

Université de Montréal

Étude des interactions entre l'antibactérien nisine
et des membranes lipidiques modèles

Par

Rachida El Jastimi

Département de Chimie
Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Chimie

Juin, 1998

© Rachida El Jastimi



QD
3
U54
1998
v. 022

Université de Montréal

Étude des réactions entre l'atmosphère et les écosystèmes forestiers

par

André G. Houlihan

et

Éditions de l'Université de Montréal

Étude des réactions entre l'atmosphère et les écosystèmes forestiers

This dissertation is the result of the author's research and is not to be considered as an official document of the University of Montreal.

juin 1998

Université de Montréal



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude des interactions entre l'antibactérien nisine
et des membranes lipidiques modèles

présentée par:

Rachida El Jastimi

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Professeur Benoît Roux, Président-rapporteur

Professeur Michel Lafleur, Directeur de recherche

Professeur Gilles Durocher, Membre du Jury

Professeur Michèle Auger, Examinatrice externe

Thèse acceptée le :98.09.10.....10 Septembre 1998

SOMMAIRE

La nisine est un agent utilisé dans la conservation des produits laitiers et des viandes. Cependant, le mécanisme d'action antibactérienne de ce peptide est encore inconnu et très peu de renseignements sont disponibles quant à l'effet de ce peptide sur les lipides. Cette thèse est consacrée principalement aux interactions entre cet antibiotique et les membranes modèles de phospholipides.

Dans un premier temps, par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, nous montrons que la structure secondaire de la nisine liée aux membranes lipidiques, donc probablement sa forme active, est différente de celle libre en milieu aqueux. Cette association avec la membrane fait la promotion des structures en coude β . Ce changement de structure semble être indépendant de la charge à la surface de la membrane.

Ensuite, par la technique de fluorescence, nous montrons que la nisine affecte l'intégrité des membranes zwitterioniques faites de 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC) en induisant des fuites. Cette perturbation de la perméabilité est augmentée en présence de charges négatives dans la membrane. Quand le cholestérol est présent dans des membranes neutres, l'effet de la nisine est fortement réduit et l'intégrité de la membrane est protégée. Les interactions

entre la nisine et les membranes lipidiques sont principalement d'origine électrostatique, les interactions hydrophobes jouent un rôle secondaire.

La morphologie des assemblages lipidiques en présence de la nisine fait également l'objet de cette thèse. Par RMN du deutérium, du phosphore et par cryo-microscopie électronique, les changements qu'induit la nisine sont caractérisés pour deux grandes classes de lipides: la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine. La présence de la nisine dans les membranes de 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine induit la formation d'agrégats et la disparition des dispersions multilamellaires. Dans les membranes de phosphatidyléthanolamine, nous montrons que la nisine favorise la formation de phases non-lamellaires hexagonales ou cubiques pour la 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine et la 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine. La présence du cholestérol a un effet protecteur contre ces réorganisations induites par la nisine.

Finalement, une nouvelle méthode de fluorescence a été développée pour mesurer de manière indépendante et simultanée le relargage de sondes à partir de deux populations de vésicules. Le couple de sondes qui a permis ce type d'expérience est la calcéïne et la sulforhodamine B. Cette technique, développée en utilisant la mélittine et le Triton X-100, est aussi appliquée à l'étude de la nisine. Les résultats montrent d'abord que la distribution hétérogène de la

mélicitine sur des vésicules de POPC avec et sans cholestérol amène des variations dans les taux de relargage observés: il y a ciblage d'une population de vésicules, celle sans cholestérol, et relargage accru de celles-ci dans des conditions de compétition. Dans le cas de la nisine, la lyse sélective n'a pas été observée. En effet, la présence ou l'absence dans le milieu, des liposomes de POPC contenant du cholestérol ne semble pas affecter le relargage induit par la nisine des vésicules de POPC.

Ces résultats montrent clairement que la nisine perturbe les membranes lipidiques et fournissent de nouvelles pistes quant à l'action antibactérienne de cet antibiotique.

Mots clés

Nisine, phospholipides, spectroscopie infrarouge, spectroscopie de fluorescence, résonance magnétique nucléaire du deutérium et du phosphore, cryo-microscopie électronique.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	i
Table des matières	iv
Liste des figures	viii
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xiv

CHAPITRE I: INTRODUCTION

1.1 Problématique	1
1.2 Qu'est-ce que la nisine ?	2
1.3 Membrane de bactéries	6
1.4 Les phospholipides	8
1.5 Interactions nisine/lipides	14
1.6 Description du projet	18
1.7 Spectroscopie infrarouge des peptides et des lipides	19
1.8 Principe de la technique de relargage de sonde fluorescente	21
1.9 Principe de la RMN du phosphore et du deutérium en phase solide ...	22

CHAPITRE II: CARACTÉRISATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE LA NISINE LIBRE ET LIÉE AUX MEMBRANES LIPIDIQUES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

2.1 Introduction	30
2.2 Partie expérimentale	31
2.2.1 Provenance des produits	31
2.2.2 Préparation des échantillons	32

2.2.3 Corrections, déconvolution et simulation spectrales	33
2.3 Résultats	35
2.4 Discussion	44

CHAPITRE III: ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA NISINE ET LES MEMBRANES LIPIDIQUES MODÈLES

3.1 Introduction	49
3.2 Partie expérimentale	50
3.2.1 Matériels	50
3.2.2 Mélanges des lipides	51
3.2.3 Expériences de fluorescence	51
a) Technique des fuites	51
b) Détermination du mécanisme de relargage	53
3.2.3 Expériences de RMN	55
a) Préparation des échantillons	55
b) Acquisition des données	55
3.2.4 Expériences de cryo-microscopie électronique	57
3.2.5 Expériences de spectroscopie infrarouge	57
3.3 Influence de la nisine sur la perméabilité des membranes lipidiques ...	58
3.3.1 Résultats	58
3.3.1.1 Effet de la nisine sur la perméabilité des vésicules de POPC	58
3.3.1.2 Effet des charges négatives sur l'activité lytique de la nisine	61

3.3.1.3 Effet du cholestérol sur le relargage induit par la nisine.....	64
3.3.1.4 Mécanisme de relargage induit par la nisine dans les vésicules de POPC et POPC/30 mol% chol	68
3.3.2 Discussion	70
3.4 Caractérisation de la dynamique et de la morphologie des complexes DPPC/nisine. Effet inhibiteur du cholestérol	74
3.4.1 Résultats	74
3.4.2 Discussion	86
3.5 Effet de la nisine sur le polymorphisme des membranes de phosphatidyléthanoline. Promotion de phases non-lamellaires	92
3.5.1 Résultats	92
3.5.1.1 Induction de la phase hexagonale dans les membranes de DOPE	92
3.5.1.2 Promotion de la phase cubique dans les membranes de POPE	97
3.5.1.3 Effet du cholestérol sur les complexes POPE/nisine ..	104
3.5.2 Discussion	107
3.6 Discussion générale	110

CHAPITRE IV: MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE À DOUBLE SONDÉS POUR MONTRER LE CIBLAGE DES LIPIDES PAR DES AGENTS PERTURBATEURS

4.1 Introduction	113
4.2 Matériels et méthodes	116
4.3 Résultats et discussion	117

CHAPITRE V: CONCLUSION 135

RÉFÉRENCES 138

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Structure primaire de la nisine	3
Figure 1.2	Amphiphilicité de la nisine	5
Figure 1.3	Représentation d'une membrane de cellule de bactéries et d'une membrane de cellules de mammifères	7
Figure 1.4	Structures de quelques lipides membranaires	9
Figure 1.5	Description schématique de la balance amphiphile	11
Figure 1.6	Conformation de certains acides aminés de la nisine liée et leur localisation dans des modèles de membranes selon la littérature ...	16
Figure 1.7	Spectres RMN du phosphore de quelques phases lipidiques	24
Figure 1.8	Spectre RMN du deutérium de la DPPC-d ₆₂ pure à 51° C	27
Figure 2.1	Bande amide I de la nisine dissoute dans H ₂ O, H ₂ O/TFE 50:50 et TFE.....	36
Figure 2.2	Effet du solvant sur la position de la bande amide I de la nisine ..	39
Figure 2.3	Variation de l'aire relative des quatres composantes de la bande amide I en fonction de la proportion de TFE dans le mélange TFE/H ₂ O.....	40
Figure 2.4	Bande amide I' de la nisine dissoute dans D ₂ O	42
Figure 2.5	Bande amide I de la nisine liée à DPPC et DPPG, dans un rapport molaire d'incubation lipide/nisine Ri=5, à 25° C	43
Figure 3.1	(A) Les trois parties d'une courbe de relargage. (B) Le pourcentage de relargage de la calcéine des vésicules de POPC en fonction du rapport molaire d'incubation nisine/POPC	60

