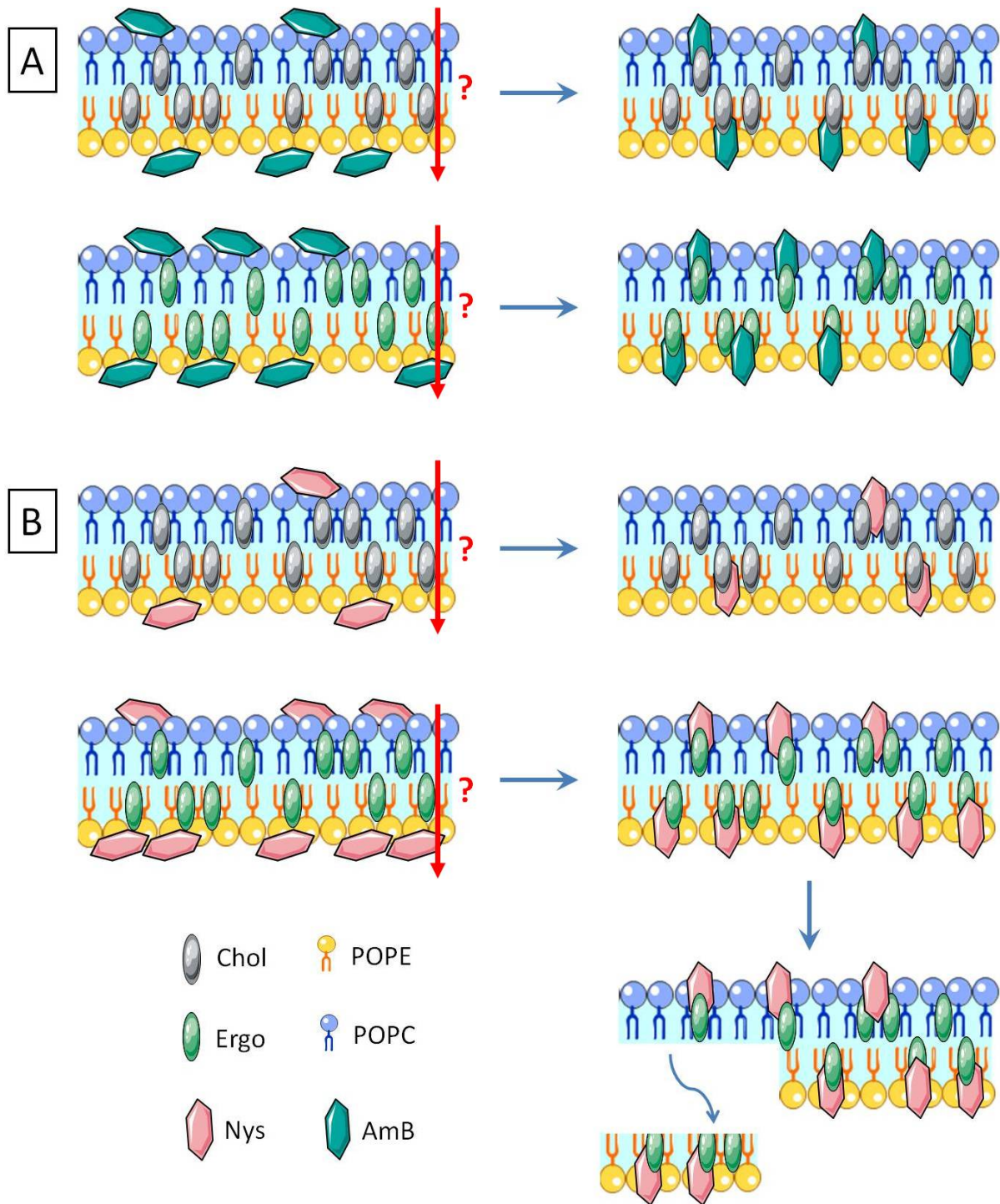


FIGURE 14.4 – Mécanisme d'interaction proposé entre les polyènes et les membranes A : Interactions avec l'AmB. B : Interactions avec la Nys.

biologiques.

La question maintenant est de savoir si ce mécanisme est transposable à l'échelle d'une cellule. Pour répondre, nous devons considérer la composition de la membrane en prenant indépendamment ce qui est connu concernant chaque feuillet lipidique. Il est établi dans la littérature que le feuillet externe des membranes biologiques est enrichi en lipides à tête polaire PhosphoCholine, c'est à dire la SM et la PC, et que la membrane interne est

enrichie en PE et en PS [242, 245, 5, 12]. Par ailleurs, la distribution du Chol dans les membranes est encore sujet à débat [27]. À l'heure actuelle, à la vue des connaissances sur la répartition des lipides dans les membranes, il est très probable que des domaines très enrichi en PE et en stérol dans le feuillet interne des membranes fongiques existent. À ce sujet, Kai Simons a proposé un modèle de composition des rafts mettant en jeu une forte concentration en SM et PC sur le feuillet externe et une forte concentration en PS et PE dans le feuillet interne [34]. Selon ce modèle, ces domaines seraient enrichis en Chol, et sa distribution serait équitable entre les deux feuilletts. Même si la présence de rafts dans les cellules fongiques est encore un sujet de discussion dans la communauté scientifique, différentes preuves, comme la distribution asymétrique des membranes ou la répartition des lipides totaux des membranes fongiques en domaines, tendent à l'affirmer [37, 24]. Il existe donc de fortes chances que ce type de domaines, favorables à une action de lyse des membranes par la Nys, existent.

14.2 Les molécules antipaludiques

Nous avons étudié la capacité de nouvelles molécules antipaludiques dérivées de la MEF à inhiber spécifiquement l'insertion de l'hémine et de l'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). Cette inhibition conduirait à l'inhibition de la formation du cristal d'hémozoïne par le parasite [188]. Ce mélange lipidique a été choisi car il a été montré lors d'une étude précédente réalisée au sein même de l'équipe que les lignes de défauts, provoquées par la différence de hauteur des domaines de DPPC, en phase gel, et des domaines de DOPC, en phase fluide, serviraient de point de nucléation du cristal d'hémozoïne et favoriseraient donc la polymérisation de l'hématine [188].

Pour déterminer le pouvoir inhibiteur de ces molécules, nous avons utilisé les monocouches de Langmuir comme biocapteur. Pour montrer la faisabilité de cette étude, nous avons utilisé la CQ comme molécule modèle, sachant que le mécanisme d'action de cette dernière a été largement étudié dans la littérature scientifique.

Le mécanisme d'action de la CQ serait principalement dû à une inhibition de la formation de l'hémozoïne [199]. La stœchiométrie de l'interaction CQ/hématine est de 1 : 2 (mol/mol) [199]. De plus, une étude récente menée au laboratoire a montré que la CQ inhibait l'insertion de l'hématine dans des monocouches lipidiques, notamment les monocouches de DPPC/DOPC 1 :1 (mol/mol) . Cette inhibition résulterait d'une interaction entre l'hème ferreux de l'hémine et la CQ.

Grâce aux expériences réalisées lors de ces travaux, nous avons pu confirmer le lien entre l'augmentation du ratio CQ/hématine et l'inhibition de l'insertion dans des monocouches lipidiques. Nous avons pu montrer que la stœchiométrie théorique optimale de la réaction était obtenue à un CQ/hématine de 0,5. L'IC₅₀ de l'inhibition de l'insertion de l'hématine

dans les membranes de PC a été estimée à $0,4 \mu\text{M}$. Il nous a par ailleurs été possible de tracer une représentation de Scatchard et obtenir un coefficient K représentant l'affinité de la CQ dans un système où l'hématine peut aussi interagir avec une membrane. L'obtention d'un K_d se fait en général dans des systèmes où seuls les molécules d'intérêt sont en présence. Le K que nous proposons reflète une interaction entre la CQ et l'hématine dans un contexte où la CQ est en compétition avec la membrane, pour laquelle l'hématine possède une grande affinité. Aussi, ce K se rapprocherait plus d'une réalité biologique que les K_d de l'interaction CQ/hématine présents dans la littérature. Pour comprendre le mécanisme d'action de la MEF et notamment l'impact de la configuration chimique sur son pouvoir inhibiteur, l'équipe du Pr Pascal Sonnet à Amiens a synthétisé des dérivés énantiomériquement purs de la MEF. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus lors de cette étude sont montrés tableau 14.2. Nous avons montré

Composés	CQ	MEF	AJPS0130	AJPS0131	AJPS0132	AJPS0133
Groupement Chimique	/	/	Hexyl	Hexyl	Heptyl	Heptyl
Enantiomère	/	Racémique	(R)	(S)	(R)	(S)
Insertion monocouches	-	++	++	+	+++	+
Stoechiométrie optimale	1 : 2	2 : 1	2 : 1	1 : 2	1 : 1	1 : 2
IC ₅₀	0,4	1,2	1	0,4	0,8	0,4
K	97 nM	1,3 μM	1,2 μM	250 nM	450 nM	126 nM
Pouvoir antiparasitaire*	+/-**	+++	+	++++	+	++++

TABLE 14.2 – **Tableau récapitulatif des expériences menées sur les molécules antipaludiques.** Échelle de valeur : de - = pas observé à +++ = phénomène important. * Déterminés d'après [217]. ** Très efficace contre les parasites non CQ-résistants.

que tous les dérivés de la MEF possédaient des PIM supérieure à 30 mN/m. Tous ces composés sont donc capables de s'insérer dans des membranes biologiques préformées à pression latérale physiologique. L'insertion des énantiomères (*R*) a été reportée comme étant plus importante que celle des énantiomères (*S*) (figure 13.15, page 173, tableau 14.2).

