



**HAL**  
open science

# Mécanisme membranotrope de l'ovotransferrine sur membranes modèles de bactéries : impact du chauffage à sec de la protéine

Youcef Menacer

## ► To cite this version:

Youcef Menacer. Mécanisme membranotrope de l'ovotransferrine sur membranes modèles de bactéries : impact du chauffage à sec de la protéine. Bactériologie. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1S144 . tel-01822384

**HAL Id: tel-01822384**

**<https://theses.hal.science/tel-01822384>**

Submitted on 25 Jun 2018

**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.

ANNÉE 2017



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*Mention : Physique*

**Ecole doctorale « Matières, Molécules et Matériaux »**

*Présentée par*  
**Youcef MENACER**

Préparée à l'unité de recherche UMR CNRS 6251  
Institut de Physique de Rennes  
UFR Sciences et Propriété de la Matière

---

**Mécanisme membranotrope  
de l'ovotransferrine  
sur membrane modèle  
de bactéries,  
impact du chauffage à sec  
de la protéine**

**Thèse soutenue à  
Rennes le 20 / 12 / 2017**

devant le jury composé de :

**Aurélien MALZERT-FRÉON**

Professeur, Université de Caen Normandie - CERMN  
*Rapporteur*

**Yannick FLEURY**

Maître de conférences, Université de Brest - LUBEM  
*Rapporteur*

**Nicolas DELORME**

Professeur, Université du Maine - IMMM  
*Examineur*

**Arnaud SAINT-JALMES**

Directeur de recherche, Université Rennes 1 - IPR  
*Examineur*

**Véronique VIÉ**

Maître de conférences, Université Rennes 1 - IPR  
*Directrice de thèse*

**Françoise NAU**

Professeur, Agrocampus Ouest - INRA  
*Co-directrice de thèse*



# TABLE DES MATIÈRES

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>I. Etat de l'art.....</b>	<b>4</b>
I.1. Avant-propos .....	5
I.2. Les membranes bactériennes .....	6
I.2.1. Structure générale des bactéries.....	6
I.2.2. L'enveloppe bactérienne.....	7
I.2.3. Les lipopolysaccharides : composés majoritaires du feuillet externe de la membrane externe.....	12
I.2.4. Modèles Membranaires.....	15
I.3. Protéines et peptides antimicrobiens .....	19
I.3.1. Propriétés et caractéristiques structurales et physico-chimiques des peptides et protéines antimicrobiens .....	19
I.3.2. Interaction des protéines/peptides perturbateurs des membranes .....	24
I.3.3. Limites des protéines et des peptides antibactériens.....	29
I.4. L'Ovotransferrine, une protéine antibactérienne.....	31
I.4.1. Caractéristiques structurales et physico-chimiques .....	31
I.4.2. Fonctions.....	32
I.4.3. Stabilité et comportement .....	35
<b>II. Matériels et méthodes .....</b>	<b>36</b>
II.1. Préparation de l'ovotransferrine .....	37
II.1.1. Purification de l'ovotransferrine.....	37
II.1.2. Chauffage à sec de l'ovotransferrine .....	39
II.1.3. Conservation.....	39
II.2. Analyse physico-chimique de l'ovotransferrine.....	39
II.2.1. Dimension et masse moléculaire de l'ovotransferrine.....	39
II.2.2. Structure moléculaire de l'ovotransferrine .....	41

II.3. Etudes à l'interface air/liquide.....	43
II.3.1. Ellipsométrie.....	43
II.3.2. Tensiométrie .....	49
II.3.3. Cuves et dispositifs expérimentaux .....	52
II.3.4. La microscopie à Force Atomique.....	54
II.3.5. Expérimentation.....	56

### **III. Caractérisation physico-chimique et interfaciale de l'ovotransferrine native et chauffée à sec .....59**

III.1. Introduction .....	60
III.2. Résultats.....	61
III.2.1. Caractérisation physico-chimique de l'ovotransferrine native et chauffée à sec .....	61
III.2.2. Caractérisation à l'interface air/liquide de l'ovotransferrine Native et chauffée à sec .....	67
III.3. Discussion.....	76
III.3.1. Le chauffage à sec induit de faibles modifications de propriétés physico-chimiques de l'ovotransferrine.....	76
III.3.2. Le chauffage à sec favorise la formation d'oligomères de l'ovotransferrine... ..	77
III.3.3. Effet du chauffage à sec sur la dynamique de l'ovotransferrine en solution et à l'interface.....	77
III.3.4. Les faibles modifications de propriétés physico-chimiques de l'ovotransferrine par chauffage à sec induisent un changement de grande ampleur de son comportement interfacial .....	78
III.3.5. Influence de l'effet barrière sur l'affinité de l'ovotransferrine native et chauffée à sec à l'interface liquide/air.....	82
III.3.6. Changement d'état des couches protéiques au cours de l'adsorption et à saturation .....	82
III.4. Conclusion .....	84

<b>IV. Interaction de l'ovotransferrine native et chauffée avec une monocouche de LPS, modèle de la membrane externe d'<i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>87</b>
IV.1. Introduction .....	88
IV.2. Résultats.....	89
IV.2.1. Caractérisation de la monocouche de lipopolysaccharides à la compression ..	89
IV.2.2. Interaction de l'ovotransferrine avec une monocouche de lipopolysaccharides ..	91
IV.2.3. Capacité d'insertion de l'ovotransferrine dans une monocouche de lipopolysaccharides ..	93
IV.2.4. Affinité de l'ovotransferrine pour une monocouche de lipopolysaccharides ..	95
IV.2.5. Topographie AFM de la monocouche de lipopolysaccharides avant et après interaction avec l'ovotransferrine ..	97
IV.3. Discussion.....	103
IV.3.1. L'affinité élevée de l'ovotransferrine native pour les lipopolysaccharides conduit à son insertion dans la monocouche de LPS ..	103
IV.3.2. Le chauffage à sec de l'ovotransferrine augmente son affinité pour la monocouche de lipopolysaccharides ..	104
IV.3.3. L'insertion de l'ovotransferrine native et chauffée à sec induit des impacts de différentes natures sur la monocouche de lipopolysaccharides ..	105
IV.3.4. L'insertion de l'ovotransferrine native et chauffée à sec est fortement influencée par l'état de la monocouche de lipopolysaccharides ..	106
IV.3.5. La longueur des chaînes de polysaccharides augmente l'affinité de l'ovotransferrine native et chauffée à sec pour les lipopolysaccharides de la monocouche ..	107
IV.3.6. La haute compressibilité de la monocouche de lipopolysaccharides favorise l'insertion de l'ovotransferrine native et chauffée à sec ..	108
IV.3.7. Comparaison de l'activité membranotrope de l'ovotransferrine et du lysozyme vis-à-vis une monocouche de lipopolysaccharides ..	109
IV.4. Conclusion .....	113

<b>V. Interaction de l'ovotransferrine native et chauffée avec une monocouche de CMEC, modèle de la membrane interne d'<i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>115</b>
V.1. Introduction .....	116
V.2. Résultats.....	117
V.2.1. Caractérisation de la monocouche de CMEC.....	117
V.2.2. Cinétique d'interaction de l'ovotransferrine avec une monocouche de CMEC .....	119
V.2.3. Topographie AFM de la monocouche de CMEC avant et après injection d'ovotransferrine .....	122
V.3. Discussion.....	129
V.3.1. La monocouche de CMEC est peu compressible avec une forte tendance à la relaxation .....	129
V.3.2. L'adsorption est le principale mode d'interaction de l'ovotransferrine avec la monocouche de CMEC.....	130
V.3.3. Le chauffage à sec confère à l'ovotransferrine de nouvelles modalités d'interaction avec la monocouche de CMEC .....	131
V.3.4. L'ovotransferrine native et chauffée à sec interagissent préférentiellement avec la phase liquide expansée de la monocouche de CMEC.....	132
V.3.5. L'interaction de l'ovotransferrine native et chauffée à sec avec la monocouche de CMEC se traduit par plusieurs types d'impacts.....	133
V.4. Conclusion .....	135
 <b>Conclusion générale .....</b>	 <b>137</b>
 <b>Références .....</b>	 <b>141</b>
 <b>ANNEXES.....</b>	 <b>155</b>

## Abréviations

AFM	Atomic force microscopy (Microscopie à force atomique)
ANS	1-anilidonaphthalene-8-sulphonate
CMEC	Mélange de phospholipides de la membrane cytoplasmique d' <i>E. coli</i>
DDPC	1,2-didocosaheptaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DH-Lyso	Lysozyme chauffé à sec
DH-Otf	Ovotransferrine chauffée à sec
D-iGlu	Dextrogyre-Acide isoglutamique
DLS	Dynamic light scattering (Diffusion dynamique de la lumière)
DMPE	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine
DOPE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine
DOPG	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycérol)
DPG	Diphosphatidylglycérol
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine
DPPE	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine
DPPG	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycérol)
DSPC	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GUV	Giant unilamellar vesicles (Vésicules unilamellaires géantes)
HCl	Acide chlorhydrique
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique
HPLC	High performance liquide chromatography (Chromatographie liquide de haute performance)
L-Ala	Lévogyre-Alanine
LC	Liquide condensé
LE	Liquide expansé
LPS	Lipopolysaccharides
LUV	Large unilamellar vesicles (Grandes vésicules unilamellaires)
m-A2pm	Acide méso-diaminopimélique
MIP	Maximum insertion pressure (Pression maximale d'insertion)
MLV	Multilamellar lipid vesicles (Vésicules lipidiques multilamellaires)
NaCl	Chlorure de sodium
NAG	N-acetylglucosamine
NAM	Acide N-acetylmuramique
NaOH	Hydroxyde de sodium
N-Lyso	Lysozyme natif
N-Otf	Ovotransferrine native
Otf	Ovotransferrine
PE	Phosphatidyléthanolamine



PG	Phosphatidylglycérol
pH	Potentiel d'hydrogène
pI	Point isoélectrique
RMS	Root mean square (Moyenne quadratique)
SUV	Small unilamellar vesicles (Petites vésicules unilamellaires)
TFA	Trifluoroacetic acid (Acide trifluoroacétique)
UV	Ultraviolet

# Introduction générale

---

La lutte contre les bactéries se révèle dans le domaine pharmaceutique par l'emploi des antibiotiques, dans le domaine agroalimentaire par l'emploi des conservateurs et au quotidien par l'emploi des désinfectants. Dans la nature, la lutte contre les bactéries est un processus vital, observée chez les organismes pluricellulaires tels que l'homme, les animaux, les plantes et les champignons, pour protéger les milieux biologiques de l'invasion bactérienne.

Dans le domaine pharmaceutique, les antibiotiques agissent sur différentes cibles bactériennes, pour donner lieu à une activité bactériostatique ou bactéricide. Le premier antibiotique, la pénicilline, a été découvert par Alexandre Fleming, en 1928. Depuis, de nombreux antibiotiques ont été découverts permettant de mieux maîtriser les maladies infectieuses. Par ailleurs, le mauvais usage des antibiotiques a favorisé le développement de plusieurs mécanismes de résistance bactérienne. C'est ainsi que l'efficacité de nombreux antibiotiques est affectée et souvent sensiblement réduite. Pour faire face à cette perte d'efficacité, la découverte continue de nouveaux antibiotiques s'impose, comme une nécessité, pour assurer leur substitution aux moins efficaces. Malheureusement, après l'apogée des découvertes des antibiotiques pendant les années 70-80, le nombre de nouveaux antibiotiques a sensiblement diminué ces dernières décennies. Cela provient principalement du manque d'intérêt des laboratoires pharmaceutiques à investir dans la recherche de nouveaux antibiotiques qui est devenue moins intéressante économiquement. En effet, la recherche est orientée principalement vers d'autres classes thérapeutiques qui possèdent un retour sur investissement plus rapide et des bénéfices plus importants. En présence d'un développement constant de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et d'infections nosocomiales, le traitement des maladies infectieuses est donc de moins en moins maîtrisé.

Parmi les stratégies de lutte contre les infections bactériennes, on trouve l'emploi de molécules agissant sur l'intégrité des structures bactériennes. Les membranes bactériennes sont une cible intéressante, en raison de leur exposition au milieu extérieur et de leur accessibilité aux molécules d'intérêt, et en raison de leur structure fortement conservée. Effectivement, pour la plupart des espèces bactériennes, il est difficile de mettre en place des mécanismes de résistance, par l'établissement de changements de composition de leurs membranes. C'est ainsi que l'usage

de molécules membranotropes, entraînant une perturbation des membranes bactériennes, semble être une opportunité fort prometteuse pour limiter le développement de résistances bactériennes.

De nombreux peptides et protéines naturels, de différentes origines, ont des propriétés antibactériennes, par leur interaction avec les membranes des bactéries. On trouve ce type de peptides chez l'homme, tels que les défensines qui font partie de l'immunité innée. Chez la grenouille, un peptide antibactérien membranolytique est sécrété au niveau de sa peau assurant sa protection face aux infections bactériennes. Le blanc d'œuf de poule est un milieu biologique impropre à la croissance bactérienne, par sa composition en protéines ayant une activité antibactérienne, protégeant l'embryon des infections bactériennes, durant les 21 jours de son développement. C'est ainsi que l'on s'est intéressé à l'arsenal protéique antibactérien du blanc d'œuf. L'activité antibactérienne du lysozyme, l'une des protéines du blanc d'œuf, a fait l'objet d'une précédente étude réalisée par notre équipe de recherche [1]. Dans la suite de ce travail, l'étude se poursuit par l'analyse de l'activité antibactérienne de l'ovotransferrine, qui est une autre protéine du blanc d'œuf ayant des propriétés différentes.

L'ovotransferrine possède une activité antibactérienne à large spectre sur de nombreuses espèces des bactéries à coloration de Gram négative et à coloration de Gram positive. L'ovotransferrine exerce une action bactériostatique par chélation du fer [2-4] et une action bactéricide par interaction avec les membranes bactériennes [5, 6]. Néanmoins, les mécanismes d'interaction de l'ovotransferrine avec les membranes bactériennes ne sont pas encore clarifiés.

De nombreuses études montrent que la modification des propriétés des peptides peut conduire à l'augmentation de leur activité membranaire. Ces modifications peuvent être apportées par voie chimique, physique ou enzymatique. Le traitement thermique à l'état solide, c'est-à-dire le chauffage à sec de la poudre, est un procédé physique qui peut produire des modifications dans les propriétés physico-chimiques des protéines. Il est montré que le chauffage à sec du lysozyme (80°C / 7 jours) augmente son activité antibactérienne [7] et son interaction avec les membranes d'*Escherichia coli* [8, 9]. Dans le présent travail, on étudie avec la même approche, l'activité membranaire de l'ovotransferrine, après chauffage à sec.

Ce travail a pour but d'étudier l'interaction de la forme native et de la forme chauffée de l'ovotransferrine, avec la membrane externe et la membrane interne de l'*E. coli* K12. La première

partie expérimentale est dédiée à la caractérisation biochimique et interfaciale, à l'interface air/liquide, des deux formes d'ovotransferrine. Cela devrait permettre de déterminer les modifications des propriétés engendrées par le chauffage à sec et d'établir le lien avec l'évolution de leur comportement à l'interface. Dans les deuxième et troisième parties, la forme native et la forme chauffée de l'ovotransferrine sont mises en contact avec un modèle membranaire de la membrane externe et interne de l'*E. coli* K12. L'évolution de l'activité membranaire de l'ovotransferrine, après chauffage à sec, est interprétée conjointement avec les modifications des propriétés physico-chimiques.

# **I. Etat de l'art**

---

## I.1. Avant-propos

Dans la nature, on peut trouver des molécules de natures et de sources différentes, qui présentent des propriétés antibactériennes. On s'intéresse dans cette thèse à l'activité antibactérienne d'une classe de molécules organiques qui sont les protides qui regroupent les peptides et les protéines.

Les bactéries qui peuvent être pathogènes et causer des infections sont la cible des peptides et protéines antimicrobiens. Pour cette raison, on présentera la structure générale des bactéries et particulièrement l'enveloppe bactérienne. Cette présentation est focalisée sur un groupe de bactéries caractérisé par une coloration de Gram négative qui regroupe *E. coli*, l'espèce bactérienne choisit dans l'étude. Les trois composés de l'enveloppe bactérienne seront ainsi détaillés. On présentera par la suite les propriétés des lipopolysaccharides, qui composent majoritairement le feuillet externe de la membrane externe, afin de pouvoir comprendre son comportement en présence de molécules antibactériennes. Etant donné que l'activité antibactérienne des molécules est réalisée *in vitro*, les modèles expérimentales mimant les membranes bactériennes seront exposées avec les avantages et les inconvénients de chacun.

Bien que l'ovotransferrine soit une protéine, on a présenté des données bibliographiques de peptides antibactériens, qui sont de nature similaire, vu la disponibilité et la richesse des études sur les peptides par rapport aux protéines. Etant donné le nombre important des peptides antimicrobiens et de la particularité de chacun, nous présentons une synthèse générale des principales propriétés de ces peptides sans être exhaustif. Ainsi, les caractéristiques structurales et les propriétés des peptides à l'origine de l'activité antibactérienne sont présentées pour les cas les plus généraux. L'ovotransferrine qui est la protéine étudiée, est présentée avec ses caractéristiques et ses activités biologiques. Les différents facteurs qui influencent l'activité antibactérienne sont ainsi détaillés.

## I.2. Les membranes bactériennes

### I.2.1. Structure générale des bactéries

Les bactéries sont des organismes vivants procaryotes qui constituent un monde très diversifié. Les bactéries les plus communes possèdent une taille de l'ordre du micromètre et une forme de cocci (sphérique) ou de bacille (bâtonnet). Certaines espèces bactériennes se présentent sous forme unicellulaire isolée tandis que d'autres sont regroupées pour donner différents types d'arrangements qui peuvent être en paires, en chaîne, en grappe ou autres.

De l'extérieur vers l'intérieur, la cellule bactérienne est entourée d'une paroi d'une composition complexe, à l'intérieur de laquelle se situe la membrane cytoplasmique interne. L'intérieur de la bactérie est occupé par le cytoplasme. Le cytoplasme contient le matériel génétique composé d'un chromosome circulaire et d'un plasmide, les ribosomes responsables de la synthèse protéique et l'ensemble des produits et des enzymes nécessaires au métabolisme bactérien (Figure I-1).

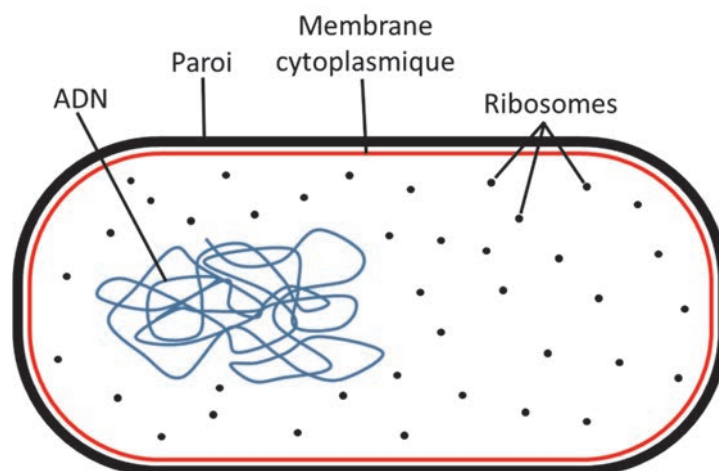


Figure I-1 : Schéma générale de la structure d'une bactérie.

## I.2.2. L'enveloppe bactérienne

### I.2.2.1. Différenciation des bactéries par la coloration de Gram

En 1884, Gram développe une méthode de coloration qui permet de caractériser le phénotype des bactéries selon leur paroi [10]. La technique découverte en 1884 par Gram porte son nom. Elle est toujours utilisée pour distinguer les bactéries en deux groupes fondamentaux selon leur aspect après la coloration. La coloration permet de distinguer les bactéries à Gram positive qui sont colorées en violet et les bactéries à Gram négative, dont la paroi a une structure différente, qui prennent une coloration violette à rose (Figure I-2).

La technique est composée de plusieurs étapes successives permettant à la paroi bactérienne d'interagir différemment suivant sa nature donnant aux bactéries une couleur différente visible au microscope optique. La coloration de Gram consiste à une première coloration avec le réactif de violet de gentiane qui pénètre dans la bactérie. L'étape de mordonnage avec la solution de Lugol fait précipiter le violet de gentiane à l'intérieur des bactéries. L'étape de décoloration avec l'éthanol est l'étape où les bactéries interagissent différemment selon la structure de leur paroi. Chez les bactéries à Gram positive, le violet de gentiane est piégé dans la bactérie alors qu'il est libéré chez les bactéries à Gram négative. La deuxième coloration à la fuschine donne un contraste aux bactéries à Gram négative pour pouvoir les observer [11-14].

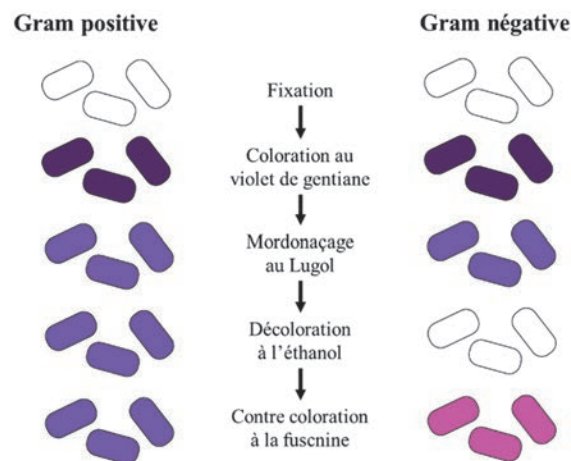


Figure I-2 : Technique de coloration de Gram pour le phénotypage des bactéries selon leur paroi bactérienne.



### **I.2.2.2. Structure de l'enveloppe bactérienne**

L'enveloppe bactérienne est l'élément le plus externe qui délimite la cellule bactérienne. C'est un élément structural de séparation et de protection de l'intérieur de la bactérie vis-à-vis de l'environnement extérieur. Cette enveloppe assure aussi le contact de la bactérie avec le milieu extérieur dans les deux sens par le transport de substances et de l'information. La structure de l'enveloppe confère à la bactérie une solidité suffisante avec une forme stable et une résistance au choc osmotique [15].

L'enveloppe bactérienne est une structure multicouche complexe. Deux types d'enveloppes existent qui correspondent aux bactéries à Gram négative et aux bactéries à Gram positive (Figure I-3). L'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négative est composée, de l'intérieur vers l'extérieur, d'une membrane cytoplasmique (membrane interne), d'une fine couche de peptidoglycane et d'une membrane externe [15, 16]. L'espace périplasmique est l'espace situé entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe [15], il contient une matrice concentrée dans laquelle est incorporé le peptidoglycane. Le peptidoglycane est attaché à la membrane externe par des lipoprotéines [17].

Chez les bactéries à Gram positive, l'enveloppe bactérienne est dépourvue d'une membrane externe et elle est composée uniquement d'une membrane interne et d'une couche épaisse de peptidoglycane [15, 16, 18]. La couche de peptidoglycane mesure entre 30 et 100 nm d'épaisseur chez les bactéries à Gram positive, alors qu'elle est de quelques nm chez les bactéries à Gram négative [15, 16, 19] (voir Figure I-3). Entre les couches de peptidoglycane se situent de longs polymères anioniques qui sont les acides téichoïques et les acides lipotéichoïques. Les acides téichoïques sont liés au peptidoglycane par des liaisons covalentes alors que les acides lipotéichoïques sont fixés dans la couche de phospholipides de la membrane cytoplasmique [16, 20].

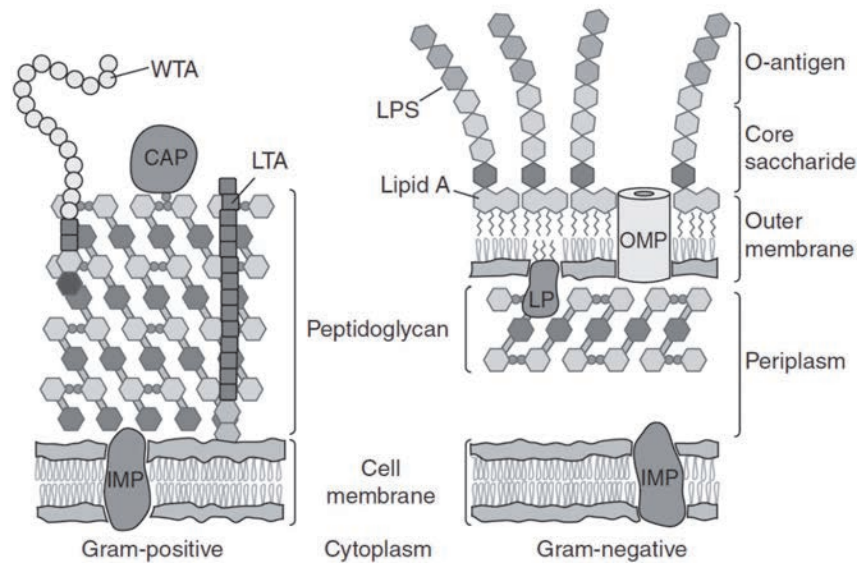


Figure I-3 : Description de la structure de l'enveloppe des bactéries à Gram positive et des bactéries à Gram négative. CAP, Protéine attachée avec des liaisons covalentes ; IMP, Protéine transmembranaire ; LP, Lipoprotéine ; LPS, Lipopolysaccharides ; LTA, Acide lipotéichoïque ; OMP, Protéine membranaire externe ; WTA, Acide téichoïque de la paroi [16].

### I.2.2.3. Composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négative

L'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négative est constituée, de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, de la membrane cytoplasmique, du peptidoglycane et de la membrane externe (Figure I-4).

#### I.2.2.3.1. La membrane cytoplasmique

C'est une membrane qui délimite le cytoplasme et qui assure de nombreux processus cellulaires très importants comme le métabolisme oxydatif, la perception de l'environnement par des récepteurs, la biosynthèse des lipides, la sécrétion des protéines et le transport spécifique et non spécifique des nutriments et des métabolites [16]. La membrane cytoplasmique est une matrice constituée par une bicouche de phospholipides. Les bactéries adaptent sa composition en phospholipides en fonction des conditions de l'environnement et principalement de la température. A 37°C, la membrane cytoplasmique de l'espèce *E. coli* K12 est composée de phosphatidyl-éthanolamine (PE - 81,7%), de phosphatidylglycérol (PG - 6,5%) et de diphosphatidylglycérol (DPG - 11,8%). La nature des chaînes aliphatiques des phospholipides donne à la membrane cytoplasmique un taux d'insaturation de 60% qui est supérieure à celle du feuillet interne de la membrane externe [21].

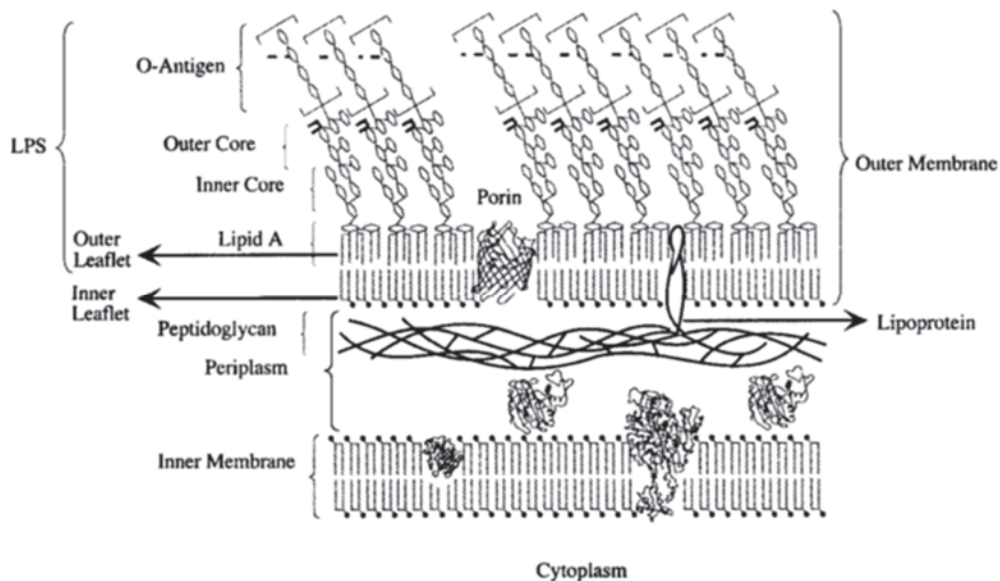


Figure I-4 : Dessin schématique de l'enveloppe bactérienne des bactéries à Gram négative [22].

#### I.2.2.3.2. Peptidoglycane

Le peptidoglycane se situe dans le périplasme entre la membrane externe et la membrane interne. C'est une structure complexe d'une épaisseur de 1,5-15 nm, qui protège la bactérie de la rupture suite à des chocs osmotiques et permet le maintien de la forme bactérienne [23-25]. C'est un hétéropolymère complexe composé de longues chaînes de polysaccharides linéaires faites d'une alternance de N-acetylglucosamine (NAG) et d'acide N-acetylmuramique (NAM) liés par des liaisons  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4. Les chaînes polysaccharidiques sont reliées par de courts ponts peptidiques de quatre résidus [23-25] (Figure I-5). Le degré d'oligomérisation est de 25 à 40 unités disaccharidiques. Le térapeptide est lié au polysaccharide par une liaison amide au groupement lactyle du NAM. Chez *E.coli*, le térapeptide est composé de L-Ala, D-iGlu, m-A2pm (acide méso-diaminopimélique) et de D-Ala [23-25]. Attachés aux polysaccharides, deux térapeptides sont généralement liés par un pont peptidique entre le groupe carboxyle en position 4 de D-Ala et le groupe amine en position 3 de m-A2pm [23]. Le peptidoglycane de *E. coli* appartient à la classe A1 $\gamma$  [26]. D'autres types particuliers de peptidoglycanes existent pour d'autres espèces bactériennes [26-28].

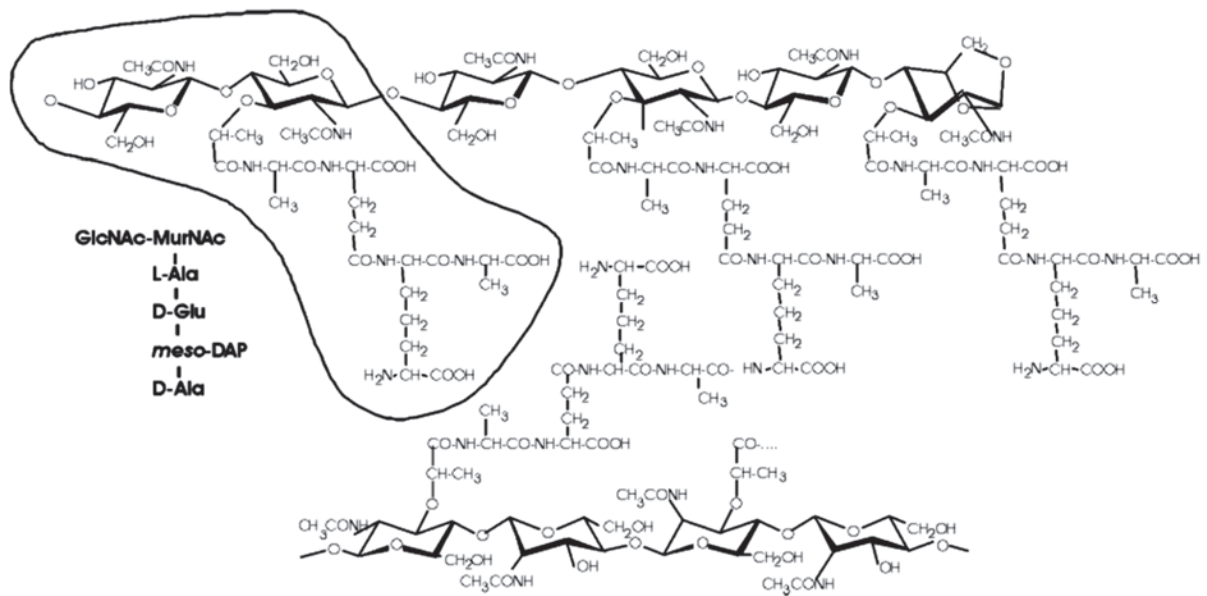


Figure I-5 : Structure de peptidoglycane d'*E. coli* [25].

### I.2.2.3.3. La membrane externe

Les bactéries à Gram négative sont caractérisées par une membrane externe d'une épaisseur entre 60 et 100 Å [29]. La fonction la plus importante de cette membrane externe est d'assurer la fonction de perméation sélective. La membrane externe est une bicouche lipidique asymétrique, avec un feuillet externe constitué de lipopolysaccharides (LPS) et un feuillet interne constitué de phospholipides (PL) [30].

Le feuillet interne de la membrane externe est composé d'un mélange de plusieurs phospholipides. La nature des phospholipides ainsi que leurs proportions varient selon l'espèce bactérienne mais aussi avec les conditions de culture notamment de la température, de la composition du milieu et de l'âge de la culture [15, 21]. A 37°C, le feuillet interne de d'*E. coli* K12 est composé de phosphatidyléthanolamine (91,4%), de phosphatidylglycérol (3,0%) et de diphosphatidylglycérol (5,6%). La membrane externe contient plus d'acides gras saturés que la membrane cytoplasmique avec un taux d'insaturation de 55% [21].

### **I.2.3. Les lipopolysaccharides : composés majoritaires du feuillet externe de la membrane externe**

#### **I.2.3.1. Structure des lipopolysaccharides**

Les lipopolysaccharides sont des molécules amphiphiles avec un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe. La structure des molécules de lipopolysaccharides est composée de trois parties (Figure I-6). Le lipide A est un diglucosamine phosphorylé (di-GlcN) sur lequel des chaînes acyles sont fixées par des liaisons covalentes. Un noyau d'oligosaccharide est fixé à l'un des résidus glucosamines et dirigé à l'extérieur ; ce noyau est divisé en noyau interne et noyau externe. Le noyau interne est composé de deux acides 3-deoxy-D-manno-octuloniques (Kdo) et L-glycéro-D-manno-heptose (Hep). Le noyau externe est composé de sucres, tels que les hexoses et les hexosamines. L'antigène-O est la partie la plus grande et la plus externe de la molécule de lipopolysaccharides qui est composée d'une répétition d'une unité d'oligosaccharide. Le nombre de répétition d'unité d'oligosaccharide est différent d'une molécule à l'autre au sein de la même bactérie ce qui donne une longueur de molécules de lipopolysaccharides différente [31].

#### **I.2.3.2. Variabilité des molécules de lipopolysaccharides**

Les molécules de lipopolysaccharides possèdent une structure très hétérogène qui diffère entre les espèces bactériennes. L'hétérogénéité intervient au niveau des trois parties de la molécule (lipide A, le noyau et l'antigène-O). La variabilité du lipide A apparaît au niveau du degré d'acylation, de la position de phosphorylation et de la nature des acides gras [30, 32, 33]. Quant au noyau, la variabilité est limitée à cause du rôle qu'il assure dans la stabilité des lipopolysaccharides dans la membrane externe [34]. Chez *E. coli*, il existe 5 structures du noyau qui sont R1, R2, R3, R4 et K12 [35, 36]. L'antigène-O est la partie la plus variable dans la molécule de lipopolysaccharides par la différence dans la nature de l'oligosaccharide répétitif. Avec deux monosaccharides seulement de 5 atomes de C asymétriques chacun, 5120 combinaisons de disaccharides sont possibles [15, 37] ; or l'oligosaccharide est composé de 2 à 8 monosaccharides ce qui conduit à une variabilité considérable. Ajoutée à cela, la possibilité de composition de l'oligosaccharide par 60 genres de monosaccharides avec des modifications structurales possibles par acétalisation, acylation, alkylation, amidation et phosphorylation ce qui amplifie encore la variabilité [15]. La distribution du degré d'oligomérisation "n" de l'oligosaccharide est différente

entre les espèces bactériennes [38, 39] ; cette distribution est influencée par les facteurs environnementaux [15]. L'antigène-O est une endotoxine responsable des réactions inflammatoires dans l'organisme et qui est le témoin d'une infection bactérienne. La variabilité de l'antigène-O est à l'origine des différents sérotypes des espèces bactériennes à Gram négative [40-42].

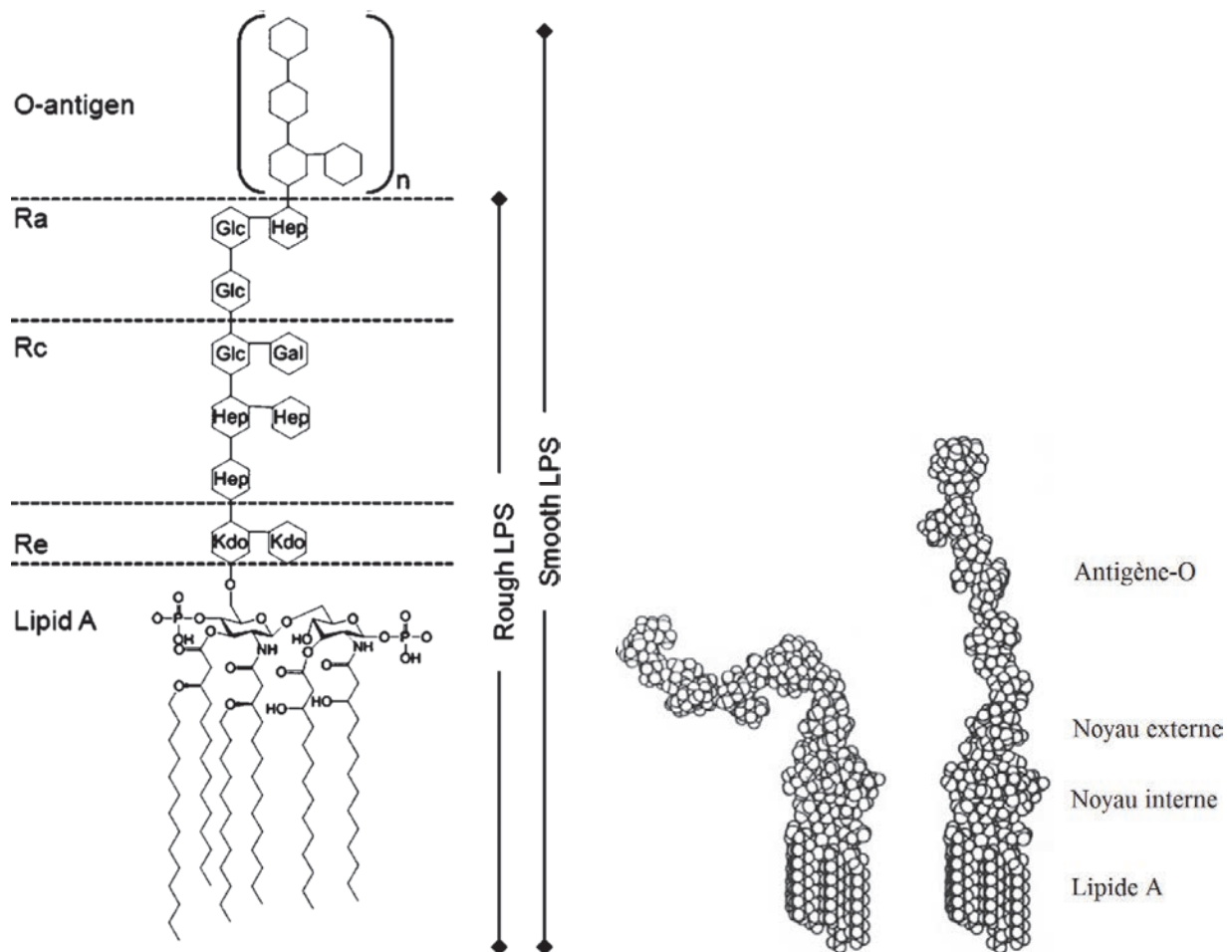


Figure I-6 : Structure des lipopolysaccharides d'*E. coli* K12 (à gauche) [43]. Les conformations courbées et allongées des molécules de lipopolysaccharides (à droite) [44].

### I.2.3.3. Conformation, auto-assemblage et stabilité

Chez *E. coli* K12, la longueur du lipide A et du Ra-LPS (voir Figure I-6) est de 5,44 et 8,75 nm respectivement [45]. Le diglucosamine phosphorylé du lipide A est orienté d'environ 45°

par rapport aux chaînes acyles [46]. Ra-LPS possède une forme approximativement cylindrique pour assurer une orientation parallèle des molécules dans la membrane, alors que l'antigène-O est plus flexible dans la molécule [44, 47]. La conformation de l'antigène-O et donc de la molécule de lipopolysaccharides dépend de la pression latérale, la conformation courbée est favorisée par de faibles pressions latérales alors que la conformation allongée est favorisée par des pressions latérales élevées (Figure I-6). A une pression latérale physiologique, les conformations courbée et allongée coexistent, correspondant respectivement aux domaines fluides et aux domaines condensés [44, 48].

La conformation de la molécule de LPS dépend de sa structure chimique. Ainsi, certains paramètres géométriques sont déterminés : la section transversale du pôle hydrophile ( $a_0$ ), la section transversale du pôle hydrophobe ( $a_h$ ) et un paramètre de forme  $S$  (Équation I-1). La structure supramoléculaire des molécules de lipopolysaccharides est en forme lamellaire quand le paramètre de forme  $S$  est compris entre 0,5 et 1. Des structures supramoléculaires hexagonale et cubique existent pour d'autres valeurs de  $S$ . Par ailleurs, une augmentation de  $a_h$  ou une diminution de  $a_0$  peut induire une transition de la forme lamellaire à la forme hexagonale. Une augmentation de  $a_h$  peut survenir suite à l'augmentation de la température, alors qu'une diminution de  $a_0$  peut être dû à une concentration élevée en cations mono ou divalents ou une diminution de pH du fait de la charge négative du lipide A [44]. Les cations divalents neutralisent les charges négatives du lipide A et stabilisent la couche de lipopolysaccharides en réduisant la mobilité des molécules [22, 49, 50].

$$S = a_h/a_0 \quad \text{Équation I-1}$$

$S$  : paramètre de forme de la molécule de LPS

$a_h$  : section transversale du pôle hydrophobe de la molécule de LPS

$a_0$  : section transversale du pôle hydrophile de la molécule de LPS

En solution aqueuse, les « smooth-lipopolysaccharides » et « rough-lipopolysaccharides » forment des agrégats dont la morphologie dépend de la structure des molécules de lipopolysaccharides [51]. Cette morphologie peut être influencée par interaction avec des peptides antimicrobiens [51, 52]. La morphologie de smooth-lipopolysaccharides reste relativement

inchangée alors que celle des rough-lipopolysaccharides montre un changement marqué de structure lamellaire à des réseaux ordonnés micellaires. Le degré d'influence des peptides antimicrobiens est lié à la structure moléculaire de lipopolysaccharides [51, 52]. La longueur des lipopolysaccharides a un impact sur la structure et la dynamique de la molécule et donc sur les propriétés des couches de lipopolysaccharides [53]. Les Ra-lipopolysaccharides qui sont plus longs que les Rc-lipopolysaccharides donnent une structure moins ordonnée. Cette différence d'organisation entre les deux chémotypes de lipopolysaccharides affecte à son tour l'effet des peptides antimicrobiens. En effet, la perturbation de la monocouche est plus importante dans le cas des Ra-Lipopolysaccharides que pour les Rc-lipopolysaccharides [52].

#### **I.2.4. Modèles Membranaires**

Il est possible d'étudier l'activité membranaire des peptides et protéines antimicrobiens *in vivo* sur des bactéries vivantes ou sur des membranes cellulaires isolées. Mais cela ne permet que d'investiguer les phénomènes d'une façon globale en raison de la complexité des membranes naturelles composées de grandes variétés de lipides et de protéines. De ce fait, les études *in vitro* sur des modèles membranaires biomimétiques trouvent leur intérêt pour l'investigation spécifique de certains phénomènes. [54].

Depuis les travaux de Simon et al. (1997) et Brown et al. (1997) sur l'organisation et le comportement des lipides membranaires, un grand intérêt est porté à l'étude des membranes biologiques. Cela a provoqué le développement de nouvelles technologies pour l'étude de ce système biologique complexe. Etant donné la complexité des membranes biologiques et la difficulté de mettre en place un système biomimétique qui les simule avec toute leur complexité, plusieurs modèles membranaires simplifiés sont développés pour permettre de réaliser des études biophysiques et biochimiques. Avec ces modèles membranaires, il est possible d'étudier les propriétés et la structure des membranes et d'examiner l'activité des surfactants, des peptides et des médicaments. Les modèles membranaires les plus connus et les plus utilisés sont les monocouches lipidiques, les vésicules lipidiques et les bicouches lipidiques supportées [55, 56].

##### **I.2.4.1. Les vésicules**

Les vésicules sont des modèles membranaires avec une forme relativement sphérique dont la membrane est composée de deux feuillettes. Les vésicules peuvent avoir différentes tailles avec



une ou plusieurs lamelles concentriques. Ainsi, on définit les « Multilamellar Lipid Vesicles (MLV) », les « Large Unilamellar Vesicles (LUV) », « Small Unilamellar Vesicles (SUV) » et les « Giant Unilamellar Vesicles (GUV) ». Une phase aqueuse est emprisonnée à l'intérieur et entre les lamelles de la vésicule [56].

Les vésicules servent dans l'étude des processus de fusion membranaires, de reconnaissance moléculaire, de l'adhésion cellulaire et de transport membranaire. Les vésicules sont utilisées pour étudier l'activité antimicrobienne des peptides et des protéines par perméabilisation membranaire. Une sonde fluorescente comme la calcéïne est incorporée dans les vésicules. La fluorescence mesurée dans le milieu externe indique la libération de la calcéïne et révèle l'activité membranaire des molécules antimicrobiennes par la perméabilisation des vésicules [56, 57]. Les vésicules trouvent aussi une grande application en pharmacologie et en dermo-cosmétologie pour l'administration des médicaments avec le contrôle du transport et de la libération des principes actifs [58, 59].

Par ailleurs, le modèle de vésicules possède certains inconvénients : la non reproduction de l'asymétrie entre les deux feuilletés présents dans les membranes biologiques naturelles [56] ; la composition lipidique des vésicules formées peut être relativement différente du mélange lipidique initial utilisé dans leur préparation [60] ; il n'est pas possible de choisir librement la composition lipidique parce que certaines compositions ne peuvent pas former de vésicules ; l'hétérogénéité de la taille des vésicules et du nombre de lamelles ; le rayon de courbure des vésicules est inférieure à celui observé dans les membranes naturelles, ce qui fait imposer une forte contrainte sur les têtes polaires des lipides et modifie ainsi les phénomènes d'insertion [54] ; au final, les vésicules présentent une faible stabilité sur le long terme avec la possibilité de fusionner ou de former des agrégats [61].

#### **I.2.4.2. Les bicouches lipidiques supportées**

Ces modèles biomimétiques des membranes cellulaires sont constitués d'une bicouche lipidique supportée sur une surface solide comme le mica, le verre ou des plaquettes d'oxyde de silicium. Pour le premier feuillet, les têtes polaires sont orientées vers le support et les chaînes apolaires sont orientées à l'opposé pour être en contact avec les chaînes apolaires du deuxième feuillet [56]. Ce modèle présente l'avantage de maîtriser la composition des deux feuilletés de la

membrane. Les bicouches supportées sont un modèle membranaire utilisé dans l'étude de l'interaction des médicaments et des peptides antimicrobiens avec les membranes cellulaires [58].

En comparaison avec les vésicules, plus de choix de techniques s'offrent pour l'analyse des bicouches supportées. Elles peuvent être analysées par microscopie à force atomique (AFM) [62], Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) [63], microscopie de fluorescence [64], ellipsométrie [65], quartz-crystal microbalance [66], réflexion des rayons X [67], réflectivité neutronique [68] et Sum Frequency Generation (SFG) vibrational spectroscopy [69].

### **I.2.4.3. Les monocouches lipidiques**

Les monocouches lipidiques sont des systèmes simples bidimensionnels qui permettent de mimer les membranes biologiques. Les monocouches lipidiques sont formées à l'interface air-eau par dépôt des lipides à l'interface de la solution. Par leur caractère amphiphile, les lipides s'étalent à l'interface et forment une monocouche. Les molécules lipidiques s'orientent perpendiculairement par rapport à l'interface où les chaînes apolaires hydrophobes sont dirigées dans l'air et les têtes polaires hydrophiles sont plongées dans la solution aqueuse [55, 56]. Ainsi, les monocouches lipidiques forment un système apparenté à un feuillet des membranes biologiques et le côté polaire de la monocouche reproduit la surface des membranes [70, 71].

Le modèle de monocouches de lipides possède l'avantage de permettre le contrôle de plusieurs paramètres expérimentaux. Il permet de maîtriser la composition lipidique de la monocouche, la composition de la sous-phase (pH, force ionique et la nature des sels), la température du milieu expérimental et la pression latérale de la monocouche. Dans des cuves de Langmuir, la pression latérale (mesurée en [mN/m]) et donc la compacité de la monocouche, peut être réglée par la quantité de lipides et/ou la surface occupée. Avec ce paramètre, il est possible de maîtriser l'aire moléculaire et l'état physique de la monocouche (gazeux, liquide dilaté, liquide condensé et solide) par le degré d'agencement des molécules et les interactions intermoléculaires [54-56] (Figure I-7). D'autres avantages de ce modèle sont la nécessité de petites quantités de lipides et la possibilité d'analyse par plusieurs techniques simultanément [72].

Ce système permet de caractériser les lipides et leur compressibilité et d'étudier les interactions lipide-lipide et lipide-molécules amphiphiles. Il permet d'étudier l'adsorption et

l'insertion à la monocouche des composés amphiphiles tel que les bio-surfactants, les médicaments et les peptides antimicrobiens [8, 9]. Ainsi, après stabilisation de la monocouche à la pression de surface voulue, les molécules d'intérêt sont injectées en sous-phase pour rentrer en interaction avec la monocouche de lipides [56]. L'interaction entre les molécules d'intérêt et la monocouche est influencée par l'ensemble des paramètres expérimentaux. De même, la nature et l'état physique de la monocouche influencent l'insertion des peptides et des protéines [73-77].