Figure 3.2	(A) Le relargage de la calcéine induit par la nisine des vésicules de POPG. (B) Le pourcentage de relargage de la calcéine des vésicules de POPG, de POPG:POPC et de POPC en fonction du rapport molaire d'incubation nisine/phospholipides	62
Figure 3.3	(A) Le relargage de la calcéine induit par la nisine des vésicules de POPC/30 mol% chol et des vésicules de POPC. (B) Le pourcentage de relargage de la calcéine de POPC, de POPC/15 mol% chol et de POPC/30 mol% chol en fonction du rapport molaire nisine/lipide .	65
Figure 3.4	(A) Le relargage de la calcéine induit par la nisine des vésicules de POPC/POPG (3:7) contenant 30 mol% chol et des liposomes de POPC/POPG (3:7). (B) Le pourcentage de relargage de la calcéine provoquée par la nisine en fonction du rapport molaire nisine/lipide .	67
Figure 3.5	Mesure de l'efficacité de l'auto-extinction de fluorescence (Q) pour déterminer le mécanisme de relargage de la calcéine induit par la nisine des vésicules de POPC et POPC/30 mol % chol	69
Figure 3.6	Spectres RMN du deutérium de DPPC-d ₆₂ en absence et en présence de la nisine	76
Figure 3.7	Spectres RMN du phosphore pour d'échantillons de DPPC, DPPC/nisine et DPPC/30 mol% chol/nisine	79
Figure 3.8	Effet de la concentration des espèces sur la dissociation du complexe DPPC/nisine	80
Figure 3.9	Un exemple de structure lipidique multilamellaire observée par cryo-microscopie électronique	82
Figure 3.10	Cryo-microscopie électronique des complexes DPPC/nisine Ri=5. A) en phase gel (25° C); B) en phase liquide cristalline (50° C)	83
Figure 3.11	Spectres RMN du deutérium des échantillons de DPPC-d ₆₂ /30 mol% chol et de DPPC-d ₆₂ /30 mol% chol/nisine	85
Figure 3.12	Spectres RMN du phosphore des échantillon de DOPE et de DOPE/nisine	93
Figure 3.13	Variation du pourcentage de la phase hexagonale et de la phase cristalline de la DOPE en fonction de la température	94

Figure 3.14	Variation du pourcentage de la phase hexagonale de la DOPE en absence et en présence de la nisine, en fonction de la température ..	96
Figure 3.15	Effet de la température sur la fréquence du mode d'élongation symétrique des méthylènes de la POPE pure et du complexe POPE/nisine $R_i=10$	98
figure 3.16	Spectres RMN du phosphore de la POPE pure et du complexe POPE/nisine à différentes températures	100
Figure 3.17	Spectres RMN du phosphore de POPE, POPE/nisine, POPE/30 mol % chol et POPE/30 mol% chol/nisine, après un nombre varié de cycles de chauffage de part et d'autre la température de transition de phase lamellaire-hexagonale	102
Figure 3.18	Pourcentage de la raie isotrope en fonction du nombre de cycles de chauffage de part et d'autre la température de transition lamellaire-hexagonale pour les échantillons de POPE et de POPE/nisine	103
Figure 3.19	Effet de la température sur la fréquence du mode d'élongation symétrique des méthylènes de POPE/30 mol% chol et de POPE/30 mol% chol/nisine	105
Figure 4.1	Spectres d'excitation et d'émission de la calcéine et de la sulforhodamine B en solution aqueuse (pH 6)	118
Figure 4.2	Variation de l'efficacité de l'auto-extinction de la calcéine et de la SRB encapsulées dans des vésicules de POPC en fonction de leur concentration interne	120
Figure 4.3	Spectres d'émission de la calcéine et de la SRB en solution aqueuse. Spectre d'émission de la calcéine et de la SRB présentes simultanément en solution	122
Figure 4.4	Le relargage induit par la mélittine de la calcéine et de la SRB co-encapsulées dans les mêmes vésicules de POPC	124
Figure 4.5	Le relargage induit par la mélittine de la calcéine et de la SRB des différents systèmes de vésicules	126
Figure 4.6	Le relargage induit par la mélittine des vésicules de POPC coexistant avec des vésicules de POPC/30 mol % chol	128

Figure 4.7	Le relargage de la calcéine des vésicules de POPC et de la SRB des vésicules de POPC/40 mol% chol induit par la méllittine et le Triton X-100	131
Figure 4.8	Comparaison entre la méthode à sonde unique et la méthode à deux sondes, dans le cas de la nisine	133

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABA	:	Acide aminobutyrique
Chol	:	Cholestérol
Δv_Q	:	Écart quadripolaire
$\Delta\sigma$:	Anisotropie du déplacement chimique
DEPE	:	1,2-diélaïdoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine
DHA	:	Déhydroalanine
DOPE	:	1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine
DPPC	:	1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
DPPC-d ₆₂	:	1,2-bis(perdeutériopalmitoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine
DPPG	:	1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol
EDTA	:	Acide éthylènediaminetétracétique
H _{II}	:	Phase hexagonale inverse
L _{α}	:	Phase liquide cristalline
l _o	:	Phase liquide ordonnée
LUV	:	Grosses vésicules unilamellaires (large unilamellar vesicles)
MES	:	Acide 2-[N-morpholino]éthanesulfonique
MLV	:	Vésicules multilamellaires (multilamellar vesicles)
PC	:	Phosphatidylcholine
PE	:	Phosphatidyléthanolamine
POPC	:	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine

POPG :	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol
POPE :	1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3- phosphoéthanolamine
Ri :	Rapport molaire d'incubation lipide/peptide
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
SDS :	Dodécyl sulfate de sodium
SRB :	Sulforhodamine B
T _m :	Température de transition de phase gel-liquide cristalline
TFE :	Trifluoroéthanol

REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner ici ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, le professeur Michel Lafleur, de m'avoir accepté dans son groupe de recherche et avoir dirigé ce travail avec un enthousiasme communicatif. J'ai beaucoup apprécié sa rigueur scientifique et ses qualités humaines tout au long de ce travail. Je le remercie également de m'avoir donné les moyens nécessaires pour mener à bien ce travail de recherche.

Je remercie le Dr Michel Belletête pour le support technique apporté lors des expériences de fluorescence. Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire Régional de Résonance Magnétique Nucléaire: le Dr Minh Tan Phan Viet, Mr Robert Mayer et Mme Sylvie Bilodeau qui m'ont apporté l'aide technique nécessaire à la réalisation des expériences RMN.

Ma grande reconnaissance est adressée au Dr Katarina Edwards de l'université d'Uppsala (Suède) qui a contribué à ce travail en réalisant les expériences de cryo-microscopie électronique.

Un grand MERCI à mes collègues de travail : Chantal Paré, Aline Percot, Mr Paul Sauvageau, Vera Velkova, pour l'ambiance agréable et l'aide apportée.

Je remercie mes parents, mes frères et soeurs pour leur soutien et leur amour, qu'ils trouvent ici un témoignage de ma profonde gratitude. Finalement, je ne saurai remercier assez mon mari Ali pour son aide, son amour et son soutien qui m'ont énormément aidée à réaliser ce travail.

À mes parents

CHAPITRE I

INTRODUCTION

La nisine est un peptide sécrété par des souches de *Streptococcus lactis* (Jung, 1991) et qui possède une grande activité antimicrobienne contre une large gamme de bactéries Gram positives. En 1988, l'organisme "Food and Drug Administration" a attribué à la nisine le statut de produit généralement reconnu comme sans danger (Generally Recognized As Safe) et a reconnu son utilisation comme agent de conservation. En 1989, la nisine a été approuvée dans de nombreux pays (Molitor et Sahl, 1991). La nisine est utilisée comme agent de conservation des produits laitiers. Elle inhibe, à des concentrations inférieures à 300 µg/mL, la croissance des souches de *Clostridium* qui se développent dans le lait. La nisine est également utilisée dans la conservation des viandes, des fruits et des légumes (Molitor et Sahl, 1991).

1.1 Problématique

La nisine agit de façon virulente contre une large gamme de bactéries. Présentement, le mécanisme d'action antibactérienne de la nisine est inconnu. Il a été

cependant identifié que la membrane est le site d'action de la nisine (Kordel et Sahl, 1986). Deux hypothèses sont proposées dans la littérature:

1- La nisine affecterait le mur cellulaire des bactéries en inhibant la synthèse du constituant principal de cette paroi: la muréine (Reisinger et coll., 1980). Ainsi la cellule perd cette enveloppe protectrice et meurt. C'est le mode d'action des antibiotiques β -lactamines dont fait partie la pénicilline (Eberlyn, 1994).

2- La nisine agirait directement sur la partie lipidique de la membrane cytoplasmique (Kordel et Sahl, 1986; García Garcerá et coll., 1993; Driessen et coll., 1995). C'est une déstabilisation de la structure lipidique qui conduit à la mort des bactéries.

Dans le cadre de cette thèse, la deuxième hypothèse sera étudiée en examinant si la nisine a un effet sur les lipides de la membrane.