La capacité de ces molécules à inhiber l'insertion de l'hématine dans ces mêmes monocouches a été déterminée. Pour cela, nous avons étudié l'insertion de mélanges AJPS/hémine 3 : 1 (mol/mol). L'hémine seule possède un $\Delta\pi_{30}$ supérieur à 10 mN/m. Lorsque l'hémine est incubée avec la MEF, ce $\Delta\pi_{30}$ diminue; il est alors égale à 7 mN/m pour la MEF. Les valeurs obtenues pour les composés AJPS sont équivalentes ou inférieures à cette valeur (tableau 13.18 page 177). Si nous comparons les composés possédant le même groupement fonctionnel (AJPS0130/0131 et AJPS0132/0133), nous constatons que le $\Delta\pi_{30}$ est systématiquement plus faible pour les composés de type (*S*).

Ainsi, nous avons montré que toutes ces molécules étaient capables de diminuer le $\Delta\pi_{30}$ de l'hémine plus efficacement que la MEF, et donc d'inhiber l'insertion de l'hémine dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). Cette diminution est plus importante pour les composés (*R*) que pour les composés (*S*). Ainsi, les complexes hémine/AJPS-(*S*) s'insèrerait davantage dans les membranes. Ce constat vient corroborer l'hypothèse selon laquelle les complexes hémine/molécules antipaludiques formés pourraient être toxique pour le parasite (Thèse de S. Azouzi). La meilleure interaction des complexes hémine/AJPS-(*S*) pourraient donc être en partie responsable de leur meilleur pouvoir antiparasitaire.

Nous avons ensuite étudié les cinétiques d'insertion de différents ratio AJPS013X/hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC 1 : 1 (mol/mol). Des ratio molécule antipaludique / hématine correspondant à une inhibition maximale de l'insertion de l'hématine dans les monocouches proche de 0,5 pour les composés (*S*) ont été obtenus. Ce ratio est de 1 pour AJPS0132 et de 2 pour AJPS0133 (figure 13.21 page 179, tableau 14.2). Pour rappel, le ratio optimal obtenu pour la MEF était autour de 2, celui de la CQ autour de 0,5. Les IC_{50} de l'inhibition de l'insertion de l'hémine dans les monocouches de PC vont dans le même sens, puisqu'elles sont plus importantes pour les énantiomères (*S*) que pour les énantiomères (*R*). Le pouvoir inhibiteur des énantiomères (*S*) est comparable à celui de la CQ, pour laquelle nous avons observé une stœchiométrie et un IC_{50} similaires. En revanche, l'inhibition de l'insertion de l'hématine par les composés (*R*) sont plus proches de la MEF, qui possède elle une stœchiométrie et une IC_{50} peu favorable au regard de la CQ.

Le pouvoir antiparasitaire de ces analogues a été rapporté dans la littérature scientifique [217]. Cette étude montre des IC_{50} du pouvoir antiparasitaire beaucoup plus importants pour les composés (*R*), avec des ratio d'efficacité (*R*)/(*S*) allant de 6 à 15. Si nous corrélons nos résultats avec ceux obtenus par cette équipe, nous pouvons conclure que les énantiomères (*R*), qui ont un pouvoir inhibiteur de l'insertion de l'hématine dans les monocouches de PC et une affinité pour cette molécule plus faibles que les énantiomères (*S*), ont aussi un pouvoir antiparasitaire plus faible. Ainsi, l'énantiométrie de ces molécules aurait un impact sur leur affinité avec l'hématine, qui elle-même aurait un impact sur leur efficacité. Il est donc pertinent de penser que l'augmentation du pouvoir inhibiteur de l'insertion de l'hématine dans les membranes participerait à l'amélioration du pouvoir antiparasitaire.

La synthèse énantiosélective de dérivés de la MEF pourrait ainsi permettre d'obtenir des molécules plus efficaces contre l'inhibition de l'insertion de l'hématine dans les membranes, inhibition reconnue comme étant une stratégie de lutte contre *Plasmodium*.

Conclusion générale

Tout au long de ces travaux de thèse, notre démarche aura été de comprendre les interactions entre des molécules d'intérêt pharmacologique et les membranes biologiques. Cependant, ces membranes sont si complexes qu'il n'est pas possible aujourd'hui d'étudier de manière précise toutes les interactions entre une molécule donnée et les différentes molécules de ces membranes. Pour palier à ce problème, nous avons donc utilisé des modèles membranaires, qui reproduisent certaines propriétés des membranes biologiques, tout en étant moins complexes.

Au cours de l'étude sur les polyènes, nous avons utilisé les modèles membranaires pour déterminer de potentiels nouveaux partenaires d'interaction. Nous avons pour cela utilisé des systèmes simplifiés, notamment les monocouches de Langmuir.

Du fait de l'organisation en double feuillet des membranes naturelles, ce modèle biomimétique ne permet pas d'étude exhaustive des interactions molécule/membrane. Cependant, il a été particulièrement utile pour étudier les premiers instants de l'insertion des molécules dans les membranes et déterminer de nouveaux partenaires potentiels d'interaction. Il nous a aussi permis d'étudier la modification des propriétés biophysiques des lipides par les polyènes et le ΔG de l'interaction lipides/polyène.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de ces partenaires dans le mécanisme d'interaction des polyènes avec les membranes. Nous avons pour cela utilisé des bicouches lipidiques, mimant le double feuillet des membranes biologiques. Ce modèle nous a permis notamment d'étudier l'enfouissement des molécules dans les membranes plasmiques, mais aussi la perméabilisation de ces membranes. Nous avons pu modifier le rayon de courbure de ces vésicules pour comprendre son impact sur l'interaction polyène/membrane. Ces études en bicouches sont donc un très bon complément des résultats obtenus en monocouches.

Nous avons aussi utilisé ces modèles dans un esprit un peu plus novateur, puisque nous avons utilisé les monocouches de Langmuir comme biocapteur afin d'étudier des phénomènes d'inhibition de l'insertion de molécules. Cette méthode nous a permis de déterminer des constantes d'affinité entre l'hématine et des inhibiteurs de sa polymérisation.

sation. Ce système n'a pas pour vocation à remplacer les méthodes traditionnelles de détermination de K_d . En revanche, il est intéressant d'utiliser un système de mesure où la molécule d'intérêt a la possibilité d'interagir avec des partenaires qu'elle retrouverait *in vivo*. Les coefficients K montrés au cours de cette étude prennent donc en compte des paramètres supplémentaires dans cette interaction hématine/inhibiteur, comme le pH du milieu ou la présence de membranes. Par ailleurs, cette méthode ne consomme que très peu de molécules, ces études ayant nécessitées moins de 2 mg de chaque composé.

Bien sûr, les systèmes biomimétiques ne remplacent pas les études sur des cellules entières. Mais, comme nous l'avons montré au cours de cette étude, l'utilisation de différents modèles membranaires nous permet d'étudier différents moments et différentes facettes de l'interaction entre une molécule et une membrane. Ces modèles ont de nombreuses fois permis de mieux comprendre les interactions entre les membranes cellulaires et les molécules étudiées. Gardons toutefois à l'esprit cette célèbre phrase d'Edidin (2003) : "Whatever we learn from models should be tempered by the fact that the cell is always right".

Perspectives

Au cours de l'étude sur les polyènes, nous avons proposé la POPE comme étant un nouveau partenaire d'interaction de la Nys. Ce lipide faciliterait aussi l'insertion de l'AmB dans les membranes. Cependant, nous n'avons pas pu pousser nos investigations dans des modèles de bicouches. Pour continuer ce travail, il est donc important de s'intéresser au rôle de la POPE dans le mécanisme d'action des polyènes dans des bicouches lipidiques. Dans un premier temps, il serait intéressant d'étudier la perméabilisation de bicouches de POPE par les polyènes en utilisant les "Black Lipid Membranes". Cela nous permettrait alors de comparer le comportement du lipide seul avec les autres résultats de perméabilisation obtenus pour d'autres lipides, comme la POPC. Nous pourrions ensuite étudier l'effet de la concentration en stérols sur cette effet de perméabilisation. Cela permettrait de mieux comprendre le rôle des stérols dans le mécanisme d'action des polyènes, mais aussi de confirmer ou d'infirmer notre hypothèse de solubilisation des membranes de POPE/Ergo par la Nys.