Le suivi de l'interaction des molécules amphiphiles, comme les peptides et les protéines antimicrobiens, peut être entrepris par plusieurs techniques. La tensiométrie permet de suivre l'insertion des molécules dans la monocouche par l'augmentation de la pression latérale [78]. La microscopie à angle de Brewster (BAM) et la microscopie de fluorescence permettent d'observer l'organisation interfaciale des lipides dans la monocouche avec une résolution latérale de l'ordre du micromètre [79-81]. La microscopie à force atomique (AFM) offre une résolution à l'échelle du nanomètre après transfert de la monocouche sur un support solide [48, 78, 82-84]. L'analyse de l'interaction des peptides et protéines avec des monocouches lipidiques peut être combinée à d'autres techniques telles que les techniques de spectroscopie infrarouge polarisée et les techniques de réflexion et de diffusion telles que l'ellipsométrie et la diffraction des rayons X à incidence rasante [56, 83, 85, 86].

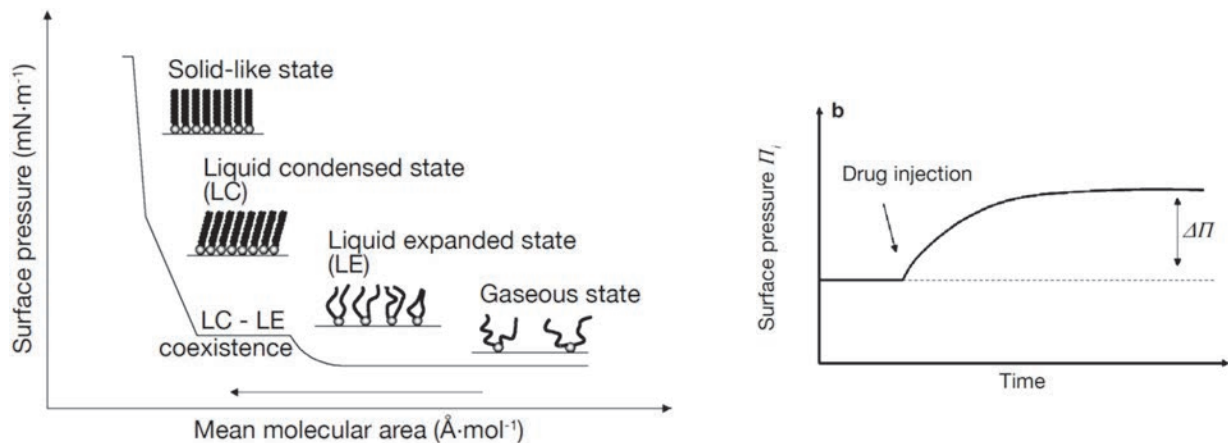


Figure I-7 : Présentation des différents états physiques d'une monocouche lipidique avec l'évolution de la pression latérale (à gauche). Effet de l'insertion d'un peptide dans la monocouche sur la pression latérale (à droite) [56].

### **I.3. Protéines et peptides antimicrobiens**

Contrairement aux antibiotiques classiques, en général les peptides antimicrobiens ne possèdent pas de récepteurs spécifiques mais ils interagissent avec les lipides des membranes bactériennes d'une manière non-spécifique. Avec ce mode d'action, il est difficile aux bactéries de développer une stratégie de résistance aux peptides antimicrobiens par la modification de la composition lipidique. Celle-ci pouvant être létale pour les bactéries. De même, l'action des peptides antimicrobiens est plus rapide que la croissance bactérienne ce qui leur empêche de développer une technique de défense efficace [87].

#### **I.3.1. Propriétés et caractéristiques structurales et physico-chimiques des peptides et protéines antimicrobiens**

##### **I.3.1.1. Origine**

Les peptides et les protéines antimicrobiens sont produits naturellement par différents organismes [88, 89]. Toutefois les peptides peuvent être issus de la bioingénierie ou la synthèse chimique [90]. Chez les insectes, des peptides antimicrobiens font partie du système immunitaire inné pour protéger l'organisme des infections éventuelles d'origine bactérienne, fongique, parasitaire et virale [88, 89]. L'infection de ces insectes stimule la synthèse des peptides antimicrobiens tels que la cécropine chez *Hyalophora cecropia* et diptericine, drosocine et attacine chez *Drosophila melanogaster*. Les peptides ayant une activité antimicrobienne ont été découverts aussi chez les vertébrés et chez les mammifères. Chez l'homme, les  $\alpha$ -Défensines sont produites par les granulocytes et certains lymphocytes. Les  $\beta$ -Défensines sont produites par les cellules épithéliales de la peau. Les Cathélicidines sont un groupe de peptides antimicrobiens situés au niveau C-terminal de peptides précurseurs. Ces propeptides inactifs sont stockés dans les granules de sécrétion des neutrophiles et sécrétés lors d'une stimulation après un processus protéolytique. Les cathélicidines CAP-18 et LL-37 font parties de ce groupe de peptides antimicrobiens et se trouvent dans les testicules, l'épithélium squameux et différentes populations de lymphocytes/monocytes [88, 91]. Par ailleurs, certains peptides d'intérêt sont synthétisés par bioingénierie par l'utilisation des bioréacteurs recombinants mais aussi des plantes et des protozoaires. Le HacD, LL-37, Mdmcec et CA-MA sont des exemples de peptides synthétisés par

bioingénierie [89, 90]. D'autres peptides antimicrobiens sont synthétisés par voie chimique par des méthodes de synthèse en phase solide ou en phase liquide [90, 92]. La synthèse chimique peut être une voie pour produire des peptides avec une activité antimicrobienne élevée ou pour obtenir des analogues à des peptides naturels avec substitution ou incorporation d'un ou plusieurs résidus [90, 93].

### I.3.1.2. Structure

Selon la séquence en acides aminés des peptides antimicrobiens, différentes structures et conformations peuvent être adoptées en solution aqueuse ou au moment de l'interaction avec les membranes biologiques (Figure I-8). Sur la base de leur structure, les peptides antimicrobiens sont classés en cinq classes majeures ; les peptides en hélice  $\alpha$  ; les peptides en feuillet  $\beta$  ; les peptides non-structurés, les peptides en boucle et les peptides cycliques. La structure de certains peptides associe plusieurs de ces classes [90, 94-98].

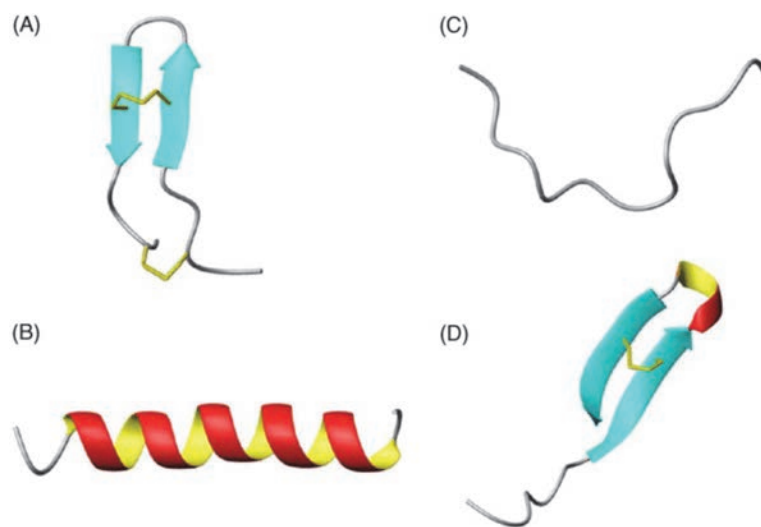


Figure I-8 : Les classes structural des peptides antimicrobiens : (A) peptide en feuillet  $\beta$  (Tachypleisine I) ; (B) peptide en hélice  $\alpha$  (Magainine 2) ; (C) peptide non-structurés (Indolicidine) ; (D) peptide en boucle (Thanatine). Les ponts disulfures sont représentés en jaune [94].

### **Les peptides en hélice $\alpha$**

Beaucoup de peptides antimicrobiens présentent une structure en hélice  $\alpha$  comme la cécropine, la magainine, la cathélicidine LL-37, la dermaseptine, la pardaxine et la mélittine. En présence de la membrane bactérienne ou en solution aqueuse, le peptide se structure en hélice  $\alpha$  avec un caractère amphiphile le long de l'axe de l'hélice, c'est-à-dire un côté polaire et l'autre côté apolaire. Cela permet l'insertion parallèle du peptide dans la membrane pendant la phase initiale d'interaction. Les peptides possèdent une longueur suffisante, entre 12-40 résidus d'acides aminés, pour s'insérer le long de l'épaisseur de la membrane [94-96, 98].

### **Les peptides en feuillet $\beta$**

Les peptides en feuillet  $\beta$  possèdent deux brins ou plus stabilisés par des ponts disulfures et forment une structure relativement rigides.  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\theta$ -défensines appartiennent à cette catégorie de peptides antimicrobiens. Beaucoup de peptides antimicrobiens à feuillet  $\beta$  exercent leur activité par perturbation de la membrane. Ils s'insèrent perpendiculairement ou s'inclinent dans la bicouche lipidique pour former des pores toroïdaux [90, 97, 98].

### **Les peptides non-structurés**

Les peptides antimicrobiens de cette catégorie sont dépourvus d'une structure secondaire. Ils contiennent une grande proportion d'acides aminés spécifiques comme la proline, le tryptophane, l'arginine et l'histidine. Beaucoup de peptides non-structurés ne sont pas actifs au niveau membranaire mais il traverse la membrane pour atteindre des cibles intracellulaires. Cependant, quelques peptides non-structurés possèdent une activité membranaire provoquant une fuite au niveau membranaire. Cette classe inclue l'indolicidine, la drosocine, le pyrrolicine, le tritrypticine et l'histatine [95, 97, 98].

### **Les peptides en boucle**

Les peptides en boucle sont caractérisés par une structure qui ressemble à une épingle à cheveux composée de brins  $\beta$  antiparallèle interconnectés par un  $\beta$ -turn de type II. Ces peptides sont très stables à cause de la présence d'un pont disulfure entre les deux brins  $\beta$ . Des exemples de cette classe incluent la tachyplepsine, la bacténécine et le dodécapeptide [98, 99].

### **Les peptides cycliques :**

Cette catégorie de peptides antimicrobien présente une cyclisation de leur chaîne d'acides aminés comme la polymyxine B et la gramicidine S [96].

Dans la présente étude, on s'intéresse à l'activité antimicrobienne d'une protéine qui est l'ovotransferrine. Les protéines sont caractérisées par un nombre de résidus plus important que les peptides et d'une structure plus complexe par conséquent.

#### **I.3.1.3. Propriétés des peptides antimicrobiens**

L'étude de la relation structure/activité des peptides antimicrobiens permet comprendre les propriétés physico-chimiques régissant cette activité biologique contre les bactéries. Les différents paramètres structuraux et physico-chimiques, détaillés ci-dessous, ont une influence importante et même cruciale pour assurer l'activité antimicrobienne des peptides [96].

#### **La longueur :**

Le peptide doit avoir une longueur minimale de 7-8 résidus pour pouvoir adopter une structure amphiphile avec une face hydrophile et une face hydrophobe permettant son insertion dans la bicouche lipidique. Dans le modèle "barel-stave", il faut au moins 22 résidus pour un peptide en hélice- $\alpha$  et 8 résidus minimum pour un peptide en feuillet  $\beta$  pour traverser la bicouche lipidique. Par ailleurs, la longueur du peptide peut avoir une influence sur sa cytotoxicité, il a été montré qu'un fragment plus court de mellitin de 15 résidus possède une cytotoxicité 300 fois plus élevée que le peptide initial [100, 101].

#### **La charge nette :**

La charge du peptide est un facteur essentiel à l'interaction électrostatique du peptide avec la membrane bactérienne chargée négativement. L'interaction des peptides cationiques est favorisée par la composition de la membrane bactérienne en phospholipides acides et la présence

de lipopolysaccharides dans la membrane externe chez les bactéries à Gram négative et des acides téichoïques et lipotéichoïques chez les bactéries à Gram positive. La charge est un paramètre important à l'activité du peptide, un changement de charge du peptide peut avoir un impact sur son activité antimicrobienne et hémolytique avec une possibilité de réduction de sa toxicité sur les cellules eucaryotes. Cependant, la relation entre la charge positive et l'activité antimicrobienne du peptide n'est pas linéaire. Par ailleurs, des petits peptides anioniques, riche en acide glutamique et en acide aspartique, possèdent une activité membranaire antibactérienne [96, 100, 102, 103].

### **L'hélicité :**

C'est l'aptitude du peptide à acquérir une structure en hélice qui est peu importante sur l'activité antimicrobienne du peptide mais qui détermine sa toxicité vis-à-vis des cellules eucaryotes. La diminution de l'hélicité peut être obtenue par le remplacement de certains résidus avec leurs énantiomères (du lévogyre au dextrogyre), cela entraîne l'élimination de l'activité hémolytique et une meilleure stabilité des protéases. Egalement, une séquence primaire d'un peptide riche en proline et en glycine présente une faible hélicité [100].

### **L'hydrophobicité :**

L'hydrophobicité des peptides antimicrobiens est un paramètre fondamental qui détermine l'importance de son insertion dans la partie hydrophobe de la bicouche lipidique. La structure primaire des peptides antimicrobiens naturels est composée d'environ 50% d'acides aminés hydrophobe. Généralement, l'augmentation de l'hydrophobicité jusqu'à un optimum améliore l'activité antimicrobienne du peptide et décroît au-delà. Cet effet est accompagné par une baisse de spécificité du peptide avec une cytotoxicité plus élevée et une interaction avec la membrane des cellules eucaryotes. Les peptides ayant une hydrophobicité élevée ont tendance à former des dimères ou des oligomères en solution aqueuse ce qui annule l'activité antibactérienne recherchée [96, 100, 104].

### **L'amphiphilicité :**

Durant l'interaction avec la membrane, les peptides adoptent des conformations entraînant l'orientation des résidus polaires et apolaires en sens opposé, ce qui stabilise le peptide inséré dans



la membrane [100, 105, 106]. La relation de l'amphiphilicité du peptide et son activité antibactérienne n'est pas linéaire, Zhu et al montrent que la perturbation de l'amphiphilicité d'un peptide, par la substitution d'un ou plusieurs acides aminés, peut entraîner dans certains cas une augmentation de l'activité antibactérienne [107, 108].

### **I.3.2. Interaction des protéines/peptides perturbateurs des membranes**

Les peptides/protéines antimicrobiens existent naturellement dans différents milieux biologiques. Ils font partie du système immunitaire inné pour défendre l'organisme contre les infections. Ils possèdent une activité à large spectre contre les bactéries, les champignons, les virus et possèdent parfois une activité anticancéreuse [109-112]. Différents mécanismes existent avec lesquels ces peptides/protéines exercent leur activité antimicrobienne. L'activité antibactérienne peut impliquer l'interaction des peptides/protéines avec les membranes bactériennes. Par ailleurs, d'autres cibles intracellulaires sont possibles avec un impact sur les processus cellulaires vitaux, tel que la synthèse de l'ADN et des protéines, la structuration des protéines, l'activité enzymatique et la synthèse de la paroi bactérienne [111-115].

#### **I.3.2.1. Etapes d'interaction avec les membranes**

Plusieurs étapes particulières sont nécessaires aux peptides/protéines pour que l'activité antibactérienne au niveau membranaire puisse se produire [116].

L'attraction : Les peptides antimicrobiens doivent avant tout être attirés par la surface bactérienne. Pour cela, il faut que le peptide possède une grande affinité aux structures de la surface bactérienne. Cette affinité amène à une augmentation considérable de la concentration locale du peptide au niveau membranaire par rapport à sa concentration en phase aqueuse [102]. Les peptides cationiques, par exemple, sont attirés par les charges négatives des lipopolysaccharides présents à la surface des bactéries à Gram négative et par les charges négatives des acides téichoïques à la surface des bactéries à Gram positive [116].

L'attachement : Arrivé à la surface bactérienne, les peptides/protéines doivent interagir et traverser la membrane externe des bactéries à Gram négative composé principalement de LPS, traverser le peptidoglycane pour arriver et interagir avec la membrane cytoplasmique [116]. Les peptides s'adsorbent à la surface membranaire pouvant provoquer ainsi un amincissement locale de la membrane.

L'insertion et la perméabilisation de la membrane : A faibles concentrations, les molécules de peptide se fixent parallèlement à la membrane bactérienne. Au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration, les peptides se réorientent perpendiculairement à la membrane et s'insèrent dans la bicouche lipidique pour former un pore transmembranaire. La concentration à laquelle le peptide commence à s'insérer dépend de la nature du peptide et de la composition membranaire.

### **I.3.2.2. Mécanismes d'interaction avec les membranes**

Plusieurs mécanismes permettent de décrire l'insertion et la perméabilisation de la membrane par le peptide ou de la protéine. Un ou plusieurs mécanismes peuvent coexister pour expliquer l'activité membranaire de ces molécules. D'après la présence ou l'absence d'une perméabilisation membranaire par les peptides/protéines, on distingue les mécanismes d'interactions membranolytiques et non-membranolytiques [95, 96]. Ainsi, plusieurs modèles sont proposés et décrites dans la Figure I-9 :

#### **Le modèle en "Barrel stave" :**

Dans ce modèle, après attraction et fixation à la surface membranaire, les monomères de peptide passent par une phase transitoire de changement de conformation, induisant un déplacement des têtes polaires des phospholipides et un amincissement local de la membrane bactérienne. La partie hydrophobe du peptide s'insère alors dans la membrane au niveau de la partie hydrophobe du feuillet externe de la bicouche lipidique. Arrivant à la concentration seuil, les peptides s'auto-associent et s'insèrent plus profondément dans la membrane. L'association continue de peptide conduit au final à la perforation de la bicouche lipidique et la formation de canaux peptidiques transmembranaire [95, 96]. Dans ce modèle (exemple : alaméthicine, zervamycine), les molécules de peptides en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$  s'insèrent dans la membrane

et forment un canal avec une lumière centrale. Cette structure est retenue par la disposition des peptides. La région hydrophobe des peptides est orientée à l'extérieur du canal et elle est alignée avec les lipides de la bicouche, et la région hydrophile des peptides est orientée à l'intérieur du canal [95, 116]. L'alaméthicine forme des pores composés de 3 à 11 hélices avec des diamètres interne et externe de 1,8 et 4,0 nm respectivement [116].

#### **Le modèle en "Pore toroïdal" :**

Dans ce modèle, les peptides s'insèrent dans la bicouche lipidique formant une courbure continue des deux feuillets de la membrane. La lumière des pores formés est donc tapissée par les peptides insérés et les têtes polaires des lipides. La formation des pores toroïdaux implique l'association des parties polaires des peptides insérés avec les têtes polaires des lipides membranaires. Ainsi les lipides s'inclinent de la superposition lamellaire pour arriver à connecter les deux feuillets de la bicouche et forment une structure continue dans le pore toroïdal. Cette courbure de lipide crée une tension élastique pouvant provoquer des défauts transitoires et la désintégration du pore. Des simulations de dynamique moléculaire montrent que l'agrégation de peptides avant ou après insertion est nécessaire à la formation de pores. La densité élevée de charges positives des peptides qui tapissent le pore est stabilisée thermodynamiquement par l'association de têtes anioniques des lipides favorisant ainsi l'agrégation des peptides et la formation des pores [96]. Une variante de ce modèle est celui des pores toroïdaux désordonnés. Dans ce modèle, les molécules de lipides restent incurvées vers l'intérieur du pore mais avec un ou deux peptides au centre, situés plus à la hauteur du feuillet externe, donnant une formation plus désordonnée aux pores [95].

#### **Le modèle en "Carpet model" :**

Ce modèle est considéré comme une extension du modèle de pore toroïdal qui se produit à des concentrations plus élevées en peptides antimicrobiens. Les peptides s'adsorbent et couvrent la surface membranaire. L'adsorption des peptides est assurée par des interactions électrostatiques avec les têtes anioniques des phospholipides à plusieurs points couvrant ainsi la membrane bactérienne. Au-delà de la concentration seuil, les peptides s'insèrent dans la membrane et forment des pores toroïdaux permettant l'accès de nouveaux peptides à la surface membranaire. La

poursuite de ce processus amène les peptides à agir comme un détergent et provoque la destruction et la désintégration de la membrane sous forme de micelles [95, 96].

D'autres peptides antimicrobiens peuvent causer une perturbation membranaire sans avoir une activité membranolytique. Ces mécanismes non-membranolytiques sont décrits ci-dessous :

#### **Formation de canaux d'agrégats :**

Après adsorption sur les têtes polaires des phospholipides, les peptides s'insèrent dans la membrane et se regroupent pour former des agrégats non-structurés. Ces agrégats sont associés à des molécules d'eau pour former des canaux de fuite d'ions et même de molécules plus grandes induisant ainsi la dépolarisation de la membrane. Cette perturbation membranaire est une étape transitoire de courte durée qui permet aux peptides de traverser la membrane pour atteindre leurs cibles intracellulaires.

#### **Electroporation moléculaire :**

Afin d'expliquer l'activité antibactérienne de certains peptides, le modèle d'électroporation est proposé (exemple : annexine). Pour que ce modèle se produise, les peptides doivent avoir des densités de charges suffisantes pour générer un champ électrique et déclencher un potentiel électrostatique supérieur à 0,2 V pendant au moins 0,1 ms. Des pores dans la membrane se forment alors sous l'effet du champ électrique externe. Ce modèle explique l'activité antimicrobienne de certains peptides qui induisent une augmentation de la perméabilité membranaire sans formation de pores transmembranaires apparents [96, 117].

#### **Induction de ségrégation lipidique :**

Ce modèle explique l'activité antimicrobienne de certains peptides cationiques qui, après adsorption sur la membrane, attirent et forment des domaines spécifiques avec les lipides anioniques. Cela entraîne par conséquent la ségrégation latérale des lipides zwitterioniques et peut même induire une modification de l'auto-assemblage des lipides à des structures autres qu'une structure lamellaire. Ce réarrangement de lipides au niveau de la membrane induit des défauts membranaires qui peuvent avoir des conséquences vitales pour la bactérie. La présence de peptides adsorbés à la surface peut induire une dépolarisation et une perméabilisation de la membrane [96].

## Ciblage des lipides oxydés

Ce modèle explique l'activité antibactérienne de certains peptides du système immunitaire inné tels que les Temporine B et L qui se trouvent dans la peau de certaines grenouilles et l'Indolicidine secrété par les macrophages humaines. Les Temporine B et L s'insèrent plus efficacement dans les membranes contenant des phosphatidylcholines oxydées par la formation d'une base de Schiff entre le groupement amine du peptide et le groupement aldéhyde du lipide. La libération de l'oxygène réactif durant la phagocytose induit l'oxydation des lipides qui pourraient augmenter l'activité membranaire des peptides antimicrobiens [95, 118].

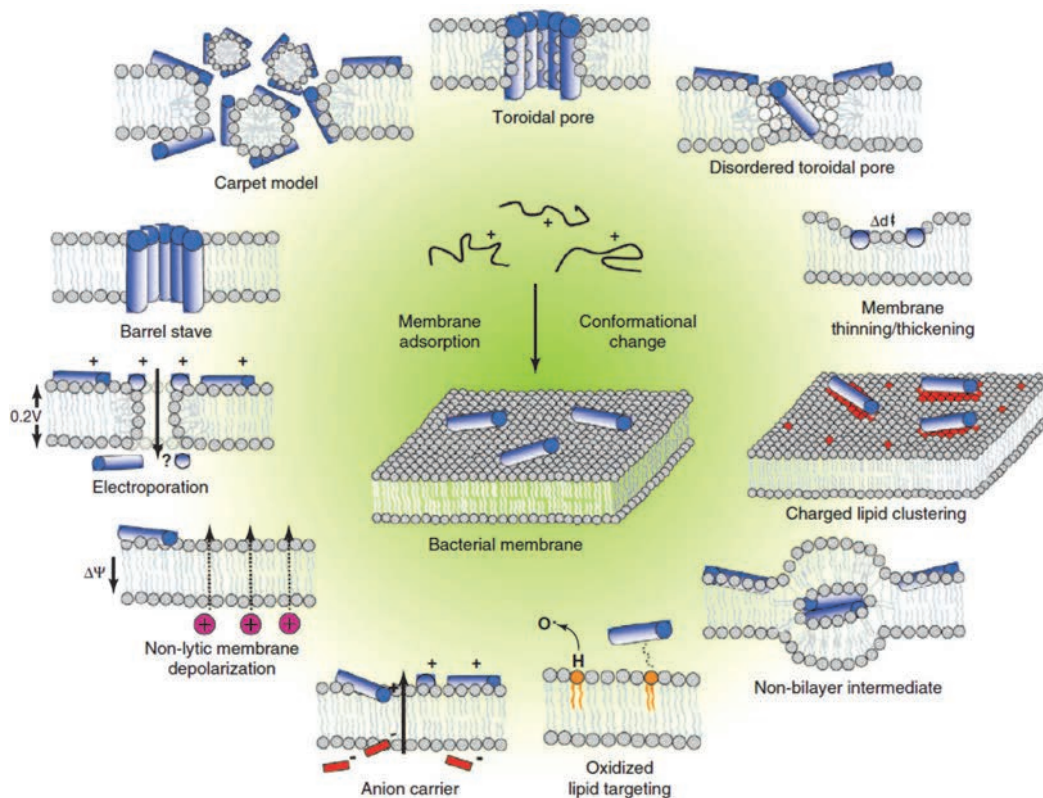


Figure I-9 : Les différents mécanismes d'interaction des peptides/protéines antibactériens avec la membrane bactérienne [95].

### **I.3.3. Limites des protéines et des peptides antibactériens**

Malgré sa difficulté, il est toutefois possible aux bactéries de développer des résistances contre les peptides et les protéines antimicrobiens. Sur des lignées d'*E. coli* et de *Pseudomonas fluorescens*, il a été démontré qu'ils ont développé une résistance à la pexiganane après de nombreuses générations [119]. Plusieurs mécanismes de résistance des bactéries aux peptides et aux protéines antimicrobiens sont exposés dans la littérature [120]. Ces mécanismes de résistance sont décrits dans la Figure I-10 :

#### **Protéolyse enzymatique du peptide**

Avec ce mécanisme, les bactéries dégradent les peptides et les protéines antibactériens par des protéases situées au niveau de la paroi ou sécrétées dans le milieu extérieur. Ainsi, les molécules sont inactivées et perdent leur activité antimicrobienne. Chez *E. coli*, des protéases extra-cytoplasmiques telle que l'Omp T permettent de dégrader et d'inactiver la protamine [121]. L'aureolysine est produit par *Staphylococcus aureus* et qui permet l'hydrolyse de la cathélicidine LL-37 [122].

#### **Ecrantage de la surface bactérienne**

Ce mécanisme de résistance dépend de différentes structures externes de la paroi bactérienne. Ainsi, les polysaccharides de la paroi, les fimbriaes, les exopolysaccharides et l'antigène-O interagissent et piègent les peptides antimicrobiens. Cela entraîne la diminution de la concentration des peptides en contact avec la membrane et réduit donc leur effet de perturbation membranaire [123, 124].

#### **Elimination du peptide par un transporteur**

Au niveau des membranes bactériennes, il existe des transporteurs membranaires qui peuvent transportés les peptides antimicrobiens vers l'intérieure de la bactérie. Chez les nouvelles souches résistantes, le gène de ces transporteurs est supprimé ou inactivé empêchant l'internalisation des peptides antimicrobiens [120, 125, 126].

## Modifications électrostatiques et structurales de la membrane

Chez certaines bactéries à Gram négative et en réponse à des stimuli, des modifications de la structure de lipopolysaccharides peuvent être apportées au niveau du lipide A ou du noyau. Cette modification a un impact sur l'activité membranaire des peptides antimicrobiens par renforcement de la barrière membranaire et la diminution des charges négatives des lipopolysaccharides [120, 127]. *Staphylococcus aureus* peut réduire la charge nette globale négative de sa paroi entraînant une diminution de l'affinité des peptides cationiques [128, 129].

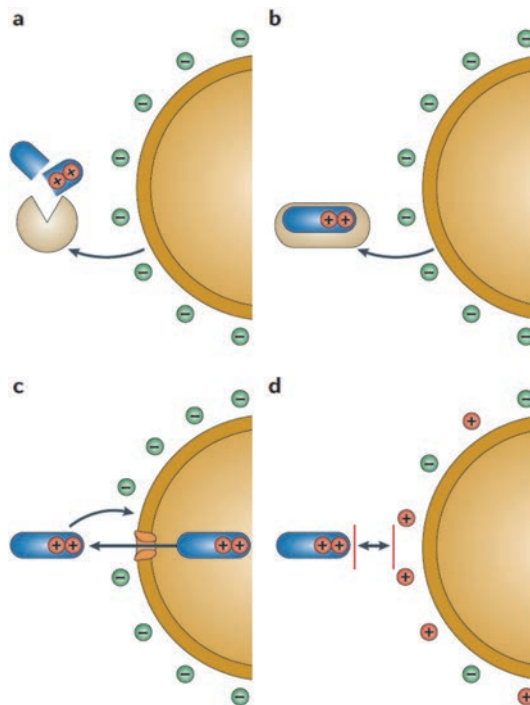


Figure I-10 : Stratégie de résistance bactérienne aux peptides et protéines antimicrobiens. (a) Protéolyse enzymatique du peptide ; (b) Ecrantage de la surface bactérienne ; (c) Elimination du peptide par un transporteur ; (d) Modifications électrostatiques et structurales de la membrane [130].

## I.4. L'Ovotransferrine, une protéine antibactérienne

### I.4.1. Caractéristiques structurales et physico-chimiques

L'ovotransferrine (Otf) est la deuxième protéine la plus abondante dans le blanc d'œuf (Tableau I-1). Le blanc d'œuf est composé principalement d'eau (88%) et de protéines (11%). Le reste est constitué de sucres, sels minéraux et des traces de lipide [131].

L'Otf appartient à la famille des protéines chélateurs du fer appelée « les transferrines » qui ont la propriété de fixer le fer d'une manière réversible. Cette famille regroupe principalement la transferrine sérique (sérum sanguin), la lactoferrine (lait, larmes, salive et fluides séminale), la mélanotransferrine (cellule cancéreuse, foie et les cellules de l'épithélium intestinal) et l'ovotransferrine (blanc d'œuf) [132].

Tableau I-1 : Composition et taux en protéines de la fraction protéique du blanc d'œuf.

Protéine	Taux
Ovalbumine	54%
Ovotransferrine	12%
Ovomucoïde	11%
Lysozyme	3,5%
Ovomucine	3,5%
Ovoglycoprotéine, Ovoflavoprotéine, Ovomacroglobuline, Cystatine et Avidine	0,05 – 1,0%

L'Otf est une protéine de 686 résidus d'acides aminés (voir Annexe 1) et d'une masse moléculaire de 77,7 kDa avec un point isoélectrique faiblement acide ( $pI = 6,0$ ). C'est une glycoprotéine monomérique avec 15 ponts disulfures, aucun groupe sulfhydryle n'est libre. Sa structure tertiaire présente deux lobes globulaires (lobe N-terminale et lobe C-terminale) reliés par une hélice  $\alpha$  de 9 acides aminés. Chaque lobe est composé de deux domaines (N1, N2, C1 et C2) [133, 134]. Chaque lobe de l'Otf est muni d'un site de fixation du fer permettant à la protéine de fixer réversiblement jusqu'à deux cations  $Fe^{3+}$ . La fixation de chaque cation  $Fe^{3+}$  nécessite deux ions  $CO_3^{2-}$  ou un ion  $HCO_3^-$ . La constante d'association est de  $1,5 \times 10^{18}$  pour le lobe C-terminal et de  $1,5 \times 10^{14}$  pour le lobe N-terminal [135-138].



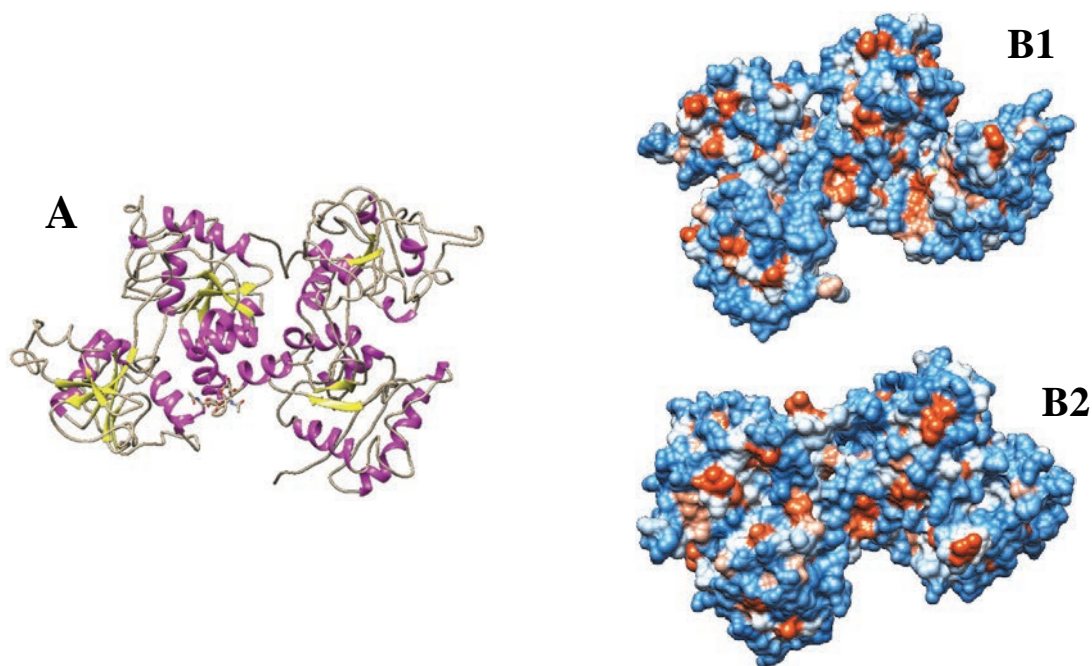


Figure I-11 : Représentation 3D de l'Otf avec ses structures secondaires (A). Structures de l'Apo-Otf (B1) et l'Otf diférique (B2), générées à partir des PDB 1aiv et 1OVT respectivement, par le logiciel Chimera 1.10.2.

## I.4.2. Fonctions

### I.4.2.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'Otf est due en partie à sa propriété de chélation du  $\text{Fe}^{3+}$ . L'appauvrissement en fer, nécessaire à la croissance bactérienne, est à l'origine de l'activité bactériostatique de l'Otf. Par cette propriété, l'Otf exerce un effet bactériostatique sur un large spectre de bactéries. La sensibilité des bactéries à l'activité bactériostatique de l'Otf est très différente en fonction des espèces bactériennes. Les espèces les plus sensibles sont *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli* et *Streptococcus mutans*. Les espèces les plus résistantes sont *Staphylococcus aureus*, *Proteus sp.* et *Klebsiella* [2-4]. La chélation des cations divalents, par l'ovotransferrine, peut avoir aussi un impact sur la rigidité et l'intégrité de la membrane externe [4]. En effet, les cations divalents participent à la stabilisation de la membrane externe par stabilisation des lipopolysaccharides et donc le maintien de l'intégrité de la membrane externe.

L'activité bactériostatique de l'Otf peut être influencée par la composition du milieu. Il est démontré que l'addition du bicarbonate fait augmenter l'activité bactériostatique de l'Otf contre *E. coli* O157:H7 et *L. monocytogenes*. En effet, l'ion bicarbonate est un élément nécessaire dans la formation du complexe Otf-fer et son abondance favorise la capacité de fixation du fer par l'Otf [139]. L'acidité du milieu augmente considérablement l'activité antimicrobienne de l'Otf et l'acide citrique présente un effet synergique sur l'activité bactéricide de l'Otf contre *E. coli* O157:H7 [139]. L'addition du  $Zn^{2+}$  à l'Otf améliore l'activité antibactérienne de l'Otf d'après certains auteurs et elle est sans effet selon d'autres [139, 140]. En présence de bicarbonate, l'addition d'EDTA ou de lysozyme augmente l'activité bactériostatique de l'Otf contre *E. coli* O157:H7 et *L. monocytogenes* [141, 142]. L'addition du bicarbonate améliore l'activité antibactérienne de l'Otf contre le *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* mais il n'apporte pas d'amélioration contre *S. aureus*. Aussi, l'addition du citrate en présence de bicarbonate augmente l'activité antibactérienne de l'Otf contre ces 3 espèces de Staphylococcus [143].

Des études ont montré que même avec la saturation de l'Otf en ions métalliques, elle présente toujours une activité bactéricide. Cela indique que l'Otf exerce cette activité bactéricide par un mécanisme autre que l'appauvrissement du milieu en fer [3]. Des expériences réalisées sur des bactéries à coloration de Gram négative et sur des membranes artificielles montrent que l'Otf a un effet sur l'intégrité de la membrane interne et externe de la bactérie. L'Otf peut traverser la membrane externe pour atteindre la membrane interne provoquant un efflux sélectif d'ions, cela entraîne une dissipation du potentiel électrique sans affecter le gradient du pH [5, 6].

Afin de déterminer le domaine de la molécule responsable de l'activité bactéricide, des études ont montré que le lobe N-terminal isolé conserve l'activité bactéricide alors que le lobe C-terminal perd cette activité. Un peptide du lobe N-terminal de l'Otf appelé "OTAP-92" est responsable de cette activité bactéricide. C'est un fragment cationique de 92 résidus, localisé entre les résidus 109-200 d'une masse moléculaire de 9,9 kDa. Il possède une activité bactéricide contre *S. aureus* et *E. coli* K-12. Le fragment "OTAP-92" contient 3 ponts disulfures (C115-C197, C160-C174 et C171-C182) donnant au fragment une structure tertiaire indispensable à l'activité bactéricide [144]. Des essais sur *E. coli* montrent que l'OTAP-92 exerce son activité bactéricide par interaction avec la membrane externe entraînant sa perforation. Après passage de l'OTAP-92

à travers la membrane externe, l'OTAP-92 interagit avec la membrane cytoplasmique provoquant des dommages sur ces fonctions biologiques [145].

#### **I.4.2.2. Autres activités biologiques de l'ovotransferrine**

Il est démontré que l'Otf possède une activité antifongique contre le genre *Candida*. Entre les espèces de *Candida* sensibles et les bactéries, les *Candida spp* présentent une sensibilité plus importante à l'action de l'Otf [146]. L'ion bicarbonate n'apporte pas d'amélioration à l'activité antifongique de l'Otf. La forme apo- et la forme halo- de l'Otf possède la même activité antifongique. L'Otf inhibe la croissance de *C. albicans* après adsorption à des récepteurs spécifiques de *C. albicans* [147].

Sur des fibroblastes de l'embryon de poulet, il est démontré que l'Otf possède une activité antivirale contre l'infection, provoqué par le virus de la maladie de Marek (MDV). L'Otf est plus efficace que la lactoferrine humaine ou bovine dans l'inhibition du MDV. Aucune corrélation n'existe entre l'efficacité de l'activité antivirale et la saturation en fer [148]. Deux fragments peptidiques de l'Otf (DQKDEYELL et KDLLFK) présentent aussi une activité antivirale contre la maladie virale de Marek [149]. Des études protéomiques renforcent l'hypothèse que l'Otf joue un rôle important, par son activité antivirale, dans la réponse immunitaire innée chez les oiseaux [150].

Des études récentes, réalisées sur l'Otf réduite et autoclavée (ponts disulfures réduits), montrent la présence d'une activité anticancéreuse. Elle donne une modulation de la prolifération, une létalité et une apoptose de deux lignées de cellules cancéreuses humaines, cancer de colon (HCT-116) et cancer du sein (MCF-7), tout en restant sans effet sur les cellules de l'épithélium mammaire (HMEC). Le mécanisme d'induction de l'apoptose est dû principalement par un changement de la morphologie cellulaire et l'effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale [151].

L'Otf montre une activité antioxydante par piégeage de l'ion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  lui conférant la fonction de superoxyde dismutase. Les deux lobes isolés de l'Otf possèdent une capacité plus importante de piéger le  $O_2^{\bullet-}$  que l'Otf entière, avec une activité plus élevée pour le lobe N-terminal [152]. L'activité antioxydante de l'Otf augmente par autoclivage après traitement avec le tris(2-

carboxyethyl)phosphine [153]. Huang et al. ont trouvé que les hydrolysats de l'Otf possèdent une capacité d'absorption de l'oxygène radicalaire significativement plus élevée que l'Otf entière [154, 155].

Une étude récente utilise l'Otf comme un médiateur de molécules ayant un intérêt thérapeutique. Une stratégie de ciblage est suivie par fixation d'un antibiotique « Le triclosan » sur l'Otf par des liaisons non-covalentes jouant ainsi le rôle de transporteur. Cette stratégie permet le ciblage de l'antibiotique aux bactéries ou aux cellules mammaires *via* le récepteur de la transferrine. La fixation à l'Otf permet aussi de lever la problématique d'insolubilité et de toxicité du triclosan [156].

#### **I.4.3. Stabilité et comportement**

Les pressions élevées ont des effets sur la structure de l'Otf. A pH 8, une pression supérieure à 200 MPa induit une diminution des groupes sulfhydryles totaux et une augmentation de l'hydrophobicité de surface accompagné d'une agrégation partielle. Au-delà de 500 MPa, la protéine se dénature par exposition des résidus aromatiques principalement le tryptophane aux molécules d'eau [157]. En milieu acide (pH 3), la pression est sans effet sur la structure protéique mais avec une diminution de la fluorescence à 600 MPa qui augmente par la suite à 700 MPa [157].

La sonication de l'Otf à une forte fréquence (60 kHz) et de longues durées (>4 minutes) fait augmenter d'environ 50% les groupes sulfhydryles réactifs. Aucun lien n'existe entre les conditions de sonication et le degré d'hydrolyse global de l'Otf [158].

## **II. Matériels et méthodes**

---

## **II.1. Préparation de l'ovotransferrine**

### **II.1.1. Purification de l'ovotransferrine**

L'Otf est purifiée à partir du blanc d'œuf de poule, suivant la procédure décrite par Croguennec et al [159]. Les étapes de procédure sont détaillées ci-dessous. Cette procédure a l'avantage d'utiliser uniquement des solutions aqueuses, ce qui permet de conserver la structure protéique de l'Otf.

#### **II.1.1.1. Préparation du blanc d'œuf démuçiné**

L'obtention d'un blanc d'œuf dépourvu de mucine est nécessaire afin d'éviter le colmatage par l'ovomucine de la colonne de chromatographie. Le blanc d'œuf de poule utilisé est obtenu à partir d'œuf frais datés du jour. Un volume de 250 ml du blanc d'œuf est dilué au tiers avec de l'eau distillée puis acidifié à pH 6,0 avec HCl 2 N. La préparation est mélangée puis gardée à 4°C pendant 3 h. Le précipité gélatineux formé est éliminé par centrifugation à 2000 g pendant 3 min. Avant de procéder au chargement sur la colonne, la solution résultante est alcalinisée à pH 8,0 avec NaOH 1 N, puis centrifugée à 25000 g pendant 20 min à 4°C, afin d'éliminer tout produit insoluble.

#### **II.1.1.2. Extraction de l'ovotransferrine par chromatographie d'échange d'anions**

L'extraction de l'Otf est réalisée en deux étapes sur la même colonne contenant une résine échangeuses d'anions. Une colonne de 13×5 cm est remplie avec la résine Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotech AB). La colonne est adaptée au système Varian™ équipé de détecteurs d'absorbance UV à 280 nm, de conductivité et de pH.

La première étape est une étape de pré-purification, qui consiste à concentrer l'Otf. La colonne est saturée avec 650 ml du blanc d'œuf démuçiné. Le lysozyme (pI 10,7) et l'avidine (pI 10,0) ne sont pas retenus par la résine et sont les premières protéines éluées, en raison de charge globale positive à pH 8,0. Après avoir dépassé la saturation de la colonne, les protéines ayant la plus faible affinité sont déplacées des sites de fixation de la résine, c'est le cas de l'Otf. Ces protéines forment le coproduit F1 (Figure II-1A), composée d'environ 70% d'Otf, qui est récupéré pour la deuxième étape.

La deuxième étape consiste à la séparation de l'Otf avec un gradient de NaCl. Le coproduit est ajusté à pH 8,0 puis chargé dans la colonne. Une première élution avec l'eau distillée sert à éliminer les protéines non retenues. Les protéines retenues sont éluées, suivant leur affinité aux sites de fixation de la résine, avec un gradient de NaCl de 0 à 0,1 M pendant 2 h. L'Otf correspond au premier à la fraction F2 de cette étape (Figure II-1B).

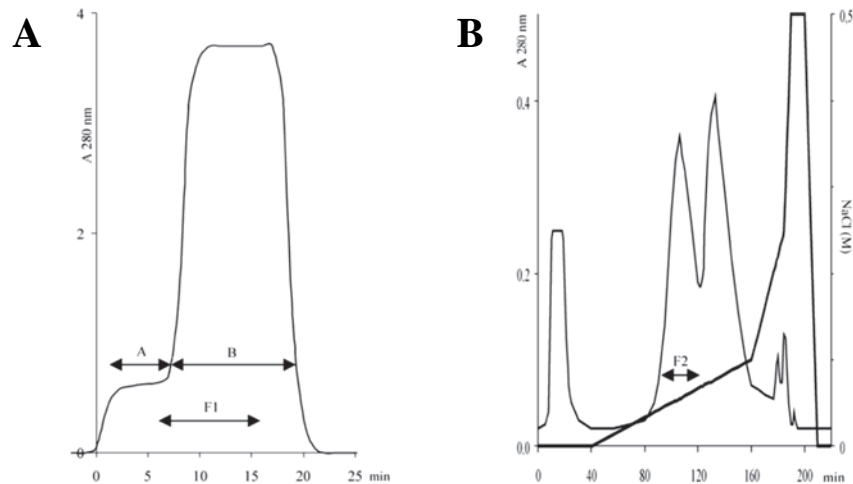


Figure II-1 : Profils de chromatographie de la première étape (A) et de la deuxième étape (B) de purification de l'Otf par la procédure décrite par Croguennec et al [159].

### II.1.1.3. Dialyse et lyophilisation

Le sel contenu dans la fraction F2 est éliminé par dialyse à travers une membrane poreuse (Spectra/Por® - seuil de coupure 12-14 kDa). Un boudin de la membrane rempli avec la fraction F2 est plongé dans de l'eau ultra pure pendant 3 jours à 4°C. L'eau ultra pure est changée régulièrement jusqu'à ce que la conductivité du bain de dialyse soit environ 1 S.cm<sup>-1</sup> (à 20 °C). La solution d'Otf dialysée est congelée puis lyophilisée.

### II.1.1.4. Dosage de la pureté d'Otf

Le dosage de l'Otf contenue dans les fractions F1 et F2 est effectué par HPLC en phase inverse, sur une colonne C4 (5 × 0,21 cm). Un gradient d'élution est appliqué à la colonne entre deux phases mobiles A et B, pour diminuer la polarité de la phase mobile au cours de la séparation. La phase mobile A est composée de l'acétonitrile avec 0,025% de TFA (acide trifluoroacétique),

et la phase mobile B correspond à l'eau distillée avec 0,025% de TFA. Au cours de la séparation, la proportion de la phase mobile A augmente de 10% à 90% sur 32 min. L'ovotransferrine purifiée à une pureté de 98%.

### **II.1.2. Chauffage à sec de l'ovotransferrine**

Le chauffage à sec de l'Otf consiste à traiter thermiquement le N-Otf à l'état déshydraté. Ainsi, le lyophilisat de N-Otf est placé dans un tube en pyrex, puis mis dans une étuve à 80°C pendant 7 jours.

### **II.1.3. Conservation**

Les lyophilisats d'Otf native et chauffée à sec sont mis dans des tubes eppendorf fermés hermétiquement sceller avec du Parafilm. Les tubes sont conservés à -20°C pour une durée maximale de 18 mois avant utilisation. Pour la mise en solution, le lyophilisat de protéine est remis à température ambiante. La solution protéique est conservée à 4°C et utilisée pendant une semaine.

## **II.2. Analyse physico-chimique de l'ovotransferrine**

### **II.2.1. Dimension et masse moléculaire de l'ovotransferrine**

#### **II.2.1.1. Dynamic Light Scattering "DLS"**

La diffusion dynamique de la lumière est une technique spectroscopique basée sur la mesure de l'intensité d'un faisceau laser au cours du temps. La diffusion se produit en présence de molécules ou de particules, d'une taille inférieure à la longueur d'onde du laser. L'intensité du signal fluctue au cours du temps, en raison des mouvements browniens des molécules. La cinétique de cette fluctuation varie avec le coefficient de diffusion qui dépend de la taille des molécules. Un traitement mathématique du signal, d'autocorrélation temporelle, permet de remonter aux rayons hydrodynamiques des molécules, par l'équation de Stokes-Einstein (Équation II-1).

$$R_H = \frac{k_b T}{3\pi\eta D} \quad \text{Équation II-1}$$



$R_H$  : rayon hydrodynamique  
 $k_b$  : constante de Boltzmann  
 $T$  : température thermodynamique  
 $\eta$  : viscosité dynamique  
 $D$  : coefficient de diffusion transversale.

Les dimensions de N-Otf et de DH-Otf sont mesurées, à l'aide d'un granulomètre à diffusion de lumière (Zetasizer NanoZS - Malvern®), sur des solutions de 11,6  $\mu\text{M}$  et 11,4  $\mu\text{M}$  respectivement, fraîchement préparées. Les solutions protéiques sont préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7. Toutes les solutions sont filtrées, avant analyse pour éliminer d'éventuelles substances insolubles, avec un filtre Sartorius® RC4 0,2  $\mu\text{m}$  (membrane de cellulose régénérée de diamètre 4 mm, avec des pores de 0,2  $\mu\text{m}$ ). Les mesures sont réalisées à température ambiante, l'indice de réfraction de l'Otf est fixé à 1,55.