1.2 Qu'est-ce que la nisine?

La nisine est un polypeptide de 34 acides aminés (figure 1.1). Elle contient 5 cycles identifiés par A, B, C, D et E, en allant de l'azote terminal au carbone terminal. Ces cycles sont formés par des ponts sulfure introduits par des modifications post-translationnelles de la sérine, la thréonine et la cystéine (Liu et Hansen, 1990). Ce peptide fait partie de la famille des lantibiotiques étant donné la présence des groupements lantionine et méthyllantionine (figure 1.1). La nisine

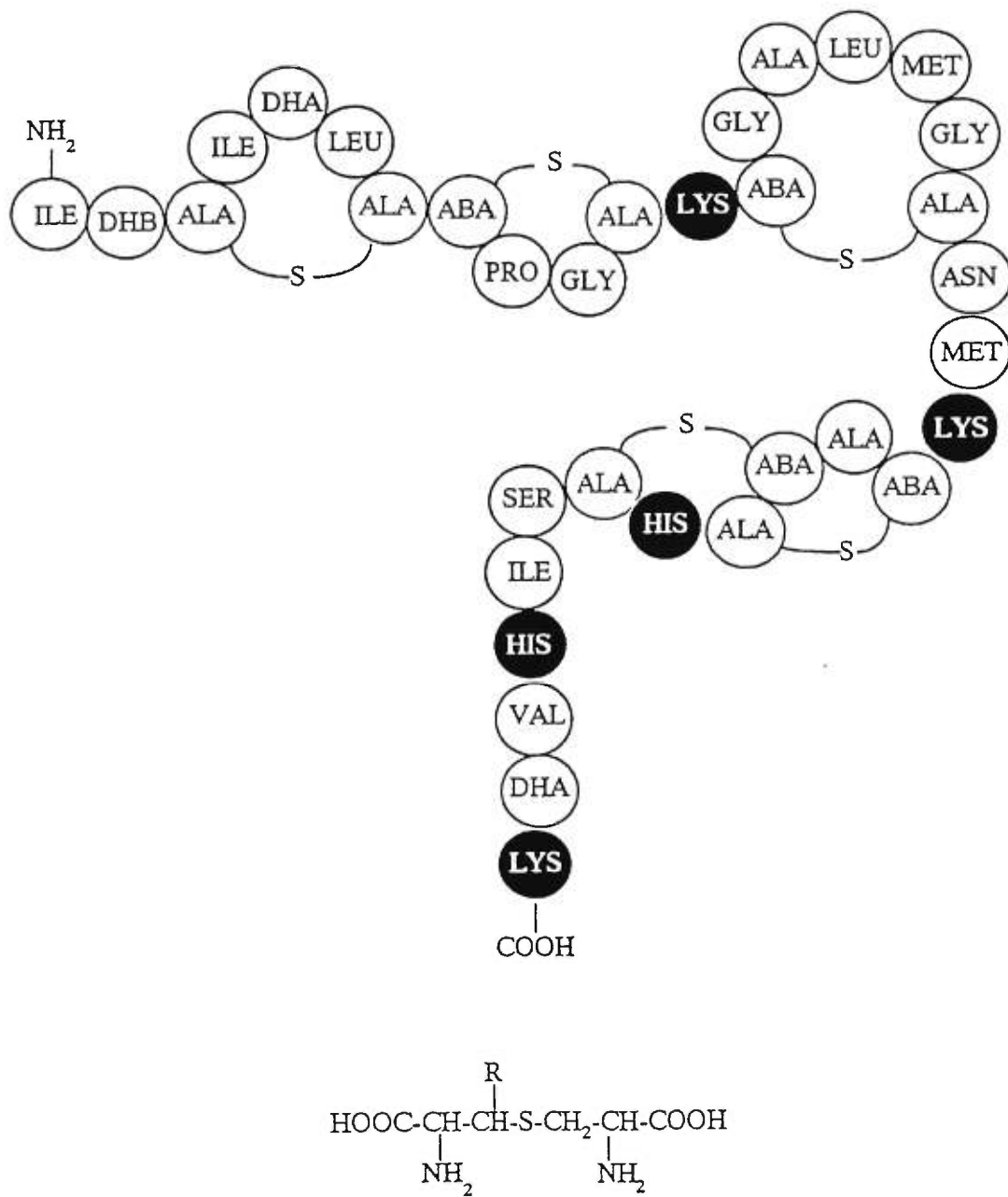


Figure 1.1 Structure primaire de la nisine. ABA: l'acide aminobutyrique; DHA: la déhydroalanine; le groupement ALA-S-ALA est appelé lanthionine (R=H) et le groupement ABA-S-ALA est dit β -méthyllanthionine (R=CH₃) (Driessen et al., 1995). Les groupements foncés sont les résidus chargés positivement.

contient également des acides aminés rares comme la déhydroalanine et la déhydrobutyrine. Elle possède 5 charges positives: trois sont situées du côté C-terminal (^{27}His , ^{31}His et ^{34}Lys) et deux autres lysines font la connexion entre les cycles B et C d'une part et C et D d'autre part (^{12}Lys et ^{22}Lys). Les valeurs des pKa de la chaîne latérale des résidus His et Lys sont 6,5 et 10 respectivement (Verheul et coll. 1997). Une autre propriété très intéressante de la nisine est son caractère amphiphile. La partie 1-21 de ce peptide est particulièrement hydrophobe sauf la lysine (^{12}Lys), comme le montrent les valeurs positives d'hydrophobicité (figure 1.2) calculées selon l'échelle d'Eisenberg (Eisenberg et coll., 1982). Subséquemment, on retrouve une alternance de résidus hydrophiles et hydrophobes. La partie C-terminal (résidus 22-34) contient quatre acides aminés positifs (figure 1.2). Le caractère amphiphile de la nisine suggère son interaction avec les membranes lipidiques.

Des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton et des simulations se sont intéressées à la structure secondaire de la nisine en solution aqueuse (Lian et coll., 1992; Van de Ven et coll., 1991). Elles ont montré que le cycle B adopte une structure de coude β . Une partie du cycle C (les résidus 16-19) est sous forme d'un tour d'hélice (Lian et coll., 1992). Les cycles D et E sont passablement rigides du fait de leur connexion. Ces deux cycles adopteraient soit une structure en hélice- α tordue, ou bien seraient sous forme de deux coudes β consécutifs (Van de Ven et coll., 1991). Peu d'informations existent à propos des segments entre les cycles. On a proposé que la région ^{22}Lys - $^{23}\text{DAbu}$ forme un coude β et finalement,

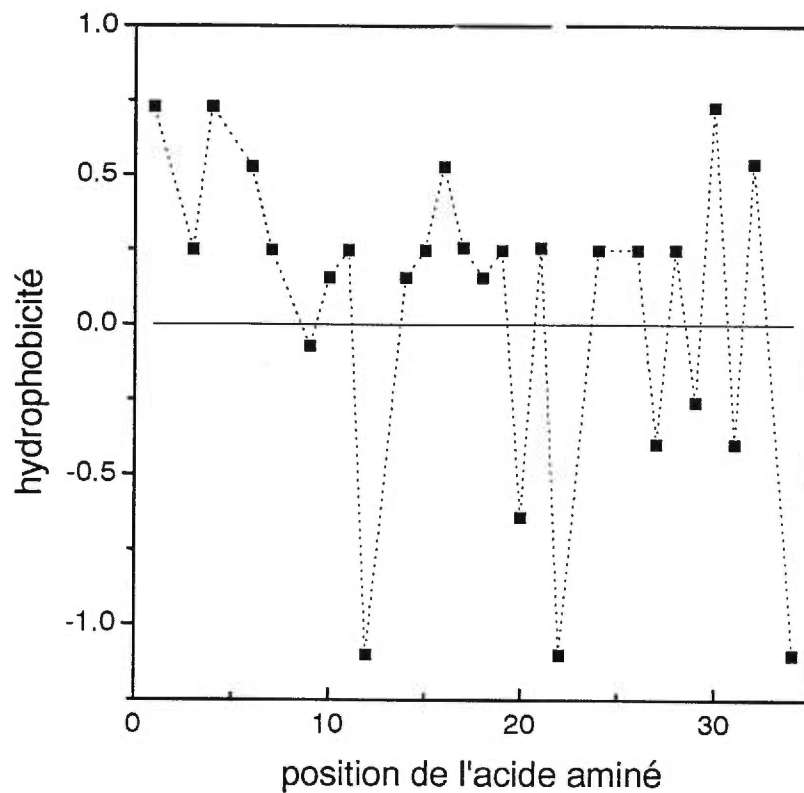


Figure 1.2 Amphiphilicité de la nisine. L'hydrophobicité des acides aminés est obtenue de l'échelle d'Eisenberg (Eisenberg et al., 1982). Les acides aminés rares, pour lesquels la mesure d'hydrophobicité n'est pas rapportée, ont été omis.

le segment 29-34 existe sous une forme étendue (Chan et coll., 1989). Des chercheurs ont également étudié l'effet du TFE sur la structure secondaire de la nisine (Van de Ven et coll. 1991). Celui-ci induit une organisation structurale du peptide: le segment hélicoïdal observé dans l'eau pour la région 23-28 est étendu jusqu'à la fin de la partie C-terminale dans les mélanges TFE/eau.

La solubilité et la stabilité de la nisine dépendent fortement du pH. La solubilité de ce peptide décroît de 57 mg/mL à pH 2 à environ 0,25 mg/mL à pH 8,5. À des pH élevés, la nisine est instable et devient inactive (Liu et Hansen, 1990). Ceci est probablement une conséquence de sa dénaturation ou des modifications chimiques qu'elle subit à des pH élevés, en présence de nucléophiles tels les ions hydroxydes (Liu et Hansen, 1990). Nous avons choisi de travailler à pH 6 pour avoir une bonne solubilisation du peptide tout en s'approchant du pH physiologique.