Des expériences d'AFM pour étudier l'action de la Nys sur des bicouches de POPE nous permettrait de déterminer les modifications topologiques engendrées par cette molécule sur ce type de membrane. À notre connaissance, à ce jour, aucune étude de ce type a été menée. Pourtant, sachant que la POPE et la Nys ont une interaction particulière, cette étude serait importante pour mieux la comprendre. L'effet des stérols sur l'interaction membrane/polyène pourrait également être étudié, notamment pour savoir si la Nys est capable de générer des structures compactes dans ce type de monocouche, mais aussi pour valider notre hypothèse de solubilisation des membranes de POPE/Ergo.

Les feuillettes des membranes biologiques ont des compositions lipidiques différentes. Aussi, pour aller plus loin dans le mécanisme d'action des polyènes, il serait pertinent d'étudier l'action de ces molécules sur des bicouches avec des feuillettes de compositions lipidiques différentes. Nous pourrions alors étudier, notamment par AFM, les modalités du modèle d'interaction que nous avons proposé sur des bicouches mimant encore plus les membranes biologiques.

Enfin, il serait intéressant d'étudier le mécanisme d'action d'autres polyènes, comme des

polyènes du 1er groupe. Prenons exemple de la Natamycine, qui est un polyène avec un anneau macrolide contenant 4 doubles liaisons. Ce polyène ne perméabiliserait pas les membranes mais inhiberait la croissance des cellules fongiques par liaison à l'Ergostérol [166]. Cette différence de comportement pourrait être étudiée en utilisant des modèles membranaires afin de dégager un mécanisme plus général de l'action des polyènes.

Concernant les molécules antipaludiques, notre équipe a montré récemment que l'hématine était capable de former des fibres dans les bicouches de DPPC/DOPC. Il serait intéressant d'étudier l'inhibition de la formation de ces fibres par les nouvelles molécules antipaludiques que nous avons utilisé. Des études en BAM peuvent être menées pour suivre la formation des fibres d'hématine dans des monocouches de DPPC/DOPC, mais aussi dans des mimes plus proches de la membrane parasitophore du parasite, enrichis en SM.

Toujours pour étudier le pouvoir inhibiteur des molécules synthétisées, il serait possible de reproduire les expériences de suivi de la formation des fibres d'hématine en AFM et d'étudier l'inhibition de leur formation.

Enfin, l'inhibition de la formation des cristaux d'hématine par les dérivées de la MEF pourrait directement être étudiée *in vivo* sur le parasite par diffraction des rayons X.

Bibliographie

- [1] S. J. Singer and G. L. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science (New York, N.Y.)*, 175(4023) :720–31, 1972.
- [2] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, and M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. WHFreeman, 2005.
- [3] G. van Meer. Cellular lipidomics. *The EMBO journal*, 24(18) :3159–65, 2005.
- [4] H. Goldfine and M. E. Ellis. N-Methyl groups in bacterial lipids. *Journal of bacteriology*, 87 :8–15, 1964.
- [5] A. Yamaji-Hasegawa and M. Tsujimoto. Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(August) :1547–1553, 2006.
- [6] J. S. O'Brien and E. L. Sampson. Lipid composition of the normal human brain : gray matter, white matter, and myelin. *J. Lipid Res.*, 6(4) :537–544, 1965.
- [7] H. Kaneko, M. Hosohara, M. Tanaka, and T. Itoh. Lipid composition of 30 species of yeast. *Lipids*, 11(12) :837–844, 1976.
- [8] R. F. Epanand, P. B. Savage, and R. M. Epanand. Bacterial lipid composition and the antimicrobial efficacy of cationic steroid compounds (Ceragenins). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(10) :2500–9, 2007.
- [9] C. S. Ejsing, J. L. Sampaio, V. Surendranath, E. Duchoslav, K. Ekroos, R. W. Klemm, K. Simons, and A. Shevchenko. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7) :2136–41, 2009.
- [10] S. Paul-André and M. Norio, editors. *Lipids in Photosynthesis : Structure, Function and Genetics*, volume 6 of *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer Netherlands, Dordrecht, 1998.
- [11] S. Sonnino and A. Prinetti. Membrane domains and the "lipid raft" concept. *Current medicinal chemistry*, 20(1) :4–21, 2013.
- [12] G. van Meer, D. R. Voelker, and G. W. Feigenson. Membrane lipids : where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2) :112–24, 2008.

- [13] J. R. Silvius, B. D. Read, and R. N. McElhaney. Thermotropic phase transitions of phosphatidylcholines with odd-numbered n-acyl chains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 555(1) :175–178, 1979.
- [14] T. Parasassi, M. Loiero, M. Raimondi, G. Ravagnan, and E. Gratton. Absence of lipid gel-phase domains in seven mammalian cell lines and in four primary cell types. *Biochimica et biophysica acta*, 1153(2) :143–54, 1993.
- [15] M. L. Schmidt, L. Ziani, M. Boudreau, and J. H. Davis. Phase equilibria in DOPC/ DPPC : Conversion from gel to subgel in two component mixtures. *The Journal of chemical physics*, 131(17) :175103, 2009.
- [16] T. Heimburg. A model for the lipid pretransition : coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophysical journal*, 78(3) :1154–65, 2000.
- [17] K. Jorgensen. Calorimetric detection of a sub-main transition in long-chain phosphatidylcholine lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1240(2) :111–114, 1995.
- [18] J. H. Ipsen, O. G. Mouritsen, and M. J. Zuckermann. Theory of thermal anomalies in the specific heat of lipid bilayers containing cholesterol. *Biophysical journal*, 56(4) :661–7, 1989.
- [19] J. Hjort Ipsen, G. Karlström, O. G. Mourtsen, H. Wennerström, and M. J. Zuckermann. Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 905(1) :162–172, 1987.
- [20] Akiko Yamaji-Hasegawa and Masafumi Tsujimoto. Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29(8) :1547–53, 2006.
- [21] Gerrit van Meer. Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(5), 2011.
- [22] R. Lindner and H. Y. Naim. Domains in biological membranes. *Experimental cell research*, 315(17) :2871–8, 2009.
- [23] F.-X. Contreras, L. Sánchez-Magraner, A. Alonso, and F. M. Goñi. Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. *FEBS letters*, 584(9) :1779–86, 2010.
- [24] S. Dogra, S. Krishnamurthy, V. Gupta, B. L. Dixit, C. M. Gupta, D. Sanglard, and R. Prasad. Asymmetric distribution of phosphatidylethanolamine in *C. albicans* : possible mediation by CDR1, a multidrug transporter belonging to ATP binding cassette (ABC) superfamily. *Yeast (Chichester, England)*, 15(2) :111–21, 1999.
- [25] J. A. Virtanen, K. H. Cheng, and P. Somerharju. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9) :4964–9, 1998.

- [26] K. A. Fisher. Analysis of membrane halves : cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(1) :173–7, 1976.
- [27] P. Wydro. The influence of cholesterol on multicomponent Langmuir monolayers imitating outer and inner leaflet of human erythrocyte membrane. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 103 :67–74, 2013.
- [28] F. Schroeder, G. Nemezc, W. Gibson Wood, C. Joiner, G. Morrot, M. Ayrault-Jarrier, and P. F. Devaux. Transmembrane distribution of sterol in the human erythrocyte. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1066(2) :183–192, 1991.
- [29] W. G. Wood, U. Igbavboa, W. E. Müller, and G. P. Eckert. Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes. *Journal of neurochemistry*, 116(5) :684–9, 2011.
- [30] U. Igbavboa, N. A. Avdulov, S. V. Chochina, and W. G. Wood. Transbilayer Distribution of Cholesterol Is Modified in Brain Synaptic Plasma Membranes of Knockout Mice Deficient in the Low-Density Lipoprotein Receptor, Apolipoprotein E, or Both Proteins. *Journal of Neurochemistry*, 69(4) :1661–1667, 2002.
- [31] L. Blau and R. Bittman. Cholesterol distribution between the two halves of the lipid bilayer of human erythrocyte ghost membranes. *The Journal of biological chemistry*, 253(23) :8366–8, 1978.
- [32] K. Simons and G. van Meer. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, 27(17) :6197–202, 1988.
- [33] R. F. M. de Almeida, A. Fedorov, and M. Prieto. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram : boundaries and composition of lipid rafts. *Biophysical journal*, 85(4) :2406–16, 2003.
- [34] K. Simons and E. Ikonen. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633) :569–72, 1997.
- [35] L. J. Pike. Rafts defined : a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research*, 47(7) :1597–8, 2006.
- [36] T. Lang. SNARE proteins and 'membrane rafts'. *The Journal of physiology*, 585(Pt 3) :693–8, 2007.
- [37] C. Klose, C. S. Ejsing, A. J. García-Sáez, H.-J. Kaiser, J. L. Sampaio, M. A. Surma, A. Shevchenko, P. Schwille, and K. Simons. Yeast lipids can phase-separate into micrometer-scale membrane domains. *The Journal of biological chemistry*, 285(39) :30224–32, 2010.
- [38] S. Morandat, M. Bortolato, and B. Roux. Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1564(2) :473–478, 2002.
- [39] R. Schroeder, E. London, and D. Brown. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-