### II.2.1.2. HPLC d'exclusion

La HPLC d'exclusion est une technique de chromatographie, qui permet la séparation des protéines et leur dosage selon leurs poids moléculaire. Une protéine de poids moléculaire élevée aura un trajet court dans la phase stationnaire, donc un temps d'élution faible. Inversement, une protéine de poids moléculaire faible aura un trajet long dans la phase stationnaire, donc un temps d'élution plus important. Des étalons de poids moléculaires permettent de déterminer le poids moléculaires des protéines.

Des solutions de N-Otf et de DH-Otf sont préparées en raison de 11,6  $\mu\text{M}$  et de 11,4  $\mu\text{M}$  avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7, puis filtrées avec un filtre RC4 0,2  $\mu\text{m}$  (membrane de cellulose régénérée de diamètre 4 mm, avec des pores de 0,2  $\mu\text{m}$ ). Un échantillon de 50  $\mu\text{l}$  de chaque solution protéique est injecté dans une colonne (BioSep™ 5  $\mu\text{m}$  SEC-s3000 400 Å, Dimension : 300  $\times$  7,8 mm). Le même tampon de préparation des solutions protéiques a servi pour éluer l'échantillon avec un débit de 0,8 ml pendant 30 minutes. La longueur d'onde de détection est à 280 nm.

## **II.2.2. Structure moléculaire de l'ovotransferrine**

### **II.2.2.1. Fluorescence intrinsèque**

Les acides aminés aromatiques possèdent une fluorescence qui dépend de la polarité de leur milieu. La fluorescence du tryptophane est la plus intense parmi les autres résidus, et sa contribution est majoritaire dans la fluorescence intrinsèque des protéines. La longueur d'onde maximale d'excitation du tryptophane est de 295 nm. La polarité du microenvironnement du tryptophane, et donc de sa fluorescence, dépend : des liaisons hydrogènes établies avec les résidus avoisinants, de la densité électronique définie par la position des atomes des résidus qui l'entoure et l'accessibilité des molécules d'eau. Ainsi, toute modification du microenvironnement des résidus tryptophane, produit des modifications sur le spectre de fluorescence intrinsèque de la protéine, par la variation de l'intensité et/ou le décalage de la longueur d'onde maximale d'émission.

Les spectres de fluorescence intrinsèque sont réalisés sur des solutions fraîchement préparées, de N-Otf (1,00  $\mu\text{M}$ ) et de DH-Otf (0,91  $\mu\text{M}$ ), préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7. Les spectres d'émission sont enregistrés de 310 à 450 nm, avec un spectrofluorimètre Fluorolog 3 (Horiba Jobin-Yvon), après excitation à la longueur d'onde 295 nm.

### **II.2.2.2. Fluorescence extrinsèque**

La mesure de la fluorescence extrinsèque permet d'évaluer l'hydrophobie de la surface des protéines. Elle est basée sur l'emploi d'une sonde apolaire fluorescente qui est L'ANS (1-anilinonaphthalene-8-sulphonate), qui a une grande affinité pour les zones apolaires en surface des protéines. En milieu polaire (dissoute en solution), la fluorescence de l'ANS est faible. En présence d'un environnement apolaire (des zones apolaires des surfaces protéiques), l'intensité de fluorescence augmente, avec un décalage de longueur d'onde maximale d'émission vers des valeurs plus faibles.

Les spectres de fluorescence extrinsèque sont réalisés sur des solutions de N-Otf (1,00  $\mu\text{M}$ ) et de DH-Otf (0,91  $\mu\text{M}$ ), préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7.

Après ajout de 4  $\mu\text{M}$  d'ANS (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), les spectres d'émission des solutions ANS/N-Otf et ANS/DH-Otf sont enregistrés de 420 à 600 nm, avec un spectrofluorimètre (Fluorolog 3 - Horiba Jobin-Yvon<sup>®</sup>), après excitation à la longueur d'onde 370 nm.

### II.2.2.3. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est la propriété d'un échantillon possédant un chromophore chiral, d'absorber différemment la lumière polarisée circulairement droite et la lumière polarisée circulairement gauche. Pour chaque longueur d'onde, la différence d'absorbance entre ces deux types de lumière, convertie en ellipticité  $\theta$  (Équation II-2), correspond au spectre dichroïque.

$$\theta = \tan^{-1}(b/a) \quad \text{Équation II-2}$$

$\theta$  : ellipticité.

$b/a$  : rapport de l'axe elliptique mineur sur l'axe elliptique majeur.

Les échantillons de N-Otf (6,08  $\mu\text{M}$ ) et de DH-Otf (6,25  $\mu\text{M}$ ) analysées, sont préparés avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7. La mesure d'ellipticité est réalisée de 200 à 250 nm avec un spectropolarimètre (J-815 - Jasco<sup>®</sup>).

La mesure du dichroïsme circulaire dans l'UV lointain (zone d'absorption des liaisons peptidiques), permet de tirer des conclusions sur la structure secondaire des peptides et des protéines, et de déterminer les proportions des structures hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , coudes et structures désordonnées après traitement des données. Tout changement de la structure secondaire lié à une à une éventuelle dénaturation, peut être observé par la diminution de la proportion des structures hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  et coudes, et par l'augmentation des structures désordonnées.

## II.3. Etudes à l'interface air/liquide

### II.3.1. Ellipsométrie

#### II.3.1.1. Principe

L'ellipsométrie est une technique d'analyse optique non destructive d'étude des surfaces des matériaux. La technique est basée sur la mesure de la modification de l'état de polarisation d'un rayonnement électromagnétique après sa réflexion sur une surface à caractériser.

Supposant une onde électromagnétique, avec une polarité rectiligne et une incidence oblique " $\theta_{incidence}$ ", arrivant sur une surface plane entre deux milieux, une partie de l'onde est transmise " $\theta_{transmission}$ " (Équation II-3) et une partie est réfléchie " $\theta_{réflexion} = \theta_{incidence}$ ". Le champ électrique  $E_i$  de l'onde incidente est décomposé de deux vecteurs orthogonaux  $E_{ip}$  et  $E_{is}$  par rapport au plan parallèle et au plan perpendiculaire au plan d'incidence (qui est le même que le plan de réflexion). De la même façon, le champ électrique  $E_r$  de l'onde réfléchie est décomposé en  $E_{rp}$  et  $E_{rs}$ . Après la réflexion et la modification du champ électrique, le changement de polarisation est représenté par les coefficients de réflexion  $r_p$  et  $r_s$  qui sont des grandeurs complexes (Équation II-4 et Équation II-5).

$$n_0 \cdot \sin \theta_{incidence} = n_1 \cdot \sin \theta_{transmission} \quad \text{Équation II-3}$$

$n_0$  : indice de réfraction du premier milieu.

$n_1$  : indice de réfraction du deuxième milieu.

$\theta_{incidence}$  : angle d'incidence de l'onde électromagnétique.

$\theta_{transmission}$  : angle de transmission de l'onde électromagnétique.

$$r_p = \frac{E_{rp}}{E_{ip}} = |r_p| e^{j\delta_p} \quad \text{Équation II-4}$$

$$r_s = \frac{E_{rs}}{E_{is}} = |r_s| e^{j\delta_s} \quad \text{Équation II-5}$$

$|r_p|$  et  $|r_s|$  sont les modules de  $r_p$  et  $r_s$   
 $\delta_p$  et  $\delta_s$  sont les phases de  $r_p$  et  $r_s$

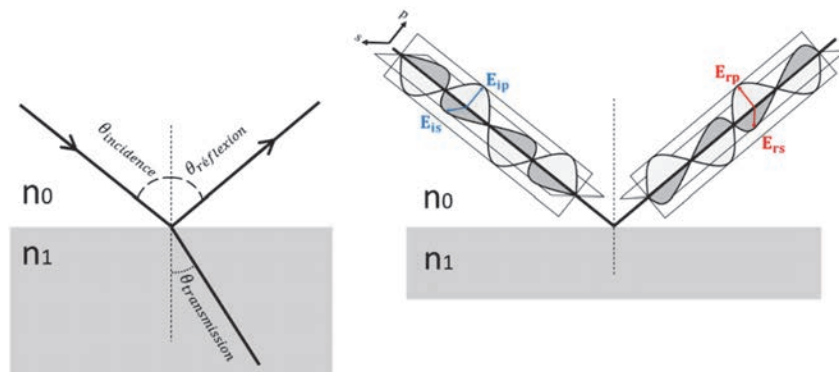


Figure II-2 : Schéma de réflexion et de transmission d'un faisceau incident sur une interface entre deux milieux avec  $n_1 > n_0$  (à gauche) et schéma représentatif des vecteurs orthogonaux du champ électrique de l'onde incidente et de l'onde réfléchie sur le plan p et sur le plan s (à droite).

Après réflexion de l'onde électromagnétique sur la surface, l'état de polarisation change d'une polarisation rectiligne à une polarisation elliptique. En pratique, l'analyse de cette ellipse consiste à mesurer  $\rho$ , aussi appelé l'ellipticité, qui est le rapport entre les deux coefficients de réflexion  $r_p$  et  $r_s$  (Équation II-6, Équation II-7 et Équation II-8).

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = \tan \Psi \cdot e^{j\Delta} \quad \text{Équation II-6}$$

$$\tan \Psi = \left| \frac{r_p}{r_s} \right| \quad \text{Équation II-7}$$

$$\Delta = \arg|\rho| = \delta_p - \delta_s \quad \text{Équation II-8}$$

Les deux paramètres  $\Delta$  et  $\Psi$  sont les angles ellipsométriques accessibles par mesure expérimentale qui permettent d'obtenir les propriétés optiques du système réfléchissant.  $\Delta$  correspond au déphasage entre la composante p et s du champ électrique après réflexion sur la surface et  $\tan \psi$  correspond au rapport des deux modules de coefficient de réflexion p et s.

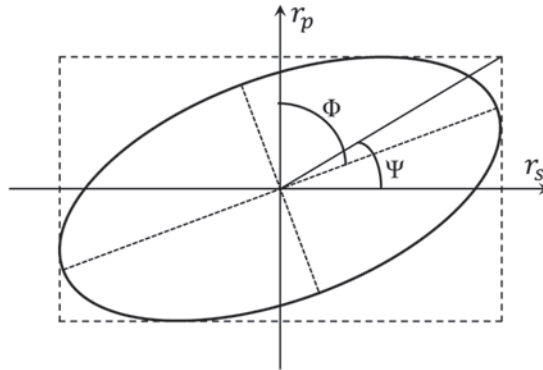


Figure II-3 : Polarisation elliptique d'une onde électromagnétique après sa réflexion.

### II.3.1.2. Particularités de l'angle de Brewster

De plus, les coefficients de réflexion peuvent être déterminés par les conditions de continuité des composantes tangentes des champs électrique et magnétique à travers l'interface. Les coefficients  $n_0$  et  $n_1$  correspondent aux indices de réfraction du milieu d'incidence et du milieu de transmission de l'onde électromagnétique.

$$r_p = \frac{n_1 \cdot \cos \theta_{incidence} - n_0 \cdot \cos \theta_{transmission}}{n_1 \cdot \cos \theta_{incidence} + n_0 \cdot \cos \theta_{transmission}} \quad \text{Équation II-9}$$

$$r_s = \frac{n_0 \cdot \cos \theta_{incidence} - n_1 \cdot \cos \theta_{transmission}}{n_0 \cdot \cos \theta_{incidence} + n_1 \cdot \cos \theta_{transmission}} \quad \text{Équation II-10}$$

$n_0$  : indice de réfraction du milieu d'incidence.

$n_1$  : indice de réfraction du milieu de transmission.

$\theta_{incidence}$  : angle d'incidence de l'onde électromagnétique.

$\theta_{transmission}$  : angle de transmission de l'onde électromagnétique.

Ainsi, pour la même surface réfléchissante,  $r_p$  et  $r_s$  varient en fonction de l'angle de l'incidence. Théoriquement, il existe un angle d'incidence pour lequel l'intensité de la composante p du champ électrique s'annule après réflexion donnant un coefficient de réflexion  $r_p$  nul. Cet angle est appelé l'angle de Brewster " $\theta_B$ " qui vérifie l'Équation II-11, au-dessous :

$$\tan \theta_B = \frac{n_1}{n_0} \quad \text{Équation II-11}$$

$n_0$  : indice de réfraction du milieu d'incidence.  
 $n_1$  : indice de réfraction du milieu de transmission.  
 $\theta_B$  : angle de Brewster.

Pour une interface de Fresnel, c'est-à-dire sans molécule adsorbée à l'interface, l'angle de Brewster dépend uniquement des indices de réfraction du milieu d'incidence et du milieu de transmission. Pour interface air/eau, l'angle de Brewster  $\theta_B = 53^\circ 12'$ . La présence de molécules adsorbées à l'interface air/eau génère une interface d'une épaisseur non nulle et donc l'interface n'est plus une interface de Fresnel. L'intensité de la composante p du champ électrique n'est plus nulle à l'angle d'incidence  $\theta_B$ . A l'angle de Brewster, la réflexion de la composante p du champ électrique due à la surface de l'eau est annulée et l'intensité résultante est due uniquement à la couche de molécules adsorbées à l'interface.

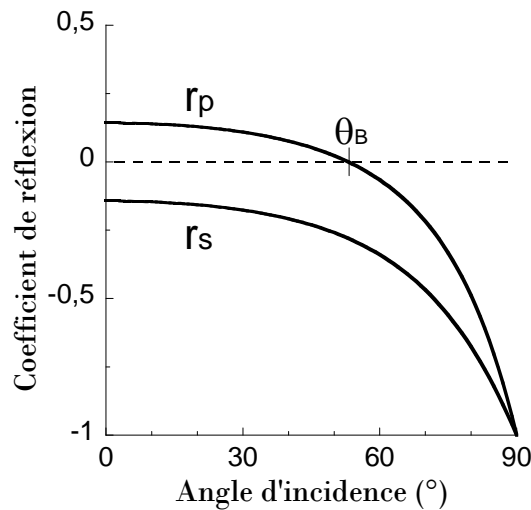


Figure II-4 : Variation des coefficients de réflexion  $r_p$  et  $r_s$  en fonction de l'angle d'incidence sur une interface air/eau.

### II.3.1.3. Instrumentation : Ellipsométrie à annulation

L'ellipsomètre utilisé est un ellipsomètre à annulation construit au laboratoire (Figure II-5). La source He-Ne (Melles Griot) génère un faisceau laser non polarisé d'une longueur d'onde  $\lambda=632,81$  nm. La source du laser est orienté avec un angle d'incidence  $\theta_i$  décalé d'un degré de l'angle de Brewster ( $\theta_i = 52^\circ 12'$ ) pour avoir un compromis entre une différence maximale entre  $r_p$  et  $r_s$  d'un côté et une intensité suffisamment détectable de la composante p après réflexion d'un autre côté. Le faisceau laser est polarisé rectilignement avec un polariseur de type Glan-Thompson (Melles Griot®) et orienté de  $45^\circ$  du plan d'incidence. Ce faisceau laser polarisé rectilignement vient éclairer la surface de l'échantillon à analyser. Après réflexion, le faisceau laser se trouve modifié par l'échantillon et prend une polarisation elliptique. Par la suite, le faisceau laser passe par un compensateur qui est une lame quart-d'onde où ses lignes neutres sont orientées par rapport au plan d'incidence avec un angle permettant de transformer la polarisation elliptique générée par l'interface air/eau à une polarisation rectiligne. L'onde électromagnétique passe à travers un polariseur appelé analyseur de type Glan-Thompson (Melles Griot) et orienté perpendiculairement par rapport à la polarisation rectiligne pour annuler le signal ou avoir le signal le plus faible. Finalement, le photomultiplicateur permet d'amplifier le signal et d'augmenter la sensibilité de la mesure.

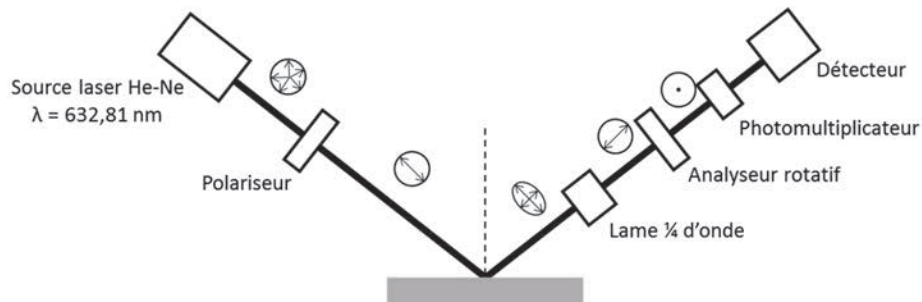


Figure II-5 : Montage expérimentale de l'ellipsomètre à annulation.

### II.3.1.4. Relation entre le déphasage $\Delta$ et la concentration surfacique $\Gamma$

L'ellipsométrie permet de déterminer l'angle de déphasage  $\Delta$  entre le champ électrique p et s après réflexion. Dans l'étude de l'adsorption des protéines globulaire à l'interface air/eau, il



est montré qu'il existe une relation linéaire entre l'angle de déphasage  $\Delta$  et la concentration surfacique  $\Gamma$ . Feijter et al. ont donné la formule suivante pour le calcul de  $\Gamma$  en fonction de  $\Delta$  :

$$\Gamma(\text{mg}/\text{m}^2) = 0,20 \times \Delta(^{\circ}) \quad \text{Équation II-12}$$

$\Gamma$  : concentration surfacique ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ).

$\Delta$  : angle ellipsométrique ( $^{\circ}$ ), qui correspond au déphasage entre le champ électrique p et s après réflexion.

Cette formule est applicable uniquement dans le cas de monocouche. Dans notre travail,  $\Gamma$  est déterminé par l'Équation II-12 pour suivre l'évolution de la concentration surfacique de l'ovotransferrine à l'interface air-eau.

### **II.3.1.5. Origine moléculaire du changement de polarisation**

La propagation des ondes électromagnétiques dans les milieux est liée aux indices de réfraction de ces derniers. Cependant, les indices de réfraction sont liés à la polarisation diélectrique des milieux. La polarisation diélectrique est la séparation partielle dans le milieu des charges positives et négatives sous l'effet d'un champ électrique externe. En présence d'un champ électrique, généré par l'éclairage avec un faisceau laser, les charges positives et négatives sont soumises à une force électrique d'une direction opposée. Ainsi, la distribution spatiale des charges positives et des charges négatives sont légèrement modifiées créant des régions plus chargées positivement ou plus chargées négativement. La polarisation électrique se produit quand le champ électrique change le barycentre des charges négatives des électrons et le barycentre des charges positives des noyaux dans des sens opposés. Ainsi, la polarisation des molécules est perpendiculaire à l'axe de propagation de l'onde électromagnétique.

A un angle d'incidence  $\theta_i \neq \theta_B$ , les axes de propagation de l'onde transmise et de l'onde réfléchie ne sont pas perpendiculaires amenant le champ électrique à interagir partiellement avec les dipôles électriques, le reste est réfléchi. Pour un angle d'incidence  $\theta_i = \theta_B$ , les axes de propagation de l'onde transmise et l'onde réfléchie se trouvent perpendiculaire et le champ électrique est complètement aligné les dipôles électriques et interagit totalement et aucune réflexion sur le plan p ne se produit.

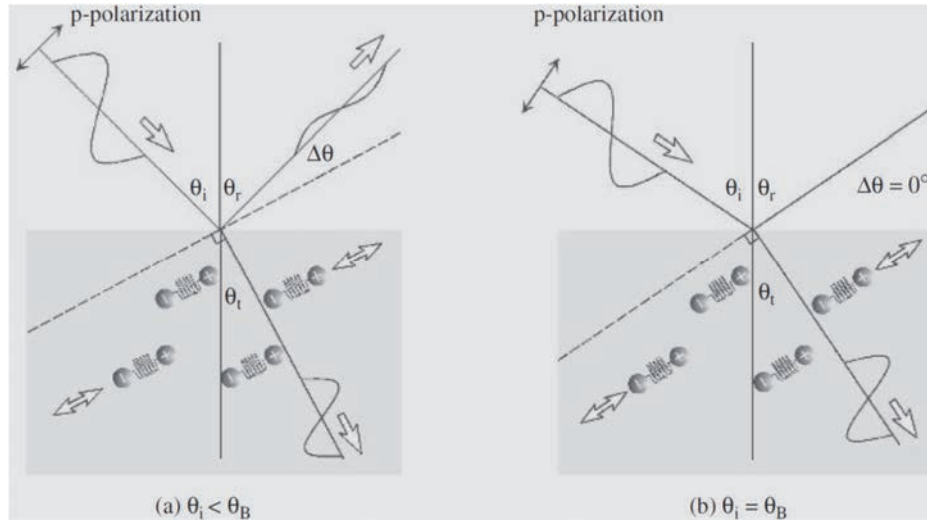


Figure II-6 : Interaction des dipôles électrique des molécules avec une onde électromagnétique à  $\theta_i \neq \theta_B$  et à  $\theta_i = \theta_B$  [160].

## II.3.2. Tensiométrie

### II.3.2.1. La tension superficielle et la pression de surface

La tension de surface est un phénomène physique macroscopique qui a pour origine les forces attractives et répulsives entre les molécules. En effet, dans un milieu fluide liquide ou gazeux, les molécules sont en équilibre dynamique sous la résultante des forces d'attraction et de répulsion. Pour une molécule située à la surface du liquide, l'environnement moléculaire n'est plus homogène et la résultante des force n'est plus nulle ce qui amène à une asymétrie de forces exercé sur la molécule. Le liquide tend à réduire sa surface pour réduire son énergie crée par cet asymétrie de force à la surface. L'augmentation de la surface de  $\delta A$  nécessite un apport d'une énergie libre de surface  $\delta F$ . La tension de surface peut être considérée comme l'énergie nécessaire pour créer de la surface, mesurée en  $J/m^2$ . Elle peut aussi être exprimée en  $N/m$  ou  $dynes/cm$  et assimilée à une force appliquée sur une unité de longueur. Thermodynamiquement, la tension de surface est l'augmentation de l'enthalpie libre de surface par unité d'aire à une température et une pression donnée (Équation II-13).

$$\gamma = \left( \frac{\delta F}{\delta A} \right)_{T,P} \quad \text{Équation II-13}$$

En présence de molécules tensioactives dissoutes en solution aqueuse comme les lipides et les protéines, ces molécules s'adsorbent à l'interface air-eau. En effet, les lipides ou les protéines adsorbées se trouvent dans un état énergétiquement plus stable en réduisant le contact de leurs parties hydrophobes avec les molécules d'eau et conservant leurs parties hydrophiles plongées dans l'eau. La composition moléculaire à l'interface se trouve alors modifier après l'adsorption des protéines ce qui fait diminuer la résultante de forces à l'interface et donc fait réduire la tension superficielle. La pression de surface «  $\pi$  » correspond à cette diminution dans la tension de superficielle entre la sous-phase seule «  $\gamma_0$  » et la sous-phase après adsorption des molécules tensio-actives «  $\gamma$  ».

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

### II.3.2.2. Mesure de la pression de surface : Méthode de la lame de Wilhelmy

Dans cette étude, la tension de surface à l'interface air/liquide est mesurée par la méthode de la lame de Wilhelmy. Il s'agit d'une lame verticale plongée en partie dans le liquide et pendue sur un crochet relié à un capteur électronique. Le capteur électronique permet de mesurer la force exercée sur la lame. La force mesurée est la résultante du poids de la lame P, la poussée d'Archimède  $P_A$  de la partie plongée de la lame et la force interfaciale  $f_i$  induite par la tension superficielle (Équation II-14).

$$\vec{F} = \vec{P} + \vec{P}_A + \vec{f}_i \quad \text{Équation II-14}$$

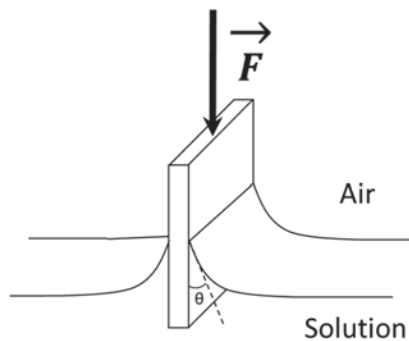


Figure II-7 : Méthode de mesure de la pression de surface par la méthode de Wilhelmy.

En pratique, nous avons remplacé la lame par un papier filtre de propriété mouillante très importante donnant un angle de contact  $\theta$  égal à 0. Les dimensions du papier filtre est de 22 mm de longueur, 10 mm de largeur et 0,5 mm d'épaisseur. Une partie du papier de longueur « h » est plongée dans le liquide pendant toute l'expérience, cela permet de conserver le poids et la poussée d'Archimède. Ainsi, la différence de forces dépend uniquement de la différence des forces interfaciales entre l'interface air-eau et l'interface air-film moléculaire.

$$\begin{aligned} \Delta F &= f_i^{eau} - f_i^{film} && \text{Équation II-15} \\ \Delta F &= (\gamma_{eau} - \gamma_{film}) \cdot \cos \theta \cdot 2(l + e) && \theta = 0 \\ \Delta F &= (\gamma_{eau} - \gamma_{film}) \cdot 2(l + e) \end{aligned}$$

La pression de surface recherchée est la différence entre la tension de surface à l'interface air-eau en absence et en présence de film moléculaire, c'est-à-dire la diminution de la tension de surface engendrée par la présence de molécules protéiques ou lipidique à l'interface. La différence de force appliquée sur le papier filtre en absence et en présence de film protéine à l'interface air/eau rapporté au périmètre du papier permet de mesure la pression de surface du film moléculaire.

$$\pi = \gamma_{eau} - \gamma_{film} = \frac{\Delta F}{2(l + e)}$$

La mesure de la pression de surface par la méthode de Wilhelmy est utilisée pour caractériser les monocouches lipidiques à la compression, pour préparer des monocouches de lipides à une compacité contrôlée. La pression de surface est utilisée aussi pour suivre en fonction du temps la cinétique d'adsorption des protéines à l'interface air/eau et de l'interaction des protéines avec les monocouches lipidiques.

### **II.3.3. Cuves et dispositifs expérimentaux**

#### **II.3.3.1. Mesures simultanées par ellipsométrie et par tensiométrie**

Deux types de cuves en Téflon sont utilisés dans la réalisation des essais à l'interface air-liquide autour desquelles sont installés les dispositifs d'ellipsométrie et de tensiométrie.

La cuve ronde en Téflon est fabriquée au laboratoire avec un diamètre interne de 5,2 cm et disposée d'une oreille latérale. Le fond de la cuve est légèrement incliné sur lequel est déposée un verre filtre pour absorber le faisceau laser transmis par l'interface. Après l'avoir remplie, la cuve est placée d'une façon à ce que le spot laser qui éclaire l'interface soit au centre loin des bords de la cuve pour assurer une réflexion sur une interface horizontale. Le papier filtre du tensiomètre est plongée en partie dans l'oreille de la cuve. Ainsi, les mesures tensiométriques et ellipsométriques sont effectués simultanément sur les mêmes essais. La cuve est dotée d'un trou fin sur le côté, cela permet l'injection des protéines en sous-phase sans perturber la stabilité des films lipidiques. Pour des essais de longue durée, la cuve est placée sur une balance pour mesurer l'évaporation d'eau et la compenser en continu par l'injection de l'eau en sous-phase à travers un trou fin.

La cuve de Langmuir est un récipient rectangulaire en Téflon de faible profondeur (environ 5 mm). Deux barrières mobiles placées à la surface du récipient, qui en présence d'une solution, divisent l'interface en 3 compartiments. Les films lipidiques sont placés dans le compartiment du milieu. Le déplacement des barrières le long de la cuve permet alors d'étudier le comportement des films lipidiques à la compression et à la décompression ainsi de contrôler leur compacité. L'injection des protéines en sous-phase est réalisée par passage au-dessous de la barrière d'une longue aiguille d'une seringue Hamilton de haute précision. La cuve de Langmuir est munie d'un puit positionné au centre du récipient qui sert à transférer le film moléculaire sur un support solide (détail dans la partie suivante).

#### **II.3.3.2. Transfert des échantillons par la méthode de Langmuir-Blodgett**

Pour observer la topographie du film moléculaire situé à l'interface air/liquide, le film est transféré sur un support solide qui est une plaque de mica. Le transfert est réalisé suivant la méthode

de Langmuir-Blodgett à l'aide d'un dispositif connecté à la cuve de Langmuir. Au niveau du puit de la cuve de Langmuir, la plaque de mica d'environ 1,5 cm est plongée verticalement avec une vitesse de 1,5 mm/min à une profondeur d'environ 1,5 cm. Par la suite, la plaque de mica est remontée à la même vitesse jusqu'à sa sortie complète. La pression de surface est ajustée en continu à la valeur du transfert par ajustement de la surface entre les deux barrières à une vitesse de 10 cm<sup>2</sup>/min. Cela permet de pallier aux variations de la pression de surface créée par la formation d'un ménisque autour de la plaque de mica et par la diminution de la quantité de molécules à l'interface durant le transfert

La surface hydrophile des plaques de mica assure l'adsorption de la partie hydrophile du film moléculaire. En plus, la structure atomique en feuillet du mica permet d'avoir, après clivage, des lames planes à l'échelle atomique sans artefact. Cela permet de préserver la topographie du film moléculaire transféré sur la plaque du mica qui est observée ensuite par microscopie à force atomique.

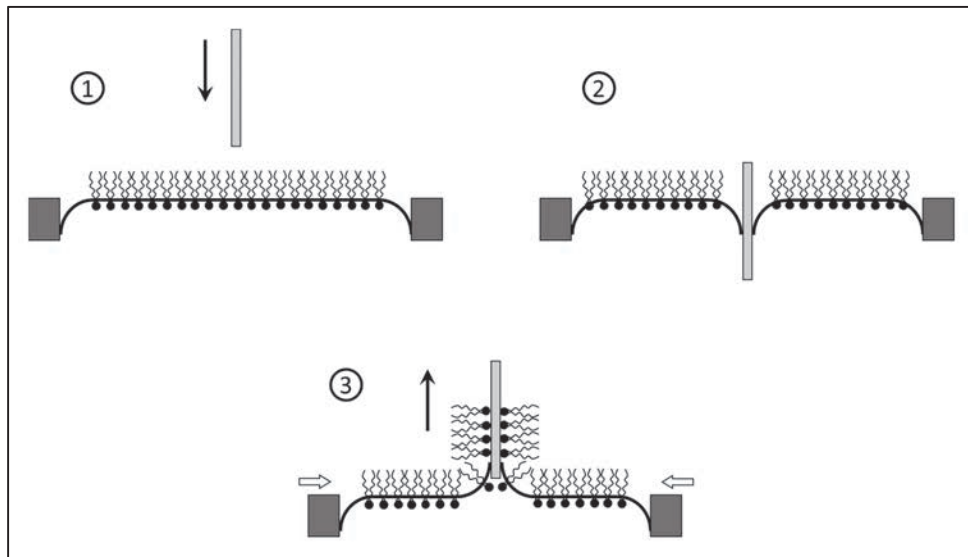


Figure II-8 : Schéma explicatif de la méthode de transfert de Langmuir-Blodgett d'un film moléculaire sur une plaque de mica.

## **II.3.4. La microscopie à Force Atomique**

### **II.3.4.1. Principe**

La microscopie à force atomique est une technique de microscopie à champ proche qui permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon à l'échelle nanométrique. La technique est développée par Gerd Binnig, Calvin Quate et Christoph Gerber en 1986. La technique est basée sur le balayage de la surface de l'échantillon avec une pointe extrêmement fine et le contrôle des interactions de l'extrémité de la pointe et la surface de l'échantillon. Durant son déplacement latéral sur l'échantillon, la pointe est soumise à des forces d'interactions avec la surface qui varient selon le rapprochement ou l'éloignement de la pointe de la surface ce qui, cela donne des informations sur la topographie de la surface de l'échantillon.

### **II.3.4.2. Instrumentation**

L'instrument de microscopie à force atomique est un AFM multimode PicoPlus (Molecular imaging®). Un faisceau laser est émis horizontalement sur un miroir rotatif sur les axes x et y. Le miroir rotatif permet de focalisé le laser sur l'extrémité du levier de forme triangulaire. Le laser est réfléchi par la surface du levier et capté par une photodiode à quatre cadrans. Les quatre cadrans permettent de localiser la zone du spot laser sur la photodiode par la mesure de l'intensité détectée par chaque cadran. Cela permet de mesurer l'inclinaison du laser réfléchi qui est liée à l'inclinaison du levier selon les axes x et y. L'inclinaison du levier est régie par les forces d'interaction de la pointe avec la surface de l'échantillon. En effet, une variation de la distance entre la pointe et la surface de l'échantillon fait varier la force appliquée sur le levier amenant son inclinaison ce qui se traduit par un décalage du laser réfléchi sur le plan vertical de la photodiode. Par ailleurs, lors du balayage de l'échantillon dans le sens perpendiculaire à l'axe du levier, les forces de frottement de la pointe avec la surface de l'échantillon induisent une torsion de l'extrémité du levier ce faisant déplacer le laser réfléchi sur le plan horizontal de la photodiode.

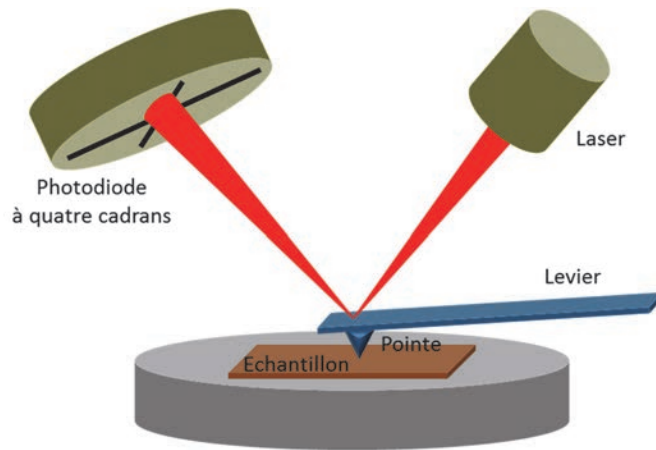


Figure II-9 : Schéma du principe de la microscopie à force atomique.

Dans ce travail, le mode contact est utilisé pour l'imagerie AFM, il consiste à appliquer une force de consigne très légère sur la surface de l'échantillon. La déflexion du levier induit le décalage du spot laser sur les quatre cadrans permet de mesurer les forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon. La variation de la déflexion au cours du balayage de de l'échantillon permet de suivre la variation de la topographie selon l'axe z et d'observer sa topographie. Cette information permet aussi, durant le balayage de la surface de l'échantillon, d'ajuster en continue la force d'interaction entre la pointe et la surface de l'échantillon par la conservation de la différence de tension appliquée de part et d'autre de la céramique piézoélectrique qui maintient le levier. La conservation de la différence de tension se fait par le déplacement de la céramique piézoélectrique en selon l'axe z. Le décalage du spot permet aussi de mesurer les forces de frottement entre la pointe et l'échantillon donnant des informations sur la nature et la rigidité de la surface.

### II.3.4.3. Les images AFM

Les images AFM sont prises ligne par ligne de gauche vers la droite avec une résolution de 512×512 pixels. La vitesse d'acquisition des images est de 1 lignes/seconde et la prise d'une image AFM nécessite environ 10 minutes. La topographie de la surface de l'échantillon est représentée par un gradient de couleur allant du foncé au clair avec la variation de la hauteur.

Plusieurs paramètres permettent de définir la résolution spatiale des images AFM qui sont l'angle d'ouverture de la pointe, la constante de raideur du levier et l'amplitude des mouvements



de la céramique piézoélectrique. La résolution verticale des images est de l'ordre de l'Angström. La résolution latérale dépend de la taille des images vu que le nombre de pixels est constant. Par exemple pour une image de taille (5×5) μm<sup>2</sup>, la résolution latérale est d'environ 10 nm. Il est possible de réduire la taille des images pour augmenter la résolution latérale.

## II.3.5. Expérimentation

### II.3.5.1. Préparation des solutions protéiques et lipidiques

Les solutions de N-Otf et de DH-Otf sont préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM), pH7 à la concentration recherchée. La concentration protéique est vérifiée par la mesure de la densité optique par spectroscopie UV à 280 nm. La concentration réelle en N-Otf ou en DH-Otf est alors calculée avec la loi de Beer-Lambert (Équation II-16), sachant que le coefficient d'extinction «  $\epsilon$  » de l'Otf est de 91200 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

$$DO_{280} = \epsilon_{280} \cdot l \cdot C \quad \text{Équation II-16}$$

$DO_{280}$  : densité optique à 280 nm.

$\epsilon_{280}$  : coefficient d'extinction molaire à 280 nm (L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>).

$l$  : longueur du trajet optique dans la solution (cm).

$C$  : concentration molaire de la solution (M).

Les LPS utilisés sont un extrait commercial des LPS de la membrane externe d'*E. coli* (LPS-EK Ultrapure – Invivogen®). Les CMEC est un mélange des principaux phospholipides de la membrane interne d'*E. coli* (Avanti Polar Lipids®), selon la description de Lugtenberg et Peters [21]. Ainsi les CMEC sont composés de DPPE (49,4%), de DOPE (32,3%), de cardiolipine (11,8%), de DPPG (3,9%) et de DOPG (2,6%). Les solutions lipidiques sont préparées par dissolution dans un mélange chloroforme : méthanol (2 : 1), les LPS à 0,5 mg/ml et les CMEC à 0,25 mM.

### **II.3.5.2. Isothermes de compression/décompression des monocouches de lipides**

Les monocouches lipidiques sont obtenues par dépôt à l'interface liquide/air, des solutions de LPS ou de CMEC, à l'aide d'une microseringue Hamilton® de haute précision. Les lipides sont déposés jusqu'à une pression de surface de 0,2 mN/m, synonyme de début d'interaction moléculaire à l'interface. Après le dépôt, une attente de 10 min avant l'isotherme de compression est nécessaire pour l'évaporation du solvant organique et pour la relaxation de la monocouche.

L'isotherme de compression/décompression de la monocouche de LPS est réalisée sur une cuve de Langmuir de 10 cm de largeur. La solution de LPS est déposée à l'interface liquide/air pour occuper une surface initiale de 600 cm<sup>2</sup>. La surface de monocouche diminue durant la compression et augmente durant la décompression avec une vitesse de 20 cm<sup>2</sup>/min.

Pour l'isotherme de compression/décompression de la monocouche de CMEC, elle est réalisée sur une cuve de Langmuir plus petite de 7 cm de largeur. Après le dépôt à l'interface liquide/air, les CMEC occupe une surface initiale de 80 cm<sup>2</sup>. Durant la compression et la décompression, la surface de monocouche entre les barrières de la cuve diminue ou augmente avec une vitesse de 5 cm<sup>2</sup>/min.

### **II.3.5.3. Cinétique d'adsorption des protéines à l'interface liquide/air**

Les expériences sont réalisées sur des cuves rondes de 8 ml en Téflon® fabriquées au laboratoire. Après calibration du papier filtre et son équilibration sur le tampon HPES (5mM), NaCl (150mM), pH 7 (même tampon employé dans la préparation des protéines), le tampon est remplacé par la solution protéique de N-Otf ou de DH-Otf à la concentration voulue. L'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique sont suivies par tensiométrie et par ellipsométrie, au cours du temps, jusqu'à des valeurs maximales stables qui correspondent à l'état d'équilibre.

### **II.3.5.4. Interaction des protéines avec les monocouches lipidiques**

Les essais d'interaction de N-Otf et de DH-Otf avec une monocouche de LPS ou de CMEC, sont réalisés sur des cuves rondes de 8 ml en Téflon® fabriquées au laboratoire. Les solutions organiques de LPS ou de CMEC sont déposées, à l'interface liquide/air, à l'aide d'une microseringue Hamilton® de haute précision, jusqu'à la pression de surface désirée. Un délai d'attente est respecté pour la relaxation des monocouches, il est de 30 min pour la monocouche de

LPS et de 10 min pour de CMEC. Après relaxation, 50  $\mu$ l d'une solution concentrée en N-Otf ou en DH-Otf est injectée en sous-phase, à l'aide d'une microseringue Hamilton<sup>®</sup> de haute précision, à travers un trou sur le côté de la cuve. Pour une concentration protéique donnée dans la cuve, la solution protéique injectée est 161 fois plus concentrée. L'interaction est suivie au cours du temps par tensiométrie et par ellipsométrie.

### **III. Caractérisation physico-chimique et interfaciale de l'ovotransferrine native et chauffée à sec**

---

### **III.1. Introduction**

Le comportement fonctionnel et interfacial des protéines dépend de leurs propriétés structurales et physico-chimiques. Toute modification de ces propriétés par un traitement physique, chimique ou enzymatique aura un impact plus ou moins important sur le comportement de la protéine.

Le traitement thermique à sec des protéines est un procédé physique qui a l'avantage d'être simple et applicable sur de grandes quantités. C'est un procédé qui est employé dans le secteur agro-alimentaire pour améliorer les propriétés techno-fonctionnelle des protéines de blanc d'œuf [161, 162]. Il constitue aussi une méthode d'inactivation des virus de concentrés protéiques des facteurs de coagulation à usage thérapeutique [163, 164]. Un autre avantage est que le traitement thermique à sec engendre de faibles modifications structurales contrairement au chauffage en solution qui entraîne la dénaturation de la protéine. De cette manière, nous pouvons comparer les propriétés et le comportement de la forme native de l'ovotransferrine et la forme légèrement modifiée par chauffage à sec. Le choix des conditions de chauffage à sec est basé sur les travaux de Kato et al. [165, 166]. Ainsi l'Otf a été ici modifiée thermiquement à l'état sec à 80°C pendant 7 jours.

Pour déterminer l'impact du chauffage à sec sur les propriétés physico-chimiques de l'Otf, une analyse comparative est réalisée entre N-Otf et DH-Otf. Ainsi, les deux formes d'Otf sont analysées par DLS et par HPLC d'exclusion pour arriver aux dimensions et au poids moléculaire des particules en solution. Elles sont aussi analysées par fluorimétrie et par dichroïsme circulaire pour évaluer toute variation structurale.

Pour évaluer le caractère amphiphile de l'Otf, nous avons également étudié son adsorption à l'interface air/liquide qui constitue un modèle d'interface hydrophobe/hydrophile. La cinétique d'adsorption des protéines à l'interface air/liquide, ainsi que les propriétés du film protéique formé, dépendent en effet des propriétés physico-chimiques de la protéine. Ces éléments peuvent aussi être indicatifs du comportement de la protéine vis-à-vis des membranes bactériennes.

## III.2. Résultats

### III.2.1. Caractérisation physico-chimique de l'ovotransferrine native et chauffée à sec

#### III.2.1.1. Dimension et hétérogénéité des populations d'ovotransferrine native et chauffée à sec

Dans l'objectif de déterminer la taille des protéines, des solutions d'Otf native (N-Otf) et d'Otf chauffée (DH-Otf) ont été analysées par DLS "Dynamic Light Scattering". Les résultats présentés dans la Figure III-1 montrent la distribution des proportions volumiques en fonction du diamètre hydrodynamique des molécules de N-Otf et de DH-Otf.

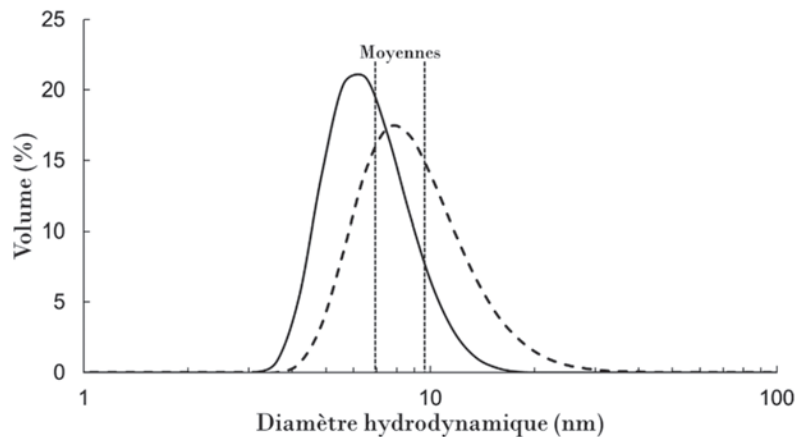


Figure III-1 : Distribution en fonction du diamètre hydrodynamique de N-Otf (—) et de DH-Otf (- -) obtenue par DLS. Les solutions protéiques de N-Otf (11,6  $\mu$ M) et de DH-Otf (11,4  $\mu$ M) sont préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7.

Le diamètre hydrodynamique est de 6,8 nm pour N-Otf alors qu'il est plus élevé avec 9,4 nm pour DH-Otf. Les dimensions de l'apo-Otf données par Kurokawa et al [167] et qui sont (5×6×10) nm<sup>3</sup> permettent de calculer un diamètre moyen de 6,8 nm, en assimilant la protéine à un ellipsoïde. Le diamètre hydrodynamique moyen que nous avons mesuré pour N-Otf est donc en accord avec celui calculé à partir des données de la littérature. Par ailleurs, la valeur minimale et la moyenne du diamètre hydrodynamique de DH-Otf sont légèrement supérieures à celles de N-Otf (Tableau III-1). Etant donné que DH-Otf provient de N-Otf, la légère augmentation du minimum

et de la moyenne du diamètre hydrométrique signifient que la structure de DH-Otf est moins compacte que N-Otf. La diminution de la compacité de la structure de DH-Otf est probablement due à la rupture d'un certain nombre de liaisons hydrogène dans N-Otf par le chauffage à sec aboutissant à une structure d'ovotransferrine moins rigide. L'hétérogénéité plus élevée du diamètre hydrométrique de DH-Otf est certainement liée en partie à la rupture plus ou moins importante des liaisons hydrogène d'une molécule à l'autre, mais on pourrait également soupçonner une agrégation partielle. En effet, la valeur maximale du diamètre hydrodynamique de DH-Otf est le double de celle de N-Otf (Tableau III-1). Ainsi, nous avons effectué l'analyse de N-Otf et DH-Otf par HPLC d'exclusion stérique.

Tableau III-1 : Récapitulatif des valeurs moyennes, minimales et maximales de N-Otf et de DH-Otf.

	Diamètre hydrodynamique		
	Valeur minimale ( $\mu\text{M}$ )	Valeur moyenne ( $\mu\text{M}$ )	Valeur maximale ( $\mu\text{M}$ )
N-Otf	3,6	6,8	18,2
DH-Otf	4,2	9,4	37,8

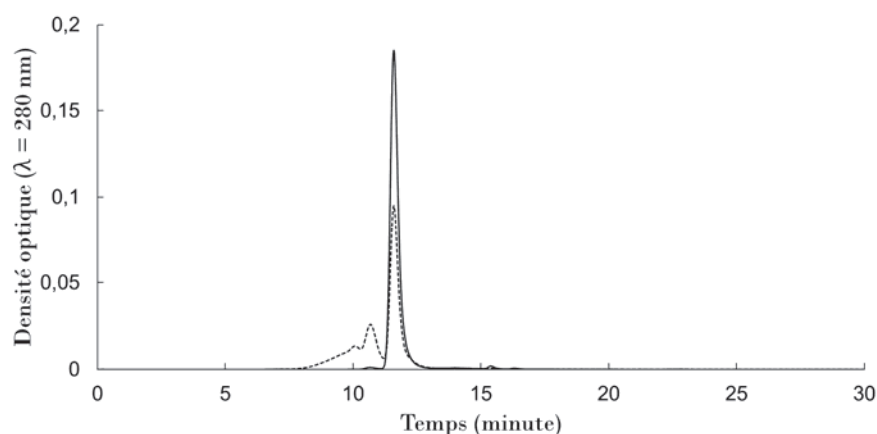


Figure III-2 : Chromatogramme de N-Otf (—) et de DH-Otf (.....) par HPLC d'exclusion stérique. Les solutions protéiques de N-Otf (11,6  $\mu\text{M}$ ) et de DH-Otf (11,4  $\mu\text{M}$ ) sont préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7. L'éluion est faite avec le même tampon sur une colonne BioSep<sup>TM</sup> 5  $\mu\text{m}$  SEC-s3000 400 Å (300  $\times$  7.8 mm).

L'analyse par HPLC d'exclusion permet la séparation des protéines selon leur masse moléculaire apparente [168-171]. Le chromatogramme de N-Otf montre un seul pic fin et

symétrique cohérent avec le caractère monomérique de l'Otf native. Le chromatogramme de DH-Otf montre en revanche trois pics principaux, correspondant donc à trois populations d'Otf de masses moléculaires différentes. Le pic majoritaire (56% de l'aire totale), correspondant au pic de N-Otf, correspond vraisemblablement à la DH-Otf à l'état monomérique. Les autres pics, de masses moléculaires supérieures correspondraient quant à elles à des états agrégés de DH-Otf, témoins donc de la formation de multimères. Ce comportement d'agrégation après chauffage a été étudié et observé pour un très grand nombre de protéines globulaires [172-177]. L'agrégation d'une partie des molécules d'Otf implique un accroissement des interactions attractives entre les molécules protéiques après chauffage à sec. Le fait que seule une partie des molécules d'Otf soient agrégées explique la plus grande hétérogénéité observée pour DH-Otf par rapport à N-Otf (Figure III-1). Par ailleurs, l'augmentation du rayon hydrodynamique moyen suggère un faible degré de polymérisation, sous forme essentiellement de dimères ou trimères.

### **III.2.1.2. Structure moléculaire de l'ovotransferrine native et chauffée à sec**

#### **La fluorescence intrinsèque**

La mesure de la fluorescence intrinsèque du tryptophane est utilisée pour détecter des changements locaux de la structure secondaire et/ou tertiaire des protéines. En effet, un changement du microenvironnement du tryptophane a une incidence sur le spectre de fluorescence de cet acide aminé. La fluorescence intrinsèque de N-Otf et de DH-Otf a été mesurée après excitation à  $\lambda_{\text{excitation}} = 295 \text{ nm}$  à l'aide d'un spectrofluorimètre (Fulorolog – Jobin Yvon®). Les spectres d'émission étaient enregistrés de 310 à 450 nm comme le montre la Figure III-3. La mesure spectrale est répétée deux fois pour chaque protéine.