1.3 Membrane de bactéries

L'action de la nisine se situe au niveau de la membrane. L'enveloppe cellulaire des bactéries Gram positives comprend deux entités essentielles, la membrane cytoplasmique et une paroi qui lui est extérieure constituée principalement de muréine (figure 1.3). La membrane cytoplasmique est formée d'une bicouche lipidique. Pour plusieurs bactéries, la composante lipidique majoritaire est la

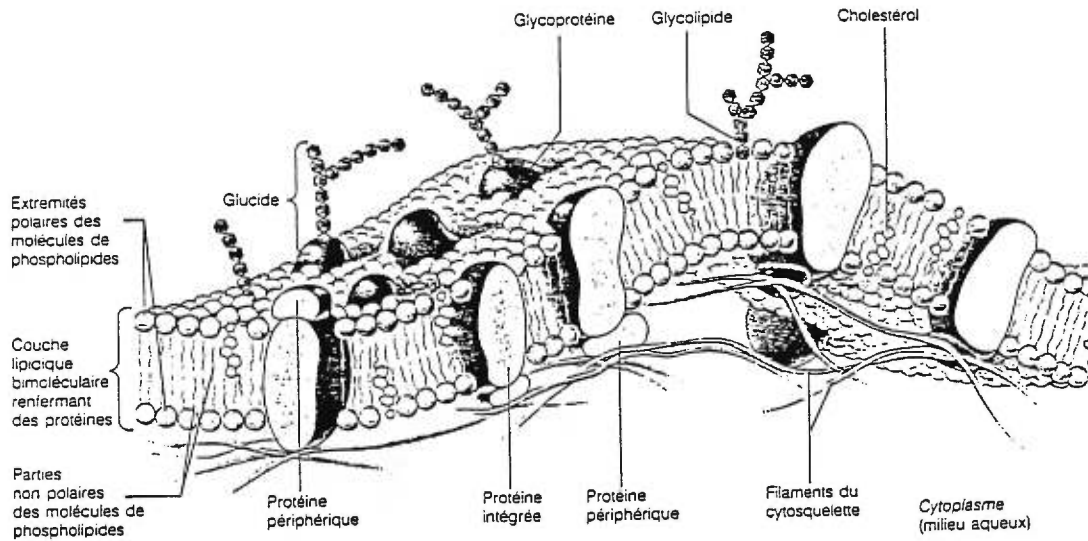
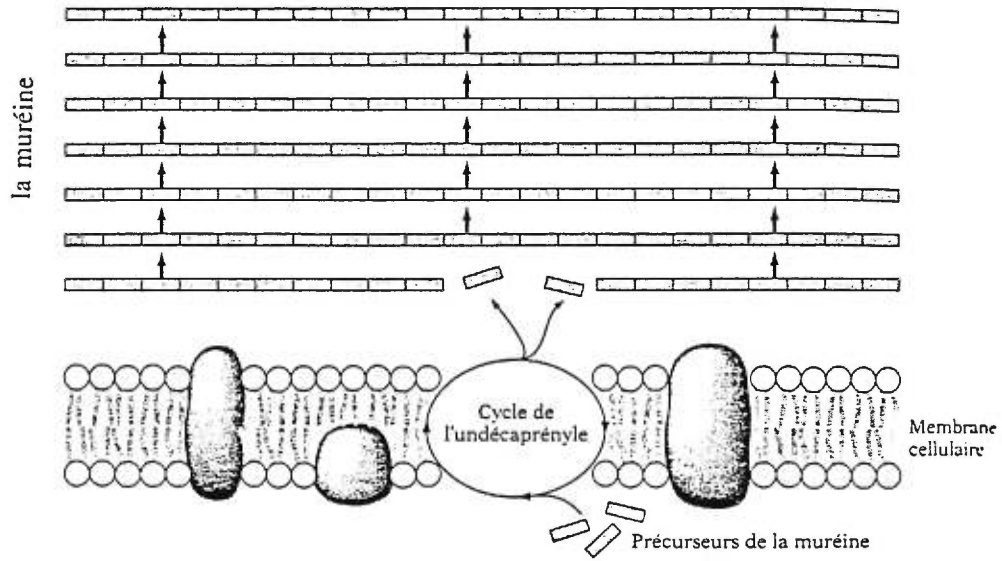


Figure 1.3 Représentation d'une membrane de cellule de bactéries (Neidhardt et al., 1994) (en haut) et d'une membrane de cellule de mammifères (Marieb et Laurendeau, 1993) (en bas).

phosphatidyléthanolamine (PE) (Gennis, 1989; O'Leary et Wilkinson, 1988). La paroi externe joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la cellule tant sur le plan de la rigidité que de la résistance à diverses agressions, telles que des modifications de force ionique (Eberlyn, 1994). Les mailles de muréine sont perméables à des composés comme les sucres et les acides aminés qui traversent facilement ce mur pour atteindre la membrane cellulaire (Neidhardt et coll., 1994).

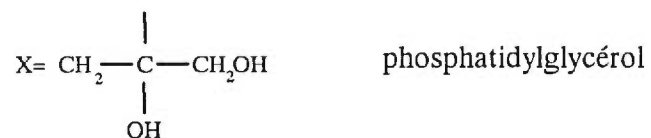
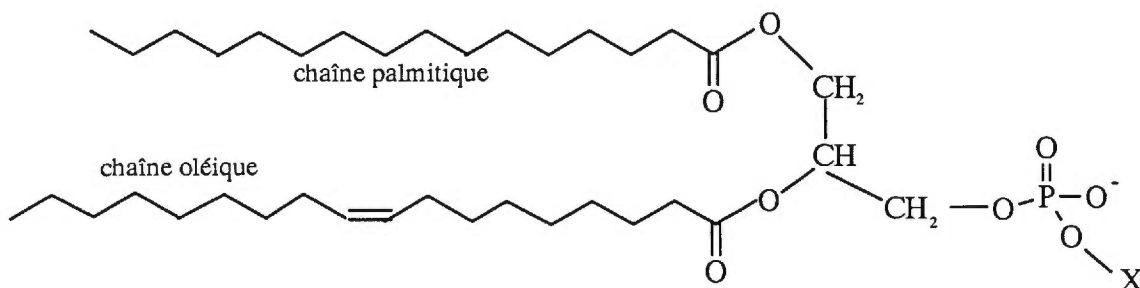
L'absence de la paroi externe constitue une différence majeure entre une cellule de bactéries et une cellule de mammifères. En effet, les cellules des eucaryotes ne possèdent pas la paroi de peptidoglycan. Cependant, ces membranes, dont le phospholipide majoritaire est la phosphatidylcholine (PC) (Gennis, 1989), contiennent des composantes qui rendent celles-ci plus rigides et plus résistantes. C'est le cas du cholestérol qui est une composante essentielle dans les membranes de mammifères et peut représenter jusqu'à 41 % de la fraction lipidique de la membrane (Gennis, 1989). Le cholestérol est absent des membranes de bactéries.

1.4 Les phospholipides

Pour étudier les effets de la nisine sur les lipides de la membrane plasmique, nous avons utilisé des membranes modèles constituées de phospholipides.

Généralement, les phospholipides sont constitués d'une partie hydrophobe et

PHOSPHOLIPIDES



CHOLESTÉROL

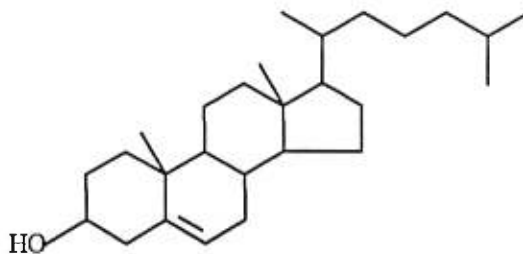


Figure 1.4 Structure de quelques lipides membranaires.

d'une partie hydrophile. La partie hydrophobe est composée d'une ou plusieurs chaînes hydrocarbonées reliées à un squelette glycérol par un groupe ester (figure 1.4). Les chaînes acyle sont reliées aux positions 1 et 2 du squelette glycérol par des liens ester; la troisième position du glycérol est estérifiée par un groupement phosphate (figure 1.4).

En dispersion aqueuse, les phospholipides peuvent s'organiser de différentes façons: en phase lamellaire, en phase cubique, en phase hexagonale, etc. Dans ces agrégats, les chaînes hydrocarbonées réduisent leur contact défavorable avec l'eau et forment un coeur hydrophobe. Leur association est, de plus, stabilisée par les interactions de van der Waals entre les chaînes hydrocarbonées adjacentes. Des interactions électrostatiques, stériques et des liaisons hydrogène peuvent exister au niveau de l'interface avec l'eau. La structure lamellaire ou bicouche est la base structurale de la membrane. Dans une phase hexagonale inverse (H_{II}), un feuillet lipidique entoure un cylindre d'eau. Les chaînes des lipides pointent vers l'extérieur du cylindre (d'où le terme inverse) et les têtes polaires constituent une interface avec la colonne d'eau (figure 1.5). Dans cette phase, les cylindres d'eau sont empilés de manière hexagonale. Les plans lipidiques peuvent se courber dans différentes directions pour donner lieu à des phases de géométries plus complexes, les phases cubiques.

Le type de structure adoptée par les lipides dépend, entre autres, de la longueur

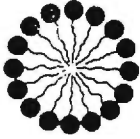

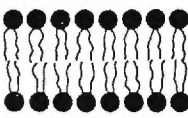

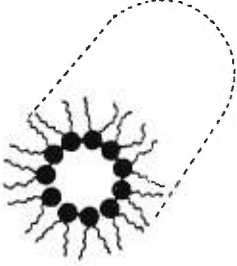

PHASE	FORME MOLÉCULAIRE
 <p data-bbox="610 621 732 653">Micellaire</p>	 <p data-bbox="902 621 1057 653">Cône inversé</p>
 <p data-bbox="626 1010 773 1041">Lamellaire</p>	 <p data-bbox="927 999 1040 1031">Cylindre</p>
 <p data-bbox="570 1398 789 1430">Hexagonale (H_{II})</p>	 <p data-bbox="951 1388 1016 1419">Cône</p>

Figure 1.5 Description schématique de la balance amphiphile. La forme moléculaire des lipides influence la préférence polymorphique des systèmes lipidiques (Cullis et al., 1985).

et du degré de saturation des chaînes acyle, de la structure de la tête polaire, de la température, de la présence de certains agents comme des ions et des peptides etc (Gennis, 1989; Lindblom et Rilfors, 1989). La tendance polymorphique des systèmes lipidiques peut être expliquée à partir du concept de la balance amphiphile (Cullis et coll., 1985). Si l'aire effective de la partie hydrophile du lipide est égale à l'aire occupée par la surface transversale des chaînes acyle hydrophobes, le système a tendance à former des phases lamellaires (figure 1.5). Par contre, si l'aire hydrophobe est supérieure à l'aire occupée par la région polaire, le système a tendance à former des phases inverses comme des phases hexagonales ou cubiques. On associe alors la forme effective du lipide à un cône (figure 1.5). Les facteurs extrinsèques cités auparavant peuvent influencer la préférence polymorphique des systèmes lipidiques en modifiant la balance amphiphile.