- anchored proteins : GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25) :12130–4, 1994.
- [40] K. El Kirat and S. Morandat. Cholesterol modulation of membrane resistance to Triton X-100 explored by atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(9) :2300–9, 2007.
- [41] E. Yamada. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 1(5) :445–58, 1955.
- [42] V. L. Reeves, C. M. Thomas, and E. J. Smart. Lipid rafts, caveolae and GPI-linked proteins. *Advances in experimental medicine and biology*, 729 :3–13, 2012.
- [43] D. A. Cadenhead, F. Muller-Landau, and B. M. J. Kellner. Bilayers at the air—water interface? *Nature*, 252(5485) :694–6, 1974.
- [44] P. Dynarowicz-Łątka and K. Kita. Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 79(1) :1–17, 1999.
- [45] K. Hac-Wydro and P. Dynarowicz-Latka. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers—the role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action. *Biophysical chemistry*, 123(2-3) :154–61, 2006.
- [46] A. Ambike, V. Rosilio, B. Stella, S. Lepêtre-Mouelhi, and P. Couvreur. Interaction of self-assembled squalenoyl gemcitabine nanoparticles with phospholipid-cholesterol monolayers mimicking a biomembrane. *Langmuir*, 27(8) :4891–9, 2011.
- [47] P. Calvez, S. Bussi eres, E. Demers, and C. Salesse. Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie*, 91(6) :718–33, 2009.
- [48] O. Albrecht, H. Gruler, and E. Sackmann. Polymorphism of phospholipid monolayers. *J. Phys. France*, 39(3) :309–13, 1978.
- [49] R. A. Demel, L. L. M. van Deenen, and S. C. Kinsky. Penetration of Lipid by Polyene Antibiotics. *Journal of Biochemical Chemistry*, 240(6) :2749–2753, 1965.
- [50] R. Maget-Dana. The monolayer technique : a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1462(1-2) :109–40, 1999.
- [51] S. Azouzi, K. El Kirat, and S. Morandat. The potent antimalarial drug cyclosporin A preferentially destabilizes sphingomyelin-rich membranes. *Langmuir*, 26(3) :1960–5, 2010.
- [52] S. Azouzi, S. Morandat, and K. El Kirat. The potent antimalarial peptide cyclosporin A induces the aggregation and permeabilization of sphingomyelin-rich membranes. *Langmuir*, 27(15) :9465–72, 2011.

- [53] S. Pérez-López, M. Nieto-Suárez, C. Mestres, M. A. Alsina, I. Haro, and N. Vila-Romeu. Behaviour of a peptide sequence from the GB virus C/hepatitis G virus E2 protein in Langmuir monolayers : its interaction with phospholipid membrane models. *Biophysical Chemistry*, 141(2-3) :153–61, 2009.
- [54] P. R. Cullis and B. de Kruijff. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 559(4) :399–420, 1979.
- [55] C.-H. Huang. Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8(1) :344–352, 1969.
- [56] F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. J. Vail, and D. Papahadjopoulos. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 557(1) :9–23, 1979.
- [57] R. L. Hamilton Jr, J. Goerke, L. S. Guo, M. C. Williams, and R. J. Havel. Unilamellar liposomes made with the French pressure cell : a simple preparative and semiquantitative technique. *J. Lipid Res.*, 21(8) :981–992, November 1980.
- [58] E. Mayhew, R. Lazo, W. J. Vail, J. King, and A. M. Green. Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 775(2) :169–174, 1984.
- [59] O. Zumbuehl and H. G. Weder. Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 640(1) :252–262, 1981.
- [60] A. Filippov, G. Orädd, and G. Lindblom. Effect of NaCl and CaCl₂ on the lateral diffusion of zwitterionic and anionic lipids in bilayers. *Chemistry and physics of lipids*, 159(2) :81–7, 2009.
- [61] C. G. Sinn, M. Antonietti, and R. Dimova. Binding of calcium to phosphatidylcholine–phosphatidylserine membranes. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 282-283 :410–419, 2006.
- [62] H. I. Petrache, S. Tristram-Nagle, D. Harries, N. Kucerka, J. F. Nagle, and V. A. Parsegian. Swelling of phospholipids by monovalent salt. *Journal of lipid research*, 47(2) :302–9, 2006.
- [63] J. Valério, M. H. Lameiro, S. S. Funari, M. J. Moreno, and E. Melo. Temperature effect on the bilayer stacking in multilamellar lipid vesicles. *The journal of physical chemistry. B*, 116(1) :168–78, 2012.
- [64] R. Volinsky, L. Cwiklik, P. Jurkiewicz, M. Hof, P. Jungwirth, and P. K. J. Kinnunen. Oxidized phosphatidylcholines facilitate phospholipid flip-flop in liposomes. *Biophysical journal*, 101(6) :1376–84, 2011.

- [65] J. C. Bozelli, E. T. Sasahara, M. R. S. Pinto, C. R. Nakaie, and S. Schreier. Effect of head group and curvature on binding of the antimicrobial peptide tritrpticin to lipid membranes. *Chemistry and physics of lipids*, 165(4) :365–73, 2012.
- [66] T. Shimizu, T. Mori, M. Tomita, and K. Tsumoto. pH switching that crosses over the isoelectric point (pI) can improve the entrapment of proteins within giant liposomes by enhancing protein-membrane interaction. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 30(2) :554–63, 2014.
- [67] T. Shimanouchi, N. Yoshimoto, A. Hiroiwa, K. Nishiyama, K. Hayashi, and H. Umakoshi. Relationship between the mobility of phosphocholine headgroup and the protein-liposome interaction : A dielectric spectroscopic study. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 116C :343–350, 2013.
- [68] Y. Zhao, A. Vararattanavech, X. Li, C. Hélixnielsen, T. Vissing, J. Torres, R. Wang, A. G. Fane, and C. Y. Tang. Effects of proteoliposome composition and draw solution types on separation performance of aquaporin-based proteoliposomes : implications for seawater desalination using aquaporin-based biomimetic membranes. *Environmental science & technology*, 47(3) :1496–503, 2013.
- [69] M. Cristani, M. D’Arrigo, G. Mandalari, F. Castelli, M. G. Sarpietro, D. Micieli, V. Venuti, G. Bisignano, A. Saija, and D. Trombetta. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes : implications for their antibacterial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(15) :6300–8, 2007.
- [70] D. Trombetta, F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, and G. Bisignano. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6) :2474–8, 2005.
- [71] L. Duelund, A. Amiot, A. Fillon, and O. G. Mouritsen. Influence of the active compounds of *Perilla frutescens* leaves on lipid membranes. *Journal of natural products*, 75(2) :160–6, 2012.
- [72] A. del V. Turina, M. V. Nolan, J. A. Zygadlo, and M. A. Perillo. Natural terpenes : self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical chemistry*, 122(2) :101–13, 2006.
- [73] A. M. Batenburg, J. C. L. Hibbeln, and B. de Kruijff. Lipid specific penetration of melittin into phospholipid model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 903(1) :155–165, 1987.
- [74] C. E. Dempsey. The actions of melittin on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1031(2) :143–161, 1990.
- [75] A. Colotto, D. P. Kharakoz, K. Lohner, and P. Laggner. Ultrasonic study of melittin effects on phospholipid model membranes. *Biophysical journal*, 65(6) :2360–7, 1993.