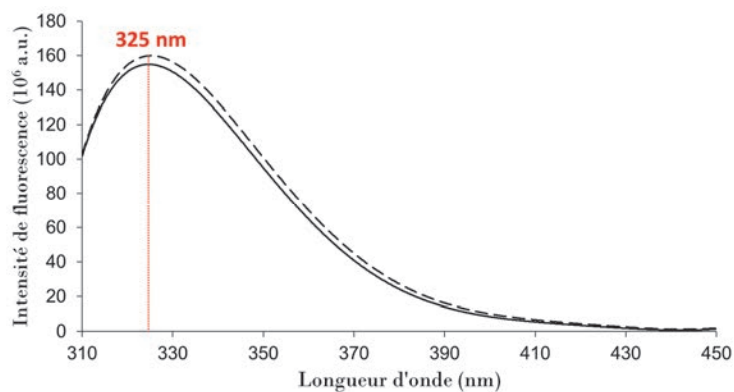


Figure III-3 : Spectre de la fluorescence intrinsèque de N-Otf (—) et de DH-Otf (---) après excitation à 295 nm. Le spectre d'émission est de 310 à 450 nm. Les solutions protéiques de N-Otf (1,00  $\mu$ M) et de DH-Otf (0,91  $\mu$ M) sont préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7. Les courbes sont normalisées selon la concentration protéique.

Les spectres d'émission de N-Otf et de DH-Otf sont pratiquement superposables, avec une fluorescence maximale identique, mesurée à une longueur d'onde de 325 nm (Figure III-3). La fluorescence intrinsèque est donc identique entre N-Otf et DH-Otf. La fluorescence intrinsèque est sensible à la polarité du microenvironnement des résidus tryptophane, la superposition des spectres de fluorescence, signifie qu'aucune modification significative n'est survenue sur les microenvironnements des résidus tryptophane après chauffage à sec de l'Otf. Néanmoins, il peut y avoir un phénomène de compensation, qui masque des variations éventuelles dans la structure de l'Otf globalement et dans le microenvironnement des résidus tryptophane en particulier. En effet, les liaisons hydrogène établies par les résidus avoisinants, la densité électronique, l'accessibilité des molécules d'eau sont des paramètres qui modifient la polarité du microenvironnement du tryptophane, qui peut modifier l'intensité de la fluorescence et un décalage de la fluorescence maximale [178-182].

### La fluorescence extrinsèque

La mesure de la fluorescence extrinsèque est un outil qui permet d'évaluer l'hydrophobie de la surface des protéines par l'emploi d'une sonde externe [183, 184]. L'ANS (Sigma-Aldrich®) (1-anilidonaphthalene-8-sulphonate) est une sonde apolaire fluorescente utilisée pour ce type de mesure [185-187]. L'ANS a une grande affinité pour les zones apolaires en surface des protéines.

Et alors que sa fluorescence est faible lorsqu'elle est en solution dans l'eau (polaire), son intensité de fluorescence augmente fortement lorsqu'elle est dans un environnement apolaire ; sa longueur d'onde maximale d'émission se déplace également vers des longueurs d'onde plus faibles. A l'aide d'un spectrofluorimètre (Fulorolog – Jobin Yvon®), les spectres d'émission de fluorescence des solutions ANS/N-Otf et ANS/DH-Otf, de 420 à 600 nm, sont présentés dans la Figure III-4, pour une longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{\text{excitation}}$  de 370 nm. La mesure spectrale est répétée deux fois pour chaque protéine.

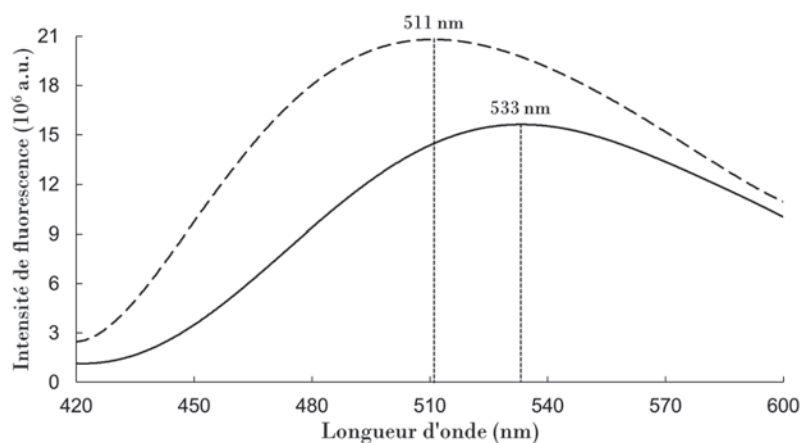


Figure III-4 : Spectre d'émission de la sonde ANS en présence de N-Otf (—) et de DH-Otf (---) après excitation à 370 nm. Le spectre d'émission est de 420 à 600 nm. Les solutions protéiques de N-Otf (1,00  $\mu\text{M}$ ) et de DH-Otf (0,91  $\mu\text{M}$ ) sont préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7.

La longueur d'onde de fluorescence maximale de N-Otf est à  $\lambda_{\text{max}} = 533$  nm alors que celle de DH-Otf est à  $\lambda_{\text{max}} = 511$  nm. La bande spectrale de DH-Otf a une intensité de fluorescence supérieure à celle du N-Otf. L'augmentation d'intensité de fluorescence et le décalage vers le bleu de  $\lambda_{\text{max}}$  (de 22 nm) suggère une hydrophobie de surface de DH-Otf plus élevée que N-Otf. En effet, l'intensité de fluorescence de l'ANS est sensible à la polarité de son environnement et augmente avec l'augmentation de l'hydrophobicité [188]. Mais étant donné que l'ANS est anionique, cette sonde est aussi susceptible de s'apparier avec les résidus chargés positivement exposés en surface [189]. Par ailleurs, la molécule d'ANS étant de petite taille, une intensité de fluorescence accrue

et/ou un décalage de la longueur d'onde maximale d'émission vers les valeurs basses peut indiquer une meilleure accessibilité de la sonde à des résidus enfouis au cœur de la protéine, en raison d'une flexibilité plus importante [190, 191]. Si les spectres de fluorescence observés pour DH-Otf suggèrent par conséquent une hydrophobie de surface accrue par rapport à N-Otf, on ne peut pas exclure totalement que DH-Otf présente également une charge positive de surface plus élevée, et/ou une structure plus flexible que N-Otf.

### Structure secondaire

L'analyse de N-Otf et de DH-Otf, par spectroscopie de dichroïsme circulaire, à l'UV lointain, devrait permettre la mise en évidence d'un éventuel changement de la structure secondaire, par effet du chauffage à sec. Les spectres CD des deux formes d'Otf sont présentés dans la Figure III-5.

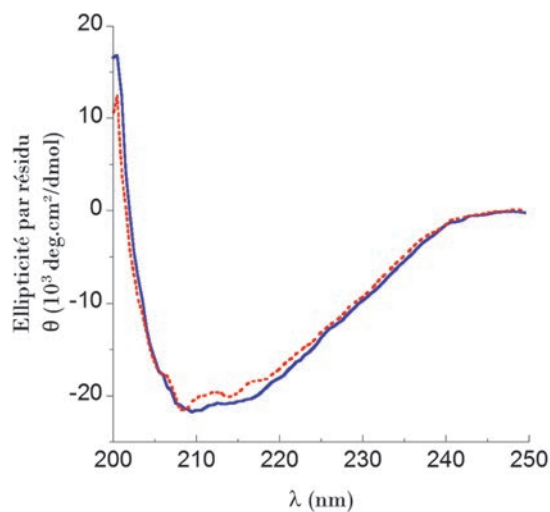


Figure III-5 : Analyse par dichroïsme circulaire en l'UV lointain de la structure secondaire de N-Otf (—) et de DH-Otf (.....). Les solutions protéiques de N-Otf (6,08 μM) et de DH-Otf (6,25 μM) sont préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7.

Les spectres CD de N-Otf et de DH-Otf sont pratiquement comparables, synonyme de l'absence de différence dans le contenu en structure secondaires entre les deux formes d'Otf. Le chauffage à sec est donc un procédé sans impact la structure secondaire de l'Otf.

### **III.2.2. Caractérisation à l'interface air/liquide de l'ovotransferrine Native et chauffée à sec**

Dans l'objectif de déterminer l'affinité de N-Otf et de DH-Otf pour les interfaces hydrophile/hydrophobe, le comportement de ces deux protéines a été caractérisé à l'interface air/liquide.

#### **III.2.2.1. Cinétique d'adsorption et vitesse de diffusion de l'ovotransferrine native et chauffée à sec**

En jouant sur la concentration protéique de la sous-phase, nous avons pu déterminer la vitesse de diffusion des deux molécules (mesures à faible concentration), mais également la concentration de saturation interfaciale (mesures à forte concentration). En raison du comportement différent à l'interface des deux protéines, les concentrations protéiques utilisées pour déterminer ces paramètres n'étaient pas identiques : 0,13 $\mu$ M et 1 $\mu$ M pour N-Otf ; 0,04  $\mu$ M et 0,4  $\mu$ M pour DH-Otf.

##### Effet de la concentration en sous-phase et du chauffage à sec

Les cinétiques d'adsorption de N-Otf et de DH-Otf à l'interface liquide/air, présentées dans la Figure III-6, ont été réalisées pour une faible et une forte concentration pour chaque protéine (0,13  $\mu$ M et 1  $\mu$ M pour N-Otf et 0,04 $\mu$ M et 0,4 $\mu$ M pour DH-Otf). La cinétique d'adsorption des protéines est suivie simultanément au cours du temps par tensiométrie pour mesurer la pression de surface ( $\pi$  ; mN/m) et par ellipsométrie pour mesurer l'angle ellipsométrique ( $\Delta$  ; °).

L'augmentation de la concentration (10 fois) de N-Otf et de DH-Otf en sous-phase conduit à une cinétique d'adsorption plus rapide avec des valeurs de  $\pi$  et de  $\Delta$  plus importantes à l'équilibre. Pour toutes les solutions, le début de la cinétique est caractérisé par une augmentation rapide de l'angle ellipsométrique qui correspond à l'arrivée et l'adsorption des protéines à l'interface libre. Pour les faibles concentrations, l'augmentation de la pression de surface a lieu en décalage par rapport à l'angle ellipsométrique environ 1h30 pour N-Otf et 1h pour DH-Otf. On note même une diminution de la pression de surface au début de la cinétique de -0,2 mN/m pour N-Otf (0,13  $\mu$ M ; Figure III-6A) et de -0,5 mN/m pour DH-Otf (0,04  $\mu$ M ; Figure III-6B). Les valeurs finales de ( $\pi$ ,  $\Delta$ ) sont de (10 mN/m, 7°) pour N-Otf à 0,13  $\mu$ M et de (12 mN/m, 8°) pour DH-Otf à 0,04  $\mu$ M.

Ainsi malgré une concentration trois fois plus faible, les valeurs finales de DH-Otf sont plus élevées mettant en évidence une plus forte activité interfaciale pour cette protéine. A plus forte concentration (de 10 fois), les deux paramètres évoluent instantanément et simultanément pour les deux protéines. Les valeurs finales de ( $\pi$ ,  $\Delta$ ) sont de (13,5 mN/m, 13°) pour N-Otf à 1  $\mu$ M et de (16,6 mN/m, 17,7°) pour DH-Otf à 0,4  $\mu$ M.

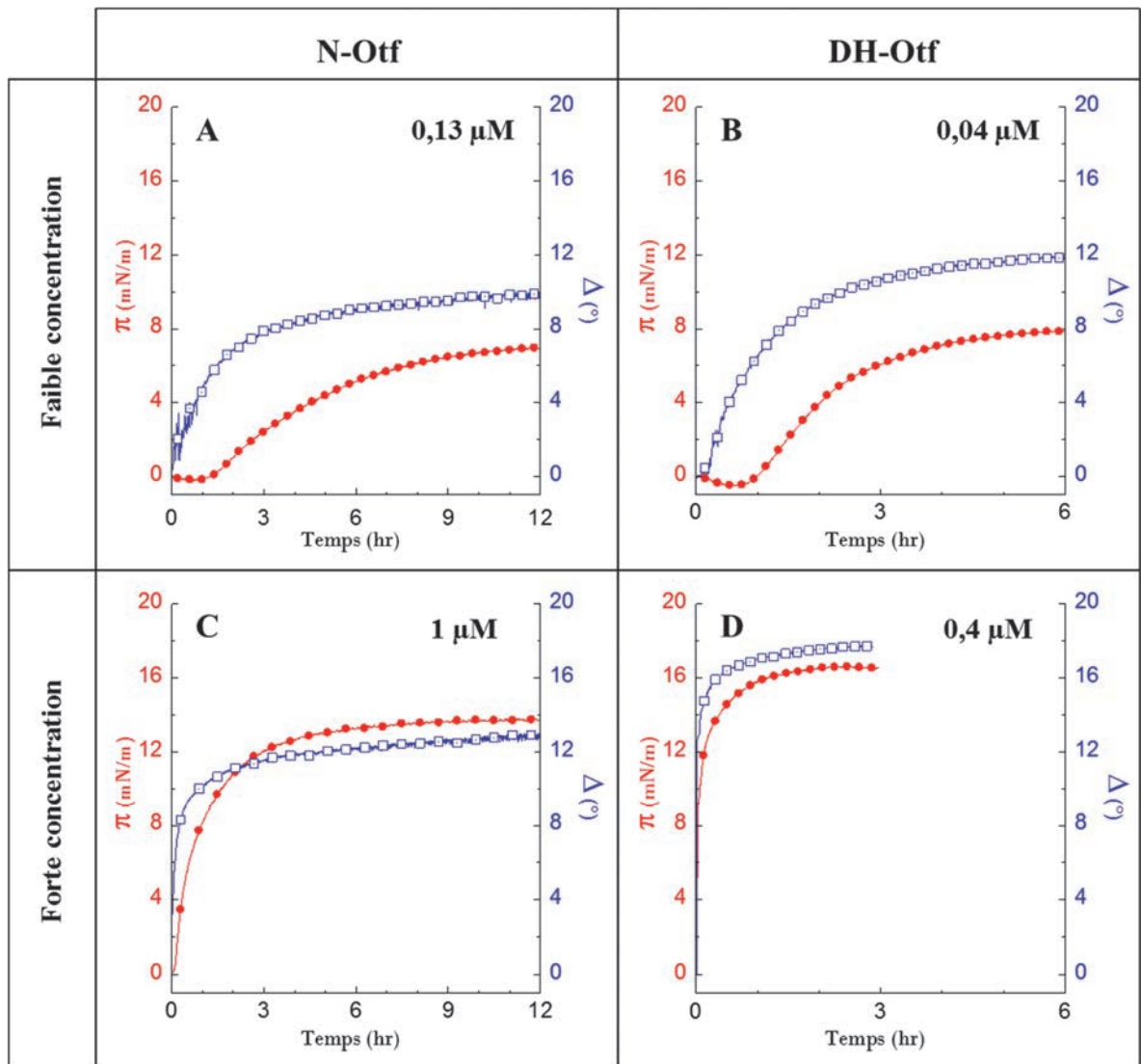


Figure III-6 : Evolution de la pression de surface (●) et de l'angle ellipsométrique (□) au cours de la cinétique d'adsorption à l'interface liquide/air de N-Otf (A : 0,13  $\mu$ M et C : 1  $\mu$ M) et de DH-Otf (B : 0,04  $\mu$ M et D : 0,4  $\mu$ M).

De ces résultats, il apparaît que les valeurs d'angle ellipsométrique ( $10^{\circ}$ - $12^{\circ}$ ) de N-Otf à l'interface air/liquide sont compatibles avec la formation d'une monocouche protéique saturée [192]. A une faible concentration, DH-Otf s'adsorbe à l'interface air/liquide en formant une monocouche saturée ( $13^{\circ}$ ) avec un angle légèrement supérieur à celui de N-Otf alors qu'à plus forte concentration la valeur de l'angle ellipsométrique ( $17,7^{\circ}$ ) suggère la formation d'une multicouche. Contrairement à ce qui a pu être observé pour des protéines telles que le lysozyme chauffé à pH 7, pour lequel l'angle ne cesse d'augmenter [193], ici la valeur de l'angle atteint une valeur stable ce qui signifie que la multicouche a une valeur limite et probablement équivalente à une double couche de protéine. Cette épaisseur plus importante peut être également reliée à la présence d'agrégats (dimères-trimères), de taille plus élevée que les formes monomériques, qui viendraient s'adsorber à l'interface.

#### Les premières étapes de l'adsorption

Pour des faibles concentrations de protéines en sous-phase, les premières étapes de l'adsorption sont intéressantes car l'interface air/liquide est libre et pas encore couverte par des protéines. Dans ces conditions, l'adsorption est régie principalement par la vitesse de diffusion de la protéine, définie par l'Équation III-1 [194] :

$$\Gamma = 2C \sqrt{\frac{D \cdot t}{\pi}} \quad \text{Équation III-1}$$

$\Gamma$  : concentration surfacique calculée par l'équation suivante [195] :  $\Gamma(\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}) = 0,2 \times \Delta (^{\circ})$   
 $D$  : coefficient de diffusion de la protéine en solution ( $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ )  
 $C$  : concentration protéique en solution ( $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ )

En pratique, l'évolution de  $\Gamma$  est représentée en fonction de  $\sqrt{t}$ . La pente relative aux premiers stades de l'adsorption, c'est-à-dire à  $\pi < 1 \text{ mN/m}$ , est égale au terme  $2C\sqrt{D/\pi}$  à partir duquel est calculé le coefficient de diffusion  $D$ . Les coefficients de diffusion calculés à partir des cinétiques d'adsorption (Figure III-6A et Figure III-6B) égaux à  $4,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour N-Otf et  $91 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour DH-Otf (Tableau III-2). Le chauffage à sec augmente donc considérablement le coefficient de diffusion de l'ovotransferrine dans ces conditions (pH = 7 et I = 155 mM).

Pour les premiers instants de l'absorption, présenter l'évolution de la pression de surface en fonction de la concentration surfacique (Figure III-7) permet d'avoir une autre vision des propriétés interfaciales des protéines. Deux paramètres relatifs aux interactions cohésives entre les molécules adsorbées peuvent en être extraits. La première étape de l'adsorption est caractérisée par une faible chute de la pression de surface associée à une augmentation de la concentration surfacique. Ce comportement est expliqué par le fait que les protéines sont chargées. Pour une protéine initialement présente à une interface fraîchement formée, son potentiel chimique est supérieur à celui de la même protéine en solution. Ces protéines subissent donc une force de répulsion électrostatique et désorbent de l'interface entraînant une chute de la pression de surface. Les protéines s'accumulent dans une région proche de l'interface et sont partiellement dénaturées par rupture de quelques liaisons hydrogènes de la structure protéique. Cela induit une exposition de quelques résidus apolaires, initialement enfouis, rendant la surface de la protéine plus hydrophobe. La dénaturation partielle de la protéine dans la région proche de l'interface entraîne une augmentation du potentiel chimique de la protéine et son migration à l'interface pour s'adsorber où elle se trouve dans un état thermodynamique plus stable [196]. Au premiers stade de l'adsorption à l'interface liquide/air, la pression de surface chute à  $-0,2$  mN/m et à  $-0,5$  mN/m pour N-Otf et DH-Otf respectivement. Une chute plus importante de la pression de surface avec DH-Otf signifie que l'ovotransferrine chauffée à sec désorbe plus de l'interface que N-Otf sous l'effet des forces de répulsions électrostatiques.

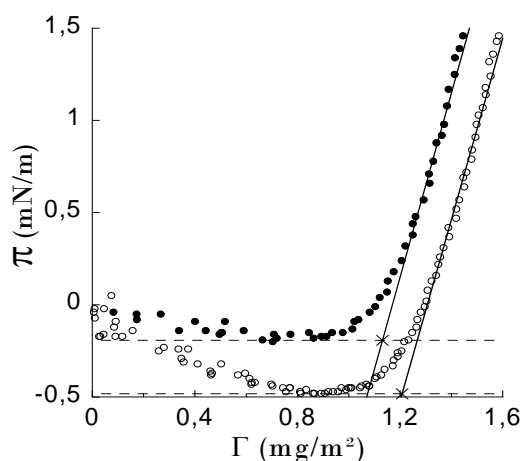


Figure III-7 : Evolution de la pression de surface (mN/m) en fonction de la concentration surfacique ( $\text{mg/m}^2$ ) pendant la cinétique d'adsorption à l'interface liquide/air de  $0,13 \mu\text{M}$  N-Otf (●) et de  $0,04 \mu\text{M}$  DH-Otf (○). Les solutions protéiques sont préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7.

Après l'étape de la chute, la pression de surface augmente linéairement avec la concentration surfacique. La concentration surfacique pour laquelle la pression commence à augmenter est appelé concentration surfacique critique et est noté  $\Gamma_0$  (Figure III-7). Ce paramètre définit la concentration minimale de protéines adsorbées à l'interface qui permet d'établir des interactions cohésives intermoléculaires induisant une augmentation de la pression de surface. Au-dessous de  $\Gamma_0$ , les protéines adsorbées sont dans un état dispersé et la distance qui les sépare est importante. La valeur de  $\Gamma_0$  reflète donc l'amplitude des forces de cohésion entre les protéines par des interactions avec des liaisons hydrogènes, électrostatique, hydrophobes et van der Waals [197]. Les valeurs de  $\Gamma_0$  sont de 1,13 et 1,21 mg/m<sup>2</sup> (Tableau III-2) pour N-Otf et DH-Otf respectivement. Pour un grand nombre de protéines globulaires,  $\Gamma_0$  est comprise entre 0,1 et 1,2 mg/m<sup>2</sup> [197]. D'après les valeurs élevées de  $\Gamma_0$  obtenues, les protéines de N-Otf et DH-Otf adsorbées à l'interface montrent l'existence de faibles forces de cohésion, les protéines ne se déplient pas ou peu. Cette information permet de dire qu'il y a peu de dénaturation des protéines à l'interface qu'elles restent dans leur ensemble globulaires.

Tableau III-2 : Valeurs expérimentales, pour N-Otf et DH-Otf, du coefficient de diffusion (D) en solution, de la concentration surfacique critique ( $\Gamma_0$ ) et de la pente  $\pi = f(\Gamma)$  ( $\Theta$ ).

	<b>N-Otf</b>	<b>DH-Otf</b>
D ( $\mu\text{m}^2/\text{s}$ )	4,2	91
$\Gamma_0$ (mg/m <sup>2</sup> )	1,13	1,21
$\Theta$ (mN.m/mg)	5,0	4,9

La pente  $\Theta$  (en mN.m/mg) est un deuxième paramètre extrait de la courbe, elle représente l'augmentation de la pression de surface (en mN/m) correspondante à l'absorption supplémentaire de 1 mg/m<sup>2</sup> de protéine.  $\Theta$  reflète la diminution de l'énergie libre de l'interface suite à l'adsorption de 1 mg de protéine dans ces conditions dynamiques [197]. La valeur de  $\Theta$  est de 5,0 et 4,9 mN.m/mg (Tableau III-2) pour N-Otf et DH-Otf respectivement. Ces valeurs comparables signifient que la magnitude des interactions cohésives entre les protéines adsorbées est identique entre la N-Otf et la DH-Otf, et qu'aucune différence n'est observée sur la flexibilité de la structure entre les deux protéines. Par comparaison, il existe un grand nombre de protéines globulaires pour lesquelles  $\Theta$  se situe entre 5 et 56 mN.m/mg [197], N-Otf et DH-Otf présentent donc un  $\Theta$  le plus



faible. De faibles valeurs de  $\Theta$  signifient que la structure globulaire des deux protéines est rigide et que cette structure est relativement conservée après adsorption à l'interface ce qui induit de faibles forces de cohésion interprotéiques.

### III.2.2.2. Propriétés interfaciales de l'ovotransferrine native et chauffée à sec

Des cinétiques d'adsorption à l'interface liquide/air ont été réalisées sur une gamme de concentrations de 0,013  $\mu\text{M}$  à 5,15  $\mu\text{M}$  pour N-Otf et de 0,005  $\mu\text{M}$  à 3,2  $\mu\text{M}$  pour DH-Otf. Les cinétiques ont été suivies par tensiométrie et ellipsométrie jusqu'à l'équilibre du système. Les valeurs obtenues à l'équilibre ( $\pi_{\text{équilibre}}$  et  $\Delta_{\text{équilibre}}$ ) pour l'ensemble des cinétiques permettent d'observer l'évolution de l'état d'équilibre du système en fonction de la concentration protéique en sous-phase (Figure III-8).

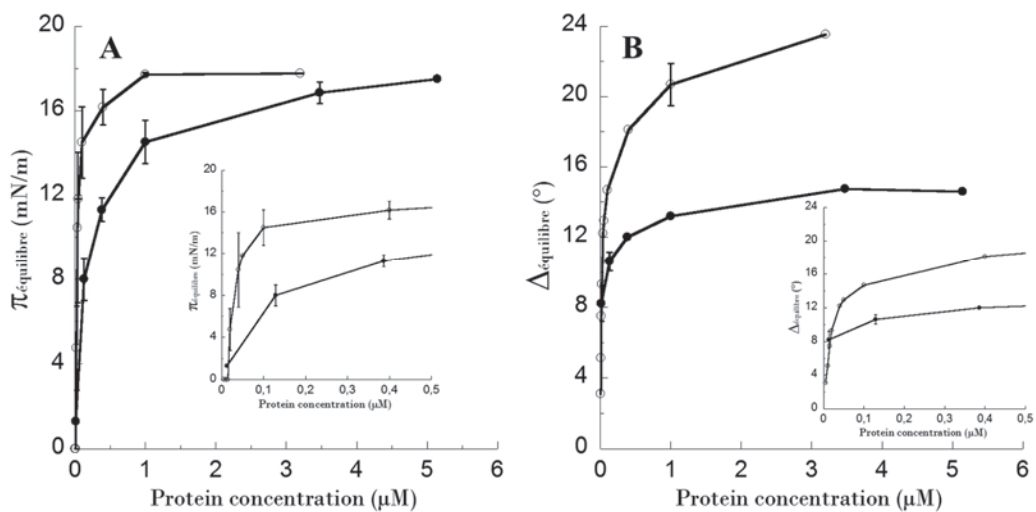


Figure III-8 : Pression de surface (A) et angle ellipsométrique (B) du film de N-Otf (●) et de DH-Otf (○) à l'interface air/liquide à l'équilibre en fonction de la concentration protéique en solution. Les solutions protéiques sont préparées avec un tampon HEPES (5 mM), NaCl (150 mM) de pH 7. Les encarts correspondent à des zooms aux faibles valeurs de concentration protéique.

N-Otf native montre une activité à l'interface air/liquide à partir de 0,013  $\mu\text{M}$ , qui est la concentration testée la plus faible, avec un  $\pi_{\text{équilibre}} = 1,3 \text{ mN/m}$  et  $\Delta_{\text{équilibre}} = 8,2^\circ$ . Par contre, à la plus faible concentration (0,005  $\mu\text{M}$ ), DH-Otf s'adsorbe à l'interface, avec  $\Delta_{\text{équilibre}}$  est à  $3,1^\circ$ , sans pour autant induire une augmentation de la pression de surface ( $\pi_{\text{équilibre}} = 0$ ). Ce résultat signifie que la quantité de DH-Otf s'adsorbe à l'interface ne suffit pas pour établir une cohésion entre les molécules adsorbées. C'est le cas aussi avec 0,01 et 0,015  $\mu\text{M}$  en DH-Otf où la valeur de  $\Delta_{\text{équilibre}}$  augmente avec la concentration mais reste sans effet sur la pression de surface à l'équilibre. C'est à partir de 0,02  $\mu\text{M}$  en DH-Otf que l'adsorption se manifeste par une augmentation de la pression de surface et donc une  $\pi_{\text{équilibre}}$  différente de zéro.

Pour une concentration protéique en sous-phase inférieure à 0,015  $\mu\text{M}$ , N-Otf présente donc une meilleure capacité d'adsorption que DH-Otf exprimée par des  $\pi_{\text{équilibre}}$  et  $\Delta_{\text{équilibre}}$  plus élevés. Mais, au-delà de 0,015  $\mu\text{M}$ , c'est DH-Otf qui possède une capacité d'adsorption plus élevée.

Comme attendu, avec l'augmentation de la concentration protéique en sous-phase, la quantité de molécules de N-Otf et de DH-Otf adsorbées à l'interface air/liquide, augmente comme le montre les valeurs de  $\pi_{\text{équilibre}}$  et  $\Delta_{\text{équilibre}}$ . Par contre, cette évolution est plus rapide pour DH-Otf que pour N-Otf. Entre les concentrations 0,015 et 0,1  $\mu\text{M}$  de DH-Otf,  $\pi_{\text{équilibre}}$  passe de 0 à 14,5 mN/m alors qu'il faut atteindre 1  $\mu\text{M}$  de la N-Otf pour obtenir la même  $\pi_{\text{équilibre}}$ . Le  $\Delta_{\text{équilibre}}$  augmente de  $7,2^\circ$  (de  $7,5^\circ$  à  $14,7^\circ$ ) entre 0,015 et 0,1  $\mu\text{M}$  de DH-Otf alors que l'augmentation est moins importante avec la N-Otf qui est d'environ  $1,8^\circ$  pour les mêmes concentrations protéiques.

A une certaine concentration protéique, relativement forte, l'adsorption de N-Otf et de DH-Otf à l'interface air/liquide atteint un plateau avec une  $\pi_{\text{équilibre}}$  d'environ 17 mN/m. L'augmentation davantage de la concentration de N-Otf ne fait pas évoluer  $\Delta_{\text{équilibre}}$  qui atteint une valeur maximale de  $14,5^\circ$ . Ce comportement est propre à la formation d'une monocouche protéique, et le résultat rejoint les valeurs trouvés dans la littérature [192]. L'augmentation de la concentration de DH-Otf montre une évolution différente de  $\Delta_{\text{équilibre}}$  par rapport au N-Otf. Le  $\Delta_{\text{équilibre}}$  augmente régulièrement avec la concentration même après la stabilisation de  $\pi_{\text{équilibre}}$ . Ce comportement est typique à une formation à une multicouche de protéines à l'interface liquide/air où les protéines s'adsorbent sous la première couche faisant augmenter davantage l'angle ellipsométrique sans augmenter la pression de surface.

Indépendamment du temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre et de la concentration protéique en sous-phase, la relation entre  $\pi_{\text{équilibre}}$  et  $\Delta_{\text{équilibre}}$  (Figure III-9) permet de déterminer l'évolution, à l'état d'équilibre, des forces de cohésion avec la densification et l'épaississement de la couche protéique à l'interface air/liquide.

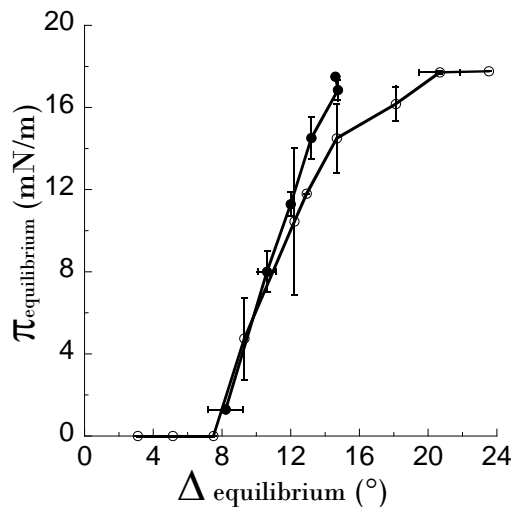


Figure III-9 : Evolution de la pression de surface en fonction de l'angle ellipsométrique à l'équilibre, à l'interface air/liquide, pour N-Otf (●) et pour DH-Otf (○), dérivés des Figure III-8A et Figure III-8B.

$\Delta_{\text{équilibre}}$  de N-Otf augmente en lien avec  $\pi_{\text{équilibre}}$  jusqu'à atteindre des valeurs maximales de  $14,6^\circ$  ( $\Gamma = 2,92 \text{ mg/m}^2$ ) et  $17,6 \text{ mN/m}$ . La couche interfaciale se densifie au fur et à mesure jusqu'à saturation complète de l'interface. La relation linéaire observée entre  $\pi_{\text{équilibre}}$  et  $\Delta_{\text{équilibre}}$  suit une pente de  $2,44 \text{ mN/m.deg}$ , ce qui équivaut à  $12,2 \text{ N.m/g}$ . Cela signifie qu'à l'état d'équilibre, une monocouche de N-Otf avec une concentration surfacique  $1 \text{ mg/m}^2$  plus importante se manifeste par une pression de surface  $12,2 \text{ mN/m}$  plus élevée.

Avec la DH-Otf, l'évolution de  $\pi_{\text{équilibre}}$  avec  $\Delta_{\text{équilibre}}$  se fait en quatre parties. Tout d'abord, des valeurs de  $\Delta_{\text{équilibre}}$  inférieures à  $7,5^\circ$  ( $1,5 \text{ mg/m}^2$ ) correspondent à des  $\pi_{\text{équilibre}}$  nulles. Ensuite, pour les  $\Delta_{\text{équilibre}}$  compris entre  $7,5^\circ$  et  $14,7^\circ$  ( $1,5 - 2,94 \text{ mg/m}^2$ ),  $\pi_{\text{équilibre}}$  augmente avec

l'augmentation de  $\Delta_{\text{équilibre}}$  avec 2,02 mN/m.deg, ce qui équivaut à 10,1 N.m/g. Comparée à la N-Otf, la relation entre  $\pi_{\text{équilibre}}$  et  $\Delta_{\text{équilibre}}$  à ce stade est proche mais légèrement inférieure avec la DH-Otf. Ensuite, à des  $\Delta_{\text{équilibre}}$  entre 14,7° et 20,7° (2,94 – 4,14 mg/m<sup>2</sup>), l'augmentation de  $\pi_{\text{équilibre}}$  avec  $\Delta_{\text{équilibre}}$  est moins importante et se stabilise à une valeur maximale de 17,7 mN/m qui est identique à celle obtenue avec la N-Otf. Au final, à  $\Delta_{\text{équilibre}} > 20,7^\circ$  ( $> 4,14$  mg/m<sup>2</sup>) l'augmentation de  $\Delta_{\text{équilibre}}$  n'a aucun effet sur  $\pi_{\text{équilibre}}$ .

Ce graphique permet décrire étape par étape l'absorption des protéines. Aux faibles concentrations ( $< 0,015$   $\mu\text{M}$ ), le comportement est dû aux protéines adsorbées à l'interface liquide/air qui sont assez espacées et qui n'ont aucune force de cohésion entre elles. La deuxième étape (concentrations entre 0,015  $\mu\text{M}$  et 0,1  $\mu\text{M}$ ) correspond à la densification de la monocouche par adsorption de quantité supplémentaire de protéines sur une même aire interfaciale. Cela crée des forces de cohésion entre les protéines adsorbées qui augmentent avec la densification de la monocouche. Dans la quatrième étape intervient l'épaississement de la couche interfaciale par la formation d'une multicouche. Le troisième stade est un stade intermédiaire entre le deuxième et le quatrième stade qui combine une densification de la première couche formée à l'interface et un épaississement par formation de multicouche.

### **III.3. Discussion**

#### **III.3.1. Le chauffage à sec induit de faibles modifications de propriétés physico-chimiques de l'ovotransferrine**

La comparaison des résultats de caractérisation physico-chimique de N-Otf et de DH-Otf indique que le traitement par chauffage à sec induit de faibles modifications de propriétés physico-chimiques de l'ovotransferrine sans modifier significativement sa structure. En effet, l'hydrophobie interne identique entre les deux formes d'Otf, montre que le microenvironnement des résidus tryptophane est relativement conservé après chauffage à sec de l'Otf. Comme le microenvironnement des résidus tryptophane dépend de la structure protéique globale, on conclut que la structure tertiaire protéique est conservée. L'analyse par CD en UV lointain conforte cette conclusion, par l'absence de différence de structure secondaire entre N-Otf et DH-Otf.

Le traitement des protéines par chauffage à sec est donc un procédé physique doux qui ne dénature pas l'ovotransferrine. Néanmoins, certaines propriétés physico-chimiques sont modifiées. L'analyse de la fluorescence extrinsèque avec la sonde ANS montre que la surface du DH-Otf est plus hydrophobe que N-Otf. Cette augmentation de l'hydrophobie de surface revient à l'exposition des résidus hydrophobes initialement enfouis dans la structure protéique vers la surface de l'ovotransferrine. Etant donné que la structure de l'ovotransferrine est globalement conservée après chauffage à sec, l'exposition de résidus hydrophobes peut être due à des modifications ponctuelles de conformation sans impact majeur sur la structure secondaire et tertiaire de l'ovotransferrine. Suite au chauffage à sec, le ou les radicaux hydrophobes peuvent être réorientés à la surface pour s'exposer aux molécules du solvant. Par le même mécanisme, des résidus basiques peuvent exposer leurs charges positive à la surface permettant à la sonde ANS chargé négativement de se fixer sur l'ovotransferrine par interactions électrostatiques.

L'augmentation de la fluorescence extrinsèque, de l'ovotransferrine après chauffage à sec, peut être due à une flexibilité plus élevée de la protéine. La flexibilité accrue de l'ovotransferrine permet l'exposition des résidus et offre la possibilité à la molécule d'ANS d'accéder à des zones plus profondes dans la structure pour se fixer sur des résidus hydrophobes et des résidus chargés positivement. La flexibilité de DH-Otf supérieure à N-Otf revient à la rupture de quelques liaisons hydrogènes et hydrophobes intramoléculaires. La suppression des forces attractives entre quelques

résidus au sein de la structure rend l'ovotransferrine légèrement moins compacte. Ce faible décompactage de la structure amène l'ovotransferrine à occuper un espace plus important qui est observé par DLS par l'augmentation du minimum, de la moyenne et du mode du diamètre hydrodynamique après le chauffage à sec.

Le chauffage à sec est un procédé physique doux qui conserve la structure de l'ovotransferrine tout en augmentant sa flexibilité, son hydrophobie et sa charge de surface. Cela est obtenu par l'intermédiaire de la rupture de quelques liaisons intramoléculaires, de l'exposition de quelques résidus hydrophobes et des résidus basiques. Le chauffage dans un milieu déshydraté assure une très faible réactivité de l'ovotransferrine contrairement au chauffage en solution et n'entraîne pas la dénaturation des protéines et la perte de leur structure.

### **III.3.2. Le chauffage à sec favorise la formation d'oligomères de l'ovotransferrine**

L'analyse comparative de la forme native et chauffée de l'ovotransferrine montre que le chauffage à sec entraîne la formation d'oligomères d'Otf. Alors que le N-Otf est sous forme monomérique, le chromatogramme de HPLC d'exclusion du DH-Otf montre la présence des entités de masse molaire supérieures relatives à une oligomérisation. Le chauffage à sec induit donc l'association des monomères d'Otf pour former des dimères et des trimères. La formation d'oligomères est partielle et représente près de la moitié de la quantité totale (~44%) et l'autre fraction restant sous forme monomérique. L'association des monomères en oligomères suite au chauffage génère des entités de taille et de diamètre hydrodynamique plus élevés, cela est observé par DLS par l'élargissement de la distribution à des valeurs supérieures (Figure III-1).

### **III.3.3. Effet du chauffage à sec sur la dynamique de l'ovotransferrine en solution et à l'interface**

On a montré que la diffusion de l'ovotransferrine en solution est fortement impactée par le chauffage à sec. En effet, le coefficient de diffusion passe de  $4,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour N-Otf à  $91 \mu\text{m}^2/\text{s}$  pour DH-Otf. Cela signifie, d'après la première loi de Fick (Équation III-2), que pour la même

concentration (C) et dans un laps de temps (t) identique, le flux massique (J) de DH-Otf est 22 fois plus élevé que pour N-Otf.

$$J = -D \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right)_t \quad \text{Équation III-2}$$

Les coefficients de diffusion ayant été calculés à partir des cinétiques réalisés dans les mêmes conditions, la différence entre les deux valeurs résulte des modifications de propriétés physico-chimiques de l'Otf après chauffage à sec. La surface plus hydrophobe de DH-Otf serait le principal facteur responsable d'un coefficient de diffusion plus élevé. En effet, le nombre de molécules d'eau liées à une protéine décroît avec l'augmentation de l'hydrophobie de surface de la protéine. Et à mesure que le nombre de molécules d'eau liée diminue, la mobilité du complexe protéine-eau liée augmente, ainsi que le coefficient de diffusion [198].

Le coefficient de diffusion en solution régit la vitesse d'adsorption de la protéine à l'interface air/liquide en fonction du temps [194, 199, 200]. Ainsi, pour une interface libre, un coefficient de diffusion élevée entraîne une adsorption plus rapide. En effet, l'adsorption à l'interface réduit la concentration protéique dans la région proche de l'interface. Un coefficient de diffusion élevée permet de renouveler plus rapidement les protéines dans cette région rendant ainsi les protéines disponible pour s'adsorber plus rapidement. Par exemple, pour les cinétiques d'Otf à la même concentration de 0,4  $\mu\text{M}$ , la forme native atteint 4° d'angle ellipsométrique en 6 minutes alors qu'il ne faut que 15 secondes pour la forme chauffée.

#### **III.3.4. Les faibles modifications de propriétés physico-chimiques de l'ovotransferrine par chauffage à sec induisent un changement de grande ampleur de son comportement interfacial**

La propriété de l'Otf à s'adsorber à l'interface liquide/air est amplement accrue, avec les faibles modifications, apportées à la protéine, suite au chauffage à sec. Le DH-Otf de structure probablement moins flexible (voir § III.3.1), se caractérise par un  $\Gamma_0$  1,21 mg/m<sup>2</sup> alors qu'elle est de 1,13 mg/m<sup>2</sup> pour N-Otf, ce qui équivaut à une concentration surfacique 7% plus élevée pour DH-Otf. Autrement dit, et dans la supposition que les deux protéines forment un réseau hexagonal

à l'interface, pour entamer des forces de cohésion, la distance moyenne entre les molécules d'ovotransferrine adsorbées passe de 8,1 nm pour le N-Otf à 7,85 nm pour le DH-Otf, c'est-à-dire que le chauffage à sec permet de réduire cette distance moyenne de 2,5 Å. Par ailleurs, la compressibilité de l'Otf qui est faible à l'origine, reste identique après chauffage à sec avec  $\Theta = 5,0 \text{ mN.m/mg}$ . L'évolution des forces latérale, durant la densification de la monocouche protéique, est désormais faible. Le comportement identique, à l'augmentation de la densité de la monocouche, pour les deux formes d'Otf, peut être un témoin de propriétés structurales proches, qui sont relativement conservées après chauffage à sec.

La capacité d'adsorption et l'affinité de l'Otf à l'interface air/liquide sont considérablement modifiées après chauffage à sec de la protéine. A des faibles concentrations inférieures à  $0,015 \mu\text{M}$ , le chauffage à sec abaisse la capacité d'adsorption de l'Otf à l'interface liquide/air. La répulsion électrostatique de l'interface air/liquide induite par l'augmentation de la charge globale de l'Otf, après le chauffage à sec, est responsable de ce comportement à faibles concentrations. Ceci favorise la demeure du DH-Otf à l'état dissous ce qui abaisse sa capacité d'adsorption à l'interface avec l'air. A des concentrations supérieures à  $0,015 \mu\text{M}$ , la capacité d'adsorption du DH-Otf est amplement accrue par rapport au N-Otf. L'augmentation de l'hydrophobie de surface de l'ovotransferrine après chauffage à sec augmente son adsorption à l'interface liquide/air pour les mêmes concentrations en sous-phase.

Cela est expliqué par le fait que l'affinité de l'Otf à l'interface liquide/air, qui est une interface hydrophile/hydrophobe, dépend essentiellement de l'hydrophobie de surface et de sa charge globale. A faibles concentrations, la charge globale plus élevée, affaiblit la capacité de la protéine à s'adsorber à l'interface qui est neutre. Pour cela, à faibles concentrations, DH-Otf s'adsorbe moins à l'interface liquide/air que N-Otf. A fortes concentrations, l'adsorption plus importante de DH-Otf est due à son hydrophobie de surface qui est plus élevée. En effet, étant donné que l'Otf est dissoute dans un milieu polaire, composé de molécules d'eau, l'augmentation de l'hydrophobie de surface fait augmenter le potentiel chimique de la protéine en solution et le diminue à l'interface avec l'air. Cela entraîne plus le déplacement de l'équilibre de l'Otf de l'état dissous à l'état adsorbé à l'interface avec l'air. Alors, sauf pour les faibles concentrations, le chauffage à sec améliore l'adsorption de l'Otf à l'interface. A titre d'exemple, il ne faut que  $0,1 \mu\text{M}$  seulement du DH-Otf pour parvenir à une adsorption équivalente au N-Otf atteinte à  $1 \mu\text{M}$ . Par



ailleurs, les deux formes de l'ovotransferrine atteignent une adsorption maximale identique d'environ 17 mN/m. La forme chauffée atteint cette adsorption maximale à une concentration plus faible à 1  $\mu\text{M}$  alors qu'elle est de 3,5  $\mu\text{M}$  pour la forme native. Bien qu'elle soit atteinte à des concentrations différentes, à cause de l'affinité différentes à l'interface, l'adsorption maximale des deux formes d'ovotransferrine est identique en raison de leurs compressibilités similaires. Cette pression de surface maximale est donc une limite qui s'oppose à l'insertion de nouvelles protéines dans la couche protéique déjà formée en contact avec l'air.

Dans la littérature, l'adsorption de l'Otf à l'interface liquide/air est sensible aux conditions physico-chimiques, qui peut former une monocouche ou une multicouche [201]. Dans les conditions expérimentales qu'on a choisies, La forme native de l'ovotransferrine forme, un film composé d'une couche unique de protéines à l'interface avec l'air. Au cours de la cinétique d'adsorption de l'ovotransferrine suivi par ellipsométrie, la concentration de surface augmente, jusqu'à parvenir à une valeur d'équilibre. Cette valeur d'équilibre est concentration-dépendante, plus la concentration en sous-phase est importante plus la concentration de surface à l'équilibre est élevée jusqu'à atteindre une valeur maximale. Les angles de décalage ellipsométrique correspondent à la formation d'une monocouche qui se densifie, faisant augmenter la pression de surface. Cette densification est interprété par Graham et Phillips comme étant la pénétration de protéines dans une interface occupée, c'est-à-dire de nouvelles protéines viennent s'insérer entre d'autres préalablement adsorbées [199, 202]. A la saturation de l'interface ( $14,7^\circ - 2,94 \text{ mg/m}^2$ ), l'augmentation de la concentration en sous-phase est sans effet à cause de l'encombrement stérique des protéines et à l'interface où la monocouche d'ovotransferrine est la plus dense possible. Dans cette situation de densité maximale, l'ovotransferrine occupe une aire à l'interface de  $44,9 \text{ nm}^2/\text{molécule}$  soit une distance de 7,1 nm entre les protéines adsorbées.

Dans cette étude, on a montré qu'aux mêmes conditions physico-chimiques, le comportement de l'Otf à l'interface est sensible aux faibles modifications de propriétés engendrées par le chauffage à sec. Le comportement interfacial des molécules de DH-Otf dépend de la concentration qui conditionne l'état du film protéique formé. Contrairement à l'Otf native qui forme toujours une monocouche, la forme chauffée forme une monocouche aux faibles concentrations ( $< 0,1 \mu\text{M}$ ) et évolue vers la formation d'une bicouche aux concentrations supérieures. Desfougeres et al. ont montré que le comportement du lysozyme à l'interface est aussi

modifié après chauffage à sec. Tandis que la forme native du lysozyme forme une monocouche, la forme chauffée s'agrège pour former des multicouches [193]. La première couche, avec les forces de cohésion inter-protéines, constitue une barrière pour l'accès de nouvelles protéines à l'interface. Cependant, tant que les forces de cohésion ne dépassent pas l'affinité pour l'interface, l'Otf peut surmonter ces forces pour arriver à s'adsorber. En parallèle, et d'après les cinétiques d'adsorption suivies par tensiométrie et par ellipométrie, DH-Otf a une affinité pour la première couche préformée, amenant à la formation d'une bicouche protéique. Néanmoins, l'affinité de DH-Otf pour la première couche préformée est moins importante que son affinité pour l'interface avec l'air. En effet, l'augmentation de la concentration protéique entraîne en priorité la densification de la première couche, tant que l'insertion de DH-Otf nécessite une énergie inférieure à 0,71 aJ. Au-delà de ce niveau d'énergie, les molécules de DH-Otf ne peuvent plus s'insérer et la première couche est dans son état le plus dense. Quand l'insertion nécessite plus de 0,64 aJ/protéine, l'affinité des protéines en solution pour la première couche préformée se traduit par l'adsorption contre celle-ci. A l'équilibre, où les forces de cohésion sont entre 0,64 et 0,71 aJ/molécule, DH-Otf en solution est en équilibre avec la forme adsorbée à l'interface d'une part et la forme adsorbée contre la couche préformée d'autre part. La Figure III-10 illustre le comportement de DH-Otf en fonction de la concentration, à l'interface liquide/air. Selon Desfougeres et al., l'agrégation du lysozyme chauffé à sec est attribuée à l'augmentation de l'hydrophobie de surface et de la flexibilité de la structure [193]. Dans le cas de DH-Otf, l'augmentation de ces deux paramètres n'entraîne pas une agrégation et l'adsorption est limitée à une double couche pour les solutions les plus concentrées.