Parmi les lipides utilisés dans cette étude, on retrouve la 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DPPC), le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol (DPPG), la 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC) et le 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol (POPG) qui forment généralement des structures lamellaires en milieu aqueux. La DPPC et le DPPG sont respectivement neutre et chargé négativement et possèdent deux chaînes acyle saturées de 16 carbones. La POPC (zwitterionique) et le POPG (chargé négativement) sont des lipides qui possèdent une chaîne saturée de 16 carbones (palmitoyl) et une de 18 carbones contenant une insaturation cis en position 9 (oléoyl) (figure 1.4).

Chaque lipide possède sa propre température de transition de phase (T_m). À une température inférieure à la T_m , celui-ci se trouve dans la phase gel. Dans cette phase, les chaînes acyle sont en conformation presque toute trans et la diffusion axiale et latérale des lipides est lente. À la T_m , on observe une transition de phase gel-cristal liquide analogue à la fusion d'un solide. Les lipides en phase liquide cristalline L_α possèdent un grand désordre conformationnel au niveau de leurs chaînes et leur rotation axiale et leur diffusion latérale deviennent plus rapide (Levin, 1984). La T_m pour la DPPC et le DPPG se trouve vers 41°C (Marsh, 1990). Quant à la POPC et le POPG, ce sont des lipides qui existent en phase cristal liquide à température ambiante puisque leur T_m est -2° C et +1° C, respectivement (Wiedmann et coll., 1993).

Une autre catégorie de lipide que l'on retrouve dans cette étude est les phosphatidyléthanolamines, plus précisément la 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE) et la 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (POPE). Ces lipides forment des phases non-lamellaires hexagonales H_{II} . L'aire interfaciale moléculaire des PE est réduite par rapport à celle des PC car les trois méthyles de l'ammonium sont remplacés par trois hydrogènes (figure 1.4). Cette réduction déplace la balance amphiphile et elle est à l'origine de la tendance de ces lipides à former des phases H_{II} . La présence d'insaturation dans les chaînes acyle favorise aussi la phase H_{II} puisqu'elle augmente l'espace occupé par la partie hydrophobe de la molécule (Cullis et coll., 1985; Lafleur et coll., 1990a).

La DOPE subit une transition de la phase lamellaire à hexagonale autour de 6° C alors que la POPE subit la même transition vers 70° C (Marsh, 1990), ce qui illustre l'effet promoteur de phase hexagonale des chaînes insaturées. Les T_m de la DOPE et de la POPE sont autour de -6° C et 25° C respectivement (Marsh, 1990).

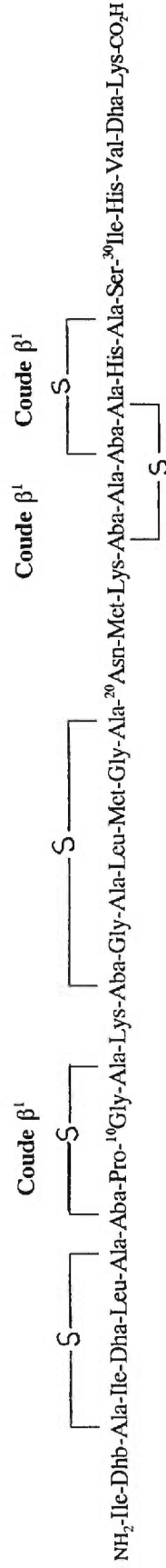
Le cholestérol est le stérol le plus commun dans la membrane des cellules animales (Gennis, 1989). C'est une molécule compacte possédant une partie hydrophobe rigide due à la présence des cycles, et une petite partie hydrophile composée d'un groupement hydroxyle (figure 1.4). Le cholestérol est connu pour être un facteur qui donne des propriétés particulières aux membranes (Vist et Davis, 1990). Dans les systèmes DPPC/cholestérol, les études ont montré que le cholestérol induit la formation d'une nouvelle phase, la phase liquide ordonnée l_o (Vist et Davis 1990). Les caractéristiques principales de cette phase est une fluidité similaire à celle de la phase liquide cristalline et un ordre élevé des chaînes acyle comme en phase gel.

1.5 Interactions nisine/lipides

Plusieurs études ont suggéré que la nisine agit au niveau de la membrane plasmique (Kordel et Sahl, 1986; García Garcerá et coll., 1993; Driessen et coll., 1995). Ceci a été d'abord suggéré par Ramseier en 1960 qui a supposé que la nisine agit comme un détergent (Ramseier, 1960). Des travaux plus récents ont suggéré que le mécanisme d'action de la nisine impliquerait l'insertion de la nisine dans la

membrane plasmique conduisant ainsi à la perte du matériel cytoplasmique (ions, acides aminés, ATP etc). Ceci provoquerait donc une dissipation du potentiel transmembranaire et un arrêt complet de toute activité de biosynthèse (Kordel et Sahl, 1986; Abee, 1995).

La nisine interagit également avec des membranes modèles (figure 1.6). En milieu micellaire comme le dodécyl sulfate de sodium et la dodécylphosphocholine, par exemple, la conformation de la nisine complexée à des micelles neutres ou chargées négativement ne dépend pas de la charge des têtes polaires des détergents (Van den Hooven et coll. 1996a). Dans ce type de milieu, les cycles B,D et E de ce peptide adoptent une structure en coude β . Il a été suggéré que la conformation de la nisine dans ce type de milieu ressemblerait à celle de la nisine dans les mélanges TFE/eau (Van den Hooven et coll. 1993). Il a été montré par RMN du proton, que les groupements hydrophobes de la partie N-terminale (^3Ala - ^{19}Ala) sont insérés dans la micelle. Parallèlement, le côté hydrophobe de la partie C-terminale (^{21}Met - ^{28}Ala) se retrouve à l'intérieur de la micelle alors que le côté plus hydrophile de cette partie réside à la surface (Van den Hooven et coll. 1996b). Des études utilisant des monocouches lipidiques comme membranes modèles ont montré que la nisine affecte grandement la pression de surface des monocouches de lipides négatifs comparativement aux lipides zwitterioniques (Demel et coll. 1996). La partie N-terminale du peptide serait à l'intérieur de la phase lipidique tandis que la partie C-terminale serait responsable des interactions électrostatiques entre la nisine et le lipide



Les résidus hydrophobes de la partie N-terminale 3-19 sont insérés dans la micelle¹

La partie N-terminale de la nisine est à l'intérieur des monocouches de lipides négatifs²

Le côté hydrophobe de la partie C-terminale est à l'intérieur de la micelle. Le côté hydrophile réside à la surface.

La partie C-terminale est responsable des interactions électrostatiques entre la nisine et la surface de la monocouche²

Le tryptophane qui remplace l'acide aminé ³⁰Ile est inséré dans la bicouche lipidique³

Figure 1.6 Conformation de certains acide aminés de la nisine liée et leur localisation dans des modèles de membranes (micelles, monocouche et bicouche) selon la littérature. 1: Van den Hooven et coll. 1996; 2: Demel et coll. 1996; 3: Martin et coll. 1996.

(Demel et coll. 1996). Des études de fluorescence utilisant une variété de nisine où le résidu ^{30}Ile a été remplacé par un ^{30}Trp ont montré que ce dernier est inséré dans le coeur de la bicouche lipidique de phosphatidylcholine:phosphatidyléthanolamine et de phosphatidylcholine:cardiolipine (Martin et coll. 1996). Cette insertion est d'autant plus importante que le lipide est chargé négativement.

Des chercheurs ont également étudié le pouvoir de la nisine d'induire la lyse dans des membranes modèles. Les résultats ont montré que la nisine induit le relargage de la carboxyfluorescéine des liposomes composés de 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DOPC) ou de mélange de DOPC avec la 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DOPE) (García Garcerá et coll., 1993). Il a été montré que le pouvoir de la nisine d'induire la lyse dans les membranes dépend de la charge de celles-ci. La lyse est inhibée quand les bicouches sont chargées négativement (García Garcerá et coll., 1993; Driessen et coll., 1995). Ce sujet est cependant controversé puisque d'autres études plus récentes ont contredit ces résultats et ont montré que la présence des lipides négatifs dans la membrane augmente considérablement le pouvoir lytique de la nisine (Martin et coll., 1996; Giffard et coll., 1997; Breukink et coll., 1997). Des études d'affinité que nous avons effectuées ont montré que la nisine se liait fortement aux membranes lipidiques chargées négativement et que les interactions hydrophobes jouaient un rôle relativement secondaire (El Jastimi et Lafleur, 1997).

1.6 Description du projet

Notre étude de l'interaction de la nisine avec les lipides comporte plusieurs volets. Dans le prochain chapitre, nous examinerons par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la structure secondaire de la nisine liée aux lipides et la comparerons avec celle de la nisine en solution dans différents milieux. Ceci permettra de mettre en relief l'interaction du peptide avec les lipides ainsi qu'identifier la forme liée, présumément la forme active du peptide.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons les résultats concernant les effets de la nisine sur les membranes lipidiques. Les changements de perméabilité des membranes de phosphatidylcholine induits par la nisine feront l'objet de la première section. Ensuite, nous examinerons le rôle du cholestérol et des charges négatives dans la lyse provoquée par la nisine dans ce type de membrane. Cette étude de perméabilité a été effectuée par la technique de fluorescence.