- [76] M. Monette and M. Lafleur. Modulation of melittin-induced lysis by surface charge density of membranes. *Biophysical journal*, 68(1) :187–95, 1995.
- [77] A. K. Ghosh, R. Rukmini, and A. Chattopadhyay. Modulation of Tryptophan Environment in Membrane-Bound Melittin by Negatively Charged Phospholipids : Implications in Membrane Organization and Function. *Biochemistry*, 2960(97) :14291–14305, 1997.
- [78] N. K. Subbarao and R. C. MacDonald. Lipid unsaturation influences melittin-induced leakage of vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1189(1) :101–107, 1994.
- [79] M. Monette and M. Lafleur. Influence of lipid chain unsaturation on melittin-induced micellization. *Biophysical journal*, 70(5) :2195–202, 1996.
- [80] T. Pott, M. Paternostre, and E. J. Dufourc. A comparative study of the action of melittin on sphingomyelin and phosphatidylcholine bilayers. *European biophysics journal : EBJ*, 27(3) :237–45, 1998.
- [81] K. Hall, T.-H. Lee, and M.-I. Aguilar. The role of electrostatic interactions in the membrane binding of melittin. *Journal of molecular recognition : JMR*, 24(1) :108–18, 2011.
- [82] M. J. G. Garcera, M. G. L. Elferink, A. J. M. Driessen, and W. N. Konings. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of protonmotive force and lipid composition. *European Journal of Biochemistry*, 212(2) :417–422, 1993.
- [83] E. Breukink, C. van Kraaij, A. van Dalen, R. A. Demel, R. J. Siezen, B. de Kruijff, and O. P. Kuipers. The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry*, 37(22) :8153–62, 1998.
- [84] C. van Kraaij, E. Breukink, M. A. Noordermeer, R. A. Demel, R. J. Siezen, O. P. Kuipers, and B. de Kruijff. Pore formation by nisin involves translocation of its C-terminal part across the membrane. *Biochemistry*, 37(46) :16033–40, 1998.
- [85] A. D. Paiva, E. Breukink, and H. C. Mantovani. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11) :5284–93, 2011.
- [86] A. D. Paiva, N. Irving, E. Breukink, and H. C. Mantovani. Interaction with lipid II induces conformational changes in bovicin HC5 structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(9) :4586–93, 2012.
- [87] K. El Kirat, S. Morandat, and Y. F. Dufrière. Nanoscale analysis of supported lipid bilayers using atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798(4) :750–65, 2010.
- [88] V. Vié, N. Van Mau, E. Lesniewska, J. P. Goudonnet, F. Heitz, and C. Le Grimmeléc. Distribution of Ganglioside G M1 between Two-Component, Two-Phase Phosphatidylcholine Monolayers. *Langmuir*, 14(16) :4574–4583, 1998.

- [89] R. P. Richter, R. Bérat, and A. R. Brisson. Formation of solid-supported lipid bilayers : an integrated view. *Langmuir*, 22(8) :3497–3505, 2006.
- [90] I. Reviakine and A. Brisson. Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, 16(4) :1806–1815, 2000.
- [91] I. Reviakine, A. Simon, and A. Brisson. Effect of Ca²⁺ on the morphology of mixed DPPC-DOPS supported phospholipid bilayers. *Langmuir*, 16(4) :1473–1477, 2000.
- [92] M. Pawlak, S. Stankowski, and G. Schwarz. Melittin induced voltage-dependent conductance in DOPC lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1062(1) :94–102, 1991.
- [93] A. M. Feigin, J. H. Teeter, and J. G. Brand. The influence of sterols on the sensitivity of lipid bilayers to melittin. *Biochemical and biophysical research communications*, 211(1) :312–7, 1995.
- [94] T. L. Jones, R. Fu, F. Nielson, T. A. Cross, and D. D. Busath. Gramicidin channels are internally gated. *Biophysical journal*, 98(8) :1486–93, 2010.
- [95] M. Nishio, A. Shoji, and M. Sugawara. Planar lipid bilayers containing gramicidin A as a molecular sensing system based on an integrated current. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 28(7) :661–7, 2012.
- [96] P. A. Gurnev, S.-T. Yang, K. C. Melikov, L. V. Chernomordik, and S. M. Bezrukov. Cationic cell-penetrating peptide binds to planar lipid bilayers containing negatively charged lipids but does not induce conductive pores. *Biophysical journal*, 104(9) :1933–9, 2013.
- [97] S. Morandat and K. El Kirat. Membrane resistance to Triton X-100 explored by real-time atomic force microscopy. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 22(13) :5786–91, 2006.
- [98] M. N. Puchkov, R. A. Vassarais, E. A. Korepanova, and A. N. Osipov. Cytochrome c produces pores in cardiolipin-containing planar bilayer lipid membranes in the presence of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(2) :208–12, 2013.
- [99] S. Morandat and K. El Kirat. Real-time atomic force microscopy reveals cytochrome c-induced alterations in neutral lipid bilayers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 23(22) :10929–32, 2007.
- [100] K. El Kirat and S. Morandat. Cytochrome c interaction with neutral lipid membranes : influence of lipid packing and protein charges. *Chemistry and physics of lipids*, 162(1-2) :17–24, 2009.

- [101] C. Carrillo, J. A. Teruel, F. J. Aranda, and A. Ortiz. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1611(1-2) :91–97, 2003.
- [102] M. Deleu, J. Lorent, L. Lins, R. Brasseur, N. Braun, K. El Kirat, T. Nylander, Y. F. Dufrêne, and M.-P. Mingeot-Leclercq. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(2) :801–15, 2013.
- [103] J. L. Vázquez, S. Merino, Ò. Doménech, M. Berlanga, M. Viñas, M. T. Montero, and J. Hernández-Borrell. Determination of the partition coefficients of a homologous series of ciprofloxacin : influence of the N-4 piperazinyl alkylation on the antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 220(1-2) :53–62, 2001.
- [104] H. Bensikaddour, K. Snoussi, L. Lins, F. Van Bambeke, P. M. Tulkens, R. Brasseur, E. Goormaghtigh, and M.-P. Mingeot-Leclercq. Interactions of ciprofloxacin with DPPC and DPPG : fluorescence anisotropy, ATR-FTIR and ³¹P NMR spectroscopies and conformational analysis. *Biochimica et biophysica acta*, 1778(11) :2535–43, 2008.
- [105] G. de Arriba, M. Calvino, S. Benito, and T. Parra. Cyclosporine A-induced apoptosis in renal tubular cells is related to oxidative damage and mitochondrial fission. *Toxicology letters*, 218(1) :30–8, 2013.
- [106] A. Berquand, M.-P. Mingeot-Leclercq, and Y. F. Dufrêne. Real-time imaging of drug-membrane interactions by atomic force microscopy. *Biochimica et biophysica acta*, 1664(2) :198–205, 2004.
- [107] N. Fa, L. Lins, P. J. Courtoy, Y. Dufrêne, P. Van Der Smissen, R. Brasseur, D. Tyteca, and M.-P. Mingeot-Leclercq. Decrease of elastic moduli of DOPC bilayers induced by a macrolide antibiotic, azithromycin. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(7) :1830–8, 2007.
- [108] D. R. Walters, J. D. Dutcher, and O. Wintersteiner. The structure of mycosamine. *Journal of the American Chemical Society*, 79(18) :5076–5077, 1957.
- [109] E. L. Hazen and R. Brown. Fungicidin, an Antibiotic Produced by a Soil Actinomycete. *Experimental Biology and Medicine*, 76(1) :93–97, 1951.
- [110] H. A. Gallis, R. H. Drew, and W. W. Pickard. Amphotericin B : 30 years of clinical experience. *Reviews of infectious diseases*, 12(2) :308–29, 1990.
- [111] A. W. K. Ng, K. M. Wasan, and G. Lopez-Berestein. Development of liposomal polyene antibiotics : an historical perspective. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*, 6(1) :67–83, 2003.
- [112] A. J. Carrillo-Muñoz, G. Quindós, C. Tur, M. T. Ruesga, Y. Miranda, O. del Valle, P. A. Cossum, and T. L. Wallace. In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin