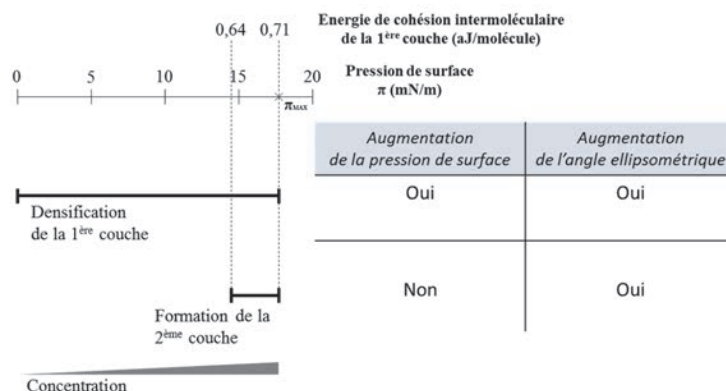


Figure III-10 : Schéma récapitulatif du comportement de DH-Otf à l'interface liquide/air avec l'augmentation de la concentration en sous-phase

### **III.3.5. Influence de l'effet barrière sur l'affinité de l'ovotransferrine native et chauffée à sec à l'interface liquide/air**

Les protéines désorbent de l'interface au début de la cinétique, phénomène observé sur des faibles concentrations pour N-Otf et pour DH-Otf. En raison de la charge des groupements acides et basiques, l'ovotransferrine subit des forces de répulsion de l'interface avec l'air qui est neutre. Bien qu'elle possède une affinité plus élevée à l'interface avec l'air, DH-Otf désorbe davantage que N-Otf au début de la cinétique, en raison de sa structure plus chargée. En effet, la chute de la pression de surface est plus importante pour DH-Otf. Cela ne revient pas à la faible concentration de DH-Otf par rapport à N-Otf (0,04 contre 0,13  $\mu\text{M}$ ) parce que déjà à cette concentration la cinétique de DH-Otf est plus rapide. L'interface liquide/air constitue donc une barrière électrostatique qui repousse plus DH-Otf que N-Otf.

L'activité interfaciale de N-Otf et de DH-Otf est régie entre autre par l'hydrophobie de surface et par la charge protéique. N-Otf arrive à surmonter la barrière électrostatique de l'interface à des concentrations plus basses que DH-Otf à cause de sa charge plus faible. C'est pourquoi N-Otf possède une activité interfaciale meilleure que DH-Otf aux faibles concentrations, inférieures à 0,015  $\mu\text{M}$ . L'attraction de DH-Otf pour l'interface, en raison de son hydrophobie de surface supérieure, dépasse les forces de répulsion électrostatique, ce qui engendre une activité interfaciale meilleure que N-Otf aux concentrations supérieures à 0,015  $\mu\text{M}$ .

### **III.3.6. Changement d'état des couches protéiques au cours de l'adsorption et à saturation**

La relation entre la pression de surface et la concentration surfacique renseigne sur l'état du film protéique formé à l'interface liquide/air. Ainsi, la pression de surface ( $\pi$ ) est déterminée par la concentration surfacique ( $\Gamma$ ) et par les forces de cohésion entre les protéines adsorbées. Le changement de conformation et le réarrangement des protéines adsorbées influence ces forces de cohésion intermoléculaires [192, 203]. Dans cette étude, la possibilité de changement de conformation de N-Otf et de DH-Otf après adsorption est éloignée vu que leurs  $\Theta$  respectives sont très faibles (Figure III-7 et Tableau III-2). Cela suggère que la structure des deux protéines est rigide et qu'aucune dénaturation ne parvient à l'interface, ce qui a pour conséquence d'augmenter

les forces de cohésion. Par ailleurs, les solutions de faible concentration sur lesquelles ont été déterminés  $\Gamma_0$  et  $\Theta$ , conduisent à des cinétiques d'adsorption très lentes.

La comparaison des valeurs de  $\Gamma_0$  et  $\Theta$  de N-Otf et de DH-Otf déterminées à faibles pressions de surface (Figure III-7) avec celles déterminées à forte pression de surface (Figure III-9) révèle un changement d'état du film lipidique. La valeur de  $\Theta$  augmente de 5 mN.m/mg aux faibles valeurs de  $\pi$ , à 12,2 et 10,1 mN.m/mg pour N-Otf et DH-Otf respectivement, aux fortes valeurs de  $\pi$ . Cette augmentation de  $\Theta$  est significative, mais elle reste faible devant la gamme de valeurs (5 à 56 mN.m/mg) obtenues par Razumovsky *et al.* pour un grand nombre de protéines [197]. Devant cette faible augmentation de  $\Theta$ , la dénaturation de N-Otf et de DH-Otf à forte pression de surface serait donc négligeable, voire nulle. C'est donc surtout la réorientation des protéines sous les forces latérales qui devrait être envisagée. Une telle réorientation irait dans le sens de réduire l'aire moléculaire à l'interface, entraînant une augmentation de la surface protéique latérale qui pourrait elle-même être responsable de l'augmentation de  $\Theta$ , par l'établissement d'un plus grand nombre de liaisons intermoléculaires.

### III.4. Conclusion

Dans ce travail, on a étudié les modifications des propriétés physico-chimiques de l'Otf engendrées par traitement thermique à l'état solide, ainsi que l'impact de ces modifications sur le comportement de l'Otf à l'interface liquide/air. Les modifications apportées sur les propriétés de l'Otf avec la conservation de sa structure secondaire et tertiaire permettent de dire que le chauffage à sec est un procédé adéquat pour modifier légèrement la protéine sans la dénaturer. La réduction de quelques liaisons intramoléculaires a permis d'aboutir à une forme d'ovotransferrine légèrement moins compacte avec une élasticité plus élevée. La forme modifiée de l'ovotransferrine possède une charge plus élevée ainsi qu'une hydrophobie de surface plus importante. On note qu'après chauffage à sec, 44% des molécules d'ovotransferrine modifiée est polymérisée en dimère et en trimère.

Bien que les structures secondaire et tertiaire ne soient pas modifiées par le chauffage à sec, le comportement de l'Otf à l'interface liquide/air montre une grande sensibilité aux modifications des propriétés physico-chimiques induites par ce traitement thermique. En effet, la cinétique d'adsorption à l'interface avec l'air est accélérée, en raison d'un coefficient de diffusion plus élevé en solution. En outre, l'affinité de l'Otf pour l'interface est fortement modifiée après le chauffage à sec. A faibles concentrations, une barrière énergétique s'oppose à l'adsorption de DH-Otf d'une manière plus importante que N-Otf, en raison de la charge nette probablement supérieure pour DH-Otf. A des concentrations plus importantes, l'hydrophobie de surface plus élevée de l'Otf chauffée assure une affinité pour l'interface largement supérieure à celle de la forme native.

On a observé que le chauffage à sec de l'Otf entraîne des modifications sur les caractéristiques du film protéique formé à l'interface liquide/air. La forme native forme un film composé d'une seule couche de protéines et dont la densité augmente avec la concentration protéique en solution jusqu'à une valeur maximale. A l'opposé, les caractéristiques du film protéique formé à l'interface par l'Otf chauffée évoluent d'une monocouche à faible concentration, vers une bicouche sans agrégation à forte concentration. Par ailleurs, les forces de cohésion de l'Otf native au sein du film protéique sont de faible ampleur. Egalement, le chauffage à sec de l'Otf n'apporte pas d'augmentation notable de ces forces de cohésion. Enfin, on a montré que l'organisation du film protéique, pour les deux formes de l'Otf, change au cours de l'adsorption à

l'interface liquide/air, *via* une réorientation des protéines sous l'effet de l'augmentation des forces latérales.

Bien que l'Otf soit la plus thermosensible parmi les protéines du blanc d'œuf [204-206], un résultat remarquable ressort de cette étude et montre que la structure de l'Otf est assez stable. Sa structure est restée relativement stable devant trois conditions physiques différentes. Le traitement thermique à l'état solide n'a pas apporté de modifications notables sur sa structure tridimensionnelle. De même, le changement de polarité du milieu auquel l'Otf est exposée lors de son passage de l'état dissout dans l'eau (polaire) à l'état adsorbé à une interface avec l'air (apolaire) n'a pas entraîné la dénaturation de la protéine. Enfin, aucune modification remarquable de la structure de l'Otf n'a été enregistrée, lors de l'adsorption à l'interface à partir d'une solution protéique concentrée, qui entraîne une compression du film protéique interfaciale par l'augmentation des forces latérales. Cette relative stabilité de la conformation de l'Otf est à mettre en relation avec la présence des quinze ponts disulfures intramoléculaires qui stabilisent sa structure tridimensionnelle.

Bien que la tensiométrie et l'ellipsométrie soient des techniques de mesure des propriétés du film interfacial, leur combinaison a permis d'accéder à des mesures à l'échelle moléculaire. En effet, entre la forme native et chauffée de l'Otf, la variation dans la distance moyenne pour laquelle les protéines adsorbées rentrent en contact est estimée à l'échelle de l'angström. On a réussi à donner une marge de l'orientation de l'ovotransferrine à l'interface et limiter les possibilités qui peuvent y avoir. Il serait judicieux de réaliser des acquisitions de spectres infrarouges sur le film protéique par PM-IRRAS pour arriver à un résultat plus précis quant à l'orientation de l'ovotransferrine à l'interface. En effet, l'appui sur le rapport des intensités des régions Amide I/Amide II permet de parvenir à l'orientation de l'hélice  $\alpha$  d'un peptide de simple structure [207]. En revanche, dès que la structure protéique est plus grande et plus complexe, il ne sera possible de déterminer l'orientation de la protéine à l'interface uniquement de l'orientation moyenne des hélices  $\alpha$  calculée à partir du rapport des intensités Amide I/Amide II. La Figure III-11 illustre cette difficulté de déterminer la disposition de la protéine à l'interface à cause d'innombrables possibilités donnant la même orientation moyenne des hélices  $\alpha$ . Néanmoins, l'exploitation des résultats de tensiométrie, d'ellipsométrie et d'orientation moyenne des hélices  $\alpha$

calculée à partir du spectre PM-IRRAS pourrait permettre d'atteindre l'orientation de l'ovotransferrine d'une manière plus précise.

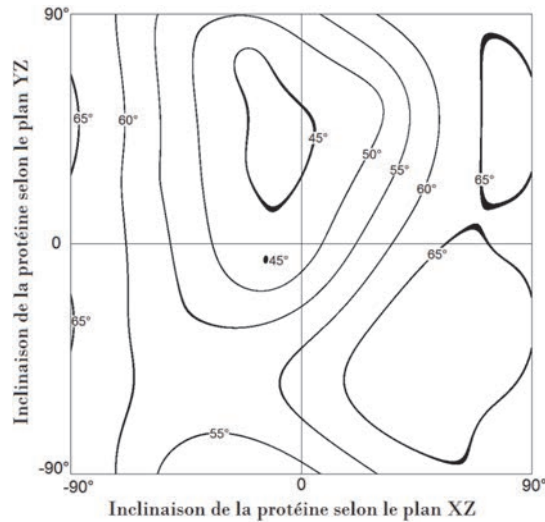


Figure III-11 : Représentation de l'inclinaison moyenne par rapport à la normale de l'interface des hélices  $\alpha$  d'une structure protéique imaginaire en fonction de sa disposition à l'interface. La structure protéique est composée de dix hélices  $\alpha$  de longueurs choisies aléatoirement entre 5 et 25 résidus et d'une orientation fixée aléatoirement.

Cette étude de l'activité de l'ovotransferrine à l'interface liquide/air devrait permettre de comprendre l'activité de l'ovotransferrine dans des milieux plus complexes. La clarification du comportement à cette interface simple hydrophile/hydrophobe servira d'appui pour élucider l'activité de l'ovotransferrine sur les membranes bactériennes de nature lipidique. Il serait intéressant de caractériser également le comportement interfacial de la forme holo de l'Otf, parce que les milieux biologiques ainsi que les produits agro-alimentaires ne sont pas exempts d'ions métalliques divalents.

**IV. Interaction de l'ovotransferrine native et chauffée  
avec une monocouche de LPS, modèle de la  
membrane externe d'*Escherichia coli***

---



## IV.1. Introduction

La membrane externe des bactéries est la première barrière que rencontrent les agents antibactériens pour exercer leur action. La couche glycolipidique de LPS constitue donc, pour les bactéries à coloration de Gram négative, la première cible des peptides et des protéines antibactériens. Il est montré dans la littérature que l'Otf possède une activité antibactérienne sur un large spectre de bactéries [2-4]. Il est montré que comme l'Otf a la propriété de chélater le fer, cela lui permet de aussi d'interagir avec les cations divalents des membranes bactériennes ce qui les fragilise [5, 6]. La protéine d'Otf interagit aussi avec les membranes bactériennes. On s'intéresse dans cette étude à identifier les mécanismes d'interaction qui régissent l'activité membranaire de l'ovotransferrine sur la membrane externe d'*E. coli* K12. Une monocouche de LPS est le modèle membranaire choisi pour étudier les propriétés membranotropes de l'ovotransferrine. Ainsi, les conditions expérimentales peuvent être modifiées aisément par le changement des propriétés de la monocouche et/ou de la solution protéique.

L'impact de l'activité membranaire de l'ovotransferrine sur la monocouche de LPS a été évalué par des mesures de tensiométrie et d'ellipsométrie associées à l'analyse par microscopie à force atomique, de la topographie du film lipidique. L'activité membranaire de l'ovotransferrine native sera comparée à celle de l'ovotransferrine légèrement modifiée. Les modifications sont apportées par un chauffage à sec de la protéine native consistant en un traitement thermique de la protéine à l'état déshydraté à 80°C pendant 7 jours. Le comportement de l'ovotransferrine native et chauffée vis-à-vis de la monocouche de LPS est confronté à leurs propriétés physico-chimiques et interfaciales afin de déterminer les paramètres conditionnant l'activité membranaire.

La monocouche de LPS sera caractérisée avant et après interaction avec N-Otf et DH-Otf. L'isotherme de compression d'une monocouche de LPS purs permettra de comprendre le comportement moléculaire des LPS par rapport à la variation de la compacité. Les capacités d'insertion de N-Otf et de DH-Otf seront étudiées sur une monocouche de LPS à 18 mN/m afin de déterminer l'effet de la concentration protéique sur l'insertion. L'affinité des deux formes d'ovotransferrine à la monocouche de LPS sera étudiée par l'évolution de l'insertion protéique sous différentes compacité de la monocouche.

## IV.2. Résultats

### IV.2.1. Caractérisation de la monocouche de lipopolysaccharides à la compression

Pour étudier le comportement de la monocouche de LPS sous l'effet des forces latérales, la monocouche de LPS a été caractérisée par isothermes de compression à l'aide d'une cuve de Langmuir. Le film lipidique a subi pour cela deux cycles successifs de compression/décompression à une vitesse de  $0,48 \text{ m}^2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$  jusqu'à une pression de surface de  $35 \text{ mN/m}$ . Le comportement de la monocouche a été suivi simultanément par tensiométrie et par ellipsométrie pour enregistrer l'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique respectivement.

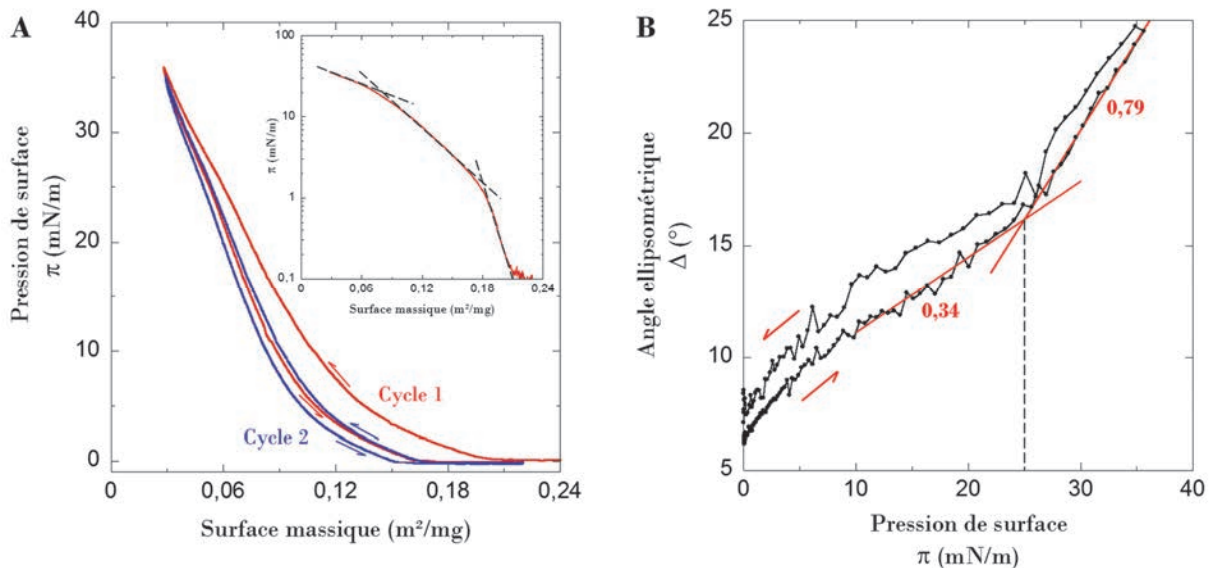


Figure IV-1 : Isothermes de compression/décompression d'une monocouche de LPS ( $0,25 \text{ mg}$ ) à une vitesse de  $0,48 \text{ m}^2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$  jusqu'à  $35 \text{ mN/m}$ . A : Evolution de la pression de surface ( $\pi$ ) au cours de deux cycles successifs. L'encart correspond à une présentation logarithmique de la pression de surface au cours de la compression du premier cycle. B : Evolution de l'angle ellipsométrique ( $\Delta$ ) en fonction de la pression de surface ( $\pi$ ) pour le premier cycle de compression/décompression. Les valeurs des pentes de proportionnalité entre  $\Delta$  et  $\pi$  sont indiquées en rouge pour chaque étape.

Les isothermes de compression/décompression de la monocouche de LPS montrent une hystérésis pour chaque cycle. En effet, l'évolution de la pression de surface en fonction de la compacité de la monocouche montre un décalage négatif à la décompression par rapport à la compression pour chaque cycle (Figure IV-1A). Autrement dit, pour la même surface massique, la

pression de surface est plus faible à la décompression qu'à la compression. De même, l'angle ellipsométrique montre une hystérésis en fonction de la pression de surface avec un décalage positif à la décompression versus la compression (Figure IV-1B). Le point marquant de cette expérience est que la deuxième compression se superpose avec la première décompression. En n'ayant uniquement les valeurs de la pression de surface, ce résultat pourrait être interprété comme une perte de matière à l'interface durant la compression. Or l'angle ellipsométrique augmente lors de la décompression. Cela suggère plutôt une augmentation de l'épaisseur de la couche lipide à l'interface favorisée par la compression. Les molécules de LPS passent d'un état de plus en plus ordonné durant la compression, alors que la relaxation de monocouche et le retour à l'état moins ordonné est plus lent que la vitesse de décompression.

Les courbes d'isotherme de compression/décompression de la monocouche de LPS montrent deux inflexions relatives aux transitions de phase (encart de la Figure IV-1A). La première transition se produit à 2 mN/m et correspond à la transition de la phase liquide expansée à la phase liquide condensée. En effet les chaînes aliphatiques des LPS sont toutes saturées. Cette première transition est mieux observée dans l'encart de la Figure IV-1A.

La deuxième transition s'établit à 25 mN/m (Figure IV-1A et B). La variation de l'angle ellipsométrique avec la pression de surface correspond à l'augmentation de l'indice de réfraction du film lipidique et de son épaisseur induite par la densification moléculaire. Si l'angle ellipsométrique évolue régulièrement,  $0,34 \text{ deg.m.mN}^{-1}$ , sur les valeurs de pression allant de 0 à 25 mN/m, un brusque changement de pente s'opère à partir de cette dernière valeur et la pente prend une valeur de  $0,79 \text{ deg.m.mN}^{-1}$  (Figure IV-1B). La transition observée sur l'isotherme de compression apparaît aussi sur les valeurs ellipsométriques et traduit un épaissement du film lipidique. Cela suggère un remaniement structural des molécules de LPS qui adopte une conformation étendue de la molécule. Cette nouvelle conformation permet de condenser davantage les molécules de LPS.

La Figure IV-1A montre que les molécules de LPS du film possèdent une grande compressibilité. En effet, la pression de surface commence à augmenter à partir de  $0,21 \text{ m}^2/\text{mg}$  pour arriver à 35 mN/m à  $0,03 \text{ m}^2/\text{mg}$ . Il faut par conséquent compacter la 7 fois pour atteindre la pression de surface de 35 mN/m, et ce sans pour autant atteindre le collapse. Les phospholipides

classiques sont de bons contre-exemples pour illustrer cette compressibilité élevée des LPS. En effet, pour des monocouches de phospholipides à chaînes saturées, comme DMPE, DPPC et DSPC, il suffit un facteur de compression entre 1,5 et 2 pour atteindre le collapse entre 45 et 60 mN/m [76, 208, 209]. Ces facteurs de compression sont nettement inférieurs à ceux appliqués ici à la monocouche de LPS. La monocouche de DDPC qui est un phospholipide à chaînes polyinsaturées possède un facteur de compression de 3 pour atteindre le collapse à 45 mN/m [208]. Ce facteur de compression est supérieur à ceux des phospholipides à chaînes saturées mais reste largement inférieure devant le facteur de compression des LPS. La monocouche de LPS montre donc une compressibilité nettement supérieure par rapport aux phospholipides classiques.

La compréhension du comportement de la monocouche de LPS sous la contrainte de la compression et de la décompression est un élément nécessaire à la compréhension du comportement des LPS dans un système plus complexe.

#### **IV.2.2. Interaction de l'ovotransferrine avec une monocouche de lipopolysaccharides**

Pour étudier l'activité membranaire des deux protéines, N-Otf et DH-Otf ont été mises en contact avec une monocouche de LPS à une pression de surface initiale de 18 mN/m. Une solution protéique concentrée a été injectée en sous-phase, en dessous de la monocouche de LPS pour atteindre la concentration voulue. En raison des différences de comportement vis-à-vis de la monocouche de LPS, la concentration en solution employée pour chacune des deux protéines était différente : 0,4  $\mu\text{M}$  pour N-Otf et 0,1  $\mu\text{M}$  pour DH-Otf. L'interaction de N-Otf et de DH-Otf a été suivie simultanément par tensiométrie et par ellipsométrie jusqu'à l'équilibre. Les évolutions de la pression de surface  $\pi$  et de l'angle ellipsométrique  $\Delta$  sont présentées dans les Figure IV-2A et Figure IV-2B.

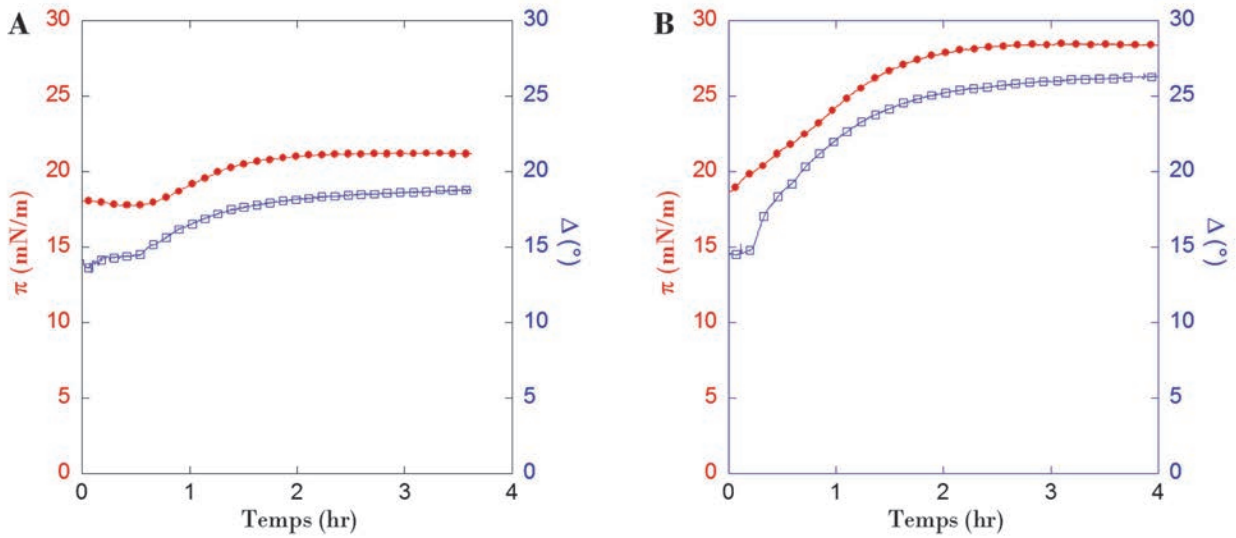


Figure IV-2 : Evolution de la pression de surface  $\pi$  (●) et de l'angle ellipsométrique  $\Delta$  (□) après injection de 0,4  $\mu$ M de N-Otf (A) et de 0,1  $\mu$ M de DH-Otf (B) en sous-phase d'une monocouche de LPS de pression de surface initiale égale à 18 mN/m.

Les deux cinétiques débutent dans les mêmes conditions expérimentales, à savoir une monocouche de LPS à une pression de surface initiale de 18 mN/m et un angle ellipsométrique initial de 14°.

Un temps de latence d'environ une demi-heure, pendant lequel la pression de surface et l'angle ellipsométrique ne varient pas ou très peu, caractérise le début des cinétiques obtenues avec N-Otf. En revanche, avec DH-Otf, on relève l'absence de temps de latence notable et la pression de surface augmente dès l'injection de la protéine.

L'équilibre est atteint après environ deux heures pour N-Otf, comme pour DH-Otf, mais les valeurs au plateau sont très différentes entre les deux solutions protéiques. L'injection de N-Otf et de DH-Otf dans ces conditions entraîne une augmentation de la pression de surface de 3,2 mN/m et de 9,7 mN/m respectivement et une augmentation de l'angle ellipsométrique de 4,5° et 11,7° respectivement.

L'augmentation de la pression de surface indique que N-Otf et DH-Otf s'insèrent dans la partie hydrophobe de la monocouche entre les molécules de LPS. Cette insertion crée une

densification et un épaissement de la monocouche qui se traduit par une augmentation de l'angle ellipsométrique. Malgré une concentration quatre fois plus faible, DH-Otf montre une cinétique plus rapide que N-Otf et avec une interaction plus élevée.

### IV.2.3. Capacité d'insertion de l'ovotransferrine dans une monocouche de lipopolysaccharides

Les expériences précédentes ont montré que les deux protéines ont la capacité à s'insérer dans les films de LPS. Pour aller plus loin dans l'analyse des interactions protéines/lipides, nous avons réalisé des cinétiques d'absorption en utilisant des concentrations sous-phasiques variables. Le film lipidique de départ a toujours la même pression de surface,  $18 \pm 1$  mN/m, afin de correspondre aux travaux déjà réalisés dans la littérature par Zhang et al [210, 211], Giacometti et al. 2006 [212] et Derde et al. 2014 [8]. La variation de la pression de surface est alors reportée en fonction de la gamme de concentration sous-phasique étudiée qui va de 0,01 à 1,5  $\mu$ M pour N-Otf et de 0,005 à 1  $\mu$ M pour DH-Otf. L'augmentation,  $\Delta\pi$ , est définie par la différence entre la pression de surface à l'état d'équilibre et la pression de surface initiale (Équation IV-1). La Figure IV-3A représente l'évolution de  $\Delta\pi$  en fonction de la concentration sous-phasique pour N-Otf et pour DH-Otf.

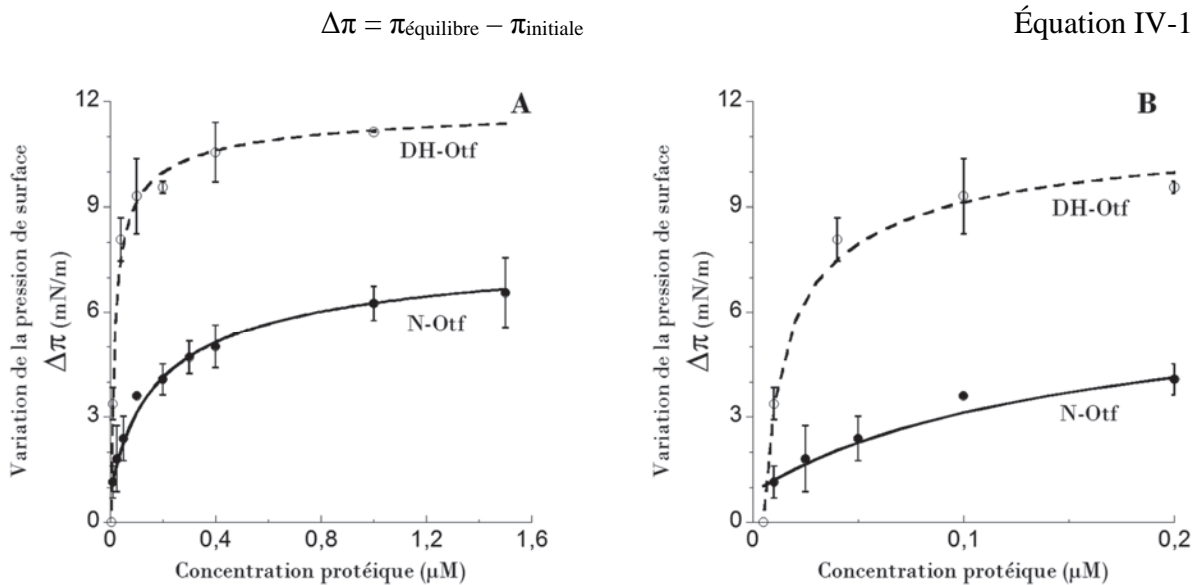


Figure IV-3 : Variation de la pression de surface ( $\Delta\pi$ ) de la monocouche de LPS ( $\pi_{\text{initiale}} = 18$  mN/m) après interaction avec N-Otf (●) et DH-Otf (○) à différentes concentrations protéiques en sous-phase. La partie des faibles concentrations de (A) est agrandie en (B).

Comme observé précédemment, les valeurs positives de  $\Delta\pi$  indiquent que N-Otf et DH-Otf s'insèrent dans la partie hydrophobe de la monocouche entre les molécules de LPS. En effet, l'insertion protéique entraîne une augmentation de la quantité de matière pour une même aire et provoque donc une compression de la monocouche, ce qui se traduit par une augmentation de la pression de surface.

L'insertion de N-Otf et de DH-Otf débute à partir de 0,01  $\mu\text{M}$  ce qui représente une faible concentration sous-phasique de protéines et donc une certaine capacité d'insertion dans la monocouche de LPS (Figure IV-3B). En effet, cette concentration est proche de celle observée avec le lysozyme, autre protéine du blanc d'œuf, aux mêmes conditions pour lesquelles l'insertion dans la monocouche de LPS est enregistrée à une concentration de 0,02  $\mu\text{M}$ . Cette concentration est obtenue pour les formes native et chauffée à sec du lysozyme [8].

L'augmentation de la concentration protéique en sous-phase entraîne une augmentation de l'insertion de N-Otf et de DH-Otf dans la monocouche de LPS qui est exprimée dans la Figure IV-3 par l'augmentation de  $\Delta\pi$ . La présence de molécules en nombre plus élevé en sous-phase induit une augmentation de protéines insérées et donc une augmentation de pression pour atteindre l'équilibre. Si l'on compare maintenant la forme native à la forme chauffée, la capacité d'insertion de DH-Otf dans la monocouche de LPS est nettement supérieure à celle de N-Otf, quel que soit la concentration en sous-phase. Aux faibles concentrations, l'insertion de DH-Otf augmente plus rapidement avec la concentration que celle de N-Otf (Figure IV-3B) et l'écart est maintenu jusqu'aux plus grandes concentrations étudiées. On peut noter que pour une augmentation identique de pression de surface 6,5 mN/m, la concentration de DH-Otf est 60 fois plus faible que celle de N-Otf.

Au-delà de 1  $\mu\text{M}$  de N-Otf et de 0,4  $\mu\text{M}$  de DH-Otf,  $\Delta\pi$  évolue plus lentement avec la concentration protéique indiquant que le système est proche de la saturation. Toutefois, la valeur maximale de  $\Delta\pi$  est plus élevée pour DH-Otf que pour N-Otf, avec respectivement 11,1 et 6,5 mN/m (Figure IV-3A). A la saturation, la densité moléculaire élevée à l'interface entraîne une augmentation des forces latérales entre les molécules adsorbées, ce qui crée une barrière qui s'oppose à l'adsorption de nouvelles protéines. DH-Otf possède donc une insertion maximale plus élevée que N-Otf et celle-ci est atteinte à une concentration plus faible.

#### IV.2.4. Affinité de l'ovotransferrine pour une monocouche de lipopolysaccharides

L'affinité de N-Otf et de DH-Otf pour la monocouche de LPS est étudiée par mesures de tensiométrie et des suivis de cinétiques d'absorption. Pour cela, la même concentration sous-phasique d'ovotransferrine est mise en interaction avec une monocouche de LPS de différentes valeurs de pression de surface initiale. Cette étude est réalisée en utilisant les concentrations déterminées dans le paragraphe précédent :  $0,4 \mu\text{M}$  en N-Otf et  $0,1 \mu\text{M}$  en DH-Otf. Ces concentrations sont choisies suivant deux critères : des concentrations inférieures à celles donnant une saturation de l'interface à l'interface air/liquide et des concentrations évitant l'agrégation protéique en sous-phase permettant ainsi de promouvoir l'interaction protéine/LPS. Les mesures de pression de surface à l'équilibre (fin de cinétique) sont utilisées pour calculer  $\Delta\pi$  (Équation IV-1). Ces valeurs sont représentées dans le graphique de la Figure IV-4 en fonction de la pression initiale du film de LPS,  $\pi_{\text{initiale}}$ .

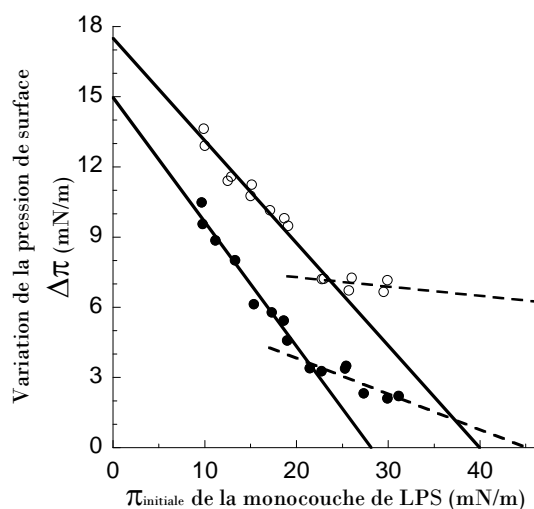


Figure IV-4 : Variation de la pression de surface ( $\Delta\pi$ ) de la monocouche de LPS après interaction avec  $0,4 \mu\text{M}$  de N-Otf (●) et  $0,1 \mu\text{M}$  de DH-Otf (○) en fonction de la pression de surface initiale de la monocouche.

Comme attendu, l'augmentation de la compacité du film lipidique, provoquée par l'augmentation de la pression de surface initiale, entraîne dans tous les cas la diminution de  $\Delta\pi$ , ce qui traduit une diminution de l'insertion de N-Otf et de DH-Otf dans la monocouche de LPS. Cependant, l'évolution de  $\Delta\pi$  est différente entre N-Otf et DH-Otf et aussi selon le niveau de pression de surface initiale.



Malgré une concentration quatre fois plus faible en sous-phase, les valeurs de  $\Delta\pi$  relatives à l'insertion de DH-Otf dans la monocouche de LPS sont toujours supérieures à celle de N-Otf. A la valeur théorique de  $\pi_{\text{initiale}}$  nulle, la différence entre les valeurs de  $\Delta\pi$  mesurées pour DH-Otf et N-Otf est de 2,5 mN/m. Cette différence  $\Delta\pi$  augmente avec l'augmentation de la pression de surface initiale de la monocouche sur toutes les expériences réalisées.

Pour les deux types d'ovotransferrine, la variation de la pression de surface ( $\Delta\pi$ ) est linéairement proportionnelle à la pression de surface initiale ( $\pi_{\text{initiale}}$ ) de la monocouche de LPS (Figure IV-4) ce qui est le comportement classique rencontré dans la littérature. Cependant, pour les deux protéines, il apparaît un fort changement de pente à une  $\pi_{\text{initiale}}$  d'environ  $21,5 \pm 0,5$  mN/m pour N-Otf et à  $23,5 \pm 0,5$  mN/m pour DH-Otf. La régression linéaire de  $\Delta\pi$  en fonction de  $\pi_{\text{initiale}}$  pour N-Otf et pour DH-Otf dans les deux intervalles de pression de surface initiale permet d'extraire trois paramètres associés à l'interaction des deux protéines avec la monocouche de LPS : La MIP (maximal insertion pressure), le facteur de synergie et  $\Delta\pi_0$  comme décrit par P. Calvez et al. [76]. Le premier paramètre est la MIP qui est la valeur de  $\pi_{\text{initiale}}$  correspondante à l'intersection de la droite de régression linéaire avec l'axe de  $\pi_{\text{initiale}}$  (Figure IV-4). Il s'agit de la pression de surface limite au-delà de laquelle la protéine ne s'insère plus dans la monocouche de LPS. Les valeurs de MIP calculées n'ont pas de sens puisque qu'ils ne peuvent correspondre à aucune expérience réelle. En effet, le film de LPS peut difficilement se comprimer au-delà de 35 mN/m. La question qui se pose est de savoir qu'elle est l'origine de ce changement brutal de pente.

Tableau IV-1 : Grandeurs caractéristiques de l'interaction de N-Otf et de DH-Otf avec une monocouche de LPS pour les deux intervalles de pression de surface initiale. Le facteur de synergie et l'augmentation théorique de la pression de surface en absence de lipides ( $\Delta\pi_0$ ) sont extraits des droites de régression linéaire de  $\Delta\pi$  en fonction de  $\pi_{\text{initiale}}$ .

	$\pi_{\text{initiale}}$ (mN/m)	Facteur de synergie	$\Delta\pi_0$ (mN/m)
N-Otf	< 21,5	$0,47 \pm 0,07$	15,0
	> 21,5	$0,85 \pm 0,10$	6,9
DH-Otf	< 23,5	$0,56 \pm 0,06$	17,5
	> 23,5	$0,96 \pm 0,11$	8,1

Le deuxième paramètre est le facteur de synergie qui est calculé à partir de la droite de régression linéaire, il est égal à la valeur de la pente + 1. Le facteur de synergie apporte des

informations sur l'affinité de la protéine pour la monocouche de LPS. Le signe du facteur de synergie indique l'existence ou non d'une affinité de la protéine pour la monocouche lipidique, la valeur du facteur de synergie étant proportionnelle à cette affinité et donc à l'interaction de la protéine avec la monocouche de LPS. Les valeurs positives du facteur de synergie obtenues (Tableau IV-1) signifient que N-Otf et DH-Otf ont une affinité pour la monocouche de LPS quel que soit  $\pi_{\text{initiale}}$  de la monocouche. Ce facteur augmente même lorsque les  $\pi_{\text{initiale}}$  sont plus élevées ce qui est paradoxal, de 0,47 à 0,85 pour N-Otf et de 0,56 à 0,96 pour DH-Otf (Tableau IV-1). Nous nous trouvons donc avec un comportement atypique que nous discuterons plus en avant.

Le troisième paramètre est l'augmentation théorique de la pression de surface en l'absence de lipides ( $\Delta\pi_0$ ), c'est-à-dire lorsque  $\pi_{\text{initiale}}$  est nulle. Il s'agit de l'intersection de la droite de régression linéaire avec l'axe de  $\Delta\pi$ .  $\Delta\pi_0$  est supérieur pour DH-Otf que pour N-Otf avec 17,5 et 15,0 mN/m respectivement, ce qui est en accord avec toutes les expériences menées jusqu'ici. On note que ces valeurs sont supérieures à ceux obtenues expérimentalement où  $\pi_{\text{équilibre}}$  à l'interface air/liquide est de 14,5 mN/m pour DH-Otf et de 11,4 mN/m pour N-Otf, ce qui montre une interaction privilégiée avec les lipides.

#### **IV.2.5. Topographie AFM de la monocouche de lipopolysaccharides avant et après interaction avec l'ovotransferrine**

Dans l'objectif de visualiser la topographie de la monocouche de LPS avant et après interaction avec N-Otf et DH-Otf, la surface de la monocouche a été analysée par AFM. Pour cela, des monocouches de LPS seuls d'une pression de surface d'environ 18 mN/m et 25 mN/m ont été transférées sur une plaque de mica. Egalement, après injection de N-Otf ou de DH-Otf sous la monocouche de LPS ( $\pi_i = 18$  mN/m), et en fin de cinétique le film interfacial est prélevé, en utilisant la méthode Langmuir-Blodgett. Les images de topographie AFM des monocouches de LPS seuls et après injection de N-Otf ou de DH-Otf en sous-phase sont présentées respectivement dans les Figure IV-5 et Figure IV-6. Le Tableau IV-2 résume quant à lui les valeurs de la pression de surface et d'angle ellipsométrique pour chaque échantillon ainsi que la rugosité des films moléculaires. La rugosité a été mesurée sur des parties des images ayant une surface minimale de  $(20 \times 20)$  pixel<sup>2</sup> ce qui équivaut à une aire  $(0,2 \times 0,2)$   $\mu\text{m}^2$  du film interfacial.

#### IV.2.5.1. Topographie de la monocouche de LPS seuls

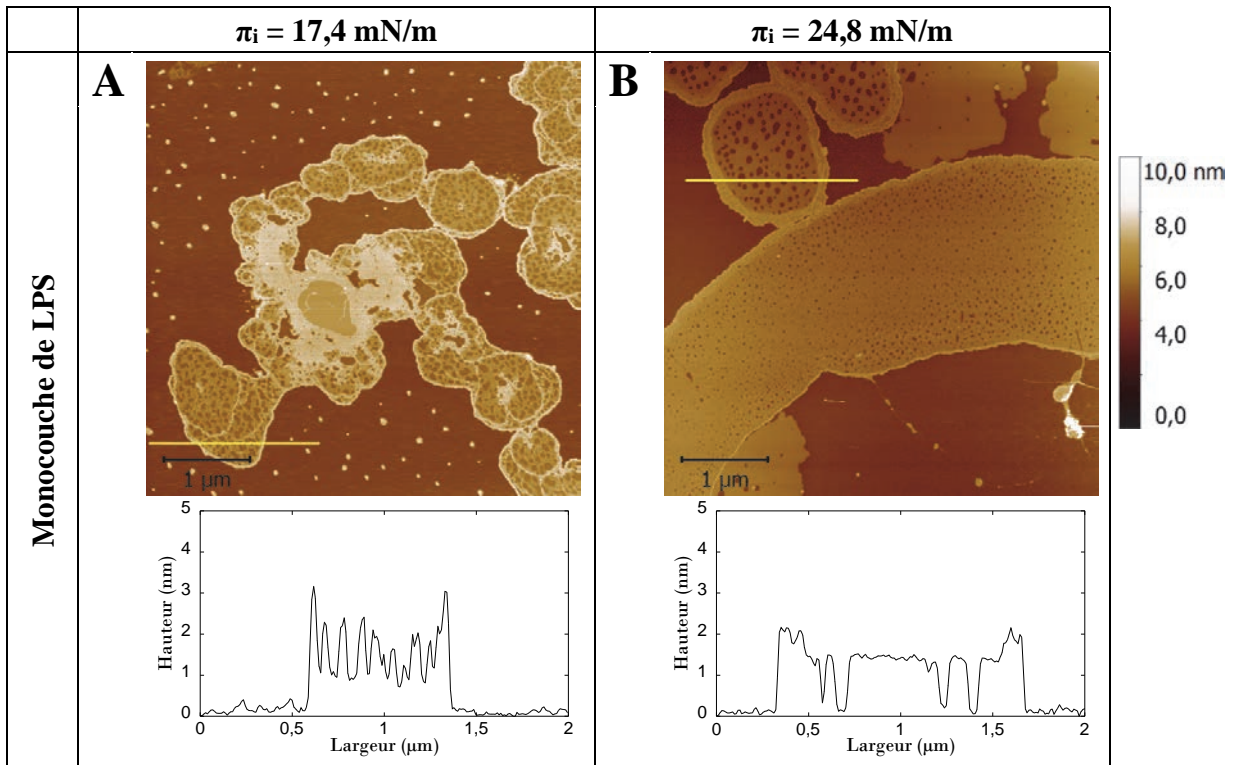


Figure IV-5 : Images topographiques AFM ( $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ) et profils de monocouche des LPS seuls à une pression de surface de 17,4 mN/m (A) et 24,8 mN/m (B). Les profils correspondent à la section jaune dessinée sur chaque image AFM.

Les images topographiques AFM des monocouches de LPS montrent la coexistence de deux zones de hauteurs différentes. On distingue ainsi une zone haute (en clair sur les images) entourée d'une zone basse continue (en foncé) quelle que soit la pression de surface des films (Figure IV-5A et Figure IV-5B). La zone basse possède une épaisseur homogène. A 18 mN/m (Figure IV-5A), la zone basse est caractérisée par la présence de petits domaines dispersés d'un diamètre variant entre 0,03 et 0,1  $\mu\text{m}$  et d'une hauteur de  $3 \pm 0,2 \text{ nm}$ , ces petits domaines sont absents à forte pression, à 25 mN/m (Figure IV-5B). Les zones hautes se présentent sous des formes plus ou moins rondes ou ovales qui semblent résulter d'une coalescence de domaines. Les images et les profils des Figure IV-5A et Figure IV-5B montrent que l'intérieur de ces domaines protubérants n'a pas une hauteur unique, mais on peut noter 3 différentes hauteurs dont le contour qui apparaît plus haut. Ce contour est notablement plus arrondi à 25 mN/m qu'à 18 mN/m. La partie polaire du film lipidique étant contre le mica, les variations de hauteurs correspondent à des variations d'épaisseurs.

L'hétérogénéité de l'épaisseur des monocouches de LPS à 18 mN/m et à 25 mN/m (Figure IV-5A et Figure IV-5B), traduite par les variations de hauteurs, résulte du fait que les LPS utilisés dans l'étude sont un extrait naturel de la membrane externe d'*E.coli* K12. Or, la longueur des molécules de LPS varie au sein d'une même bactérie, du fait du nombre variable d'un nombre variables des unités répétitives formant l'antigène-O (voir § I.2.3.1). La différence de hauteur d'environ 2 nm entre la zone haute et la zone basse correspond donc vraisemblablement à des molécules de LPS ayant une partie antigène-O plus ou moins longue avec deux à trois unités répétitives de plus par rapport aux molécules de LPS de la zone basse. On peut noter que les LPS courts et les LPS longs ne se répartissent pas uniformément, puisqu'ils sont à l'origine de zones distinctes qui sont la zone basse et la zone haute.

L'augmentation de la pression de surface engendre plusieurs effets sur la topographie de la monocouche de LPS. Le passage de 18 mN/m à 25 mN/m entraîne la disparition des petits domaines qui fusionnent vraisemblablement au contour de la zone haute, en effet ces derniers présentent la même hauteur, et dont la largeur croit. La fusion des petits domaines avec les contours ainsi que leur changement de forme avec une circularité qui augmente indiquent une minimisation de la tension de ligne par la diminution des lignes de contact entre les différentes longueurs de molécules. L'augmentation de la pression de surface favorise également un épaissement plus homogène pour chaque zone du film. En effet, le profil de la zone haute est plus homogène à 25 mN/m qu'à 18 mN/m (Figure IV-5A et B). Il en est de même avec le fond qui devient moins rugueux comme le confirme la mesure de RMS qui diminue de 0,11 nm à 0,08 nm (Tableau IV-2).

#### **IV.2.5.2. Topographie de la monocouche de LPS après injection en sous-phase de N-Otf et DH-Otf**

Les images AFM des monocouches de LPS après injection de N-Otf et de DH-Otf en sous-phase (Figure IV-6) montrent que la distribution des LPS en essentiellement deux zones n'est pas impactée par la présence des protéines. Néanmoins, plusieurs effets que nous allons décrire sont notables sur la topographie des monocouches mixtes protéines/LPS.