Nous examinerons ensuite, par RMN du deutérium et du phosphore et par cryo-microscopie électronique, si la nisine affecte le macroassemblage des membranes lipidiques de DPPC. L'effet de ce peptide sur la morphologie de ce type de membranes en présence du cholestérol sera également mis en évidence. Cette section sera également consacrée à l'étude des effets de la nisine sur le polymorphisme des membranes de phosphatidyléthanolamines et plus particulièrement l'influence que

possède la nisine sur la formation de phases non-lamellaires. Le rôle du cholestérol dans la modulation du polymorphisme de ces membranes par la nisine sera également examiné.

Au quatrième chapitre, nous décrirons la mise au point d'une technique de fuite à deux sondes fluorescentes. Cette méthode permet d'étudier le relargage sélectif induit par un agent perturbateur quand deux populations de vésicules de compositions différentes sont présentes en solution. Cette méthode permettra de montrer que la nisine est capable de cibler les vésicules de POPC ne contenant pas de cholestérol en présence de celles qui en contiennent. Une comparaison avec le Triton, un détergent, et la mélittine, une toxine extraite du venin d'abeille, sera faite.

1.7 Spectroscopie infrarouge des peptides et des lipides

La spectroscopie infrarouge a été pendant longtemps un outil permettant d'étudier de façon qualitative la structure secondaire des protéines, puisque depuis 1950, l'existence d'une corrélation empirique entre les bandes amide I et II et la conformation du polypeptide a été établie (Eliott et Ambrose, 1950). C'est l'avènement de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et l'augmentation de la stabilité, la reproductibilité et la précision de la mesure du signal et sa digitalisation qui ont permis à l'infrarouge de devenir une technique de pointe dans l'établissement de structure secondaire des protéines.

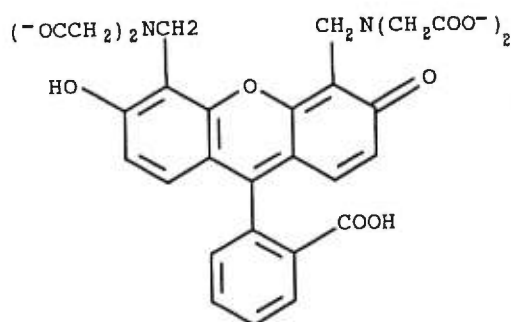
Le mode de vibration du groupement amide le plus utile en analyse infrarouge de la structure secondaire est la vibration amide I, située entre 1600 et 1700 cm^{-1} . La bande amide I représente la vibration d'élongation C=O du groupe amide couplée à la déformation CNH (figure 1.6). La fréquence de cette vibration dépend de la nature de la liaison hydrogène impliquant C=O et N-H et donc de la structure secondaire qu'adopte la chaîne peptidique (Susi et Byler, 1983). Cette bande est généralement large et contient plusieurs composantes correspondant à différentes structures. Ceci nécessite donc des traitements mathématiques de spectres que l'on verra au chapitre II. La bande amide II peut être aussi utilisée pour caractériser la structure secondaire des peptides et des protéines (Haris et coll., 1986), cependant, sa sensibilité à la conformation des peptides est moindre.

La spectroscopie infrarouge offre également une méthode puissante pour examiner les propriétés structurales des lipides. Par exemple, les bandes d'absorption associées aux élongations C-H des chaînes acyle ($\nu_{\text{C-H}}$) situées entre 2700 et 3100 cm^{-1} sont sensibles aux transitions de phase des lipides. Durant la transition de phase gel-liquide cristalline, les bandes $\nu_{\text{C-H}}$ des groupements méthylène se déplacent de 3 - 4 cm^{-1} (Umemura et coll., 1980). Ce déplacement est surtout associé au changement d'ordre conformationnel qui se produit lors de la transition (Casal et coll., 1980) mais aussi à des changements de couplage intermoléculaire et/ou de la torsion des chaînes acyle des lipides (Kodati et coll., 1995). À partir de cette approche, on déterminera de quelle façon la nisine affecte les transitions de phases des lipides.

1.8 Principe de la technique de relargage de sonde fluorescente

La mesure des changements de perméabilité induits par la nisine dans les membranes lipidiques a été effectuée par une technique de fluorescence. Une sonde fluorescente est encapsulée à haute concentration à l'intérieur de vésicules lipidiques unilamellaires. À cause de sa forte concentration, la sonde s'auto-éteint à l'intérieur des liposomes. Si la perméabilité de la membrane est affectée lors de l'addition de la nisine, il y a relargage de la sonde dans le milieu externe. Ceci entraîne sa dilution et provoque une augmentation importante de l'intensité de fluorescence que l'on peut suivre directement en fonction du temps. C'est ce qu'on appelle l'analyse des fuites.

La sonde utilisée est la calcéïne. C'est une molécule chargée négativement (voir la formule chimique ci-dessous) et la membrane lipidique est donc pratiquement imperméable à ce fluorophore (Allen, 1984). C'est une propriété importante pour ce genre d'expérience car le relargage par diffusion passive de la sonde à travers la membrane doit être négligeable. Les spectres d'excitation et d'émission de cette molécule sont donnés à la page 118).



La calcéïne

1.9 Principe de la RMN du phosphore et du deutérium en phase solide

La résonance magnétique nucléaire est une technique qui permet l'étude de la structure et de la dynamique moléculaires. Dans le champ magnétique, les transitions entre les niveaux énergétiques associées aux spins nucléaires sont sensibles aux champs magnétiques locaux existant dans leur environnement. Dans le cas du phosphore dont le spin est de $1/2$, les interactions prédominantes sont l'anisotropie du déplacement chimique et les interactions dipolaires phosphore-proton (Seelig, 1978). Le champ magnétique ressenti au niveau du noyau est réduit par le nuage électronique qui entoure ce dernier. Ce nuage n'est généralement pas isotrope et dépend des liaisons de l'atome avec les atomes avoisinants. L'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique externe influence donc le déplacement chimique. La variation du déplacement chimique en fonction de l'orientation de la molécule donne lieu à l'anisotropie du déplacement chimique ($\Delta\sigma$). En solution, les molécules tournent rapidement sur elles-mêmes et le déplacement chimique observé est un scalaire car il est moyenné par rapport à l'échelle de temps RMN. En phase solide, les molécules possèdent une orientation fixe par rapport au champ magnétique. Dans ce cas, on observe l'anisotropie du déplacement chimique. Dans le cas des membranes lipidiques, les mouvements rapides des lipides (principalement la rotation du lipide autour de son axe long et le balancement de l'axe long du lipide par rapport à la normale à la bicouche) par rapport à l'axe de symétrie locale (la normale à la bicouche) ont pour conséquence le moyennage des interactions autour de cet axe. Ce

mouvement de symétrie axiale réduit la description de l'anisotropie à deux composantes: la composante parallèle à cet axe (σ_{\parallel}) et la composante perpendiculaire à cet axe (σ_{\perp}). On peut donc exprimer la fréquence de résonance ν du noyau par :

$$\nu(\theta) = \nu_o + \frac{2}{3} \Delta\sigma \left(\frac{3\cos^2(\theta) - 1}{2} \right) \quad (1.1)$$

où ν_o est la fréquence de résonance en conditions isotropes, θ est l'angle entre l'axe de symétrie locale et le champ magnétique externe et $\Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$.

Dans une dispersion multilamellaire, toutes les orientations sont possibles et les spectres observés, appelés spectres de poudre, sont représentatifs de la distribution d'orientation des lipides par rapport au champ magnétique. Dans le cas d'une bicouche en phase gel, $\Delta\sigma$ est autour de 60 ppm. En phase fluide, le balancement de l'axe long du lipide cause un moyennage additionnel et la $\Delta\sigma$ diminue autour de 44 ppm (figure 1.7). L'anisotropie du déplacement chimique permet donc de caractériser directement la dynamique au niveau de la tête polaire, lors de la transition phase lamellaire gel-phase lamellaire fluide. Dans nos expériences, les interactions phosphore-proton sont éliminées en effectuant un découplage des protons avec les noyaux ^{31}P , simplifiant ainsi les signaux enregistrés.

La RMN du phosphore peut également caractériser des lipides en phase hexagonale. Dans cette phase, un axe de symétrie est ajouté à cause de la diffusion des lipides autour de l'axe du cylindre d'eau qui cause un moyennage supplémentaire