- in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 44(3) :397–401, 1999.
- [113] S. Arikan, L. Ostrosky-Zeichner, M. Lozano-Chiu, V. Paetznick, D. Gordon, T. Wallace, and J. H. Rex. In vitro activity of nystatin compared with those of liposomal nystatin, amphotericin B, and fluconazole against clinical *Candida* isolates. *Journal of clinical microbiology*, 40(4) :1406–12, 2002.
- [114] R. Semis, I. Polacheck, and E. Segal. Nystatin-intralipid preparation : characterization and in vitro activity against yeasts and molds. *Mycopathologia*, 169(5) :333–41, 2010.
- [115] D. Ellis. Amphotericin B : spectrum and resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49(Suppl 1) :7–10, 2002.
- [116] A. M. Tortorano, A. Prigitano, E. Biraghi, and M. A. Viviani. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy : in vitro susceptibility of 375 *Candida albicans* isolates and biofilm production. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 56(4) :777–9, 2005.
- [117] Z. A. Kanafani and J. R. Perfect. Antimicrobial resistance : resistance to antifungal agents : mechanisms and clinical impact. *Clinical infectious diseases*, 46(1) :120–8, 2008.
- [118] M. A. Pfaller, S. A. Messer, L. Boyken, S. Tendolkar, R. J. Hollis, and D. J. Diekema. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents : a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *Journal of clinical microbiology*, 42(7) :3142–6, 2004.
- [119] S. Ball, C. J. Bessell, and A. Mortimer. The production of polyenic antibiotics by soil streptomycetes. *Journal of general microbiology*, 17(1) :96–103, 1957.
- [120] J. O. Lampen, E. R. Morgan, A. Slocum, and P. Arnow. Absorption of nystatin by microorganisms. *Journal of bacteriology*, 78 :282–9, 1959.
- [121] F. M. Harold. *Adv in Microbial Physiology APL, Volume 4*. Academic Press, 1970.
- [122] A. P. Stuyk, I. Hoette, G. Drost, J. M. Waisvisz, T. Van Eek, and J. C. Hoogerheide. Pimaricin, a new antifungal antibiotic. *Antibiotics annual*, 5 :878–85, 1957.
- [123] G. M. Hahn, G. C. Li, and E. Shiu. Interaction of amphotericin B and 43 degrees hyperthermia. *Cancer research*, 37(3) :761–4, 1977.
- [124] S. Hartsel and J. Bolard. Amphotericin B : new life for an old drug. *Trends in Pharmacological Sciences*, 17(12) :445–449, 1996.
- [125] S. C. Kinsky. Nystatin binding by protoplasts and a particulate fraction of *Neurospora crassa*, and a basis for the selective toxicity of polyene antifungal antibiotics.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48 :1049–56, 1962.
- [126] H. Goldfine. *Adv in Microbial Physiology APL, Volume 8*. Academic Press, 1972.
- [127] J .T. Dodge and G. B. Phillips. Composition of phospholipids and of phospholipid fatty acids and aldehydes in human red cells. *Journal of lipid research*, 8(6) :667–75, 1967.
- [128] J. O. Lampen and P. M. Arnow. Location and role of sterol at nystatin-binding sites. *Journal of bacteriology*, 84(6) :1952–60, 1962.
- [129] W. A. Zygmunt and P. A. Tavormina. Steroid interference with antifungal activity of polyene antibiotics. *Applied microbiology*, 14(6) :865–9, 1966.
- [130] B. de Kruijff, W. Gerritsen, A. Oerlemans, R. A. Demel, and L. L. M. van Deenen. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 339(1) :30–43, 1974.
- [131] D. B. Archer. Effect of the lipid composition of *Mycoplasma mycoides* subspecies Capri and phosphatidylcholine vesicles upon the action of polyene antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 436(1) :68–76, 1976.
- [132] J. Bolard, M. Seigneuret, and G. Boudet. Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericin B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 599(1) :280–293, 1980.
- [133] J. Bolard, P. Legrand, F. Heitz, and B. Cybulska. One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry*, 30(23) :5707–15, 1991.
- [134] R. Seoane, J. Miñones, O. Conde, M. Casas, and E. Iribarnegaray. Molecular organisation of amphotericin B at the air-water interface in the presence of sterols : a monolayer study. *Biochimica et biophysica acta*, 1375(1-2) :73–83, 1998.
- [135] P. Dynarowicz-Łątka, J. Miñones, O. Conde, M. Casas, and E. Iribarnegaray. BAM studies on the penetration of amphotericin B into lipid mixed monolayers of cellular membranes. *Applied Surface Science*, 246(4) :334–341, 2005.
- [136] P. Dynarowicz-Łątka and R. Seoane. Study of penetration of amphotericin B into cholesterol or ergosterol containing dipalmitoyl phosphatidylcholine Langmuir monolayers. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 27 :249–263, 2003.
- [137] W. C. Chen and R. Bittman. Kinetics of association of amphotericin B with vesicles. *Biochemistry*, 16(19) :4145–9, 1977.
- [138] A. Vertut-Croquin, J. Bolard, M. Chabbert, and C. Gary-Bobo. Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-

- containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study. *Biochemistry*, 22(12) :2939–44, 1983.
- [139] S. Clejan and R. Bittman. Rates of amphotericin B and filipin association with sterols. A study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles. *The Journal of biological chemistry*, 260(5) :2884–9, 1985.
- [140] C. Charbonneau, I. Fournier, S. Dufresne, J. Barwicz, and P. Tancrède. The interactions of amphotericin B with various sterols in relation to its possible use in anticancer therapy. *Biophysical Chemistry*, 91(2) :125–133, 2001.
- [141] C. M. Gary-Bobo. Polyene–sterol interaction and selective toxicity. *Biochimie*, 71(1) :37–47, 1989.
- [142] C C Hsuchen and D S Feingold. Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics : studies on natural membranes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 4(3) :316–9, 1973.
- [143] M. Baginski, H. Resat, and E. Borowski. Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1567(1-2) :63–78, 2002.
- [144] M. Baran, E. Borowski, and J. Mazerski. Molecular modeling of amphotericin B-ergosterol primary complex in water II. *Biophysical chemistry*, 141(2-3) :162–8, 2009.
- [145] A. Neumann, M. Baginski, and J. Czub. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets. *Journal of the American Chemical Society*, 132(51) :18266–72, 2010.
- [146] A. Neumann, J. Czub, and M. Baginski. On the possibility of the amphotericin B-sterol complex formation in cholesterol- and ergosterol-containing lipid bilayers : a molecular dynamics study. *The journal of physical chemistry. B*, 113(48) :15875–85, 2009.
- [147] C. C. Hsuchen and D. S. Feingold. Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics : studies on lecithin membrane models (liposomes). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 4(3) :309–15, 1973.
- [148] Y. Nakagawa, Y. Umegawa, T. Takano, H. Tsuchikawa, N. Matsumori, and M. Murata. Effect of Sterol Side Chain on Ion Channel Formation by Amphotericin B in Lipid Bilayers. *Biochemistry*, 2014.
- [149] J. Bolard. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochimica et Biophysica Acta*, 864(3-4) :257–304, 1986.
- [150] B. de Kruijff, W. Gerritsen, A. Oerlemans, P. Vandijk, R. A. Demel, and L. L. M. van Deenen. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma*

- laidlawii cells and lecithin liposomes. II. Temperature dependence of the polyene antibiotic-sterol complex formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 339(1) :44–56, 1974.
- [151] A. Coutinho and M. Prieto. Cooperative partition model of nystatin interaction with phospholipid vesicles. *Biophysical journal*, 84(5) :3061–78, 2003.
- [152] S. C. Kinsky. Effect of polyene antibiotics on protoplasts of *Neurospora crassa*. *Journal of bacteriology*, 83 :351–8, 1962.
- [153] C. L. Slayman and C. W. Slayman. Measurement of membrane potentials in *Neurospora*. *Science*, 136(3519) :876–7, 1962.
- [154] R. Holz and A. Finkelstein. The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *The Journal of general physiology*, 56(1) :125–45, 1970.
- [155] B. V. Cotero, S. Rebolledo-Antúnez, and I. Ortega-Blake. On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1375(1-2) :43–51, 1998.
- [156] B. E. Cohen. A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1108(1) :49–58, 1992.
- [157] B. Venegas, J. González-Damián, H. Celis, and I. Ortega-Blake. Amphotericin B channels in the bacterial membrane : role of sterol and temperature. *Biophysical journal*, 85(4) :2323–32, 2003.
- [158] B. E. Cohen. Amphotericin B membrane action : role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *The Journal of membrane biology*, 238(1-3) :1–20, 2010.
- [159] D. M. Kamiński. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *European biophysics journal : EBJ*, 2014.
- [160] T.-S. Yang, K.-L. Ou, P.-W. Peng, B.-C. Liou, W.-T. Wang, Y.-C. Huang, C.-M. Tsai, and C.-H. Su. Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1828(8) :1794–801, 2013.
- [161] W. I. Gruszecki, M. Gagoś, M. Hereć, and P. Kernen. Organization of antibiotic amphotericin B in model lipid membranes. A mini review. *Cellular & molecular biology letters*, 8(1) :161–70, 2003.
- [162] W. I. Gruszecki, M. Gagos, and P. Kernen. Polyene antibiotic amphotericin B in monomolecular layers : spectrophotometric and scanning force microscopic analysis. *FEBS letters*, 524(1-3) :92–6, 2002.