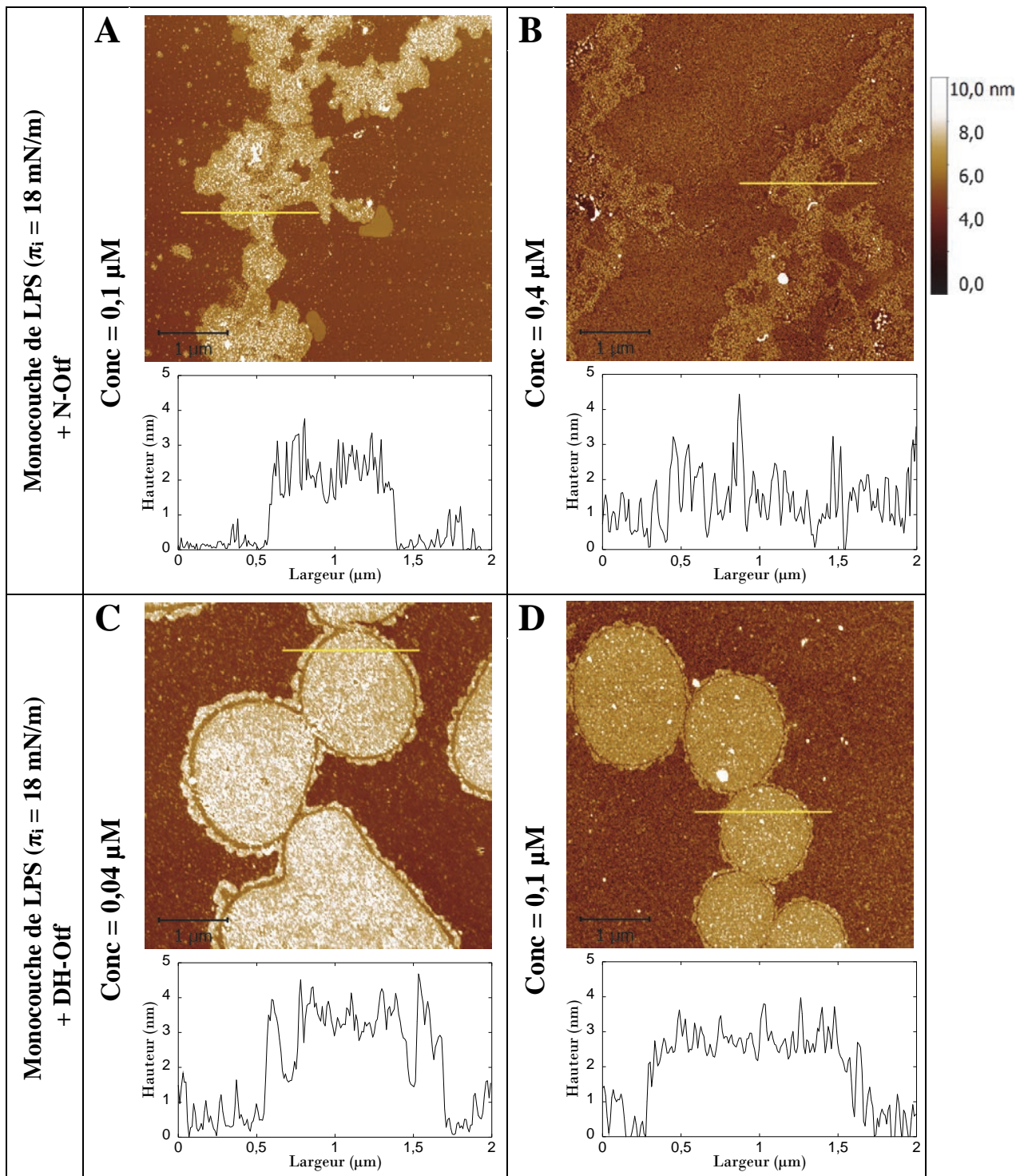


Figure IV-6 : Images topographiques AFM ( $5 \times 5$ )  $\mu\text{m}^2$  et profils de films moléculaires mixtes protéines/LPS. A et B : monocouche de LPS après injection de 0,1  $\mu\text{M}$  et de 0,4  $\mu\text{M}$  de N-Otf respectivement. C et D : monocouche de LPS après injection de 0,01  $\mu\text{M}$  et de 0,4  $\mu\text{M}$  de DH-Otf respectivement. Les profils correspondent à la section jaune sur chaque image AFM.

En présence de N-Otf (Figure IV-6A et Figure IV-6B), les domaines hauts possèdent des contours anguleux similaires à ceux observés avec une monocouche de LPS seule à 17,4 mN/m. En présence de DH-Otf (Figure IV-6C et Figure IV-6D), les domaines hauts sont caractérisés par des contours arrondis qui rappellent ceux de la monocouche de LPS à 24,8 mN/m. La comparaison des profils des sections des monocouches de LPS avec et sans protéines (Figure IV-6 et Figure IV-5 respectivement) montre que l'injection de N-Otf et de DH-Otf engendre une hétérogénéité plus forte des variations de hauteurs et donc de l'épaisseur de l'ensemble des zones. Cette observation est confortée par la mesure de rugosité de la zone basse (fond de l'image) : les valeurs de RMS (Tableau IV-2) passent d'environ 0,1 nm en absence de protéine à environ 0,3 nm aux faibles concentrations en protéine (0,1  $\mu$ M N-Otf et 0,04  $\mu$ M DH-Otf) et à environ 0,5 nm aux fortes concentrations en protéine (0,4  $\mu$ M N-Otf et 0,1  $\mu$ M DH-Otf).

A faible concentration en N-Otf (0,1  $\mu$ M) et en DH-Otf (0,04  $\mu$ M), la rugosité de la zone basse est nettement inférieure à celle de la zone haute. Cela est attesté par les images AFM des Figure IV-6A et Figure IV-6C et par les valeurs de RMS pour DH-Otf, 0,36 nm pour la zone basse contre 0,56 nm pour la zone haute (Tableau IV-2). L'augmentation de la concentration en N-Otf (0,4  $\mu$ M) et en DH-Otf (0,1  $\mu$ M), permet d'accroître la rugosité de la zone basse pour atteindre enfin la même rugosité de la zone haute avec un RMS d'environ 0,5 nm.

Par ailleurs, pour les deux protéines, l'augmentation de la concentration protéique en sous-phase, et par conséquent l'augmentation de l'insertion, induit une diminution de la différence d'épaisseur entre la zone haute et la zone basse. Cela se remarque assez aisément sur les images en observant uniquement le contraste de couleur entre les domaines des Figure IV-6A et Figure IV-6C par rapport aux Figure IV-6B et Figure IV-6D, cet effet est quantifiable sur les profils enregistrés.

En résumé, l'ensemble des impacts produits sur la topographie de la monocouche de LPS par N-Otf et DH-Otf sont la conséquence de l'augmentation de la pression de surface et de la perturbation de l'organisation moléculaire dans la monocouche. L'augmentation élevée de la pression de surface, dans le cas de DH-Otf, est responsable de l'arrondissement des contours de la zone haute. Cette caractéristique n'est pas observée avec le N-Otf en raison de l'augmentation moins importante de la pression de surface. En outre, la perturbation de l'organisation des

molécules de LPS est à l'origine de l'aspect rugueux de la monocouche suite par l'incorporation de N-Otf et de DH-Otf dans la monocouche.

Tableau IV-2 : Récapitulatif des grandeurs caractéristiques des monocouches de LPS analysées par AFM.  $\Delta\pi$  et  $\delta\Delta$  : augmentation respectivement de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique après l'injection de protéine en sous-phase. RMS : « Root Mean Square », paramètre de mesure de la rugosité.

	Concentration protéique ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta\pi$ (mN/m)	$\delta\Delta$ ( $^\circ$ )	RMS (nm)	
				Zone basse	Zone haute
Monocouche de LPS ( $\pi = 18$ mN/m)	-	-	-	$0,11 \pm 0,02$	-
Monocouche de LPS ( $\pi = 25$ mN/m)	-	-	-	$0,08 \pm 0,01$	-
Monocouche de LPS ( $\pi_i = 18$ mN/m) + N-Otf	0,1	2,4	3,5	$0,29 \pm 0,07$	-
	0,4	4,2	4,5	$0,56 \pm 0,06$	-
Monocouche de LPS ( $\pi_i = 18$ mN/m) + DH-Otf	0,04	7,5	10,2	$0,36 \pm 0,06$	$0,56 \pm 0,12$
	0,1	9,5	12,0	$0,51 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,06$

### **IV.3. Discussion**

L'ensemble des résultats de cette étude montre que N-Otf a une affinité pour la monocouche de LPS qui se traduit par une capacité d'insertion dans la partie hydrophobe du film de LPS. Cette affinité pourrait être à l'origine des propriétés antibactériennes de N-Otf décrites dans la littérature [5, 6]. Nous allons essayer de comprendre ce qui génère cette affinité entre N-Otf et les LPS. Nous examinerons en parallèle l'effet du chauffage sur cette propriété.

#### **IV.3.1. L'affinité élevée de l'ovotransferrine native pour les lipopolysaccharides conduit à son insertion dans la monocouche de LPS**

L'insertion de N-Otf dans la monocouche de LPS est régie d'une part par les propriétés de la monocouche de LPS et d'autre part par les propriétés de surface de la structure protéique de N-Otf. Ainsi, la structure de la monocouche de LPS se caractérise par une région hydrophile de polysaccharides, qui sera la première à rentrer en contact avec la protéine, et d'une région hydrophobe de chaînes acyl. Entre les régions hydrophile et hydrophobe, il y a une zone anionique, qui est souvent décrite comme étant déterminante dans l'activité antimicrobienne des peptides. L'interaction basée purement sur des effets électrostatiques ne semble pas être à l'origine de l'affinité protéine/LPS. L'hétérogénéité de la répartition des charges en surface de la protéine, lui permet certainement une mobilité dans les différentes zones de la couche de LPS. N-Otf est susceptible de former des interactions électrostatiques de type dipôle/dipôle avec la région hydrophile de polysaccharides et de s'introduire dans cette région. Au niveau de la région anionique de la monocouche, N-Otf forme des interactions électrostatiques avec les LPS par ses résidus cationiques présents à sa surface. Au final, N-Otf arrive au niveau de la région hydrophobe de la monocouche et établit avec elle des interactions hydrophobes de type dipôle-induit/dipôle-induit.

L'insertion de N-Otf dans la monocouche de LPS s'étend jusqu'à une MIP de 45 mN/m (Tableau IV-1), cette valeur reste théorique puisque aucune expérience n'a pu être réalisée à cette pression de surface. La valeur de MIP ainsi calculée pour N-Otf est cohérente avec celles d'autres protéines et peptides antibactériens, pour lesquels des valeurs de MIP entre 36 et 48 mN/m sont reportées : 41,5 mN/m pour le lysozyme [8], 44 mN/m pour la temporine L [212] et 36 mN/m pour la plasticine [213]. Malheureusement, la pression de surface *in vivo* de la membrane externe des



bactéries n'est pas connue à ce jour. Il n'est donc pas possible de raisonner les valeurs de MIP calculées pour ces différents peptides et protéines antibactériens par rapport aux conditions réelles de la membrane bactérienne. En outre, le facteur de synergie entre N-Otf et la monocouche de LPS est très élevé et augmente de 0,47 à 0,85 entre les pressions de surface faibles ( $< 21,5$  mN/m) et élevées ( $> 21,5$  mN/m). Ce facteur est pratiquement équivalent (0,79) pour le lysozyme alors qu'il est faible pour la temporine L et la plastine (inférieur à 0,2) pourtant de plus petite taille. La comparaison de ces valeurs permet de dire que contrairement aux peptides, l'Otf a une meilleure affinité pour les LPS et qu'elle augmente avec la pression de surface.

Les peptides antimicrobiens détaillés dans le § I.3 se caractérisent généralement par leurs structures simples et sont de petites tailles. Pour cette raison, la taille de ces peptides n'est pas un facteur limitant à leur insertion dans les membranes bactérienne. Pour N-Otf, sa grande taille avec un diamètre hydrodynamique de 6,8 nm (voir § III.2.1.1) ne contraint pas pour autant son insertion dans la monocouche de LPS. En effet, on a démontré que N-Otf parvient à s'insérer dans la monocouche de LPS, qui constitue une barrière physique et énergétique, par l'agencement et la cohésion des molécules de LPS. L'insertion des protéines dans la monocouche de LPS a été observé aussi avec le lysozyme, protéine de 129 résidus [1, 8]. L'ovotransferrine de 686 résidus parvient également à s'insérer. Par conséquent, la taille grande des protéines n'est pas à elle seule un facteur qui entrave l'insertion membranaire des protéines. Ainsi, l'ensemble des propriétés physico-chimiques de la protéine conditionne la capacité d'insertion de N-Otf à la monocouche de LPS.

#### **IV.3.2. Le chauffage à sec de l'ovotransferrine augmente son affinité pour la monocouche de lipopolysaccharides**

L'activité membranaire de l'ovotransferrine vis-à-vis de la monocouche de LPS est accrue, après le chauffage à sec de la protéine. En effet, l'activité membranaire de DH-Otf est plus élevée que celle de N-Otf aux mêmes concentrations. Cela permet à DH-Otf de s'insérer dans la monocouche en quantité importante, ce qui se traduit par une augmentation plus importante de la pression de surface. Ainsi, une même augmentation de la pression de surface de 6,5 mN/m est observée pour respectivement 0,025  $\mu$ M de DH-Otf et 1,5  $\mu$ M de N-Otf. En outre, l'affinité de l'ovotransferrine pour la monocouche de LPS est améliorée par le chauffage à sec. Ainsi, le facteur

de synergie de DH-Otf est plus important, et la valeur de MIP est extrêmement élevée, ce qui suggère une insertion de DH-Otf possible même à pression de surface élevée de la monocouche. Par ailleurs, l'action membranaire de DH-Otf est plus rapide que celle de N-Otf en raison de son coefficient de diffusion plus élevé en solution.

Les modifications des propriétés physico-chimiques suite au chauffage à sec sont à l'origine de l'amplification de l'activité et de l'affinité de l'ovotransferrine pour la monocouche de LPS. Ce sont vraisemblablement ces mêmes propriétés physico-chimiques qui sont responsables de l'augmentation de l'activité de DH-Otf à l'interface air/liquide (voir § III.2.1). Ainsi, la flexibilité accrue de DH-Otf permettrait à cette forme de l'ovotransferrine de mieux s'insérer dans la monocouche de LPS. En étant capable d'adapter légèrement sa structure pour surmonter le compactage des molécules de LPS et l'encombrement stérique des chaînes de polysaccharides, DH-Otf pourrait s'introduire plus facilement au cœur de la monocouche. L'augmentation de l'hydrophobie de surface conférerait également à DH-Otf une affinité plus élevée pour les LPS et favoriserait son interaction avec la région hydrophobe de la monocouche. En outre, une charge de surface électropositive potentiellement plus élevée pourrait aussi contribuer à l'augmentation de l'affinité de DH-Otf pour la monocouche, *via* des interactions électrostatiques plus importantes avec la région anionique de la monocouche de LPS.

#### **IV.3.3. L'insertion de l'ovotransferrine native et chauffée à sec induit des impacts de différentes natures sur la monocouche de lipopolysaccharides**

L'insertion de N-Otf ou de DH-Otf engendre plusieurs répercussions sur les propriétés de la monocouche de LPS. Comme indiqué dans ce chapitre, l'insertion des deux protéines provoque l'augmentation de la pression de surface de la monocouche et les molécules de LPS se trouvent alors plus compactes. Une augmentation considérable de la compacité de la monocouche suite à l'insertion d'une grande quantité de N-Otf ou de DH-Otf, peut provoquer ainsi une transition de phase. La transition de phase correspond au changement conformationnel des molécules de LPS par l'élongation de leurs chaînes polysaccharidiques (plus de détails sur la conformation des LPS dans le § I.2.3.3). Ainsi, la monocouche s'épaissit suite à cette élongation des molécules de LPS.

L'insertion de N-Otf ou de DH-Otf dans la monocouche et leur présence entre les molécules de LPS produit une monocouche de composition hétérogène. Cette hétérogénéité donne lieu à un état plus désordonné où la présence des protéines perturbe l'organisation des molécules de LPS. La désorganisation de la monocouche engendre une variation plus importante de l'épaisseur de la monocouche de LPS. Cela est observé par AFM, avec des valeurs de rugosité plus élevées et un profil plus hétérogène.

#### **IV.3.4. L'insertion de l'ovotransferrine native et chauffée à sec est fortement influencée par l'état de la monocouche de lipopolysaccharides**

L'influence de l'état de la monocouche de LPS sur les propriétés membranotropes d'une protéine est démontrée pour la première fois dans cette étude. En effet, l'allongement des chaînes de polysaccharides sous l'effet de la pression de surface augmente l'affinité de N-Otf et de DH-Otf pour la monocouche de LPS. Un phénomène comparable a été observé avec des monocouches de phospholipides dont l'état physique modifie l'affinité des protéines [73, 74]. En raison de leur différence structurale, le changement d'état physique responsable de ce phénomène est de nature différente pour les deux lipides. Il est dû à une isomérisation cis-trans au niveau des chaînes acyl hydrophobes pour les phospholipides alors qu'il est dû à une élongation des polysaccharides hydrophiles. En effet, les LPS diffèrent des phospholipides par une région hydrophobe plus complexe et une grande région hydrophile de polysaccharides [44, 48].

Le changement de conformation des molécules de LPS sous l'effet de l'augmentation de la pression de surface entraîne une augmentation considérable de l'affinité de N-Otf et de DH-Otf pour la monocouche. En effet, le facteur de synergie est de 0,47 et 0,56 pour N-Otf et DH-Otf respectivement lorsque les molécules de LPS ont une conformation courbée à des  $\pi_{\text{initiale}} < 21,5$  mN/m. Ce facteur de synergie augmente, à 0,85 et 0,96 pour N-Otf et DH-Otf respectivement, lorsque les LPS ont une conformation allongée à des  $\pi_{\text{initiale}} > 21,5$  mN/m. L'augmentation de l'affinité traduit une interaction plus favorable de N-Otf et de DH-Otf avec les LPS après élongation des chaînes de polysaccharides. Cela est dû à la région hydrophile qui devient moins condensée, après élongation des chaînes de polysaccharides, facilitant ainsi l'insertion protéique. En effet, même si l'aire moléculaire diminue, le gain en épaisseur de la monocouche fait

augmenter le volume moléculaire des LPS, donnant une monocouche moins compacte au niveau de la région des polysaccharides. Ce décompactage de la région hydrophile faciliterait l'accès et l'interaction de N-Otf et de DH-Otf avec les régions anionique et hydrophobe de la monocouche de LPS, ce qui expliquerait l'augmentation de l'affinité.

Pour une monocouche de LPS d'une pression de surface initiale inférieure à 25 mN/m, la transition de phase peut survenir durant le processus d'insertion protéique si  $\Delta\pi$  est suffisamment élevée. Ainsi, N-Otf et DH-Otf s'insèrent en premier lieu dans une monocouche de LPS courbés, entraînant l'augmentation de la pression de surface, qui entraîne à son tour une transition de phase de la monocouche ; N-Otf et le DH-Otf s'insèrent alors dans une monocouche de LPS allongés dans un deuxième temps. On note qu'avec N-Otf, la transition de phase s'établit à 25,0 mN/m ( $\pi_i = 21,4$  mN/m ;  $\Delta\pi = 3,6$  mN/m), alors qu'elle s'établit à 31,4 mN/m ( $\pi_i = 23,7$  mN/m ;  $\Delta\pi = 7,6$  mN/m) avec DH-Otf. Aucun décalage de transition de phase n'existe entre une monocouche de LPS purs et en présence de N-Otf, alors qu'un décalage de + 6,4 mN/m apparait en présence de DH-Otf. Cela peut être expliqué par l'interaction plus forte entre les molécules de LPS et de DH-Otf, ce qui implique une énergie supérieure (par une pression de surface supérieure) pour la transition de phase.

#### **IV.3.5. La longueur des chaînes de polysaccharides augmente l'affinité de l'ovotransferrine native et chauffée à sec pour les lipopolysaccharides de la monocouche**

L'importance des polysaccharides de la structure des LPS dans l'insertion des protéines membranotropes a été démontrée par une étude comparative de l'interaction du lysozyme avec une monocouche de LPS et une monocouche de KLA (LPS dépourvus de polysaccharides) [8]. Dans cette étude, le lien entre la longueur du polysaccharide des LPS et l'affinité des protéines membranotropes pour la monocouche a été établi.

L'étude par AFM des monocouches de LPS après interaction de N-Otf et de DH-Otf, à faible et à forte concentration, suggère que l'affinité des deux protéines est plus élevée pour les LPS portant de longues chaînes de polysaccharides. En effet, à faible concentration, N-Otf et DH-

Otf s'insèreraient préférentiellement au niveau des zones hautes de la monocouche, qui correspondent à des LPS de longs polysaccharides, comme le suggère la plus forte rugosité de la zone haute dans ces conditions de concentration. Et ce n'est qu'à fortes concentrations que l'insertion semble intervenir au niveau de la zone basse de la monocouche, qui correspond à des LPS de courts polysaccharides, comme le suggère l'augmentation de rugosité de la zone basse.

La différence d'affinité des deux formes d'Otf, aux zones de la monocouche de longueurs de LPS différentes, se manifeste aussi par la diminution de la différence de hauteur entre les deux zones, avec l'augmentation de la concentration protéique. Etant donné que l'Otf est d'une grande taille, de  $(5 \times 6 \times 10) \text{ nm}^3$  [167], son hauteur dans la monocouche peut dépasser l'épaisseur de la zone basse de la monocouche de LPS, ce qui fait augmenter l'épaisseur globale de la zone basse. Or, ce qu'on observe par AFM est la différence de hauteur entre les deux zones, qui diminue par l'insertion de l'Otf. Pour cela, l'insertion plus importante de N-Otf dans la zone basse à  $1 \mu\text{M}$  par rapport à  $0,4 \mu\text{M}$  a diminué significativement la différence de hauteur entre les deux zones. Avec DH-Otf, l'augmentation importante de la pression de surface, abouti à l'élongation des molécules de LPS et l'épaississement de la monocouche, qui dissimule toute variation de hauteur des zones liée à l'insertion de l'Otf.

#### **IV.3.6. La haute compressibilité de la monocouche de lipopolysaccharides favorise l'insertion de l'ovotransferrine native et chauffée à sec**

L'insertion de N-Otf et de DH-Otf dans la monocouche de LPS entraîne une augmentation conjointe de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique. La Figure IV-2 montre que pour N-Otf, un  $\Delta\pi$  de  $3,2 \text{ mN/m}$  est associée à un  $\delta\Delta$  de  $4,5^\circ$ . En outre, un  $\Delta\pi$  de  $9,7 \text{ mN/m}$  lié à l'insertion de DH-Otf est associée à un  $\delta\Delta$  de  $11,7^\circ$ . Les valeurs de  $\delta\Delta$  atteintes sont très élevées relativement aux valeurs de  $\Delta\pi$  causés. En effet, pour des monocouches de phospholipides (DOPC/DOPS ou DOPC/DOPE), l'insertion d'un segment de la dystrophine montre des  $\delta\Delta$  nettement inférieures pour les même  $\Delta\pi$  ( $1^\circ$  pour  $3,2 \text{ mN/m}$  et  $3^\circ$  pour  $9,7 \text{ mN/m}$ ) [214]. Par comparaison entre les phospholipides et les LPS, on en conclut donc que la monocouche de LPS a la propriété de permettre l'insertion d'une grande quantité de protéines sans pour autant engendrer une augmentation considérable de la pression de surface.

La haute compressibilité de la monocouche de LPS serait à l'origine de la faible évolution de la pression de surface par rapport à la quantité de protéine insérée. Cette propriété permet de limiter l'augmentation de la pression de surface, laissant aux protéines la possibilité de continuer à s'insérer sans être gênées par des pressions de surface élevées. La structure complexe et de grande taille des molécules de LPS seraient à l'origine de cette forte compressibilité de la monocouche de LPS, par remaniement des molécules de LPS sous l'effet du compactage latéral.

A faible pression de surface, les chaînes acyles d'une molécule de LPS occupent un grand volume et se trouvent alors espacées pour être dans l'état énergétique le plus bas. La diminution de l'aire moléculaire des LPS, suite à l'insertion protéique, contraint les chaînes acyles à se rapprocher permettant ainsi de maintenir une distance suffisante entre les molécules de LPS et donc de limiter l'augmentation de la pression de surface. Le rapprochement des chaînes acyles des molécules de LPS compense de ce fait la diminution de l'aire moléculaire des LPS. Ce comportement des chaînes acyles sous l'effet du compactage de la monocouche joue un effet « tampon » permettant de modérer l'évolution de la pression de surface et de faciliter l'insertion de N-Otf et de DH-Otf. Cette propriété de la monocouche de LPS de favoriser l'insertion protéique par sa haute compressibilité peut a priori être étendue à l'ensemble des peptides et protéines membranotropes.

#### **IV.3.7. Comparaison de l'activité membranotrope de l'ovotransferrine et du lysozyme vis-à-vis une monocouche de lipopolysaccharides**

La comparaison des résultats de l'activité membranaire de l'ovotransferrine et du lysozyme permet d'émettre des hypothèses quant aux propriétés physico-chimiques des protéines qui favorisent l'interaction avec une monocouche de LPS. Les résultats obtenus avec l'ovotransferrine au cours de cette étude ont donc été confrontés aux résultats d'une étude précédente conduite par Derde et al sur le lysozyme [8]. La Figure IV-7 représente l'augmentation de la pression de surface après l'insertion dans une monocouche de LPS des formes native et chauffée à sec de l'ovotransferrine et du lysozyme.

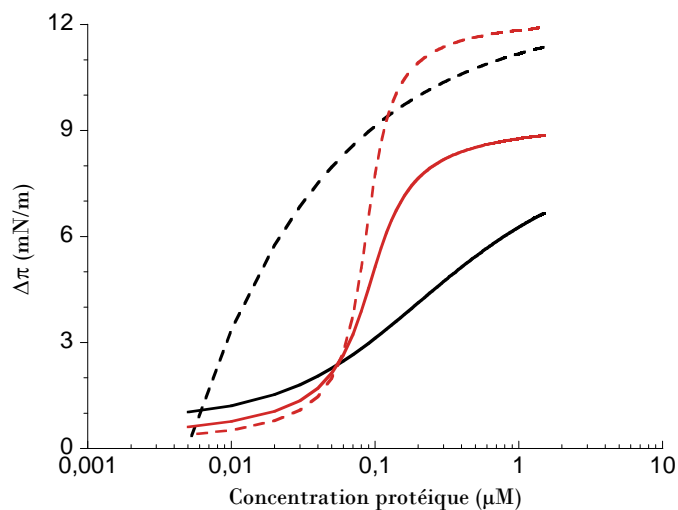


Figure IV-7 : Augmentation de la pression de surface d'une monocouche de LPS ( $\pi_{\text{initiale}} = 18 \text{ mN/m}$ ) après interaction avec N-Otf (courbe noire continue ; —), DH-Otf (courbe noire discontinue ; - -), N-Lyso (courbe rouge continue ; —) et DH-Lyso (courbe rouge discontinue ; - -) à différentes concentrations protéiques en sous-phase. Les courbes de N-Otf et de DH-Otf proviennent de la Figure IV-3. Les courbes de N-Lyso et de DH-Lyso proviennent de l'étude de l'activité membranaire du lysozyme sur une monocouche de LPS [8].

Comme pour l'ovotransferrine, il a été démontré que le chauffage à sec améliore l'activité membranaire du lysozyme vis-à-vis des monocouches de LPS. Le DH-Lyso possède une capacité d'insertion supérieure à N-Lyso et l'affinité du lysozyme pour la monocouche de LPS augmente légèrement après chauffage à sec (augmentation du facteur de synergie de 0,79 à 0,85 et du MIP de 41,5 mN/m à 59,6 mN/m).

L'affinité de l'Otf pour la monocouche de LPS est supérieure à celle du lysozyme, et ce tant pour les formes natives que pour les formes chauffées. Le facteur de synergie est de 0,85 contre 0,79 pour N-Otf et N-Lyso respectivement. L'ovotransferrine garde cet avantage après chauffage à sec avec un facteur de synergie de 0,96 contre 0,85 pour DH-Otf et DH-Lyso respectivement. Pratiquement, aucune différence n'existe entre le MIP du N-Otf et du N-Lyso. Par contre, une grande différence apparaît après chauffage à sec en faveur de l'Otf avec un MIP calculée plus élevée que celle pour le lysozyme. Concernant, les formes natives, N-Otf possède une activité membranaire légèrement plus élevée aux faibles concentrations ( $< 0,05 \mu\text{M}$ ) et N-Lyso est plus actif aux fortes concentrations. Pour les formes chauffées, DH-Otf est nettement plus actif aux

faibles concentrations ( $< 0,1 \mu\text{M}$ ) alors que DH-Lyso est légèrement plus actif aux concentrations supérieures.

La capacité d'insertion des deux formes d'Otf et de lysozyme montre plusieurs points de divergence (Figure IV-7). Premièrement, l'augmentation de la pression de surface en fonction du logarithme de la concentration est progressive pour les deux formes d'Otf, alors qu'elle est relativement brusque pour les deux formes de lysozyme.  $\Delta\pi$  augmente d'une manière progressive et continue pour N-Otf et DH-Otf entre  $0,01 \mu\text{M}$  et  $1,5 \mu\text{M}$ , alors qu'elle augmente brusquement entre  $0,03 \mu\text{M}$  et  $0,2 \mu\text{M}$  pour N-Lyso et DH-Lyso. Ainsi, l'intervalle de concentration protéique, dans lequel  $\Delta\pi$  est en augmentation, est plus large pour les deux formes d'Otf que pour les deux formes de lysozyme. La deuxième différence est que le chauffage à sec améliore différemment la capacité d'insertion de l'ovotransferrine et du lysozyme. Le chauffage à sec du lysozyme entraîne par conséquent une plus grande insertion de la protéine pour une même concentration, ce qui se traduit par une  $\Delta\pi$  plus élevée. En plus d'une plus forte insertion, le chauffage à sec permet à l'Otf d'acquérir une capacité d'insertion à des concentrations plus faibles, ce qui est observé par un décalage de la courbe de DH-Otf vers des faibles concentrations (Figure IV-7).

Tableau IV-3 : Récapitulatif des propriétés structurales et physico-chimiques de l'ovotransferrine et du lysozyme

	<b>Ovotransferrine</b>	<b>Lysozyme</b>
<b>Structure tertiaire</b>	Globulaire	Globulaire
<b>Nombre d'acides aminés</b>	686	129
<b>Masse moléculaire</b>	77,7 kDa	14,3 kDa
<b>Dimension</b>	$5 \times 6 \times 10 \mu\text{m}^3$	$3 \times 3 \times 4,5 \mu\text{m}^3$
<b>Nombre de ponts disulfures intramoléculaires</b>	15	4
<b>pI</b>	6,5	10,7

La taille de l'Otf et du lysozyme n'est a priori pas un facteur déterminant pour l'activité membranaire de ces deux protéines. En effet, malgré une masse moléculaire 5,4 fois plus élevée et un volume environ 7 fois supérieur, l'Otf est plus active vis-à-vis d'une monocouche de LPS à faibles concentrations. Les deux protéines possèdent une structure rigide qui peut être plus



importante pour le lysozyme, en raison de nombre de ponts disulfures rapporté au volume de la protéine, qui est plus élevé pour le lysozyme que pour l'Otf. Si cette hypothèse sur la rigidité des deux protéines est juste, la rigidité plus élevée du lysozyme n'empêche pas son insertion dans la monocouche de LPS et d'avoir une activité membranaire supérieure à celle de l'Otf à des concentrations protéiques élevées.

Dans les conditions expérimentales de pH 7, le lysozyme ( $pI = 10,7$ ) est fortement chargé positivement alors que l'Otf ( $pI = 6,5$ ) est proche de la neutralité. Cette différence de charge nette pourrait s'avérer le facteur déterminant pour la différence de capacité d'insertion entre l'ovotransferrine et le lysozyme vis-à-vis de la monocouche de LPS. A faibles concentrations, N-Lyso de charge positive élevée, a tendance à demeurer dissous en solution plutôt que d'interagir avec la monocouche de LPS. Les interactions électrostatiques avec la monocouche de LPS ne prédominent pas à ce niveau et l'insertion du lysozyme se trouve limitée. Ce n'est qu'à des concentrations plus importantes que les interactions hydrophobes l'emportent permettant à l'insertion du N-Lyso d'évoluer brusquement avec la concentration. Concernant N-Otf, sa neutralité de charge lui assure de créer des interactions hydrophobes avec la monocouche, même à des faibles concentrations. Son affinité pour la monocouche de LPS, ajoutée à sa stabilité en solution lui confère alors une évolution progression de l'insertion dans la monocouche. L'augmentation de l'hydrophobie de surface des deux protéines, par le chauffage à sec, améliorerait différemment leur capacité d'insertion, en raison de leur charge nette différente. En effet, cette hydrophobie de surface accrue aurait plus d'impact sur la capacité d'insertion de l'Otf que celle du lysozyme. Ainsi, une hydrophobie de surface supérieure permet au DH-Otf de s'activer à des plus faibles concentrations, en raison de sa neutralité, ce qui n'est pas le cas avec DH-Lyso à cause de sa charge positive élevée.

#### **IV.4. Conclusion**

On a montré dans la présente étude que l'ovotransferrine native possède une affinité pour la monocouche de LPS qui est un modèle de la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négative. Cette affinité se traduit par l'interaction de N-Otf avec la monocouche qui finalement aboutit à son insertion entre les molécules de LPS, lui conférant ainsi une activité membranotrope. L'insertion de N-Otf est régie par les propriétés de sa surface et principalement par son hydrophobie de surface. Par ailleurs, la rigidité de N-Otf et sa grande taille semblent ne pas être des obstacles à son insertion protéique dans le film lipidique.

Le chauffage à sec est un procédé physique simple qui augmente considérablement l'affinité de l'ovotransferrine pour la monocouche de LPS. L'insertion de DH-Otf dans la monocouche devient plus élevée, avec une activation de la protéine à des concentrations plus faibles. L'augmentation de l'hydrophobie de surface et de la flexibilité de la structure, après le chauffage à sec, pourrait expliquer l'activité membranaire plus importante de l'Otf chauffée à sec. Par ailleurs, l'augmentation du coefficient de diffusion de l'Otf, après le chauffage à sec, accélère son interaction avec la monocouche de LPS.

Après l'insertion de l'ovotransferrine, la monocouche de LPS devient plus compacte, avec possibilité d'une transition de phase et changement de conformation des molécules de LPS. L'organisation des LPS dans la monocouche se trouve perturbée après l'insertion de l'Otf. Cette désorganisation des LPS produit une hétérogénéité importante dans l'épaisseur de la monocouche.

Etant donné que l'insertion est le résultat de l'interaction entre la protéine et la monocouche, les caractéristiques de la monocouche et les propriétés des molécules de LPS conditionnent l'insertion de l'ovotransferrine. L'état physique de la monocouche influence l'affinité de l'ovotransferrine. Ainsi, l'affinité est plus élevée à l'état liquide condensé qui est lié à une conformation allongée des LPS, alors que l'affinité est moins élevée à l'état liquide expansé où les LPS adoptent une conformation courbée. En outre, la haute compressibilité de la monocouche de LPS favorise l'insertion de l'ovotransferrine. Cette propriété permet à la compacité de la monocouche (la pression de surface) d'évoluer modérément avec l'insertion de la protéine, limitant les difficultés à la poursuite de l'insertion de l'Otf. Au niveau de la structure moléculaire des LPS, on a montré que la longueur des chaînes de polysaccharides favorise l'insertion de l'Otf. En présence

de LPS avec des polysaccharides de différentes longueurs, l'Otf s'insère préférentiellement dans les zones de LPS longs.

Au final, la comparaison entre les formes natives et chauffées de l'ovotransferrine et du lysozyme permet de conclure que l'hydrophobie et la charge de la surface ainsi que la charge nette de la protéine sont les paramètres les plus déterminants de l'activité membranaires des protéines sur la monocouche de LPS. Par ailleurs, la taille et le niveau de rigidité de la structure protéique ne sont pas des facteurs importants dans les propriétés membranotropes des protéines antibactériens.

**V. Interaction de l'ovotransferrine native et chauffée avec une monocouche de CMEC, modèle de la membrane interne d'*Escherichia coli***

---

## V.1. Introduction

Les bactéries à coloration de Gram négative possèdent une membrane interne composée majoritairement de phospholipides de différentes natures. Les propriétés membranotropes de l'ovotransferrine vis-à-vis de la membrane interne d'*E. coli* K12 ont été étudiées *in vitro* sur un modèle membranaire. Le modèle membranaire employé est une monocouche lipidique composée d'un mélange des principaux phospholipides, anioniques et zwitterioniques, constitutifs de la membrane interne d'*E. coli* K12. Plusieurs éléments ont été contrôlés pour que les conditions expérimentales soient proches des conditions réelles. D'une part, la composition lipidique de la monocouche de CMEC était proche de la composition lipidique de la membrane interne d'*E. coli* K12 ; d'autre part, le pH (pH = 7) et la force ionique ( $I = 155$  mM) des solutions protéiques étaient proches des conditions physiologiques des fluides biologiques.

L'activité membranaire de l'ovotransferrine a été étudiée à faible et à forte concentration protéique en sous-phase d'une monocouche de CMEC. Le film lipidique a été analysé avant et après mise en contact avec l'ovotransferrine. L'interaction protéine/lipide membranaire était évaluée simultanément par tensiométrie et par ellipsométrie au cours du temps. Cela nous a permis d'étudier les propriétés d'adsorption et/ou d'insertion de l'ovotransferrine à la monocouche de CMEC. L'impact de cette interaction sur l'intégrité de la monocouche a été examiné par imagerie AFM qui permet d'analyser sa topographie à l'échelle du nanomètre.

L'effet du chauffage à sec (80°C pendant 7 jours) sur l'activité membranaire de l'ovotransferrine a été déterminé par une étude équivalente à celle conduite pour la forme native de la protéine. Les changements observés dans l'activité membranaire de l'ovotransferrine ont été analysés au regard des modifications des propriétés physico-chimiques de la protéine sous l'effet du chauffage à sec. Cela nous a permis d'émettre des hypothèses quant aux propriétés qui régissent l'ampleur et les types d'interaction de l'ovotransferrine avec la monocouche de CMEC.

## V.2. Résultats

### V.2.1. Caractérisation de la monocouche de CMEC

#### V.2.1.1. Caractérisation de la monocouche de CMEC à la compression

La compressibilité de la monocouche de CMEC a été caractérisée au cours d'une isotherme de compression dans une cuve de Langmuir. La monocouche était compressé puis décompressé à une vitesse de  $5 \text{ m}^2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$  ( $11,1 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) jusqu'à  $40 \text{ mN/m}$ . La Figure V-1 présente le comportement de la monocouche de CMEC durant le cycle de compression/décompression, étudié conjointement par tensiométrie et par ellipsométrie pour suivre l'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique, respectivement.

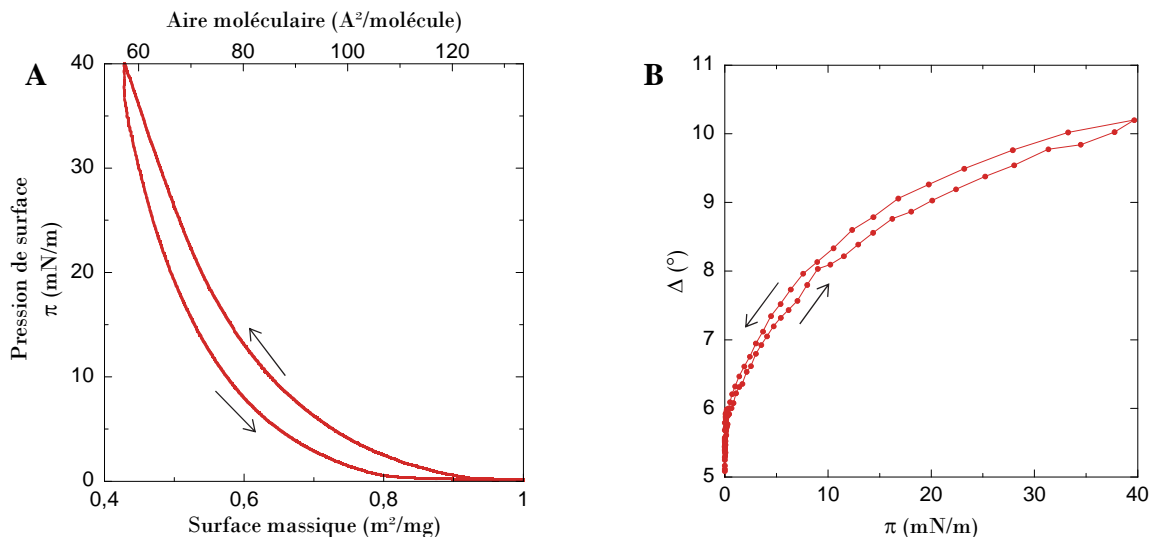


Figure V-1 : Isotherme de compression/décompression d'une monocouche de CMEC ( $30 \mu\text{l}$  à  $0,25 \text{ mM}$ ) à une vitesse de  $5 \text{ m}^2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$  ( $11,1 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécule}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) jusqu'à  $40 \text{ mN/m}$ . A : Evolution de la pression de surface  $\pi$  en fonction de la surface massique et de l'aire moléculaire. B : Evolution de l'angle ellipsométrique  $\Delta$  en fonction de la pression de surface  $\pi$ .

L'évolution de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire (Figure V-1A) présente une hystérésis de comportement. A la même compacité de la monocouche de CMEC, la pression de surface à la décompression est en décalage négatif par rapport à la compression. De même, l'angle ellipsométrique présente une hystérésis en fonction de la pression de surface (Figure V-1B). L'angle ellipsométrique est supérieur à la décompression par rapport à la compression pour une même pression de surface. Cependant, on note que l'hystérésis de l'angle

ellipsométrique (Figure V-1B) est moins importante pour la monocouche de CMEC que pour la monocouche de LPS (voir § IV.2.1). En effet, le décalage de l'angle ellipsométrique est de  $0,25^\circ$  pour la monocouche de CMEC alors qu'il était de  $1,4$  à  $2^\circ$  pour la monocouche de LPS.

Durant la compression, la pression de surface commence à augmenter à  $125 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ , où les interactions intermoléculaires se mettent en place, pour atteindre  $40 \text{ mN/m}$  à  $57 \text{ \AA}^2/\text{molécule}$ . Cela donne un facteur de compression de  $2,2$  qui est faible par rapport à la monocouche de LPS qui atteint  $35 \text{ mN/m}$  pour un facteur de compression de  $7$  (voir § IV.2.1). La monocouche de CMEC est considérée donc peu compressible. Par ailleurs, l'angle ellipsométrique n'augmente que de  $6^\circ$  à  $10,2^\circ$  ( $1,7$  fois) pour un facteur de compression de  $2,2$ . Cela signifie que la compression de la monocouche de CMEC amène principalement à sa densification sans que son épaisseur augmente de manière significative.

#### V.2.1.2. Relaxation de la monocouche de CMEC

Afin de suivre le comportement de la monocouche de CMEC en des conditions statiques, a suivi au cours du temps a été réalisé par tensiométrie et par ellipsométrie. La Figure V-2 présente l'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique d'une monocouche de CMEC de pression de surface initiale de  $20 \text{ mN/m}$ .

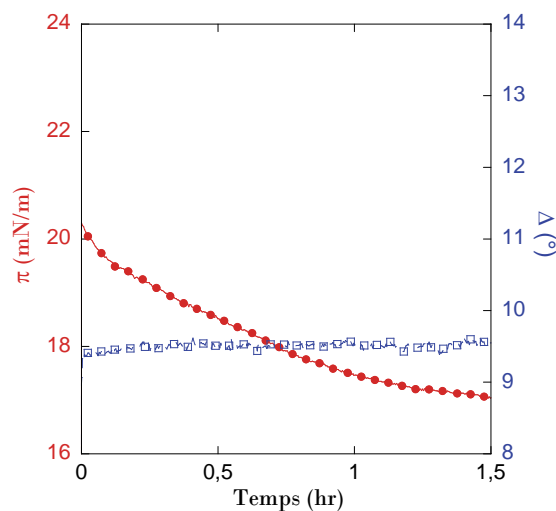


Figure V-2 : Evolution de la pression de surface  $\pi$  et de l'angle ellipsométrique  $\Delta$  durant la relaxation d'une monocouche de CMEC ( $\pi_i = 20 \text{ mN/m}$ ).

Même en absence de tout facteur externe, la pression de surface de la monocouche de CMEC diminue lentement de 3 mN/m au cours des 90 minutes de suivi, alors que l'angle ellipsométrique reste stable.

### **V.2.2. Cinétique d'interaction de l'ovotransferrine avec une monocouche de CMEC**

L'activité membranaire de N-Otf et de DH-Otf vis-à-vis d'une monocouche de CMEC a été étudiée simultanément par tensiométrie et par ellipsométrie sur trois heures. Sous une monocouche de CMEC de pression de surface initiale de 20 mN/m, une solution soit de N-Otf ou de DH-Otf a été injectée à faible et à forte concentration. Les concentrations choisies sont différentes pour N-Otf et DH-Otf en raison des niveaux d'activités très différents des deux protéines. N-Otf a été injectée à des concentrations de 0,4  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  alors que DH-Otf a été injectée à des concentrations dix fois moins importantes, de 0,04  $\mu\text{M}$  et 0,1  $\mu\text{M}$ . La Figure V-3 montre l'évolution de la pression de surface  $\pi$  et de l'angle ellipsométrique  $\Delta$  après injection de N-Otf et de DH-Otf sous une monocouche de CMEC ( $\pi_i = 20 \text{ mN/m}$ ).

Les quatre cinétiques ont débuté dans les mêmes conditions, à savoir une pression de surface initiale de 20 mN/m et un angle ellipsométrique initial de 9,3°. Bien que la cinétique soit différente et malgré les phases de diminution et d'augmentation de la pression de surface, l'angle ellipsométrique n'a à aucun moment été inférieure à la valeur initiale d'une monocouche seule.

Durant la première heure qui suit l'injection sous la monocouche de CMEC de N-Otf à 0,4  $\mu\text{M}$ , la pression de surface chute légèrement (- 0,6 mN/m) tandis que l'angle ellipsométrique reste stable. Par la suite, la pression de surface se stabilise et l'angle ellipsométrique augmente légèrement (+ 0,25°). A plus forte concentration en N-Otf (1  $\mu\text{M}$ ), la cinétique d'évolution de la pression de surface se découpe trois phases : après une légère chute (- 0,25 mN/m en 0,5 h), la pression de surface augmente (+ 0,7 mN/m en 1,5 h) avant de chuter de nouveau (- 0,2 mN/m en 1 h). Dans le même temps, l'angle ellipsométrique est en augmentation constante, de + 0,6° sur les trois heures de la cinétique.



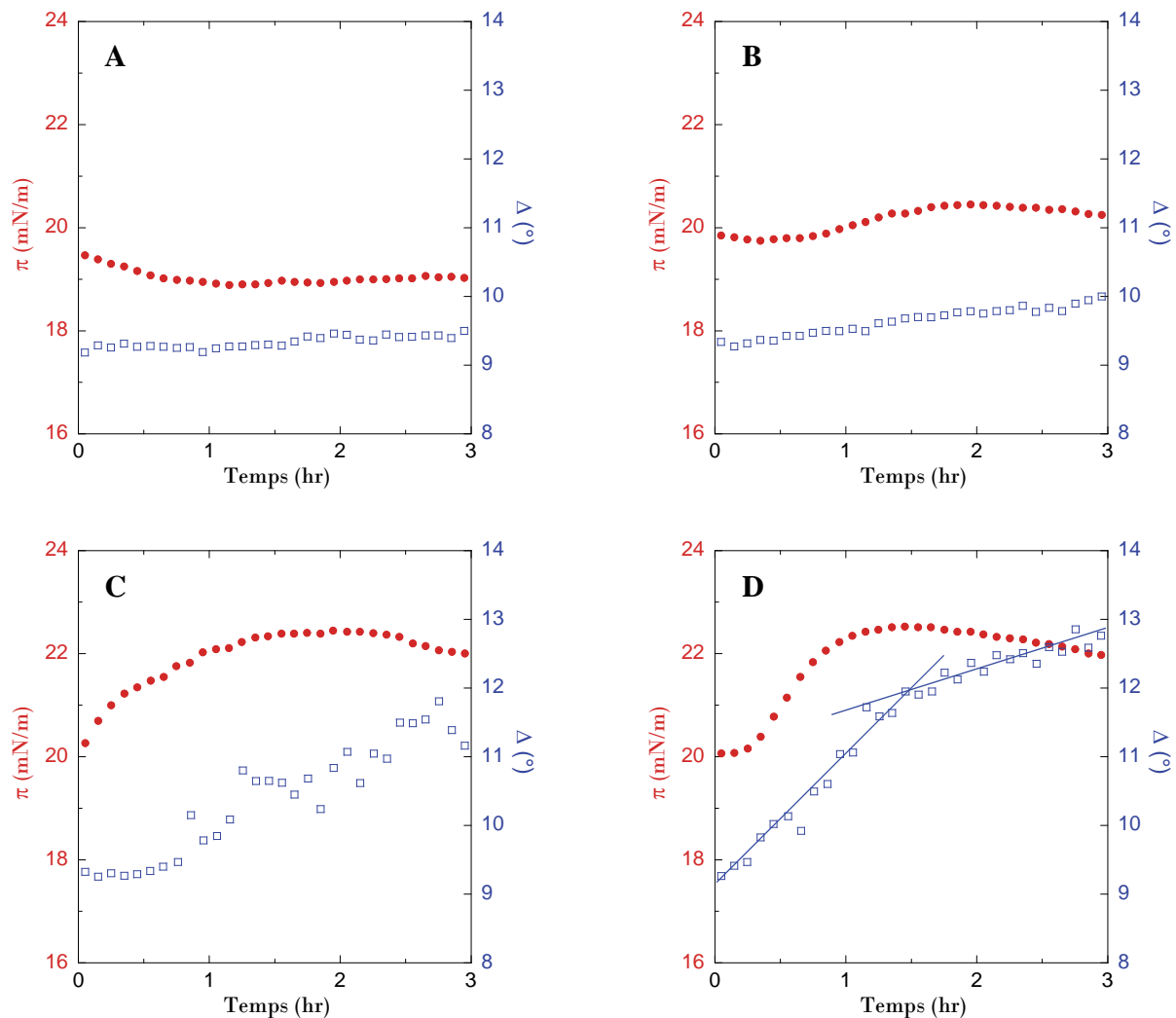


Figure V-3 : Evolution de la pression de surface  $\pi$  (●) et de l'angle ellipsométrique  $\Delta$  (□) d'une monocouche de CMEC ( $\pi_i = 20$  mN/m) après injection en sous-phase de N-Otf à  $0,4 \mu\text{M}$  (A) et  $1 \mu\text{M}$  (B) et de DH-Otf à  $0,04 \mu\text{M}$  (C) et  $0,1 \mu\text{M}$  (D).

Contrairement à N-Otf, l'injection de DH-Otf n'est pas suivie d'une chute de la pression de surface. A concentration de DH-Otf ( $0,04 \mu\text{M}$ ), la pression de surface de la monocouche augmente (+  $2,4$  mN/m en 2 h) puis diminue légèrement (-  $0,6$  mN/m en 1 h), tandis que l'angle ellipsométrique augmente de  $2,0^\circ$  sur les 3 h de la cinétique. Une concentration plus élevée en DH-Otf ( $0,1 \mu\text{M}$ ) entraîne une augmentation plus rapide de la pression de surface (1,5 h) et légèrement plus forte (+  $2,5$  mN/m), suivie d'une diminution de -  $0,6$  mN/m en 1,5 h. L'augmentation de l'angle ellipsométrique est également plus importante à une concentration plus élevée en DH-Otf : +  $3,5^\circ$  en 3 h à  $0,1 \mu\text{M}$  *versus* +  $2,0^\circ$  à  $0,04 \mu\text{M}$ . On peut noter que l'angle ellipsométrique

augmente en deux phases qui coïncident avec les phases d'augmentation et de diminution de la pression de surface. Durant la phase d'augmentation de la pression de surface, l'angle ellipsométrique augmente au rythme de  $1,9^\circ/\text{h}$ , contre  $0,6^\circ/\text{h}$  durant la phase de diminution de la pression de surface.