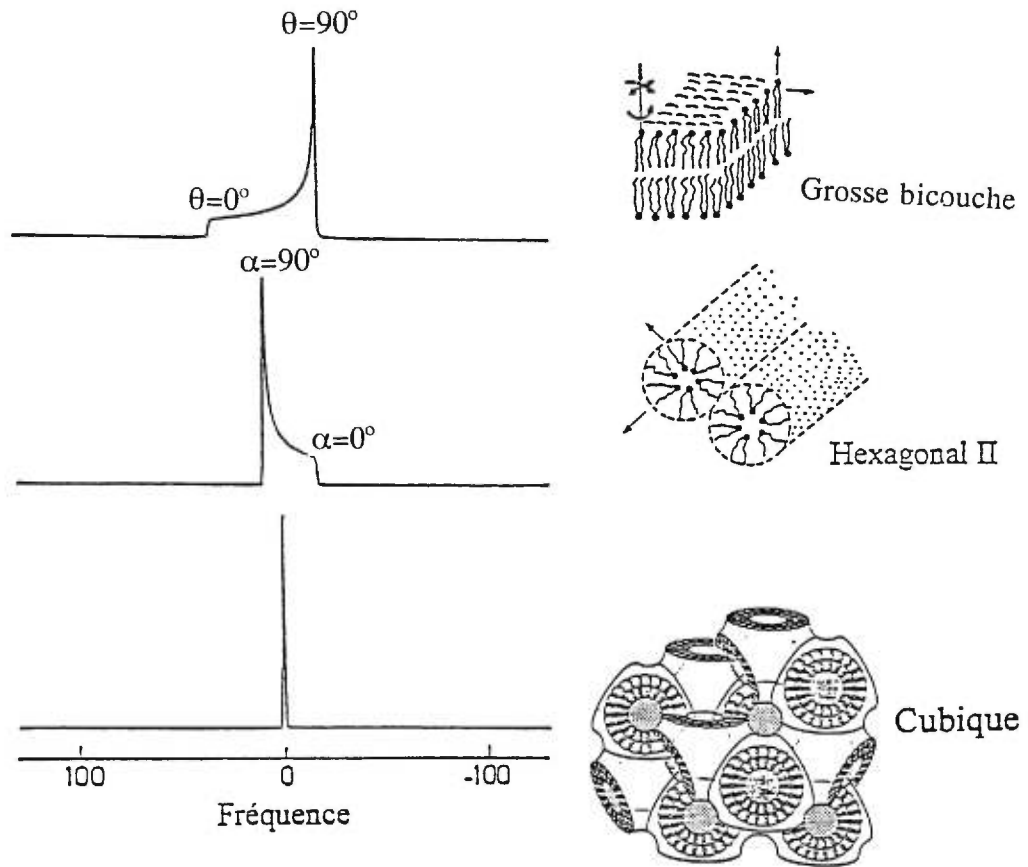


Figure 1.7 Spectres RMN du phosphore de quelques phases lipidiques (Cullis et al., 1983)

des interactions. Le spectre de poudre obtenu est inversé par rapport au spectre en phase lamellaire et réduit de moitié. Ceci est expliqué par l'addition d'un terme supplémentaire qui décrit ce moyennage additionnel (Lafleur et coll., 1990b). La fréquence de résonance ν est alors donnée par :

$$\nu(\theta) = \nu_o + \frac{2}{3} \Delta\sigma \left(\frac{3\cos^2(\alpha) - 1}{2} \right) \left(\frac{3\cos^2(\beta) - 1}{2} \right) \quad (1.2)$$

où α est l'angle entre l'axe du cylindre et le champ magnétique, et β est l'angle entre l'axe de symétrie locale et l'axe du cylindre. Ce dernier est égal à 90° . Ceci implique que la valeur du terme supplémentaire est de $1/2 (3\cos^2(90^\circ) - 1)$, soit $-1/2$, d'où la réduction de la largeur du spectre en phase hexagonale par la moitié et son inversion.

Les petites vésicules, les micelles et les phases cubiques donnent lieu en RMN du ^{31}P à des raies isotropes (Verkleij et coll., 1979; Burnell et coll., 1980; Nayar et coll., 1982; Eriksson et coll., 1985) La rotation rapide de la structure lipidique sur elle-même et/ou la diffusion des lipides le long des surfaces courbes amènent un moyennage des interactions responsables de l'anisotropie de déplacement chimique et peuvent conduire à une raie isotrope.

La RMN du deutérium en phase solide est une technique qui permet d'étudier la dynamique des chaînes des membranes modèles. Comme le deutérium est de spin $I=1$, il possède un moment électrique quadripolaire eQ ; où e représente la charge

élémentaire et Q , le moment quadripolaire du noyau. Ce dernier peut interagir avec un gradient de champ électrique au noyau, ce qui va donner lieu à une interaction quadripolaire représentée par une constante de couplage quadripolaire, e^2qQ/h . Le couplage quadripolaire maximum que l'on peut observer pour le deutérium d'une liaison C-²H est de 167 kHz (Davis, 1983) et le gradient de champ électrique est à peu près dans la même direction que le lien C-D. Ainsi, les couplages dipolaires et l'anisotropie du déplacement chimique sont négligeables par rapport à ce paramètre (Davis et Jeffrey, 1977). Puisque le deutérium est de spin $I=1$, deux transitions sont possibles ($m=+1$ à $m=0$ et $m=0$ à $m=-1$). Les interactions entre le moment quadripolaire du noyau et le gradient de champ électrique le long du lien C-D font en sorte que le changement d'orientation du moment magnétique du noyau n'implique pas la même énergie pour ces deux transitions et on observe deux raies. L'écart entre ces deux raies est dit écart quadripolaire $\Delta\nu_Q$ et dépend de l'angle entre la liaison C-D et le champ magnétique appliqué. Dans le cas des bicouches lipidiques fluides, comme en RMN du ³¹P, un spectre RMN du deutérium est la superposition de toutes les résonances des différentes orientations possibles. Les fluctuations du segment C-D par rapport à la normale de la bicouche, principalement dues à l'isomérisation trans-gauche, causent également un moyennage des interactions quadripolaires. L'éclatement quadripolaire résiduel mesuré est donc donné par:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \left(\frac{e^2qQ}{h} \right) \left(\frac{3\cos^2(\theta) - 1}{2} \right) \left\langle \frac{3\cos^2(\delta) - 1}{2} \right\rangle \quad (1.3)$$

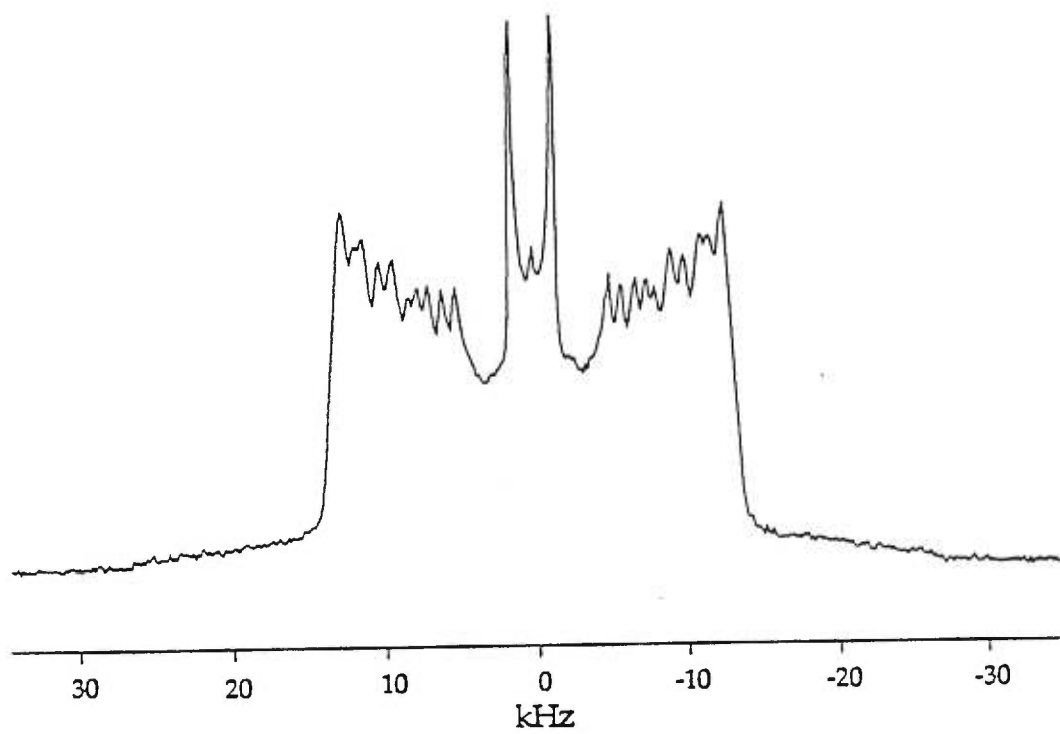


Figure 1.8 Spectre RMN du deutérium de la DPPC-d₆₂ pure à 51° C.

où θ est l'angle entre la normale de la bicouche et le champ magnétique appliqué; et δ est l'angle entre le lien C-D et la normale à la bicouche et $\langle \rangle$ représentent une moyenne sur l'échelle de temps RMN. Si le phospholipide est marqué au deutérium sur l'ensemble de la chaîne, comme dans le cas de la 1,2-bis(perdeutériopalmitoyl)-sn-glycérol-3-phosphocholine (DPPC-d₆₂), le spectre obtenu sera une superposition de plusieurs spectres de poudre associés aux divers deutériums le long de la chaîne (figure 1.8). Il est bien établi qu'il existe un gradient de flexibilité le long de la chaîne et ceci entraîne la variation de l'éclatement quadripolaire selon la position du groupement CD₂ sur la chaîne deutérée du lipide (Seelig et Seelig, 1977; Lafleur et coll., 1990b). Les spectres les plus larges sont attribués aux CD₂ près de la tête glycérol puisque leur proximité au point d'ancrage réduit leur mobilité. Dans cette région, l'ordre orientationnel varie peu; ceci se traduit par une série de doublets non-résolus dans le spectre et un "plateau" dans le profil d'ordre. Plus on s'éloigne vers l'extrémité de la chaîne, plus les mouvements augmentent causant une réduction de $\Delta\nu_Q$. Les groupements méthyle terminaux sont associés à la partie centrale du spectre de poudre puisqu'ils possèdent une rotation libre autour du lien CD₂-CD₃.