- [163] E. P. Reeves, T. Murphy, P. Daly, and K. Kavanagh. Amphotericin B enhances the synthesis and release of the immunosuppressive agent gliotoxin from the pulmonary pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Journal of medical microbiology*, 53(Pt 8) :719–25, 2004.
- [164] T. Katsu, S. Okada, T. Imamura, K. Komagoe, K. Masuda, T. Inoue, and S. Nakao. Precise size determination of amphotericin B and nystatin channels formed in erythrocyte and liposomal membranes based on osmotic protection experiments. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 24(12) :1551–6, 2008.
- [165] B. E. Cohen. Amphotericin B toxicity and lethality : a tale of two channels. *International Journal of Pharmaceutics*, 162(1-2) :95–106, 1998.
- [166] Y. M. te Welscher, H. H. ten Napel, M. M. Balagué, C. M. Souza, H. Riezman, B. de Kruijff, and E. Breukink. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. *The Journal of biological chemistry*, 283(10) :6393–401, 2008.
- [167] K. C. Gray, D. S. Palacios, I. Dailey, M. M. Endo, B. E. Uno, B. C. Wilcock, and M. D. Burke. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7) :2234–9, 2012.
- [168] B. de Kruijff and R. A. Demel. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 339(1) :57–70, 1974.
- [169] Ryota Mouri, Keiichi Konoki, Nobuaki Matsumori, Tohru Oishi, and Michio Murata. Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance. *Biochemistry*, 47(30) :7807–15, 2008.
- [170] T. M. Anderson, M. C. Clay, A. G. Cioffi, K. A. Diaz, G. S. Hisao, M. D. Tuttle, A. J. Nieuwkoop, G. Comellas, N. Maryum, Shu Wang, Brice E Uno, Erin L Wildeman, Tamir Gonen, Chad M Rienstra, and Martin D Burke. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature chemical biology*, 10(5) :400–6, 2014.
- [171] D. S. Palacios, I. Dailey, D. M. Siebert, B. C. Wilcock, and M. D. Burke. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(17) :6733–8, 2011.
- [172] A. Strachecka, G. Borsuk, K. Olszewski, J. Paleolog, M. Gagoś, J. Chobotow, A. Nawrocka, M. Gryzińska, and M. Bajda. The Effect of Amphotericin B on the Lifespan,

- Body-surface Protein Concentrations, and DNA Methylation Levels of Honey Bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Science*, 56(2) :107–113, 2012.
- [173] R. Schneiter, B. Brügger, R. Sandhoff, G. Zellnig, A. Leber, M. Lampl, K. Athens-taedt, C. Hrastnik, S. Eder, G. Daum, F. Paltauf, F. T. Wieland, and S. D. Kohlwein. Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *The Journal of cell biology*, 146(4) :741–54, 1999.
- [174] E. M. O’Shaughnessy, C. A. Lyman, and T. J. Walsh. Amphotericin B : Polyene Resistance Mechanisms. In D Mayers, editor, *Antimicrobial Drug Resistance - Mechanisms of Drug Resistance, Volume 1*, pages 299–304. Humana Press, a part of Springer Science, 2009.
- [175] World Health Organization. World Malaria Report 2013. Technical report, WHO, 2013.
- [176] X. Su, K. Hayton, and T. E. Wellems. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nature reviews. Genetics*, 8(7) :497–506, 2007.
- [177] K. Haldar, N. Mohandas, B. U. Samuel, T. Harrison, N. L. Hiller, T. Akompong, and P. Cheresch. Protein and lipid trafficking induced in erythrocytes infected by malaria parasites. *Cellular microbiology*, 4(7) :383–95, 2002.
- [178] V. L. Lew, T. Tiffert, and H. Ginsburg. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Blood*, 101(10) :4189–94, 2003.
- [179] S. Vippagunta. Characterization of chloroquine-hematin μ -oxo dimer binding by isothermal titration calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1475(2) :133–140, 2000.
- [180] H. Ginsburg and R. A. Demel. The effect of ferriprotoporphyrin IX and chloroquine on phospholipid monolayers and the possible implications to antimalarial activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 732(1) :316–319, 1983.
- [181] K. Becker, L. Tilley, J. L. Vennerstrom, D. Roberts, S. Rogerson, and H. Ginsburg. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes : host-parasite interactions. *International journal for parasitology*, 34(2) :163–89, 2004.
- [182] C. Asher, K. A. de Villiers, and T. J. Egan. Speciation of ferriprotoporphyrin IX in aqueous and mixed aqueous solution is controlled by solvent identity, pH, and salt concentration. *Inorganic chemistry*, 48(16) :7994–8003, 2009.
- [183] P. Loria, S. Miller, M. Foley, and L. Tilley. Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *The Biochemical journal*, 339 (Pt 2 :363–70, 1999.

- [184] H. Ginsburg, O. Famin, J. Zhang, and M. Krugliak. Inhibition of glutathione-dependent degradation of heme by chloroquine and amodiaquine as a possible basis for their antimalarial mode of action. *Biochemical Pharmacology*, 56(10) :1305–1313, 1998.
- [185] T. J. Egan, J. M. Combrinck, J. Egan, G. R. Hearne, H. M. Marques, S. Ntenti, B. T. Sewell, P. J. Smith, D. Taylor, D. A. van Schalkwyk, and J. C. Walden. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Biochemical journal*, 365(Pt 2) :343–7, 2002.
- [186] A. N. Hoang, K. K. Ncokazi, K. A. de Villiers, D. W. Wright, and T. J. Egan. Crystallization of synthetic haemozoin (beta-haematin) nucleated at the surface of lipid particles. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 39(5) :1235–44, 2010.
- [187] E. Hempelmann, C. Motta, R. Hughes, S. A. Ward, and P. G. Bray. *Plasmodium falciparum* : sacrificing membrane to grow crystals? *Trends in Parasitology*, 19(1) :23–26, 2003.
- [188] S. Azouzi. *Interactions de molécules antipaludiques avec des systèmes membranaires biomimétiques*. PhD thesis, UTC, 2011.
- [189] B. M. Greenwood, D. A. Fidock, D. E. Kyle, S. H. I. Kappe, P. L. Alonso, F. H. Collins, and P. E. Duffy. Malaria : progress, perils, and prospects for eradication. *The Journal of clinical investigation*, 118(4) :1266–76, 2008.
- [190] M. Foley. Quinoline Antimalarials Mechanisms of Action and Resistance and Prospects for New Agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 79(1) :55–87, 1998.
- [191] P. B. Macomber and H. Sprinz. Morphological effects of chloroquine on *Plasmodium berghei* in mice. *Nature*, 214(5091) :937–9, 1967.
- [192] D. C. Warhurst and D. J. Hockley. The mode of action of Chloroquine on blood stages of malaria parasites. *Parasitology*, 57(4) :23P, 1967.
- [193] M. Aikawa. High-resolution autoradiography of malarial parasites treated with 3 H-chloroquine. *The American journal of pathology*, 67(2) :277–84, 1972.
- [194] S. M. El-Shoura. *Falciparum malaria in naturally infected human patients : VIII. Fine structure of intraerythrocytic asexual forms before and during chloroquine treatment*. *Applied parasitology*, 35(3) :207–18, 1994.
- [195] P. H. Schlesinger, D. J. Krogstad, and B. L. Herwaldt. Antimalarial agents : mechanisms of action. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32(6) :793–8, 1988.
- [196] S. R. Hawley, P. G. Bray, B. K. Park, and S. A. Ward. Amodiaquine accumulation in *Plasmodium falciparum* as a possible explanation for its superior antimalarial activity over chloroquine. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 80(1) :15–25, 1996.

- [197] C. P. Sanchez, S. Wünsch, and M. Lanzer. Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum*. Differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype. *The Journal of biological chemistry*, 272(5) :2652–8, 1997.
- [198] S. Wünsch, C. P. Sanchez, M. Gekle, L. Grosse-Wortmann, J. Wiesner, and M. Lanzer. Differential stimulation of the Na⁺/H⁺ exchanger determines chloroquine uptake in *Plasmodium falciparum*. *The Journal of cell biology*, 140(2) :335–45, 1998.
- [199] T. J. Egan. Interactions of quinoline antimalarials with hematin in solution. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(5-6) :916–26, 2006.
- [200] P. A. Adams, P. A. M. Berman, T. J. Egan, P. J. Marsh, and J. Silver. The iron environment in heme and heme-antimalarial complexes of pharmacological interest. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 63(1) :69–77, 1996.
- [201] A. Chai, R. Chevli, and C. Fitch. Ferriprotoporphyrin IX Fulfills the Criteria for Identification as the Chloroquine Receptor of Malaria Parasites. *Biochemistry*, 19(8) :1543–1549, 1980.
- [202] S. Moreau, B. Perly, and J. Biguet. Interaction of chloroquine with ferriprotoporphyrin IX. Nuclear magnetic resonance study. *Biochimie*, 64(11-12) :1015–25, 1982.
- [203] G. Blauer. Optical properties of complexes of antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX in aqueous medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251(1) :306–314, 1986.
- [204] L. B. Casabianca, D. An, J. K. Natarajan, J. N. Alumasa, P. D. Roepe, C. Wolf, and A. C. de Dios. Quinine and chloroquine differentially perturb heme monomer-dimer equilibrium. *Inorganic chemistry*, 47(13) :6077–81, 2008.
- [205] L. M. B. Ursos, K. F. DuBay, and P. D. Roepe. Antimalarial drugs influence the pH dependent solubility of heme via apparent nucleation phenomena. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 112(1) :11–17, 2001.
- [206] L. M. B. Ursos, S. M. Dzekunov, and P. D. Roepe. The effects of chloroquine and verapamil on digestive vacuolar pH of *P. falciparum* either sensitive or resistant to chloroquine. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 110(1) :125–134, 2000.
- [207] N. Klonis, O. Tan, K. Jackson, D. Goldberg, M. Klemba, and L. Tilley. Evaluation of pH during cytosomal endocytosis and vacuolar catabolism of haemoglobin in *Plasmodium falciparum*. *The Biochemical journal*, 407(3) :343–54, 2007.
- [208] C. D. Fitch, Y.-F. Chen, and G.-Z. Cai. Chloroquine-induced masking of a lipid that promotes ferriprotoporphyrin IX dimerization in malaria. *The Journal of biological chemistry*, 278(25) :22596–9, 2003.
- [209] R. C. San George, R. L. Nagel, and M. E. Fabry. On the mechanism for the red-cell accumulation of mefloquine, an antimalarial drug. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 803(3) :174–181, 1984.