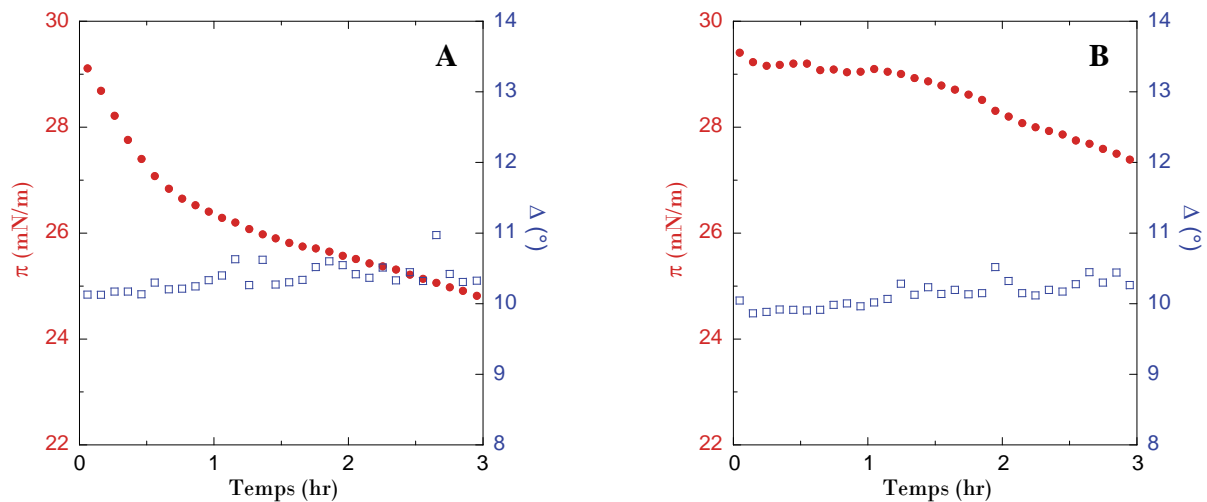


Figure V-4 : Evolution de la pression de surface  $\pi$  (●) et de l'angle ellipsométrique  $\Delta$  (□) d'une monocouche de CMEC ( $\pi_i = 30$  mN/m) après injection en sous-phase de DH-Otf à  $0,04 \mu\text{M}$  (A) et  $0,1 \mu\text{M}$  (B).

Afin d'évaluer l'effet de la pression de surface initiale de la monocouche de CMEC, des cinétiques d'interaction ont été réalisées à une pression de surface initiale de  $30$  mN/m. Après injection de DH-Otf à  $0,04 \mu\text{M}$  ou à  $0,1 \mu\text{M}$  (Figure V-4A et Figure V-4B), la pression de surface de la monocouche diminue, tandis que l'angle ellipsométrique augmente légèrement. A la concentration de  $0,04 \mu\text{M}$  en DH-Otf (Figure V-4A), la pression de surface de la monocouche chute brutalement ( $-2,4$  mN/m) au cours des 45 premières minutes, l'angle ellipsométrique reste stable. Au-delà, la pression de surface diminue moins rapidement ( $-2,0$  mN/m en 195 min), parallèlement à une légère augmentation de l'angle ellipsométrique ( $+0,25^\circ$ ). Une concentration plus élevée de DH-Otf ( $0,1 \mu\text{M}$ ) entraîne une diminution moins conséquente de la pression de surface, mais toujours en deux phases. La pression de surface diminue d'abord faiblement ( $-0,4$  mN/m en 1 h) avant de diminuer plus rapidement ( $-1,8$  mN/m en 2 h). Cette diminution de la pression de surface est accompagnée d'une légère augmentation continue de l'angle ellipsométrique ( $+0,4^\circ$  en 3 h).

### **V.2.3. Topographie AFM de la monocouche de CMEC avant et après injection d'ovotransferrine**

Pour observer l'impact de l'interaction de l'Otf sur l'organisation de la monocouche de CMEC, des images de la surface d'une monocouche de CMEC ont été réalisées par AFM, avant et après injection en sous-phase de différentes concentrations de N-Otf et de DH-Otf. Avant interaction, les images AFM ont été faites sur une monocouche de CMEC de pression de surface initiale 20 mN/m. Les images AFM sont présentées dans les Figure V-5 et Figure V-6.

#### **V.2.3.1. Topographie AFM de la monocouche de CMEC seule**

Des images AFM de  $(5 \times 5) \mu\text{m}^2$  ont été réalisées sur une monocouche de CMEC seule ( $\pi_i = 20 \text{ mN/m}$ ) après 10 min (Figure V-5A) et 2 h de relaxation (Figure V-5B). Les Figure V-5C et D présentent une analyse comparative entre les monocouches de CMEC selon la durée de relaxation. Les Figure V-5E et F montrent quelques propriétés topographiques de la Figure V-5B.

Les images AFM de la monocouche de CMEC (Figure V-5A et Figure V-5B) montrent la présence de deux zones : une zone continue de faible hauteur et une zone dispersées de hauteur supérieure. La zone continue correspond aux phospholipides à l'état LE et la zone dispersée correspond aux phospholipides à l'état LC. La différence de hauteur entre les deux zones est de  $1,1 \pm 0,1 \text{ nm}$  identique après 10 min et 2 h de relaxation de la monocouche. Dans les deux images, on distingue des domaines LC de grande taille et une forme ronde ou ovale, et des domaines LC de petite taille et de forme plus irrégulière.

Le contour des domaines LC apparaît moins rugueux après 2 h de relaxation qu'après 10 min de relaxation. Des mesures de la surface et du périmètre des domaines LC, relevées sur plusieurs images de monocouches de CMEC après 10 min et après 2 h de relaxation, ont permis de tracer la relation entre le périmètre et la surface<sup>1/2</sup> des domaines LC pour les deux durées de relaxation (Figure V-5C). L'ensemble des domaines possèdent un périmètre supérieur à celui d'un cercle d'une surface identique. Les droites de régression établies indiquent des pentes significativement différentes, de 5,52 et 4,43 respectivement pour 10 min et 2 h de relaxation. A surface équivalente, le périmètre des domaines LC diminue donc de 20% entre 10 min et 2 h de

relaxation. Le périmètre des domaines LC et le contact entre les deux zones de la monocouche de CMEC diminuent au cours du temps. Ainsi, le contour des domaines LC évolue : « rugueux » au début de la formation de la monocouche, il devient plus « lisse » avec la relaxation.

Entre les deux images AFM présentées dans les Figure V-5A et Figure V-5B, le nombre de domaines LC de petite taille est moins important à 10 min qu'à 2 h de relaxation. Afin d'objectiver cette observation, la surface de tous les domaines LC a été mesurée pour trois images AFM d'une monocouche de CMEC, pour les deux durées de relaxation. La Figure V-5D montre la distribution des domaines LC en fonction de leur taille, exprimée en diamètre équivalent. Ainsi, on distingue deux populations de domaines LC selon leur taille. La première population, de petite taille avec un diamètre équivalent  $<0,4 \mu\text{m}$  ( $<0,2 \mu\text{m}$  à 10 min de relaxation) et la deuxième population, de grande taille avec un diamètre équivalent  $>0,6 \mu\text{m}$ . Aucun domaine LC n'a une taille comprise entre  $0,4$  et  $0,6 \mu\text{m}$  (entre  $0,2$  et  $0,6 \mu\text{m}$  à 10 min de relaxation). Pour la monocouche de CMEC à 10 min de relaxation, le nombre des tout petits domaines LC (moins de  $0,035 \text{ nm}$  de diamètre équivalent) est très élevé ; il atteint 48% du nombre total, alors qu'il n'est plus que de 12% à 2 h de relaxation. Au total, la population de petite taille est plus importante à 10 min de relaxation ; elle représente 93% du nombre total des domaines LC, contre 73% à 2 h de relaxation.

La distribution des hauteurs d'une monocouche de CMEC à 2 h de relaxation (Figure V-5E) montre que les domaines LC possèdent deux niveaux de hauteur avec une légère différence de  $1,6 \text{ \AA}$ . Le profil de la monocouche de CMEC (Figure V-5F) permet de mieux visualiser les variations de hauteur entre les différentes zones et d'avoir une mesure locale plus fine. Le profil montre que le domaine LC contient deux régions d'une hauteur légèrement différente de  $0,9 \text{ \AA}$ . La coexistence de deux sous-domaines LC est présente aussi pour la monocouche de CMEC à 10 min de relaxation, mais son observation est moins évidente.

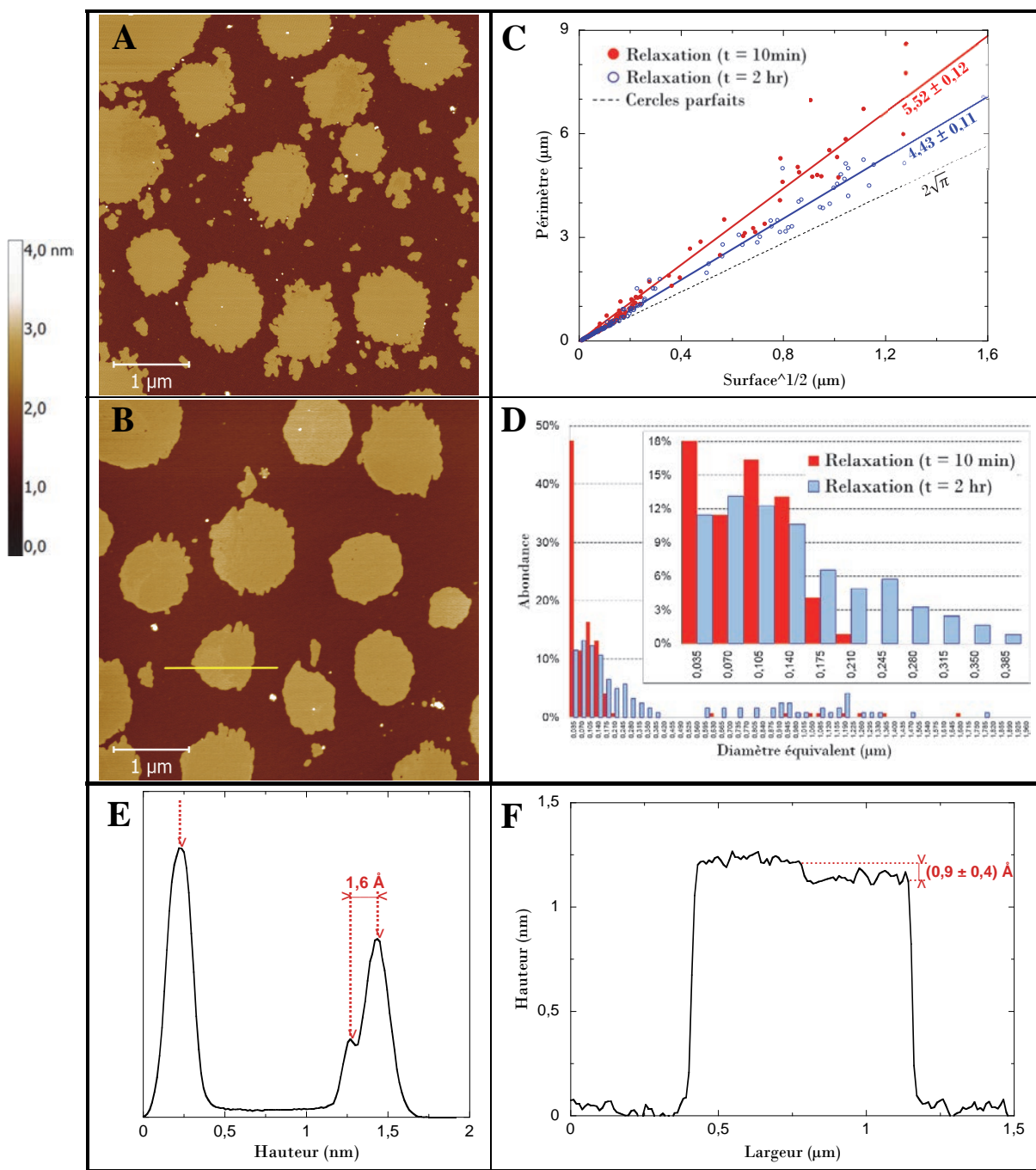


Figure V-5 : Topographie et analyse des images d'une monocouche de CMEC ( $\pi_i = 20$  mN/m) après une durée de relaxation de 10 min (A) et de 2 h (B). C : Evolution du périmètre des domaines LC en fonction de  $\sqrt{\text{Surface}}$  après 10 min et 2 h de relaxation. D : Abondance des domaines LC selon leur taille (diamètre équivalent) après 10 min et 2 h de relaxation. E : Distribution des hauteurs de l'image B. F : Profil de la section en jaune dans l'image B.

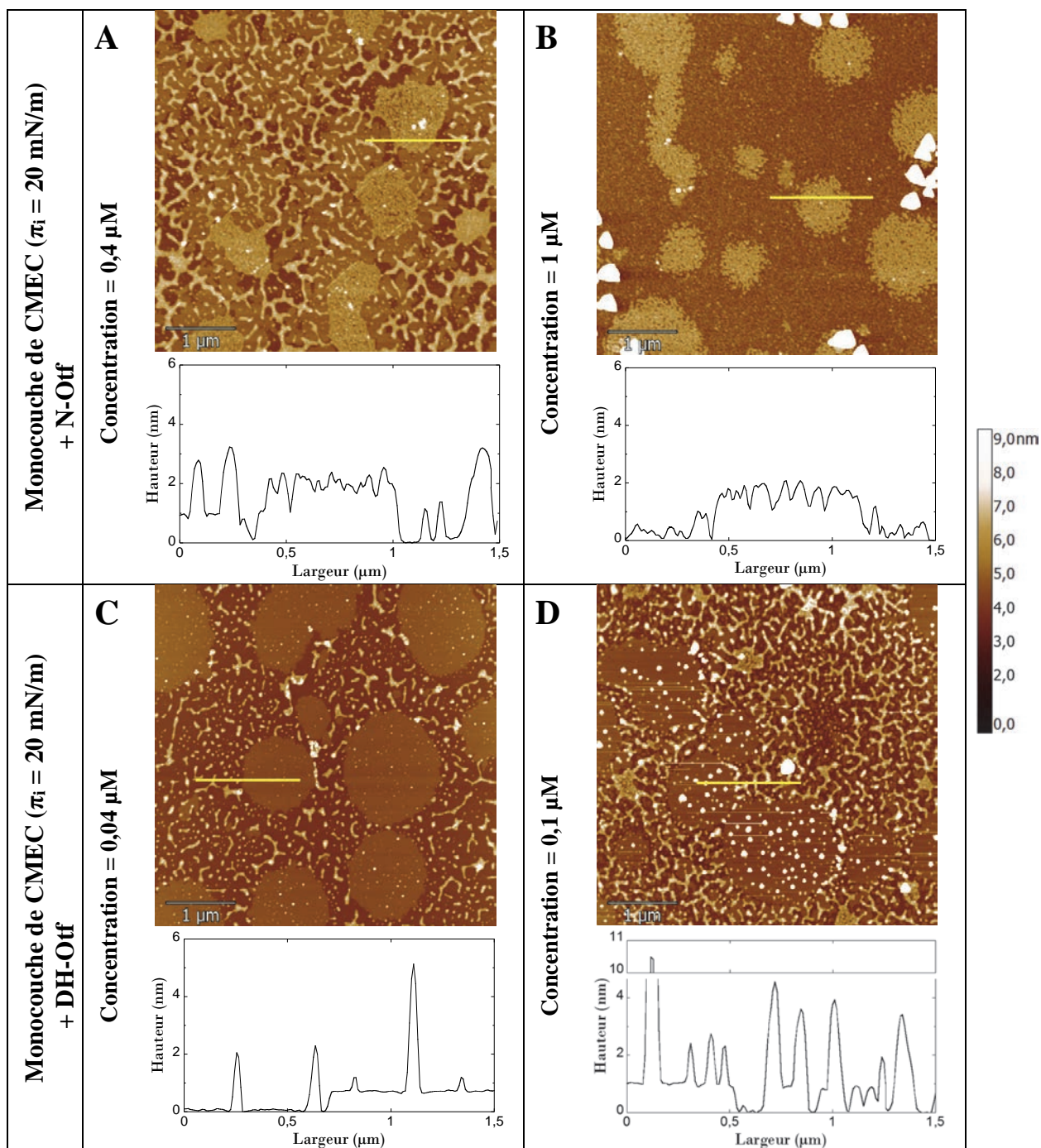


Figure V-6 : Images topographiques AFM ( $5 \times 5$ )  $\mu\text{m}^2$  et profils de monocouche de CMEC après injection en sous-phase de N-Otf à 0,4  $\mu\text{M}$  (A) ou 1  $\mu\text{M}$  (B), ou de DH-Otf à 0,4  $\mu\text{M}$  (C) ou 1  $\mu\text{M}$  (D). Les profils correspondent à la section jaune sur chaque image.

### V.2.3.2. Topographie AFM de la monocouche de CMEC après injection en sous-phase de l'ovotransferrine native et chauffée à sec

Les images AFM de la Figure V-6 sont celles d'une monocouche de CMEC 2 h après injection en sous-phase de N-Otf ou de DH-Otf. Deux niveaux de concentrations (faible et forte) ont été employés pour chaque forme de la protéine. Les concentrations employées pour les deux protéines étaient différentes en raison de leur différence de comportement vis-à-vis de la monocouche de CMEC. Les Figure V-6A et Figure V-6B présentent la topographie ainsi qu'un profil de la monocouche de CMEC après injection de 0,4  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$  de N-Otf respectivement. Les Figure V-6C et Figure V-6D présentent la topographie ainsi qu'un profil de la monocouche de CMEC après injection de 0,04  $\mu\text{M}$  et 0,1  $\mu\text{M}$  de DH-Otf respectivement.

Par comparaison avec une monocouche seule (Figure V-5), l'ensemble des images AFM de la Figure V-6 montrent que la répartition des phospholipides en phases LE et LC est conservée. Néanmoins, l'aspect global de la monocouche est profondément modifié suite à l'interaction de N-Otf et de DH-Otf. L'effet de N-Otf (Figure V-6A et Figure V-6B) et de DH-Otf (Figure V-6C et Figure V-6D) sur la monocouche de CMEC est très différent. Par ailleurs, les modifications générées sur la monocouche varient également en fonction de la concentration protéique, pour N-Otf comme pour DH-Otf.

Après interaction de la monocouche de CMEC avec 0,4  $\mu\text{M}$  de N-Otf (Figure V-6A), les domaines LC présentent un contour rugueux. Des éléments (couleur claire) apparaissent sur la monocouche au niveau des deux phases ; les dimensions de ces éléments sont rapportées dans le Tableau V-1. Deux types d'objets ponctuels peuvent être distingués selon leur hauteur sur chacune des deux phases, LE et LC. La hauteur et la largeur des petits objets ( $H = 1,0 \text{ nm}$  ;  $L \sim 56 \text{ nm}$ ) sont identiques pour les deux phases. De même, les grands objets possèdent la même hauteur et la même largeur ( $H = 2,2 \text{ nm}$  ;  $L \sim 83 \text{ nm}$ ) au niveau des deux phases. Un autre type d'éléments sous forme de filaments réticulés ( $H = 3,0 \text{ nm}$  ;  $L \sim 105 \text{ nm}$ ) se situent principalement au niveau de la phase LE, même s'ils débordent aussi sur la phase LC. Une autre structure apparaît sur la phase LE ; il s'agit de régions de rugosité élevée ( $H = 1,8 \text{ nm}$  ;  $RMS = 0,36 \text{ nm}$ ) et couvrant de grandes surfaces qui peuvent atteindre 1  $\mu\text{m}^2$ . L'injection d'une concentration plus élevée de 1  $\mu\text{M}$  de N-Otf (Figure V-6B) entraîne un changement radical de la surface de la monocouche de CMEC. Les deux phases LE et LC peuvent toujours être distinguées, mais leur aspect est totalement modifié. La

différence de hauteur entre les deux phases est pratiquement conservée (1,2 nm contre 1,1 nm pour une monocouche seule). Mais la surface de la monocouche est complètement rugueuse au niveau de la phase LE et de la phase LC.

Tableau V-1 : Récapitulatif des dimensions des différents éléments observés sur la monocouche de CMEC après interaction avec N-Otf (0,4  $\mu\text{M}$  et 1  $\mu\text{M}$ ) et DH-Otf (0,04  $\mu\text{M}$  et 0,1  $\mu\text{M}$ ). N.D : signifie « non déterminé » pour les éléments difficiles à mesurer en raison de la complexité du système. La hauteur des éléments est mesurée par rapport à la phase dans laquelle ils se trouvent.

		N-Otf		DH-Otf	
		0,4 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	0,04 $\mu\text{M}$	0,1 $\mu\text{M}$
Phase liquide expansé	Hauteur de la phase (nm)	0	0	0	0
	RMS de la phase (nm)	N.D	0,28 $\pm$ 0,02	N.D	N.D
	<i>Petits objets</i>				
	Hauteur (nm)	1,0 $\pm$ 0,2	-	1,4 $\pm$ 0,3	N.D
	Largeur (nm)	57 $\pm$ 5		48 $\pm$ 4	
	<i>Grands objets</i>				
	Hauteur (nm)	2,2 $\pm$ 0,3	-	3,1 $\pm$ 0,4	N.D
	Largeur (nm)	79 $\pm$ 8		78 $\pm$ 10	
	<i>Filaments</i>				
	Hauteur (nm)	3,0 $\pm$ 0,3	-	3,2 $\pm$ 0,6	3,6 $\pm$ 0,5
Largeur (nm)	105 $\pm$ 16		92 $\pm$ 12	96 $\pm$ 10	
<i>Régions rugueuses</i>					
Hauteur (nm)	1,8 $\pm$ 0,2	-	-	-	
RMS (nm)	0,36 $\pm$ 0,05				
Phase liquide condensé	Hauteur de la phase (nm)	1,0 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1
	RMS de la phase (nm)	N.D	0,37 $\pm$ 0,04	N.D	N.D
	<i>Petits objets</i>				
	Hauteur (nm)	1,0 $\pm$ 0,2	-	0,9 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3
	Largeur (nm)	55 $\pm$ 9		45 $\pm$ 6	56 $\pm$ 7
	<i>Grands objets</i>				
	Hauteur (nm)	2,2 $\pm$ 0,2	-	3,0 $\pm$ 0,7	8,4 $\pm$ 3,9
	Largeur (nm)	87 $\pm$ 10		59 $\pm$ 6	88 $\pm$ 15
	<i>Filaments</i>				
	Hauteur (nm)	2,3 $\pm$ 0,2	-	-	-
Largeur (nm)	95 $\pm$ 15				

Après injection de DH-Otf (Figure V-6C et Figure V-6D), les domaines de la phase LC sont pratiquement ronds avec un contour lisse. Ils sont toutefois plus fragmentés à 0,1  $\mu\text{M}$  de DH-Otf qu'à 0,04  $\mu\text{M}$ . De petits et de grands objets apparaissent sur la phase LE et sur la phase LC de la monocouche de CMEC. Les petits objets sont légèrement plus hauts sur la phase LE que sur la phase LC (1,4 nm contre 1,0 nm ; Largeur  $\sim$  50 nm). La taille des grands objets au niveau de



la phase LC évolue très fortement avec la concentration en DH-Otf. En effet, leur hauteur est pratiquement triplée entre 0,04  $\mu\text{M}$  et 0,1  $\mu\text{M}$  de DH-Otf (de 3,0 nm à 8,4 nm), avec une largeur également plus importante (de 59 nm à 88 nm). Par ailleurs, des structures filamenteuses sont présentes au niveau de la phase LE ( $H \sim 3,4$  nm ;  $L \sim 94$  nm), mais totalement absentes sur les domaines de la phase LC. Ces filaments sont courts et non connectés à 0,04  $\mu\text{M}$  de DH-Otf, alors qu'ils plus longs, plus réticulés et enchevêtrés à 0,1  $\mu\text{M}$  de DH-Otf.

### **V.3. Discussion**

#### **V.3.1. La monocouche de CMEC est peu compressible avec une forte tendance à la relaxation**

La monocouche de CMEC est caractérisée par une faible compressibilité. Le facteur de compression de 2,2 obtenu avec la monocouche de CMEC est cohérent avec les valeurs mentionnées dans la littérature pour des monocouches d'autres phospholipides [76, 208, 209]. La monocouche de CMEC s'avère ainsi plus sensible à la diminution de l'aire moléculaire qu'une monocouche de LPS (voir § IV.2.1), en raison de la structure plus rigide des phospholipides. Cela se traduit par une augmentation plus importante des forces latérales à la compression, ce qui explique la faible compressibilité de la monocouche de CMEC.

L'hystérésis négative, de la pression de surface en fonction de l'aire moléculaire, traduit une différence de comportement de la monocouche à la décompression par rapport à la compression. La perte de l'agencement des phospholipides à la décompression est moins rapide par rapport à la vitesse de l'agencement des phospholipides à la compression. Ainsi, les phospholipides de la monocouche de CMEC perdent leur agencement plus lentement à la décompression qu'ils ne s'organisent lors de la compression. Pour cette raison, la pression de surface chute très brutalement d'environ 3,5 mN/m dès le début de la décompression. Pour une même densité moléculaire, les phospholipides de la monocouche sont plus ordonnés à la décompression, ce qui réduit l'énergie du système et par conséquent la pression de surface.

La monocouche de CMEC a tendance à se relaxer pour réduire les forces latérales entre les phospholipides le constituant. La diminution de la pression de surface d'une monocouche statique n'est pas liée à une perte de matière de l'interface, mais traduit un phénomène de relaxation de la monocouche. En effet, la valeur constante de l'angle ellipsométrique prouve le maintien des phospholipides dans la monocouche. Cette résultat est confirmé par l'analyse du nombre et du contour des domaines LC, observés sur des images AFM d'une monocouche de CMEC à des durées de relaxation différentes. En effet, les domaines LC de la monocouche de CMEC fusionnent et coalescent durant la relaxation. Ainsi, les domaines de petite taille fusionnent avec les domaines de grande taille ce qui explique la diminution de la première population (de 93% à 73% du nombre total des domaines LC entre 10 min et 2 h de relaxation). Les domaines de petite taille fusionnent

aussi entre eux, permettant d'agrandir leur taille jusqu'à 0,4  $\mu\text{m}$  de diamètre équivalent. Par ailleurs, durant la relaxation, des remaniements interviennent au sein de la monocouche de CMEC, qui tendent à réduire la surface de contact entre les différents domaines. Ainsi, le contour des domaines LC devient moins « rugueux » après une longue durée de relaxation. De plus, les domaines LC semblent s'organiser en sous-domaines, de hauteurs différentes. Ce comportement, de relaxation de la monocouche de CMEC, est lié à sa composition en cinq différents types de phospholipides. L'énergie de ce système hétérogène est élevée pour une monocouche fraîchement formée. Elle baisse pour être plus stable, par la ségrégation des phospholipides qui la constituent. La ségrégation progressive des phospholipides aboutit à leur organisation en domaines de phospholipides de structure et de propriétés proches. Le contact et les interactions entre des phospholipides de propriétés différentes étant alors réduit, le système devient plus stable énergétiquement et la pression de surface de la monocouche diminue. Cependant, on peut noter que la diminution de la pression de surface est lente et progressive, ce qui indique que la ségrégation des phospholipides est elle-même un phénomène lent.

### **V.3.2. L'adsorption est le principale mode d'interaction de l'ovotransferrine avec la monocouche de CMEC**

L'aptitude de N-Otf à interagir avec la monocouche de CMEC est démontrée dans notre étude par l'ensemble des résultats obtenus. Alors que la monocouche de CMEC pure voit sa pression de surface diminuer au cours du temps sous l'effet de sa relaxation, cette chute de la pression de surface n'est plus observée en présence de N-Otf. A faible concentration (0,4  $\mu\text{M}$ ), N-Otf stabilise la pression de surface à une valeur supérieure à celle de la monocouche seule. A une concentration plus élevée (1  $\mu\text{M}$ ), N-Otf s'insère même faiblement dans la monocouche de CMEC, comme en témoigne la très légère augmentation de la pression de ( $\Delta\pi < 1 \text{ mN/m}$ ). Cependant, l'insertion reste négligeable et l'adsorption de N-Otf semble être le principale mode d'interaction avec la monocouche de CMEC. En effet, malgré des concentrations considérables en sous-phase, l'augmentation de la pression de surface est très faible. Par ailleurs, les images AFM (Figure V-6A et Figure V-6B) montrent que la monocouche de CMEC subit de grandes modifications. Ce résultat est ainsi cohérent avec ceux rapportés par *Aguilera et al* [6] qui n'ont pas observé de perméabilisation de la membrane interne par N-Otf, ni sur culture bactérienne d'*E. coli*, ni sur

liposomes. Or, à défaut d'une insertion de N-Otf, la membrane interne ne peut être perméabilisée que s'il y a *a minima* insertion de N-Otf.

L'insertion très limitée de N-Otf dans la monocouche de CMEC tient à la fois aux propriétés de N-Otf et à celles des phospholipides. La charge globale neutre de N-Otf au pH de travail (pH 7,0) en particulier, limite son insertion dans la monocouche de CMEC composée de phospholipides anioniques et zwitterioniques. On peut en effet noter qu'avec la même monocouche de CMEC et dans les mêmes conditions, la densité élevée du lysozyme en charges positives lui confère une capacité d'insertion à des concentrations plus faibles [9]. En outre, la faible compressibilité de la monocouche de CMEC pourrait aussi être un facteur responsable de l'insertion négligeable de N-Otf. En effet, l'insertion protéique se trouve mécaniquement limitée par la faible compressibilité de la monocouche, nécessitant alors une énergie importante. Au final, l'adsorption de N-Otf à la monocouche de CMEC serait seule responsable de toutes les modifications observées quant à l'organisation et la structure de la monocouche (Figure V-6A et Figure V-6B).

### **V.3.3. Le chauffage à sec confère à l'ovotransferrine de nouvelles modalités d'interaction avec la monocouche de CMEC**

Les propriétés membranotropes de l'ovotransferrine vis-à-vis de la monocouche de CMEC sont remarquablement accrues par les modifications des propriétés physico-chimiques de la protéine apportées par le chauffage à sec. En effet, l'interaction de DH-Otf avec la monocouche de CMEC engendre une augmentation plus importante de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique, et ce à des concentrations protéiques plus faibles que celles nécessaires avec N-Otf (Figure V-3).

DH-Otf semble interagir avec la monocouche de CMEC par deux mécanismes successifs. Au tout début, en présence d'une monocouche de CMEC libre, DH-Otf interagit préférentiellement avec la monocouche par insertion entre les molécules de phospholipides. Cette insertion est responsable de l'augmentation de la pression de surface de la monocouche. Une fois un certain niveau de pression de surface atteint, l'insertion de DH-Otf s'arrête, en raison vraisemblablement de l'énergie élevée nécessaire dans ces conditions. Cependant, DH-Otf continue à interagir avec la

monocouche de CMEC, cette fois-ci par adsorption aux têtes polaires des phospholipides, comme en témoigne l'augmentation de l'angle ellipsométrique. Cette étape d'adsorption de DH-Otf est associée à une baisse de la pression de surface, qui peut être expliquée par le changement de densité des phospholipides adsorbés au DH-Otf ce qui compacterait localement les phospholipides, et donc fait diminuer la pression de surface de la monocouche. L'affinité de DH-Otf pour la région apolaire de la monocouche serait plus importante que son affinité pour la région polaire. En effet, l'étape d'insertion de DH-Otf précède l'étape d'adsorption et intervient selon une cinétique plus rapide, comme le montre l'évolution de l'angle ellipsométrique (Figure V-3D).

Les modifications des propriétés physico-chimiques de l'ovotransferrine apportées par chauffage à sec sont responsables du pouvoir d'insertion de DH-Otf et de son adsorption accrue à la monocouche de CMEC. Une charge positive plus élevée que celle de N-Otf pourrait renforcer les interactions électrostatiques avec les têtes polaires des phospholipides anioniques, favorisant ainsi l'adsorption à la monocouche. La flexibilité accrue de la structure protéique de DH-Otf par rapport à la forme protéique native et l'augmentation de son hydrophobie de surface pourraient quant à elles faciliter son insertion dans la monocouche. Une fois encore, la taille de la protéine ne semble pas un facteur déterminant en lui seul pour la capacité d'insertion dans la monocouche de CMEC. En effet, bien que l'ovotransferrine soit une protéine de grande taille, de légères modifications de ses caractéristiques propriétés physico-chimiques semblent suffire pour conférer à l'ovotransferrine une aptitude à l'insertion dans une monocouche de CMEC.

#### **V.3.4. L'ovotransferrine native et chauffée à sec interagissent préférentiellement avec la phase liquide expansée de la monocouche de CMEC**

Les deux types d'ovotransferrine possèdent une affinité supérieure pour la phase LE de la monocouche de CMEC, par rapport à la phase LC. En effet, à faible concentration protéique (0,4  $\mu\text{M}$  de N-Otf et 0,04  $\mu\text{M}$  de DH-Otf), les images AFM (Figure V-6) montrent que la monocouche de CMEC est plus impactée au niveau de la phase LE que de la phase LC. Cela signifie que N-Otf et DH-Otf interagissent préférentiellement avec la phase.

Le polymorphisme des têtes polaires des phospholipides entre les phases LE et LC serait responsable de la différence de comportement de N-Otf entre les deux phases. En effet, N-Otf interagit principalement par adsorption au niveau de la région polaire de la monocouche de CMEC (voir §V.3.1). Le polymorphisme des phospholipides au niveau des chaînes apolaires n'a donc a priori pas d'influence sur l'adsorption de N-Otf à la monocouche de CMEC. Par ailleurs, la conformation des phospholipides à l'état LE rend les têtes polaires plus accessibles pour établir des interactions électrostatiques avec N-Otf. En effet, la conformation moins compacte des phospholipides à l'état LE augmente la distance entre les têtes polaires. C'est pourquoi N-Otf a un impact plus important au niveau de la phase LE, par rapport à la phase LC. En revanche, le polymorphisme des têtes polaires et des chaînes apolaires des molécules de phospholipides, entre les phases LE et LC, interviendrait dans l'interaction de DH-Otf avec la monocouche de CMEC. En effet, comme pour N-Otf, le polymorphisme des têtes polaires influencerait l'adsorption de DH-Otf qui serait facilitée dans la phase LE. En outre, le changement conformationnel des phospholipides au niveau des chaînes aliphatique influencerait l'affinité de DH-Otf pour la région hydrophobe des phospholipides.

### **V.3.5. L'interaction de l'ovotransferrine native et chauffée à sec avec la monocouche de CMEC se traduit par plusieurs types d'impacts**

L'étude de la topographie du film moléculaire après interaction avec N-Otf et DH-Otf (Figure V-6) montre l'apparition de plusieurs éléments (Tableau V-1) qui correspondent à différents types d'interactions des protéines avec la monocouche de CMEC. L'existence de plusieurs types d'éléments sur la monocouche est la preuve de la multitude des modalités d'interaction entre l'ovotransferrine et la monocouche de CMEC. Cette diversité résulte à la fois de la nature de la monocouche de CMEC et de la nature des deux formes d'ovotransferrine. En effet, la monocouche de CMEC est un mélange complexe de cinq types de phospholipides, de structures et de propriétés différentes, et qui sont de plus présents dans la monocouche sous forme LE ou LC, ce qui participe aussi de la complexité du système. Quant aux deux formes d'ovotransferrine, leur aptitude à établir à la fois des interactions électrostatiques et des interactions hydrophobes est aussi responsable de la multitude de types d'interactions avec la monocouche.

La hauteur des différents éléments observés sur le film moléculaire peut donner des indications quant aux types d'interactions protéine/monocouche, connaissant l'épaisseur de la monocouche et les dimensions de N-Otf et de DH-Otf. Ainsi, les petits objets, d'une hauteur d'environ 1 nm ne correspondent à l'ovotransferrine, ni adsorbée, ni insérée ; il s'agirait plutôt de perturbations de l'arrangement des phospholipides, générés par l'ovotransferrine. Ainsi, l'ovotransferrine interagirait avec la monocouche sans s'y adsorber, en créant des décalages locaux et permanents dans l'arrangement des phospholipides. Les grands objets, en revanche, correspondent probablement à de l'ovotransferrine insérée ou adsorbée. La hauteur de ces grands objets varie entre N-Otf et DH-Otf mais aussi en fonction de la concentration pour DH-Otf. L'augmentation de la concentration en DH-Otf de 0,04  $\mu\text{M}$  à 0,1  $\mu\text{M}$  entraîne, au niveau de la phase LC, l'agrandissement de ces grands objets, par l'augmentation à la fois de leur hauteur (de  $3,0 \pm 0,7$  nm à  $8,4 \pm 3,9$  nm) et leur largeur (de  $59 \pm 6$  nm à  $88 \pm 15$  nm). Les molécules de DH-Otf, préalablement adsorbées à la monocouche semblent jouer le rôle de précurseurs de l'agrégation de DH-Otf au niveau de la monocouche, comme en témoigne l'agrandissement progressif des grands objets. Les éléments sous forme de filaments, présents au niveau de la phase LE principalement avec N-Otf et exclusivement avec DH-Otf correspondraient à de l'ovotransferrine adsorbée ou insérée à la monocouche, compte tenu de la hauteur de ces filaments, qui varie entre 2,3 nm et 3,6 nm. Ces filaments se développent avec l'augmentation de la concentration de 0,04  $\mu\text{M}$  à 0,1  $\mu\text{M}$  et prennent un aspect plus long, continu et réticulé. Le développement de ces filaments peut être expliqué par l'interaction de l'ovotransferrine qui se trouve favorisée au niveau des régions de la monocouche présentant déjà une perturbation, qui revient à une adsorption ou une insertion préalable d'autres molécules d'ovotransferrine. Ainsi, les premières perturbations, au niveau de la monocouche, servent comme amorces pour la prolifération de cette perturbation qui prennent la forme de filaments diffusés.

En résumé, la complexité de ce système monocouche/protéine permet à N-Otf et à DH-Otf d'établir des interactions avec la monocouche de CMEC selon une multitude de modalités. Cela se manifeste par différents éléments présents sur les images AFM du film moléculaire après interaction. Certains de ces éléments ont la particularité de se développer localement (les grands objets) ou par propagation (les filaments). Leur développement poursuit sur des sites de la monocouche présentant un défaut, il s'agit des sites initiaux d'interaction de N-Otf ou DH-Otf qui servent comme amorces.

#### V.4. Conclusion

La présente étude montre que N-Otf possède une activité membranotrope vis-à-vis de la monocouche de CMEC, modèle de la membrane interne d'*E. coli* K12. N-Otf interagit avec la monocouche de CEMC principalement par adsorption aux têtes polaires des phospholipides. L'adsorption de N-Otf a plusieurs conséquences sur l'organisation de la monocouche. Elle limite la ségrégation naturelle des phospholipides qui, en absence de protéines, tendent à réduire la ligne de contact entre les phases LE et LC de la monocouche. La relaxation de la monocouche se trouve ainsi limitée et la pression de surface de la monocouche reste relativement stable. En outre, l'adsorption de N-Otf entraîne l'apparition de défauts dans la monocouche de CMEC et une perturbation dans l'organisation des phospholipides. Ainsi, différents éléments apparaissent sur la monocouche avec la présence de zones plus rugueuses.

Le chauffage à sec modifie l'activité membranaire de l'ovotransferrine. L'activité de l'ovotransferrine s'intensifie permettant son interaction avec la monocouche de CMEC à des plus faibles concentrations. L'ovotransferrine acquiert aussi, après chauffage à sec, une capacité d'insertion dans la monocouche de CMEC. Cette insertion est associée à une adsorption accrue à la région polaire de la monocouche. Les faibles modifications des propriétés physico-chimiques de l'ovotransferrine, induits par son chauffage à sec, sont responsables des changements de son activité membranaire. Sa structure protéique plus flexible, associé à une hydrophobie de surface plus élevée pourraient être à l'origine de la capacité d'insertion de DH-Otf entre les phospholipides, pour finalement interagir avec la région hydrophobe de la monocouche. Aussi, la surface plus cationique de DH-Otf pourrait être à l'origine de son adsorption plus importante à la région polaire de la monocouche. Toutefois, DH-Otf a une affinité plus importante pour la région hydrophobe que pour la région polaire. Par ailleurs, l'activité membranaire de DH-Otf engendre différents types de défauts au niveau de la monocouche de CMEC, défauts qui traduisent tous une modification de l'arrangement des phospholipides.

L'ovotransferrine native et chauffée interagit préférentiellement avec les phospholipides à l'état liquide expansé, par rapport à l'état liquide condensé. Le polymorphisme des phospholipides entre ces deux états serait à l'origine de cette différence d'affinité. Par ailleurs, les défauts de la monocouche de CMEC, produits par l'interaction de l'ovotransferrine, ont tendance à se développer localement (les grands objets) ou latéralement (les filaments). Ceci peut être expliqué



par le fait que l'interaction favorisée de l'ovotransferrine au niveau des régions, de la monocouche de CMEC, présentant des défauts préalables qu'au niveau des régions encore conservées.

## Conclusion générale

---

La lutte contre les bactéries nécessite l'emploi d'agents antimicrobiens. Dans le domaine pharmaceutique, les antibiotiques sont employés pour le traitement et la prévention des infections bactériennes. En agro-alimentaire, des conservateurs sont ajoutés aux produits pour inhiber le développement bactériens assurant ainsi la qualité des produits sur de longues périodes. Etant donné que ces agents antibactériens sont exposés au développement de résistance par les bactéries, leur efficacité peut être réduite au cours des années. Pour empêcher ou pour limiter le développement d'une résistance bactérienne, une approche consiste à agir sur l'intégrité des membranes bactériennes qui sont des structures fortement conservées. En effet, les membranes bactériennes sont des cibles faciles à atteindre vu qu'elles sont exposées au milieu extérieur. Leur perturbation peut avoir de sérieuses conséquences sur la vitalité et / ou la croissance bactériennes.

Dans ce travail, on s'est intéressé aux propriétés membranotropes de l'ovotransferrine à l'origine de son activité antibactérienne contre *E. coli*. L'injection de l'ovotransferrine en sous-phase de monocouches lipidiques composées de LPS ou de CMEC, modèles pour la membrane externe et la membrane interne d'*E. coli*, a permis de mettre en évidence l'affinité et l'interaction de l'ovotransferrine avec ces membranes. Cette interaction se traduit par l'insertion de l'ovotransferrine dans la monocouche de LPS et par son adsorption à la monocouche de CMEC. L'organisation des molécules de LPS est modifiée durant l'insertion de l'ovotransferrine dans la monocouche, et est observée en AFM et se traduit par l'augmentation de la rugosité de la monocouche. Avec la monocouche de CMEC, plusieurs types d'impact apparaissent suite à l'adsorption de l'ovotransferrine, relatifs probablement à différents types d'interaction avec la monocouche.

Afin de déterminer les propriétés physico-chimiques qui régissent l'activité membranaire de l'ovotransferrine, une forme modifiée de la protéine est générée par chauffage à sec (80°C / 7 jours) permettant de lier les propriétés de la protéine aux variations de l'activité membranaire. L'influence du traitement thermique à sec sur l'ovotransferrine a été déterminée par une analyse comparative des formes native et chauffée. Malgré la conservation de la structure secondaire et tertiaire de la protéine après le chauffage à sec, l'analyse a mis en évidence des modifications des propriétés physico-chimiques de l'ovotransferrine.

Environ la moitié des molécules d'ovotransferrine s'associe pour former des dimères et trimères. La forme chauffée de l'ovotransferrine est caractérisée par une structure plus flexible que la forme native. Ce gain en flexibilité est interprété par la rupture de certaines liaisons intramoléculaires permettant, à la forme chauffée de l'ovotransferrine, une meilleure déformation sous l'effet des contraintes. La surface de l'ovotransferrine est plus hydrophobe et probablement plus chargée positivement après le chauffage à sec. Les modifications physico-chimiques de l'ovotransferrine, sans impact sur ses structures secondaire et tertiaire, permettent de qualifier le procédé de chauffage à sec comme doux.

A l'interface liquide/air, l'adsorption de l'ovotransferrine est accélérée et amplifiée après le chauffage à sec. Le coefficient de diffusion de l'ovotransferrine en solution est plus élevé pour la forme chauffée que pour la forme native, permettant d'accélérer le processus d'adsorption de la protéine à l'interface. La forme native de l'ovotransferrine s'adsorbe à l'interface liquide/air pour former une monocouche. Le chauffage à sec rend l'ovotransferrine plus active à l'interface, l'adsorption commence à des concentrations plus faibles et avec une intensité plus importante. A des concentrations importantes, l'ovotransferrine chauffée forme des doubles couches à l'interface. L'augmentation de l'hydrophobie de surface ainsi que l'augmentation de la flexibilité de la structure de l'ovotransferrine, après chauffage à sec, sont responsables du développement de son adsorption à l'interface liquide/air. La structure plus flexible de l'ovotransferrine, après le chauffage à sec, permet à la protéine de supporter des aires moléculaires plus faibles pour établir des interactions intermoléculaires, ce qui se traduit par une légère augmentation de la concentration surfacique critique ( $\Gamma_0$ ).

Les modifications des propriétés physico-chimiques, par chauffage à sec, ont aussi un impact sur l'interaction de l'ovotransferrine avec la monocouche de LPS et avec la monocouche de CMEC. Après chauffage à sec, l'insertion de l'ovotransferrine dans la monocouche de LPS est nettement améliorée et accélérée. L'affinité de l'ovotransferrine à la monocouche de LPS est plus élevée, avec une capacité d'insertion amplifiée et une activité de la protéine à des concentrations plus faibles. Les modifications des propriétés physico-chimiques, après chauffage à sec, de l'ovotransferrine sont à l'origine de l'amélioration de son insertion dans la monocouche de LPS. L'augmentation de l'hydrophobie de surface de l'ovotransferrine, après chauffage à sec, est à l'origine de l'affinité plus élevée à la monocouche de LPS, et l'interaction favorable de la protéine

avec la région hydrophobe de la monocouche. L'augmentation de la flexibilité de la structure de l'ovotransferrine, après chauffage à sec, favorise l'augmentation de sa capacité d'insertion dans la monocouche de LPS. En effet, le léger remaniement de la structure protéine, sous l'effet des forces latérales au niveau de la monocouche, facilite l'insertion de l'ovotransferrine. L'insertion de l'ovotransferrine native et chauffée apporte un désordre dans l'organisation des molécules de LPS au niveau de la monocouche avec une hétérogénéité élevée dans l'épaisseur de la monocouche. De plus, l'insertion de l'ovotransferrine, conduisant à une augmentation des forces latérales, peut induire une transition de phase des LPS. Au final, les faibles modifications des propriétés physico-chimiques de l'ovotransferrine, par chauffage à sec, induisent une bonne amélioration de son insertion à la monocouche de LPS.

L'interaction de l'ovotransferrine avec la monocouche de CMEC (modèle de la membrane interne) est aussi améliorée par le chauffage à sec. La forme native de l'ovotransferrine s'adsorbe à la monocouche de CMEC sur les têtes polaires des phospholipides. Après chauffage à sec, l'interaction se met en place à des concentrations plus faibles. La capacité d'insertion à l'ovotransferrine est amplifiée. L'insertion de l'ovotransferrine chauffée au niveau de la région apolaire des phospholipides provient de l'augmentation de son hydrophobie de surface et de l'augmentation de sa flexibilité. De plus, l'adsorption plus importante est liée probablement à l'augmentation des charges positives à la surface de la protéine qui entraînent plus d'interaction avec les têtes polaires des phospholipides anioniques. Les images AFM présentent différents objets attribués à la présence de zones concentrées en protéines. Il est important de noter qu'au cours de l'interaction, la présence d'un défaut au niveau de la monocouche, lié à une interaction préalable, favorise l'interaction de nouvelles molécules d'ovotransferrine à côté de ce défaut. Le défaut initial sert d'amorce à un développement local du défaut ou sa propagation sur la monocouche d'où la présence d'objet de forme allongée.

Dans ce travail, on a démontré que l'affinité des deux formes d'ovotransferrine est modifiée par l'état physique de la monocouche de LPS qui est lié à la conformation des molécules de LPS. Ainsi, l'affinité de l'ovotransferrine est plus élevée pour la conformation allongée de l'oligosaccharide des LPS aux fortes pressions de surface, que pour la conformation courbée aux faibles pressions de surface. On a montré aussi que la longueur de l'oligosaccharide des molécules de LPS favorise l'insertion de l'ovotransferrine, où l'insertion est plus importante au niveau des

régions de la monocouche composées de LPS avec un oligosaccharide plus long qu'avec un oligosaccharide court.

Bien qu'il ne soit pas le seul facteur à intervenir, la compressibilité de la monocouche semble être un facteur important pour permettre l'insertion de l'ovotransferrine. L'insertion protéique est plus importante dans la monocouche de LPS de haute compressibilité, alors qu'elle est modérée avec la monocouche de CMEC peu compressible. La rigidité de la structure des phospholipides par rapport aux LPS participe à limiter la capacité d'insertion de l'ovotransferrine dans la monocouche de CMEC.