- [210] R. Chevli and C. D. Fitch. The antimalarial drug mefloquine binds to membrane phospholipids. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 21(4) :581–6, 1982.
- [211] J. Desneves. Photoaffinity labeling of mefloquine-binding proteins in human serum, uninfected erythrocytes and Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 82(2) :181–194, 1996.
- [212] D. E. Schwartz, G. Eckert, D. Hartmann, B. Weber, D. Richard-Lenoble, J. M. Ekue, and M. Gentilini. Single dose kinetics of mefloquine in man. Plasma levels of the unchanged drug and of one of its metabolites. *Chemotherapy*, 28(1) :70–84, 1982.
- [213] A. F. G. Slater. Chloroquine : Mechanism of drug action and resistance in plasmodium falciparum. *Pharmacology & Therapeutics*, 57(2-3) :203–235, 1993.
- [214] A. C. Chou and C. D. Fitch. Control of heme polymerase by chloroquine and other quinoline derivatives. *Biochemical and biophysical research communications*, 195(1) :422–7, 1993.
- [215] G. Vanderkooi, P. Prapunwattana, and Y. Yuthavong. Evidence for electrogenic accumulation of mefloquine by malarial parasites. *Biochemical Pharmacology*, 37(19) :3623–3631, 1988.
- [216] C. D. Fitch, R. L. Chan, and R. Chevli. Chloroquine resistance in malaria : accessibility of drug receptors to mefloquine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 15(2) :258–62, 1979.
- [217] C. Mullié, A. Jonet, C. Desgrouas, N. Taudon, and P. Sonnet. Differences in anti-malarial activity of 4-aminoalcohol quinoline enantiomers and investigation of the presumed underlying mechanism of action. *Malaria journal*, 11 :65, 2012.
- [218] J. M. Karle, R. Olmeda, L. Gerena, and W. K. Milhous. Plasmodium falciparum : role of absolute stereochemistry in the antimalarial activity of synthetic amino alcohol antimalarial agents. *Experimental parasitology*, 76(4) :345–51, 1993.
- [219] R. Shepherd. Use Of (+)mefloquine For The Treatment Of Malaria - The Lens, 1998.
- [220] H. Ginsburg and R. A. Demel. Interactions of hemin, antimalarial drugs and hemin-antimalarial complexes with phospholipid monolayers. *Chemistry and physics of lipids*, 35(4) :331–47, 1984.
- [221] K. K. Ncokazi and T. J. Egan. A colorimetric high-throughput beta-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. *Analytical biochemistry*, 338(2) :306–19, 2005.
- [222] S. Henon and J. Meunier. Microscope at the Brewster angle : Direct observation of first-order phase transitions in monolayers. *Review of Scientific Instruments*, 62(4) :936, 1991.

- [223] D. Hoenig and D. Moebius. Direct visualization of monolayers at the air-water interface by Brewster angle microscopy. *The Journal of Physical Chemistry*, 95(12) :4590–4592, 1991.
- [224] D. M. Jameson. Gregorio Weber, 1916-1997 : a fluorescent lifetime. *Biophysical journal*, 75(1) :419–21, 1998.
- [225] T. Parasassi, G. De Stasio, G. Ravagnan, R. M. Rusch, and E. Gratton. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical journal*, 60(1) :179–89, 1991.
- [226] S. A. Sanchez, M. A. Tricerri, G. Gunther, and E. Gratton. Laurdan generalized polarization : from cuvette to microscope. In A. Mendez-Villas and J. Diaz, editors, *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, pages 1007–1014. Formatex 2007, 2007.
- [227] K. Hac-Wydro and P. Dynarowicz-Łatka. Nystatin in Langmuir monolayers at the air/water interface. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 53(1) :64–71, 2006.
- [228] O. Domènech, J. Ignés-Mullol, M. T. Montero, and J. Hernandez-Borrell. Unveiling a complex phase transition in monolayers of a phospholipid from the annular region of transmembrane proteins. *The journal of physical chemistry B*, 111(37) :10946–51, 2007.
- [229] J. Miñones, S. Pais, O. Conde, and P. Dynarowicz-Łatka. Interactions between membrane sterols and phospholipids in model mammalian and fungi cellular membranes— a Langmuir monolayer study. *Biophysical chemistry*, 140(1-3) :69–77, 2009.
- [230] S. Alexandre, G. Colé, S. Coutard, C. Monnier, V. Norris, W. Margolin, X. Yu, and J. M. Valleton. Interaction of FtsZ protein with a DPPE Langmuir film. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 23(4) :391–395, 2002.
- [231] M. N. Islam and T. Kato. Anomalous phase behavior in Langmuir monolayers of monomyristoyl-rac-glycerol at the air-water interface. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 21(24) :10920–2, 2005.
- [232] M. V. Dwivedi, R. K. Harishchandra, O. Koshkina, M. Maskos, and H. J. Galla. Size influences the effect of hydrophobic nanoparticles on lung surfactant model systems. *Biophysical journal*, 106(1) :289–98, 2014.
- [233] R H Meade. Drug therapy reviews : clinical pharmacology and therapeutic use of antimycotic drugs. *American journal of hospital pharmacy*, 36(10) :1326–34, October 1979.
- [234] A. Coutinho, L. Silva, A. Fedorov, and M. Prieto. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation : relation to pore formation. *Biophysical journal*, 87(5) :3264–76, 2004.

- [235] J. Milhaud, M. A. Hartmann, and J. Bolard. Interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with model membranes : differences between small and large unilamellar vesicles. *Biochimie*, 71(1) :49–56, 1989.
- [236] Ol. Wesołowska, M. Kuzdzał, J. Strancar, and K. Michalak. Interaction of the chemopreventive agent resveratrol and its metabolite, piceatannol, with model membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 1788(9) :1851–60, 2009.
- [237] J. Bolard, M. Cheron, and J. Mazerski. Effect of surface curvature on the interaction of single lamellar phospholipid vesicles with aromatic and nonaromatic heptaene antibiotics (vacidin A and amphotericin B). *Biochemical Pharmacology*, 33(22) :3675–3680, 1984.
- [238] J. Miñones, C. Carrera, P. Dynarowicz-Łatka, J. Miñones, O. Conde, R. Seoane, and J. M. Rodríguez Patino. Orientational Changes of Amphotericin B in Langmuir Monolayers Observed by Brewster Angle Microscopy. *Langmuir*, 17(5) :1477–1482, 2001.
- [239] A. Marty and A. Finkelstein. Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin, Differences in its one-sided and two-sided action. *The Journal of general physiology*, 65(4) :515–26, 1975.
- [240] P. van Hoogevest and B. de Kruijff. Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoyl phosphatidylcholine. A refinement of the model for the formation of pores by amphotericin B in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 511(3) :397–407, 1978.
- [241] I. Gruda and J. Bolard. On the existence of an amphotericin B–sterol complex in lipid vesicles and in propanol-water systems. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 65(3) :234–8, 1987.
- [242] A. J. Verkleij and R. F. A. Zwaal. The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy. . . . *et Biophysica Acta (BBA) . . .*, pages 178–193, 1973.
- [243] Michael R Yeaman and Nannette Y Yount. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1) :27–55, 2003.
- [244] Yechiel Shai. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1-2) :55–70, 1999.
- [245] R. F. A. Zwaal and A. J. Schroit. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89(4) :1121–32, 1997.