La propriété de l'ovotransferrine d'interagir avec les deux types de monocouches, de composition lipidique différente (LPS et CMEC), est liée à la nature de la macromolécule qui permet d'établir différents types d'interaction. Ainsi, la présence de régions hydrophobes, hydrophiles et chargées à la surface de la structure de l'ovotransferrine permet d'interagir avec les chaînes hydrophobes des lipides, avec les chaînes d'oligosaccharides des LPS et avec les têtes polaires des CMEC. L'interaction non-spécifique et la diversité des modalités d'interaction est un réel avantage pour l'ovotransferrine. Cela permet à l'ovotransferrine d'avoir un champ d'action large et de préserver son activité membranaire avec d'autres monocouches lipidiques, modèles membranaires d'autres espèces bactériennes. De plus, de légères modifications sur les propriétés de l'ovotransferrine n'abolissent pas son activité membranaire, c'est bien au contraire, l'activité membranaire de l'ovotransferrine est exaltée après son chauffage à sec.

## Références

---

- [1] M. Derde, V. Lechevalier, C. Guerin-Dubiard, M. F. Cochet, S. Jan, F. Baron, *et al.*, "Hen egg white lysozyme permeabilizes Escherichia coli outer and inner membranes," *J Agric Food Chem*, vol. 61, pp. 9922-9, Oct 16 2013.
- [2] R. Board and H. Tranter, "The microbiology of eggs," *Egg science and technology*, vol. 4, pp. 81-104, 1995.
- [3] P. Valenti, G. Antonini, C. Von Hunolstein, P. Visca, N. Orsi, and E. Antonini, "Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin," *International journal of tissue reactions*, vol. 5, pp. 97-105, 1982.
- [4] P. Valenti, G. Antonini, M. Fanelli, N. Orsi, and E. Antonini, "Antibacterial activity of matrix-bound ovotransferrin," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 21, pp. 840-841, 1982.
- [5] R. d. Ellison, T. J. Giehl, and F. M. LaForce, "Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin," *Infection and Immunity*, vol. 56, pp. 2774-2781, 1988.
- [6] O. Aguilera, L. M. Quiros, and J. F. Fierro, "Transferrins selectively cause ion efflux through bacterial and artificial membranes," *FEBS Letters*, vol. 548, pp. 5-10, 2003.
- [7] M. Derde, C. Guerin-Dubiard, V. Lechevalier, M. F. Cochet, S. Jan, F. Baron, *et al.*, "Dry-heating of lysozyme increases its activity against Escherichia coli membranes," *J Agric Food Chem*, vol. 62, pp. 1692-700, Feb 19 2014.
- [8] M. Derde, F. Nau, V. Lechevalier, C. Guerin-Dubiard, G. Paboeuf, S. Jan, *et al.*, "Native lysozyme and dry-heated lysozyme interactions with membrane lipid monolayers: lateral reorganization of LPS monolayer, model of the Escherichia coli outer membrane," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1848, pp. 174-83, Jan 2015.
- [9] M. Derde, F. Nau, C. Guerin-Dubiard, V. Lechevalier, G. Paboeuf, S. Jan, *et al.*, "Native and dry-heated lysozyme interactions with membrane lipid monolayers: Lipid packing modifications of a phospholipid mixture, model of the Escherichia coli cytoplasmic membrane," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1848, pp. 1065-73, Apr 2015.
- [10] C. Gram, "The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations," *Fortschritte der Medizin*, vol. 2, pp. 185-189, 1884.
- [11] A. C. Smith and M. A. Hussey, "Gram stain protocols," in *American Society for Microbiology-ASM Conference for Undergraduate Educators*, 2005.
- [12] J. Davies, G. Anderson, T. Beveridge, and H. Clark, "Chemical mechanism of the Gram stain and synthesis of a new electron-opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain," *Journal of bacteriology*, vol. 156, pp. 837-845, 1983.
- [13] T. Beveridge and J. Davies, "Cellular responses of Bacillus subtilis and Escherichia coli to the Gram stain," *Journal of bacteriology*, vol. 156, pp. 846-858, 1983.
- [14] M. Salton, "The relationship between the nature of the cell wall and the Gram stain," *Microbiology*, vol. 30, pp. 223-235, 1963.
- [15] G. Seltmann and O. Holst, *The bacterial cell wall*: Springer Science & Business Media, 2013.

- [16] T. J. Silhavy, D. Kahne, and S. Walker, "The bacterial cell envelope," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, p. a000414, May 2010.
- [17] V. Braun, "Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, vol. 415, pp. 335-377, 1975.
- [18] M. Salton, "Studies of the bacterial cell wall: IV. The composition of the cell walls of some gram-positive and gram-negative bacteria," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 10, pp. 512-523, 1953.
- [19] T. J. Beveridge and L. L. Graham, "Surface layers of bacteria," *Microbiological reviews*, vol. 55, pp. 684-705, 1991.
- [20] F. C. Neuhaus and J. Baddiley, "A Continuum of Anionic Charge: Structures and Functions of D-Alanyl-Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 67, pp. 686-723, 2003.
- [21] E. Lugtenberg and R. Peters, "Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 441, pp. 38-47, 1976.
- [22] L. P. Kotra, D. Golemi, N. A. Amro, G.-Y. Liu, and S. Mobashery, "Dynamics of the Lipopolysaccharide Assembly on the Surface of *Escherichia coli*," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 121, pp. 8707-8711, 1999.
- [23] W. Vollmer, D. Blanot, and M. A. de Pedro, "Peptidoglycan structure and architecture," *FEMS Microbiol Rev*, vol. 32, pp. 149-67, Mar 2008.
- [24] W. Vollmer and U. Bertsche, "Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1778, pp. 1714-34, Sep 2008.
- [25] D. Mengin-Lecreulx and B. Lemaître, "Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system," *J Endotoxin Res*, vol. 11, pp. 105-11, 2005.
- [26] K. H. Schleifer and O. Kandler, "Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications," *Bacteriological reviews*, vol. 36, p. 407, 1972.
- [27] W. Vollmer and S. J. Seligman, "Architecture of peptidoglycan: more data and more models," *Trends Microbiol*, vol. 18, pp. 59-66, Feb 2010.
- [28] P. Demchick and A. L. Koch, "The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*," *Journal of Bacteriology*, vol. 178, pp. 768-773, 1996.
- [29] A. M. Glauert and M. J. Thornley, "The topography of the bacterial cell wall," *Annual review of microbiology*, vol. 23, pp. 159-198, 1968.
- [30] H. Nikaido, "Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 67, pp. 593-656, 2003.
- [31] L. A. Clifton, M. W. Skoda, E. L. Daulton, A. V. Hughes, A. P. Le Brun, J. H. Lakey, *et al.*, "Asymmetric phospholipid: lipopolysaccharide bilayers; a Gram-negative bacterial outer membrane mimic," *J R Soc Interface*, vol. 10, p. 20130810, Dec 6 2013.
- [32] M. Caroff, D. Karibian, J.-M. Cavaillon, and N. Haefner-Cavaillon, "Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides," *Microbes and infection*, vol. 4, pp. 915-926, 2002.

- [33] M. Caroff and D. Karibian, "Structure of bacterial lipopolysaccharides," *Carbohydrate Research*, vol. 338, pp. 2431-2447, 2003.
- [34] D. E. Heinrichs, J. A. Yethon, and C. Whitfield, "Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*," *Molecular microbiology*, vol. 30, pp. 221-232, 1998.
- [35] C. Erridge, E. Bennett-Guerrero, and I. R. Poxton, "Structure and function of lipopolysaccharides," *Microbes and infection*, vol. 4, pp. 837-851, 2002.
- [36] E. T. Rietschel, T. Kirikae, F. U. Schade, A. J. Ulmer, O. Holst, H. Brade, *et al.*, "The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity," *Immunobiology*, vol. 187, pp. 169-190, 1993.
- [37] P. E. JANSSON, B. LINDBERG, A. A. LINDBERG, and R. WOLLIN, "Structural studies on the hexose region of the core in lipopolysaccharides from *Enterobacteriaceae*," *European journal of biochemistry*, vol. 115, pp. 571-577, 1981.
- [38] A. Kilar, V. Farkas, K. Kovacs, B. Kocsis, and F. Kilar, "Novel quantitative electrophoretic analysis of endotoxins on microchips," *Electrophoresis*, vol. 29, pp. 1713-22, Apr 2008.
- [39] A. Kilar, A. Dornyei, and B. Kocsis, "Structural characterization of bacterial lipopolysaccharides with mass spectrometry and on- and off-line separation techniques," *Mass Spectrom Rev*, vol. 32, pp. 90-117, Mar-Apr 2013.
- [40] Y. Ohkouchi, S. Tajima, M. Nomura, and S. Itoh, "Inflammatory responses and potencies of various lipopolysaccharides from bacteria and cyanobacteria in aquatic environments and water supply systems," *Toxicon*, vol. 97, pp. 23-31, Apr 2015.
- [41] A. Aljada, "Lipopolysaccharides-Induced Inflammatory Response in White Blood Cells Is Associated with Alterations in Senescence Mediators: Modulation by Metformin," *Metab Syndr Relat Disord*, vol. 13, pp. 278-85, Aug 2015.
- [42] C. R. Raetz and C. Whitfield, "Lipopolysaccharide endotoxins," *Annual review of biochemistry*, vol. 71, p. 635, 2002.
- [43] A. P. Le Brun, L. A. Clifton, C. E. Halbert, B. Lin, M. Meron, P. J. Holden, *et al.*, "Structural characterization of a model gram-negative bacterial surface using lipopolysaccharides from rough strains of *Escherichia coli*," *Biomacromolecules*, vol. 14, pp. 2014-2022, 2013.
- [44] U. Seydel, H. Labischinski, M. Kastowsky, and K. Brandenburg, "Phase behavior, supramolecular structure, and molecular conformation of lipopolysaccharide," *Immunobiology*, vol. 187, pp. 191-211, 1993.
- [45] N. Kato, "Crystallization and electron microscopy of bacterial lipopolysaccharide (LPS)," *Micron*, vol. 24, pp. 91-114, 1993.
- [46] H. Labischinski, G. Barnickel, H. Bradaczek, D. Naumann, E. T. Rietschel, and P. Giesbrecht, "High state of order of isolated bacterial lipopolysaccharide and its possible contribution to the permeation barrier property of the outer membrane," *Journal of bacteriology*, vol. 162, pp. 9-20, 1985.
- [47] E. L. Wu, P. J. Fleming, M. S. Yeom, G. Widmalm, J. B. Klauda, K. G. Fleming, *et al.*, "E. coli outer membrane and interactions with OmpLA," *Biophysical journal*, vol. 106, pp. 2493-502, Jun 3 2014.



- [48] S. Roes, U. Seydel, and T. Gutschmann, "Probing the properties of lipopolysaccharide monolayers and their interaction with the antimicrobial peptide polymyxin B by atomic force microscopy," *Langmuir*, vol. 21, pp. 6970-6978, 2005.
- [49] P. G. Adams, L. Lamoureux, K. L. Swingle, H. Mukundan, and G. A. Montano, "Lipopolysaccharide-induced dynamic lipid membrane reorganization: tubules, perforations, and stacks," *Biophys J*, vol. 106, pp. 2395-407, Jun 3 2014.
- [50] R. T. Coughlin, S. Tonsager, and E. J. McGroarty, "Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*," *Biochemistry*, vol. 22, pp. 2002-2007, 1983.
- [51] G. Bello, J. Eriksson, A. Terry, K. Edwards, M. J. Lawrence, D. Barlow, *et al.*, "Characterization of the aggregates formed by various bacterial lipopolysaccharides in solution and upon interaction with antimicrobial peptides," *Langmuir*, vol. 31, pp. 741-51, Jan 20 2015.
- [52] G. Bello, A. Bodin, M. J. Lawrence, D. Barlow, A. J. Mason, R. D. Barker, *et al.*, "The influence of rough lipopolysaccharide structure on molecular interactions with mammalian antimicrobial peptides," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1858, pp. 197-209, Feb 2016.
- [53] E. L. Wu, O. Engstrom, S. Jo, D. Stuhlsatz, M. S. Yeom, J. B. Klauda, *et al.*, "Molecular dynamics and NMR spectroscopy studies of *E. coli* lipopolysaccharide structure and dynamics," *Biophys J*, vol. 105, pp. 1444-55, Sep 17 2013.
- [54] 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 membranes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1462, pp. 109-140, 1999.
- [55] P. L. Yeagle, *The membranes of cells*: Academic Press, 2016.
- [56] M. Eeman and M. Deleu, "From biological membranes to biomimetic model membranes," *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vol. 14, p. 719, 2010.
- [57] T. Shimanouchi, H. Ishii, N. Yoshimoto, H. Umakoshi, and R. Kuboi, "Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane: effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 73, pp. 156-60, Oct 1 2009.
- [58] C. Peetla, A. Stine, and V. Labhasetwar, "Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery," *Molecular pharmaceuticals*, vol. 6, pp. 1264-1276, 2009.
- [59] G. M. El Maghraby, B. W. Barry, and A. C. Williams, "Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes," *Eur J Pharm Sci*, vol. 34, pp. 203-22, Aug 7 2008.
- [60] F. M. Goni, A. Alonso, L. A. Bagatolli, R. E. Brown, D. Marsh, M. Prieto, *et al.*, "Phase diagrams of lipid mixtures relevant to the study of membrane rafts," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1781, pp. 665-84, Nov-Dec 2008.
- [61] E. F. Marques, "Size and stability of catanionic vesicles: effects of formation path, sonication, and aging," *Langmuir*, vol. 16, pp. 4798-4807, 2000.
- [62] M. P. Mingeot-Leclercq, M. Deleu, R. Bresseur, and Y. F. Dufrene, "Atomic force microscopy of supported lipid bilayers," *Nat Protoc*, vol. 3, pp. 1654-9, 2008.
- [63] Y. H. Chan and S. G. Boxer, "Model membrane systems and their applications," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 11, pp. 581-7, Dec 2007.

- [64] J. M. Crane and L. K. Tamm, "Fluorescence microscopy to study domains in supported lipid bilayers," *Methods in Membrane Lipids*, pp. 481-488, 2007.
- [65] G. Puu and I. Gustafson, "Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes—factors of importance for kinetics and stability," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1327, pp. 149-161, 1997.
- [66] C. Keller and B. Kasemo, "Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance," *Biophysical journal*, vol. 75, pp. 1397-1402, 1998.
- [67] C. Miller, J. Majewski, and T. Kuhl, "Characterization of single biological membranes at the solid-liquid interface by X-ray reflectivity," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 284, pp. 434-439, 2006.
- [68] H. P. Wacklin and R. K. Thomas, "Spontaneous formation of asymmetric lipid bilayers by adsorption of vesicles," *Langmuir*, vol. 23, pp. 7644-7651, 2007.
- [69] X. Chen and Z. Chen, "SFG studies on interactions between antimicrobial peptides and supported lipid bilayers," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1758, pp. 1257-73, Sep 2006.
- [70] H. Brockman, "Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?," *Current opinion in structural biology*, vol. 9, pp. 438-443, 1999.
- [71] J. J. Giner-Casares, G. Brezesinski, and H. Möhwald, "Langmuir monolayers as unique physical models," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 19, pp. 176-182, 2014.
- [72] R. Verger and F. Pattus, "Lipid-protein interactions in monolayers," *Chemistry and physics of lipids*, vol. 30, pp. 189-227, 1982.
- [73] P. Calvez, S. Bussieres, D. Eric, and C. Salesse, "Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers," *Biochimie*, vol. 91, pp. 718-33, Jun 2009.
- [74] E. I. Boisselier, P. Calvez, E. r. Demers, L. Cantin, and C. Salesse, "Influence of the physical state of phospholipid monolayers on protein binding," *Langmuir*, vol. 28, pp. 9680-8, Jun 26 2012.
- [75] É. Boisselier, P. Calvez, E. Demers, L. Cantin, and C. Salesse, "Effect of oxidation of polyunsaturated phospholipids on the binding of proteins in monolayers," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 109, pp. 109-14, Sep 1 2013.
- [76] P. Calvez, E. Demers, E. Boisselier, and C. Salesse, "Analysis of the contribution of saturated and polyunsaturated phospholipid monolayers to the binding of proteins," *Langmuir*, vol. 27, pp. 1373-9, Feb 15 2011.
- [77] O. Bouffou, A. Berquand, M. Eeman, M. Paquot, Y. F. Dufrene, R. Brasseur, *et al.*, "Molecular organization of surfactin-phospholipid monolayers: effect of phospholipid chain length and polar head," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1768, pp. 1758-68, Jul 2007.
- [78] V. Vié, N. Van Mau, L. Chaloin, E. Lesniewska, C. Le Grimellec, and F. Heitz, "Detection of peptide-lipid interactions in mixed monolayers, using isotherms, atomic force microscopy, and Fourier transform infrared analyses," *Biophysical journal*, vol. 78, pp. 846-856, 2000.
- [79] C. W. McConlogue and T. K. Vanderlick, "A close look at domain formation in DPPC monolayers," *Langmuir*, vol. 13, pp. 7158-7164, 1997.
- [80] T. Zhang, "Studies of DPPA & LPS Monolayers on Aqueous Solutions by Surface Tensiometry and Brewster Angle Microscopy," The Ohio State University, 2014.

- [81] D. Vollhardt, "Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 19, pp. 183-197, 2014.
- [82] A. Clausell, M. A. Busquets, M. Pujol, A. Alsina, and Y. Cajal, "Polymyxin B-lipid interactions in Langmuir-Blodgett monolayers of Escherichia coli lipids: a thermodynamic and atomic force microscopy study," *Biopolymers*, vol. 75, pp. 480-90, Dec 15 2004.
- [83] J. Glenska-Olender, S. Sek, K. Dworecki, and W. Kaca, "A total internal reflection ellipsometry and atomic force microscopy study of interactions between Proteus mirabilis lipopolysaccharides and antibodies," *Eur Biophys J*, vol. 44, pp. 301-7, Jul 2015.
- [84] T. Furuno, "Atomic force microscopy study on the unfolding of globular proteins in the Langmuir films," *Thin Solid Films*, vol. 552, pp. 170-179, 2014.
- [85] L. Silvestro and P. H. Axelsen, "Infrared spectroscopy of supported lipid monolayer, bilayer, and multibilayer membranes," *Chemistry and physics of lipids*, vol. 96, pp. 69-80, 1998.
- [86] C. Stefaniu, G. Brezesinski, and H. Mohwald, "Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 208, pp. 197-213, Jun 2014.
- [87] K. Lohner, "New strategies for novel antibiotics: peptides targeting bacterial cell membranes," *General physiology and biophysics*, vol. 28, pp. 105-116, 2009.
- [88] K. V. Reddy, R. D. Yedery, and C. Aranha, "Antimicrobial peptides: premises and promises," *Int J Antimicrob Agents*, vol. 24, pp. 536-47, Dec 2004.
- [89] Y. Li, Q. Xiang, Q. Zhang, Y. Huang, and Z. Su, "Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application," *Peptides*, vol. 37, pp. 207-15, Oct 2012.
- [90] J. P. da Costa, M. Cova, R. Ferreira, and R. Vitorino, "Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines?," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 99, pp. 2023-40, Mar 2015.
- [91] O. N. Silva, K. C. Mulder, A. E. Barbosa, A. J. Otero-Gonzalez, C. Lopez-Abarrategui, T. M. Rezende, *et al.*, "Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications," *Front Microbiol*, vol. 2, p. 232, 2011.
- [92] D. Goodwin, P. Simerska, and I. Toth, "Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity," *Current medicinal chemistry*, vol. 19, pp. 4451-4461, 2012.
- [93] A. L. Russell, A. M. Kennedy, A. M. Spuches, W. S. Gibson, D. Venugopal, D. Klapper, *et al.*, "Determining the effect of the incorporation of unnatural amino acids into antimicrobial peptides on the interactions with zwitterionic and anionic membrane model systems," *Chem Phys Lipids*, vol. 164, pp. 740-58, Nov 2011.
- [94] J. P. Powers and R. E. Hancock, "The relationship between peptide structure and antibacterial activity," *Peptides*, vol. 24, pp. 1681-91, Nov 2003.
- [95] L. T. Nguyen, E. F. Haney, and H. J. Vogel, "The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action," *Trends in biotechnology*, vol. 29, pp. 464-72, Sep 2011.
- [96] V. Teixeira, M. J. Feio, and M. Bastos, "Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes," *Prog Lipid Res*, vol. 51, pp. 149-77, Apr 2012.
- [97] M. D. Seo, H. S. Won, J. H. Kim, T. Mishig-Ochir, and B. J. Lee, "Antimicrobial peptides for therapeutic applications: a review," *Molecules*, vol. 17, pp. 12276-86, 2012.

- [98] A. Ahmad, E. Ahmad, G. Rabbani, S. Haque, M. Arshad, and R. Hasan Khan, "Identification and Design of Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications," *Current Protein & Peptide Science*, vol. 13, pp. 211-223, 2012.
- [99] J. B. McPhee and R. E. Hancock, "Function and therapeutic potential of host defence peptides," *J Pept Sci*, vol. 11, pp. 677-87, Nov 2005.
- [100] A. A. Bahar and D. Ren, "Antimicrobial peptides," *Pharmaceuticals (Basel)*, vol. 6, pp. 1543-75, 2013.
- [101] C. Subbalakshmi, R. Nagaraj, and N. Sitaram, "Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity," *FEBS letters*, vol. 448, pp. 62-66, 1999.
- [102] M. N. Melo, R. Ferre, and M. A. Castanho, "Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 7, pp. 245-250, 2009.
- [103] M. L. Juba, D. K. Porter, E. H. Williams, C. A. Rodriguez, S. M. Barksdale, and B. M. Bishop, "Helical cationic antimicrobial peptide length and its impact on membrane disruption," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1848, pp. 1081-91, May 2015.
- [104] Y. Chen, M. T. Guarnieri, A. I. Vasil, M. L. Vasil, C. T. Mant, and R. S. Hodges, "Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 51, pp. 1398-406, Apr 2007.
- [105] M. Fernandez-Vidal, S. Jayasinghe, A. S. Ladokhin, and S. H. White, "Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity," *J Mol Biol*, vol. 370, pp. 459-70, Jul 13 2007.
- [106] G. Drin and B. Antonny, "Amphipathic helices and membrane curvature," *FEBS Lett*, vol. 584, pp. 1840-7, May 3 2010.
- [107] X. Zhu, N. Dong, Z. Wang, Z. Ma, L. Zhang, Q. Ma, *et al.*, "Design of imperfectly amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced cell selectivity," *Acta Biomater*, vol. 10, pp. 244-57, Jan 2014.
- [108] X. Zhu, L. Zhang, J. Wang, Z. Ma, W. Xu, J. Li, *et al.*, "Characterization of antimicrobial activity and mechanisms of low amphipathic peptides with different alpha-helical propensity," *Acta Biomater*, vol. 18, pp. 155-67, May 2015.
- [109] M. Zaiou, "Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 85, pp. 317-329, 2007.
- [110] M. Zasloff, "Antimicrobial peptides of multicellular organisms," *nature*, vol. 415, pp. 389-395, 2002.
- [111] T. Ganz, "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity," *Nat Rev Immunol*, vol. 3, pp. 710-20, Sep 2003.
- [112] K. A. Brogden, M. Ackermann, P. B. McCray, and B. F. Tack, "Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 22, pp. 465-478, 2003.
- [113] L. Otvos, "Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets," *Journal of Peptide Science*, vol. 11, pp. 697-706, 2005.

- [114] M. Cudic and L. Otvos Jr, "Intracellular targets of antibacterial peptides," *Current drug targets*, vol. 3, pp. 101-106, 2002.
- [115] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, and J. J. Collins, "How antibiotics kill bacteria: from targets to networks," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, p. 423, 2010.
- [116] K. A. Brogden, "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?," *Nat Rev Microbiol*, vol. 3, pp. 238-50, Mar 2005.
- [117] W. F. Bennett, C. K. Hong, Y. Wang, and D. P. Tieleman, "Antimicrobial Peptide Simulations and the Influence of Force Field on the Free Energy for Pore Formation in Lipid Bilayers," *J Chem Theory Comput*, vol. 12, pp. 4524-33, Sep 13 2016.
- [118] J. P. Mattila, K. Sabatini, and P. K. Kinnunen, "Oxidized phospholipids as potential molecular targets for antimicrobial peptides," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1778, pp. 2041-50, Oct 2008.
- [119] G. G. Perron, M. Zasloff, and G. Bell, "Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide," *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, vol. 273, pp. 251-256, 2006.
- [120] S. Gruenheid and H. Le Moual, "Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 330, pp. 81-9, May 2012.
- [121] S. Stumpe, R. Schmid, D. L. Stephens, G. Georgiou, and E. P. Bakker, "Identification of OmpT as the Protease That Hydrolyzes the Antimicrobial Peptide Protamine before It Enters Growing Cells of *Escherichia coli*," *Journal of bacteriology*, vol. 180, pp. 4002-4006, 1998.
- [122] M. Sieprawska-Lupa, P. Mydel, K. Krawczyk, K. Wójcik, M. Puklo, B. Lupa, *et al.*, "Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 48, pp. 4673-4679, 2004.
- [123] M. A. Campos, M. A. Vargas, V. Regueiro, C. M. Llompart, S. Albertí, and J. A. Bengoechea, "Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides," *Infection and immunity*, vol. 72, pp. 7107-7114, 2004.
- [124] M. Foschiatti, P. Cescutti, A. Tossi, and R. Rizzo, "Inhibition of cathelicidin activity by bacterial exopolysaccharides," *Molecular microbiology*, vol. 72, pp. 1137-1146, 2009.
- [125] W. Shafer, X.-D. Qu, A. Waring, and R. Lehrer, "Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, pp. 1829-1833, 1998.
- [126] E. A. Groisman, "How bacteria resist killing by host-defense peptides," *Trends in microbiology*, vol. 2, pp. 444-449, 1994.
- [127] L. Guo, K. B. Lim, C. M. Poduje, M. Daniel, J. S. Gunn, M. Hackett, *et al.*, "Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides," *Cell*, vol. 95, pp. 189-198, 1998.
- [128] S. A. Kristian, M. Dürr, J. A. Van Strijp, B. Neumeister, and A. Peschel, "MprF-mediated lysinylation of phospholipids in *Staphylococcus aureus* leads to protection against oxygen-independent neutrophil killing," *Infection and immunity*, vol. 71, pp. 546-549, 2003.
- [129] A. Peschel, R. W. Jack, M. Otto, L. V. Collins, P. Staubitz, G. Nicholson, *et al.*, "*Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine," *The Journal of experimental medicine*, vol. 193, pp. 1067-1076, 2001.

- [130] A. Peschel and H.-G. Sahl, "The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 4, pp. 529-536, 2006.
- [131] J. Kovacs-Nolan, M. Phillips, and Y. Mine, "Advances in the value of eggs and egg components for human health," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 53, pp. 8421-8431, 2005.
- [132] J. Wu and A. Acero-Lopez, "Ovotransferrin: Structure, bioactivities, and preparation," *Food Research International*, vol. 46, pp. 480-487, 2012.
- [133] J. M. JELTSCH and P. CHAMBON, "The complete nucleotide sequence of the chicken ovotransferrin mRNA," *European Journal of Biochemistry*, vol. 122, pp. 291-295, 1982.
- [134] J. WILLIAMS, T. C. Elleman, I. B. KINGSTON, A. G. WILKINS, and K. A. KUHN, "The primary structure of hen ovotransferrin," *European journal of biochemistry*, vol. 122, pp. 297-303, 1982.
- [135] F. Bou Abdallah and J. M. El Hage Chahine, "Hen ovo-transferrin, interaction with bicarbonate and iron uptake," *European journal of biochemistry*, vol. 258, pp. 1022-1031, 1998.
- [136] F. B. Abdallah and J. M. E. H. Chahine, "Transferrins, the mechanism of iron release by ovotransferrin," *European Journal of Biochemistry*, vol. 263, pp. 912-920, 1999.
- [137] L. N. Lin, A. B. Mason, R. C. Woodworth, and J. F. Brandts, "Calorimetric studies of the binding of ferric ions to ovotransferrin and interactions between binding sites," *Biochemistry*, vol. 30, pp. 11660-11669, 1991.
- [138] L. N. Lin, A. B. Mason, R. C. Woodworth, and J. F. Brandts, "Calorimetric studies of serum transferrin and ovotransferrin. Estimates of domain interactions, and study of the kinetic complexities of ferric ion binding," *Biochemistry*, vol. 33, pp. 1881-1888, 1994.
- [139] K. Y. Ko, A. F. Mendonca, and D. U. Ahn, "Influence of zinc, sodium bicarbonate, and citric acid on the antibacterial activity of ovotransferrin against Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in model systems and ham," *Poult Sci*, vol. 87, pp. 2660-70, Dec 2008.
- [140] P. Valenti, P. Visca, G. Antonini, N. Orsi, and E. Antonini, "The effect of saturation with Zn<sup>2+</sup> and other metal ions on the antibacterial activity of ovotransferrin," *Medical microbiology and immunology*, vol. 176, pp. 123-130, 1987.
- [141] K. Y. Ko, A. F. Mendonca, and D. U. Ahn, "EDTA and Lysozyme Improves Antimicrobial Activities of Ovotransferrin against Escherichia coli O157: H7," *Animal Industry Report*, vol. 656, p. 19, 2010.
- [142] K. Y. Ko, A. F. Mendonca, and D. U. Ahn, "Effect of ethylenediaminetetraacetate and lysozyme on the antimicrobial activity of ovotransferrin against Listeria monocytogenes," *Poult Sci*, vol. 87, pp. 1649-58, Aug 2008.
- [143] P. Valenti, A. De Stasio, P. Mastromerino, L. Seganti, L. Sinibaldi, and N. Orsi, "Influence of bicarbonate and citrate on the bacteriostatic action of ovotransferrin towards staphylococci," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 10, pp. 77-79, 1981.
- [144] H. R. Ibrahim, E. Iwamori, Y. Sugimoto, and T. Aoki, "Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1401, pp. 289-303, 1998.
- [145] H. R. Ibrahim, Y. Sugimoto, and T. Aoki, "Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 1523, pp. 196-205, 2000.

- [146] P. Valenti, P. Visca, G. Antonini, and N. Orsi, "Antifungal activity of ovotransferrin towards genus *Candida*," *Mycopathologia*, vol. 89, pp. 169-175, 1985.
- [147] P. Valenti, P. Visca, G. Antonini, and N. Orsi, "Interaction between lactoferrin and ovotransferrin and *Candida* cells," *FEMS microbiology letters*, vol. 33, pp. 271-275, 1986.
- [148] F. Giansanti, P. Rossi, M. T. Massucci, D. Botti, G. Antonini, P. Valenti, *et al.*, "Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin," *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 80, pp. 125-130, 2002.
- [149] F. Giansanti, M. T. Massucci, M. F. Giardi, F. Nozza, E. Pulsinelli, C. Nicolini, *et al.*, "Antiviral activity of ovotransferrin derived peptides," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 331, pp. 69-73, May 27 2005.
- [150] F. Giansanti, M. F. Giardi, M. T. Massucci, D. Botti, and G. Antonini, "Ovotransferrin expression and release by chicken cell lines infected with Marek's disease virus," *Biochem Cell Biol*, vol. 85, pp. 150-5, Feb 2007.
- [151] H. R. Ibrahim and T. Kiyono, "Novel anticancer activity of the autocleaved ovotransferrin against human colon and breast cancer cells," *J Agric Food Chem*, vol. 57, pp. 11383-90, Dec 9 2009.
- [152] H. R. Ibrahim, M. I. Hoq, and T. Aoki, "Ovotransferrin possesses SOD-like superoxide anion scavenging activity that is promoted by copper and manganese binding," *Int J Biol Macromol*, vol. 41, pp. 631-40, Dec 1 2007.
- [153] S. H. Moon, J. H. Lee, D. U. Ahn, and H. D. Paik, "In vitro antioxidant and mineral-chelating properties of natural and autocleaved ovotransferrin," *J Sci Food Agric*, vol. 95, pp. 2065-70, Aug 15 2015.
- [154] W.-Y. Huang, K. Majumder, and J. Wu, "Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals," *Food Chemistry*, vol. 123, pp. 635-641, 2010.
- [155] W. Huang, S. Shen, C. Nimalaratne, S. Li, K. Majumder, and J. Wu, "Effects of addition of egg ovotransferrin-derived peptides on the oxygen radical absorbance capacity of different teas," *Food Chem*, vol. 135, pp. 1600-7, Dec 1 2012.
- [156] H. R. Ibrahim, S. Tatsumoto, H. Ono, F. Van Immerseel, R. Raspoet, and T. Miyata, "A novel antibiotic-delivery system by using ovotransferrin as targeting molecule," *Eur J Pharm Sci*, vol. 66, pp. 59-69, Jan 23 2015.
- [157] A. Acero-Lopez, A. Ullah, M. Offengenden, S. Jung, and J. Wu, "Effect of high pressure treatment on ovotransferrin," *Food Chem*, vol. 135, pp. 2245-52, Dec 15 2012.
- [158] B. Lei, K. Majumder, S. Shen, and J. Wu, "Effect of sonication on thermolysin hydrolysis of ovotransferrin," *Food Chemistry*, vol. 124, pp. 808-815, 2011.
- [159] T. Croguennec, F. Nau, S. Pezennec, M. Piot, and G. Brulé, "Two-step chromatographic procedure for the preparation of hen egg white ovotransferrin," *European Food Research and Technology*, vol. 212, pp. 296-301, 2001.
- [160] H. Fujiwara, *Spectroscopic ellipsometry: principles and applications*: John Wiley & Sons, 2007.
- [161] Y. Desfougères, V. r. Lechevalier, S. p. Pezennec, F. Artzner, and F. Nau, "Dry-heating makes hen egg white lysozyme an efficient foaming agent and enables its bulk aggregation," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 56, pp. 5120-5128, 2008.

- [162] E. Talansier, C. Loisel, D. Dellavalle, A. Desrumaux, V. Lechevalier, and J. Legrand, "Optimization of dry heat treatment of egg white in relation to foam and interfacial properties," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 42, pp. 496-503, 2009.
- [163] I. S. Kim, Y. W. Choi, Y. Kang, H. M. Sung, and J. S. Shin, "Dry-heat treatment process for enhancing viral safety of an antihemophilic factor VIII concentrate prepared from human plasma," *J Microbiol Biotechnol*, vol. 18, pp. 997-1003, 2008.
- [164] C. Huangfu, X. Zhao, M. Lv, J. Jia, F. Zhu, R. Wang, *et al.*, "Inactivation of viruses during a new manufacturing process of  $\alpha$ 2-macroglobulin from Cohn Fraction IV by dry-heat treatment," *Transfusion*, vol. 56, pp. 2274-2277, 2016.
- [165] A. Kato, H. R. Ibrahim, H. Watanabe, K. Honma, and K. Kobayashi, "New approach to improve the gelling and surface functional properties of dried egg white by heating in dry state," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 37, pp. 433-437, 1989.
- [166] A. Kato, H. R. Ibrahim, H. Watanabe, K. Honma, and K. Kobayashi, "Structural and gelling properties of dry-heated egg white proteins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, pp. 32-37, 1990.
- [167] H. Kurokawa, J. C. Dewan, B. Mikami, J. C. Sacchettini, and M. Hirose, "Crystal Structure of Hen Apo-ovotransferrin BOTH LOBES ADOPT AN OPEN CONFORMATION UPON LOSS OF IRON," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, pp. 28445-28452, 1999.
- [168] P. Andrews, "The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range," *Biochemical Journal*, vol. 96, p. 595, 1965.
- [169] J. Porath, "Gel filtration of proteins, peptides and amino acids," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 39, pp. 193-207, 1960.
- [170] T. C. Laurent and J. Killander, "A theory of gel filtration and its experimental verification," *Journal of Chromatography A*, vol. 14, pp. 317-330, 1964.
- [171] A. Striegel, W. W. Yau, J. J. Kirkland, and D. D. Bly, *Modern size-exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*: John Wiley & Sons, 2009.
- [172] S.-H. Chang, L.-Y. Chen, and W.-Y. Chen, "The effects of denaturants on protein conformation and behavior at air/solution interface," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 41, pp. 1-6, 2005.
- [173] I. Van der Plancken, A. Van Loey, and M. E. Hendrickx, "Effect of heat-treatment on the physico-chemical properties of egg white proteins: A kinetic study," *Journal of Food Engineering*, vol. 75, pp. 316-326, 2006.
- [174] W. S. Gosal and S. B. Ross-Murphy, "Globular protein gelation," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 5, pp. 188-194, 2000.
- [175] T. Nicolai and D. Durand, "Protein aggregation and gel formation studied with scattering methods and computer simulations," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 12, pp. 23-28, 2007.
- [176] D. Durand, J. C. Gimel, and T. Nicolai, "Aggregation, gelation and phase separation of heat denatured globular proteins," *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 304, pp. 253-265, 2002.
- [177] R. Piazza, "Interactions and phase transitions in protein solutions," *Current opinion in colloid & interface science*, vol. 5, pp. 38-43, 2000.



- [178] Y. K. Reshetnyak, Y. Koshevnik, and E. A. Burstein, "Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues," *Biophysical journal*, vol. 81, pp. 1735-1758, 2001.
- [179] E. Burstein, N. Vedenkina, and M. Ivkova, "Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules," *Photochemistry and photobiology*, vol. 18, pp. 263-279, 1973.
- [180] Y. Chen and M. D. Barkley, "Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins," *Biochemistry*, vol. 37, pp. 9976-9982, 1998.
- [181] J. T. Vivian and P. R. Callis, "Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins," *Biophysical Journal*, vol. 80, pp. 2093-2109, 5// 2001.
- [182] P. R. Callis and B. K. Burgess, "Tryptophan fluorescence shifts in proteins from hybrid simulations: an electrostatic approach," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 101, pp. 9429-9432, 1997.
- [183] A. Hawe, M. Sutter, and W. Jiskoot, "Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization," *Pharmaceutical research*, vol. 25, pp. 1487-1499, 2008.
- [184] A. Kato and S. Nakai, "Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins," *Biochimica et biophysica acta (BBA)-Protein structure*, vol. 624, pp. 13-20, 1980.
- [185] C. A. Royer, "Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence," *Chemical reviews*, vol. 106, pp. 1769-1784, 2006.
- [186] N. Alizadeh-Pasdar and E. C. Li-Chan, "Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, pp. 328-334, 2000.
- [187] M. Cardamone and N. Puri, "Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins," *Biochemical Journal*, vol. 282, pp. 589-593, 1992.
- [188] T. Tsutsui, E. Li-Chan, and S. Nakai, "A Simple Fluorometric Method for Fat-Binding Capacity as an Index of Hydrophobicity of Proteins," *Journal of Food Science*, vol. 51, pp. 1268-1272, 1986.
- [189] D. Matulis and R. Lovrien, "1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation," *Biophysical Journal*, vol. 74, pp. 422-429, 1998.
- [190] H. Lavoie, J. Gallant, M. Grandbois, D. Blaudez, B. Desbat, F. Boucher, *et al.*, "The behavior of membrane proteins in monolayers at the gas-water interface: comparison between photosystem II, rhodopsin and bacteriorhodopsin," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 10, pp. 147-154, 1999.
- [191] A. H. Martin, M. A. C. Stuart, M. A. Bos, and T. v. Vliet, "Correlation between mechanical behavior of protein films at the air-water interface and intrinsic stability of protein molecules," *Langmuir*, vol. 21, pp. 4083-4089, 2005.
- [192] J. De Feijter and J. Benjamins, "Adsorption Kinetics of Proteins at the Air/Water interface," *Food emulsions and foams*, p. 72, 1987.
- [193] Y. Desfougeres, A. Saint-Jalmes, A. Salonen, V. Vie, S. Beaufils, S. Pezennec, *et al.*, "Strong improvement of interfacial properties can result from slight structural modifications of proteins: the case of native and dry-heated lysozyme," *Langmuir*, vol. 27, pp. 14947-57, Dec 20 2011.

- [194] A. Ward and L. Tordai, "Time-dependence of boundary tensions of solutions I. The role of diffusion in time-effects," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 14, pp. 453-461, 1946.
- [195] J. De Feijter, d. J. Benjamins, and F. Veer, "Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface," *Biopolymers*, vol. 17, pp. 1759-1772, 1978.
- [196] S. Xu and S. Damodaran, "The role of chemical potential in the adsorption of lysozyme at the air-water interface," *Langmuir*, vol. 8, pp. 2021-2027, 1992.
- [197] L. Razumovsky and S. Damodaran, "Surface activity– compressibility relationship of proteins at the air– water interface," *Langmuir*, vol. 15, pp. 1392-1399, 1999.
- [198] D. Brune and S. Kim, "Predicting protein diffusion coefficients," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 90, pp. 3835-3839, 1993.
- [199] D. Graham and M. Phillips, "Proteins at liquid interfaces: I. Kinetics of adsorption and surface denaturation," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 70, pp. 403-414, 1979.
- [200] F. MacRitchie and A. Alexander, "Kinetics of adsorption of proteins at interfaces. Part I. The role of bulk diffusion in adsorption," *Journal of Colloid Science*, vol. 18, pp. 453-457, 1963.
- [201] C. Le Floch-Fouere, S. Pezennec, M. Pasco, G. Paboeuf, A. Renault, and S. Beaufils, "Moderate conformational impact of citrate on ovotransferrin considerably increases its capacity to self-assemble at the interface," *J Colloid Interface Sci*, vol. 437, pp. 219-26, Jan 1 2015.
- [202] D. Graham and M. Phillips, "Proteins at liquid interfaces: II. Adsorption isotherms," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 70, pp. 415-426, 1979.
- [203] J. Benjamins, J. De Feijter, M. Evans, D. Graham, and M. Phillips, "Dynamic and static properties of proteins adsorbed at the air/water interface," *Faraday discussions of the Chemical Society*, vol. 59, pp. 218-229, 1975.
- [204] P. R. Azari and R. E. Feeney, "The resistances of conalbumin and its iron complex to physical and chemical treatments," *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 92, pp. 44-52, 1961.
- [205] P. R. Azari and R. E. Feeney, "Resistance of metal complexes of conalbumin and transferrin to proteolysis and to thermal denaturation," *Journal of Biological Chemistry*, pp. 293-302, 1957.
- [206] A. Wishnia and R. C. Warner, "The Kinetics of Denaturation of Conalbumin1," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 83, pp. 2065-2071, 1961.
- [207] S. Castano, B. Desbat, M. Laguerre, and J. Dufourcq, "Structure, orientation and affinity for interfaces and lipids of ideally amphipathic lytic L i K j (i= 2j) peptides," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1416, pp. 176-194, 1999.
- [208] G. Weidemann and D. Vollhardt, "Long range tilt orientational order in phospholipid monolayers: a comparison of the order in the condensed phases of dimyristoylphosphatidylethanolamine and dipalmitoylphosphatidylcholine," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 100, pp. 187-202, 1995.
- [209] G. Weidemann and D. Vollhardt, "Long-range tilt orientational order in phospholipid monolayers: a comparative study," *Biophysical journal*, vol. 70, pp. 2758-2766, 1996.
- [210] L. Zhang, M. G. Scott, H. Yan, L. D. Mayer, and R. E. Hancock, "Interaction of polyphemusin I and structural analogs with bacterial membranes, lipopolysaccharide, and lipid monolayers," *Biochemistry*, vol. 39, pp. 14504-14514, 2000.

- [211] L. Zhang, P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, and R. E. Hancock, "Interactions of Bacterial Cationic Peptide Antibiotics with Outer and Cytoplasmic Membranes of *Pseudomonas aeruginosa*," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 44, pp. 3317-3321, 2000.
- [212] A. Giacometti, O. Cirioni, R. Ghiselli, F. Mocchegiani, F. Orlando, C. Silvestri, *et al.*, "Interaction of antimicrobial peptide temporin L with lipopolysaccharide in vitro and in experimental rat models of septic shock caused by gram-negative bacteria," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 50, pp. 2478-2486, 2006.
- [213] J. P. Michel, Y. X. Wang, E. De, P. Fontaine, M. Goldmann, and V. Rosilio, "Charge and aggregation pattern govern the interaction of plasticins with LPS monolayers mimicking the external leaflet of the outer membrane of Gram-negative bacteria," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1848, pp. 2967-79, Nov 2015.
- [214] J. Sarkis, J.-F. Hubert, B. Legrand, E. Robert, A. Chéron, J. Jardin, *et al.*, "Spectrin-like repeats 11–15 of human dystrophin show adaptations to a lipidic environment," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, pp. 30481-30491, 2011.

# ANNEXES

---

1 APPKSVIRWCTISSPEEKKCN 20  
NLRDLTQQERISLTCVQKATYLDCKAIANNEADAISLDG 50  
GQVFEAGLAPYKLPAAAEIYEHTEGSTTSYYAVAVVKKG 100  
TEFTVNDLQGGKTSCHTGLGRSAGWNIPIGTLLHWGAIIEWE 140  
GIESGSVEQAVAKFFSASCVPGATIEQKLCRQCKGDPKTK 180  
CARNAPYSGYSGAFHCLKDGGKDVAFVKHTTVNENAPDLN 220  
DEYELLCLDGSRQPVDNYKTCNWARVAHAHVVARDDNKVE 260  
DIWSFLSKAQSDFGVDTKSDFHFLFGPPGKKDPVLKDLLFK 280  
DSAIMLKRVPSLMDSQLYLGF EYYS AIQSMRKDQLTPSPR 340  
ENRIQWCAVGKDEKSKCDRWSVVSNGDVECTVVDETKDCI 380  
IKIMKGEADAVALDGGLVYTAGVCGLVPVMAERYDDESQC 420  
SKTDERPASYFAVAVARKDSNVNWNNLKGGKKSCHTAVGRT 460  
AGWVIPMGLIHNRTGTCNFDEYFSEGCAPGSPNSRLCQL 500  
CQGS GGIPPEKCVASSHEKYFGYTGALRCLVEKGDVAFIQ 540  
HSTVEENTGGKNKADWAKNLQMDDFELLCTDGRRANVMDY 580  
RECNLAEVPTHAVVVRPEKANKIRDLLERQEKRFVNGSE 620  
KSKFMMFESQNKDLLFKDLTKCLFKVREGTTYKEFLGDKF 660  
YTVISNLKTCNPSDILQMCSFLEGK 685

Annexe 1 : Séquence d'acides aminés de l'ovotransferrine de poule [134].

## Résumé

L'emploi d'agents antibactériens est un moyen important d'une part dans la lutte contre les infections bactériennes et d'autre part dans la conservation des produits alimentaires. La perte d'efficacité des antibiotiques dû au développement de résistances bactériennes ainsi que la toxicité des conservateurs synthétiques rendent nécessaire l'utilisation de nouveaux produits antibactériens naturels. Les protéines et les peptides antibactériens agissant sur les membranes bactériennes paraissent une alternative pouvant limiter l'instauration de résistances bactériennes. L'ovotransferrine est une protéine du blanc d'œuf ayant des propriétés membranotropes responsables entre autres de son activité antibactérienne.

L'objectif de cette thèse est d'étudier les mécanismes membranotropes de l'ovotransferrine vis-à-vis des membranes externe et cytoplasmique d'*E. coli*. Pour cela, des monocouches de LPS (lipopolysaccharides) et de phospholipides sont utilisés comme des modèles membranaires expérimentaux. L'ovotransferrine possède une capacité d'insertion dans la monocouche de LPS qui dépend de la concentration protéique, de la compacité de la monocouche et de la conformation des molécules de LPS. L'ovotransferrine s'adsorbe faiblement sur la monocouche de phospholipides. L'interaction protéine/lipide induit une désorganisation locale des lipides ce qui pourrait favoriser *in vivo* la perméabilité membranaire et être la cause de l'activité antibactérienne.

L'analyse comparative physico-chimique de l'ovotransferrine chauffée à sec avec la forme native a montré une conservation des structures secondaire et tertiaire, une augmentation de l'hydrophobie de surface et probablement de la flexibilité et une affinité plus élevée aux interfaces hydrophiles/hydrophobes (eau/air). L'activité membranaire de l'ovotransferrine est accrue après le chauffage à sec. La capacité d'insertion ainsi que son affinité à la monocouche de LPS sont amplifiées. De plus, le traitement thermique à sec induit une capacité d'insertion dans la monocouche de phospholipides ainsi qu'une adsorption plus élevée. Ainsi, l'ovotransferrine chauffée à sec induit des perturbations plus importantes des monocouches à des concentrations protéiques plus faibles.

**Mots clés :** Ovotransferrine, membranes bactériennes, modèle membranaire, *Escherichia coli*, lipopolysaccharides, phospholipides, chauffage à sec, activité membranaire.

---

## Abstract

The use of antibacterial agents is very important, firstly, on the fight against bacterial infections, and secondly, to keep food products. The loss of antibiotics effectiveness due to the development of bacterial resistance and the toxicity of synthetic preservatives necessitates the development of new natural antibacterial products. Antibacterial proteins and peptides acting on the bacterial membranes appear as an alternative that can limit the establishment of bacterial resistances. Ovotransferrin is an egg-white protein with membranotropic properties responsible among other things for its antibacterial activity.

The aim of this thesis is to study the membranotropic mechanisms of ovotransferrin towards the outer and cytoplasmic membranes of *E. coli* using respectively monolayers of LPS (lipopolysaccharides) and phospholipids as experimental membrane models. Ovotransferrin has an insertion capacity in LPS monolayer that is dependent on protein concentration, monolayer compactness, and LPS molecule conformation. Ovotransferrin weakly adsorbs to the monolayer of phospholipids. The protein/lipid interaction induce local lipids disruption that could promote membrane permeability *in vivo* and be the cause of the antibacterial activity.

The physicochemical comparative analysis of dry-heated ovotransferrin with the native form showed conservation of secondary and tertiary structures, an increase of surface hydrophobicity and probably of flexibility and higher affinity to hydrophilic/hydrophobic interfaces (water/air). The membrane activity of ovotransferrin is increased after dry-heating. The insertion capacity and the affinity to the LPS monolayer are amplified. In addition, the dry thermal treatment induce an insertion capacity in the phospholipid monolayer as well as with higher adsorption. Thus, dry-heated ovotransferrin induces greater disruption of monolayers at lower protein concentrations.

**Keywords:** Ovotransferrin, bacterial membranes, membrane models, *Escherichia coli*, lipopolysaccharides, phospholipids, dry-heating, membrane activity.