La RMN du deutérium permet également de caractériser les lipides en phase hexagonale. De façon similaire à la RMN du ³¹P, le spectre RMN du ²H typique d'une phase hexagonale est réduit par facteur plus grand que 2 par rapport à celui de la phase lamellaire et ceci est associé essentiellement à la diffusion du lipide autour du cylindre d'eau et à l'augmentation du désordre dans les chaînes acyles (Lafleur et

coll. 1990b). Dans ce cas, l'inversion des spectres n'est pas observée à cause de leur symétrie. Finalement, les petites structures lipidiques (petites vésicules, micelles, bicelles) et les phases cubiques donnent lieu à une raie isotrope en RMN du ^2H à cause de la rotation des objets sur eux-mêmes et/ou la diffusion rapide du lipide le long de la surface courbe.

Les mouvements qui ont lieu dans les membranes modèles de phospholipides sont complexes. L'étude des temps de relaxation permet de mieux comprendre la dynamique moléculaire de ces systèmes. Lorsque le moment magnétique d'un échantillon est déplacé de sa position d'équilibre, il retourne à sa position d'équilibre selon divers mécanismes de relaxation. On peut décomposer ce retour à l'équilibre en relaxation longitudinale (le retour du moment magnétique le long de l'axe du champ de l'aimantation défini comme z), et en relaxation transversale (perte de la magnétisation selon un axe perpendiculaire à l'axe du champ magnétique). La perte de la magnétisation selon l'axe x (M_x) est exponentielle: $M_x = \alpha \exp(-t/T_2)$, où t est le temps et T_2 est le temps de relaxation transversale. Cette décroissance est associée à la perte de mémoire de phase des spins nucléaires. Elle n'implique aucune variation d'énergie mais plutôt des interactions entre les spins, d'où le nom de relaxation spin-spin. Dans les membranes lipidiques, le T_2 est sensible aux mouvements lents comme la diffusion des molécules de lipide le long de la surface courbée de la bicouche (Bloom et Sternin, 1987) et les ondulations de celle-ci (Bloom et Evans, 1991).

CHAPITRE II

CARACTÉRISATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE LA NISINE LIBRE ET LIÉE AUX MEMBRANES LIPIDIQUES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

2.1 Introduction

Afin de comprendre le mécanisme d'action de la nisine en tant qu'agent antimicrobien, il est essentiel de connaître la structure de la nisine quand elle interagit avec les membranes lipidiques. Des études en RMN de solution se sont intéressées à cet aspect en utilisant le trifluoroéthanol (TFE) pour simuler l'environnement lipidique (Van de Ven et al., 1991). Ces résultats ont montré que la structure secondaire de la nisine dans ce milieu diffère de celle qu'elle adopte dans l'eau. La présence du TFE induit une organisation structurale du peptide: le segment hélicoïdal observé dans l'eau pour la région 23-28 est étendu jusqu'à la fin de la partie C-terminal dans les mélanges eau/TFE. D'autres milieux qui miment la membrane lipidique tels le dodécyl sulfate de sodium (SDS) et la dodécylphosphocholine ont aussi été utilisés (Van den Hooven et al., 1993; Van Den Hooven et al., 1996) et ont confirmé les changements structuraux entre la nisine libre dans l'eau et liée à ces micelles. Cependant, jusqu'à maintenant, aucune étude structurale n'a été faite sur

la nisine liée aux véritables membranes de phospholipides.

Dans ce chapitre, nous allons d'abord étudier par spectroscopie infrarouge la structure secondaire de la nisine dans différents solvants: l'eau, le TFE et les mélanges TFE/eau. Ensuite, par la même technique, nous allons examiner la structure de la nisine liée à des membranes lipidiques neutre et chargée négativement.

2.2 Partie expérimentale

2.2.1 Provenance des produits

La nisine (activité > 30 000 U/mg) a été achetée de la compagnie NBS Biologicals (North Mymms, Royaume Uni). La pureté de la nisine a été évaluée par HPLC à 88 %; le contaminant majoritaire était la (³³Ser) nisine. Tous les lipides ont été achetés de la compagnie Avanti (Birmingham, Al, É.U) et ont été utilisés sans purification ultérieure. L'acide 2-[N-Morpholino]éthanesulfonique (MES) et l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) ont été achetés de la compagnie Sigma (St.Louis, É.U). Le TFE est obtenu de Aldrich Chemical Co (Milwaukee, WI, É.U).

2.2.2 Préparation des échantillons

Pour chaque échantillon de nisine en solution, quelques milligrammes de nisine sont dissous dans un des solvants suivants : H₂O, TFE, TFE:H₂O (différentes proportions) à une concentration finale de 10% (poids/volume).

L'échantillon est ensuite vortexé pour assurer la dissolution totale du peptide. Le pH des solutions aqueuses est vérifié à l'aide d'un pH-mètre muni d'une microélectrode combinée (Microelectrodes, Inc. Bedford, NH, É.U.). L'échantillon est ensuite introduit dans une cellule fermée faite de deux fenêtres de CaF₂ séparées par un espaceur en Téflon de 5 µM d'épaisseur; le spectre des solvants et des échantillons sont enregistrés à l'aide de la même cellule (Dousseau et coll., 1989).

Le lipide (DPPG ou DPPC) est hydraté dans un tampon (50 mM MES, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA à pH 5,5) à une concentration de 20 % (poids/volume). Il est incubé au-dessus de sa T_m pour une dizaine de minutes et vortexé pour assurer la formation d'une dispersion multilamellaire. Une quantité de nisine (solution de 10% en poids préparée dans le même tampon) est ajoutée de façon à obtenir un rapport molaire d'incubation lipide/nisine de 5. L'échantillon est ensuite gelé dans l'azote liquide puis dégelé et chauffé jusqu'à une température supérieure à la T_m du lipide. Le processus est répété 5 fois de manière à favoriser une distribution uniforme de la nisine dans l'échantillon. Finalement, le complexe est transféré dans une cellule

démontable faite de deux fenêtres de CaF_2 séparées par un espaceur de Téflon de 5 μm d'épaisseur. Les spectres des complexes sont ensuite enregistrés. Dans le cas des complexes DPPC/nisine, l'échantillon est centrifugé pendant 1h à $3000 \times g$ et un aliquot du culot est utilisé pour enregistrer le spectre. Cette méthode permet de s'assurer que l'absorption est due à la nisine liée. Les spectres du tampon sont mesurés dans les mêmes conditions.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés à 25°C , sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier Bio-Rad FTS-25, muni d'un détecteur de type MCT (tellure de mercure et de cadmium). Les spectres sont enregistrés avec une résolution de 2 cm^{-1} et le nombre de balayage est de 200. Une apodisation triangulaire est utilisée lors de la transformée de Fourier.

2.2.3 *Corrections, déconvolution et simulation spectrales*

a) Correction pour la région de la bande amide I

Grâce à la grande sensibilité de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, il est possible de soustraire avec une grande précision la contribution du solvant des spectres de nisine (Dousseau et coll., 1989), si toutefois le solvant n'absorbe pas trop et si sa structure n'est pas modifiée par le peptide ou les lipides. Pour les spectres en milieu aqueux, on corrige pour la contribution de l'eau vers 1645

cm^{-1} associée au mode de déformation. On utilise la bande d'association de l'eau, vers 2125 cm^{-1} , comme standard interne. La soustraction est jugée satisfaisante si on arrive à avoir une ligne de base linéaire dans la région $1750\text{-}2650 \text{ cm}^{-1}$, région où ni le peptide ni le lipide n'absorbent. Pour soustraire la contribution de TFE, on utilise comme standards internes les bandes à 1454 , 1414 et 1372 cm^{-1} présentes dans le TFE et absentes dans le peptide. On corrige pour la contribution du mélange TFE/eau en utilisant les mêmes standards internes. Afin de faciliter ces corrections, l'épaisseur de l'échantillon est gardée constante pour la solution contenant le peptide et le tampon grâce à l'utilisation de la cellule fermée. Le faible recouvrement de la bande amide II avec la bande amide I a été corrigé à l'aide d'un polynôme d'ordre quatre qui simule le flanc de cette bande. Pour la nisine liée, les bandes d'élongation des carbonyles du lipide interfèrent avec la bande amide I du peptide. La nisine introduit une perturbation à l'interface de la membrane et cause des changements dans la forme de la bande carbonyle du lipide. Ceci nous a empêché de corriger cette contribution en utilisant le spectre du lipide. La contribution du lipide a été corrigée en simulant la bande carbonyle avec deux bandes entre $1680\text{-}1785 \text{ cm}^{-1}$ et en soustrayant ces bandes simulées dans la région de la bande amide I.

b) La déconvolution spectrale

L'auto-déconvolution de Fourier est un algorithme mathématique qui permet de diminuer artificiellement la largeur de bande. Ce processus permet donc de mettre

en évidence les constituants mal résolus donnant lieu à une bande large. Cette méthode a été utilisée pour déterminer le nombre de bandes contenues dans la région amide I ainsi que leurs positions.

c) La simulation spectrale

La bande amide I est généralement une bande large qui est un recouvrement de plusieurs contributions spectrales. La simulation spectrale permet d'obtenir la position, la largeur et l'aire des pics contenus dans une bande large donnée. Ce processus parvient à une solution en minimisant χ^2 de manière itérative, où χ^2 quantifie la différence entre le spectre expérimental et le spectre simulé. Ce programme nécessite la connaissance du nombre de pics contenus dans la bande large. La simulation spectrale a été faite entre 1750 et 1580 cm^{-1} sur les spectres corrigés tel que décrit ci-haut. Ce traitement mathématique a été effectué en utilisant le logiciel GRAMS (Galactic Industry, Salem, É.U).

2.3 Résultats

Nous avons étudié la structure secondaire de la nisine dans différents solvants. La figure 2.1 montre la région de la bande amide I des spectres infrarouges de la nisine dans l'eau, le TFE et un mélange eau/TFE (50:50). Les spectres déconvolués

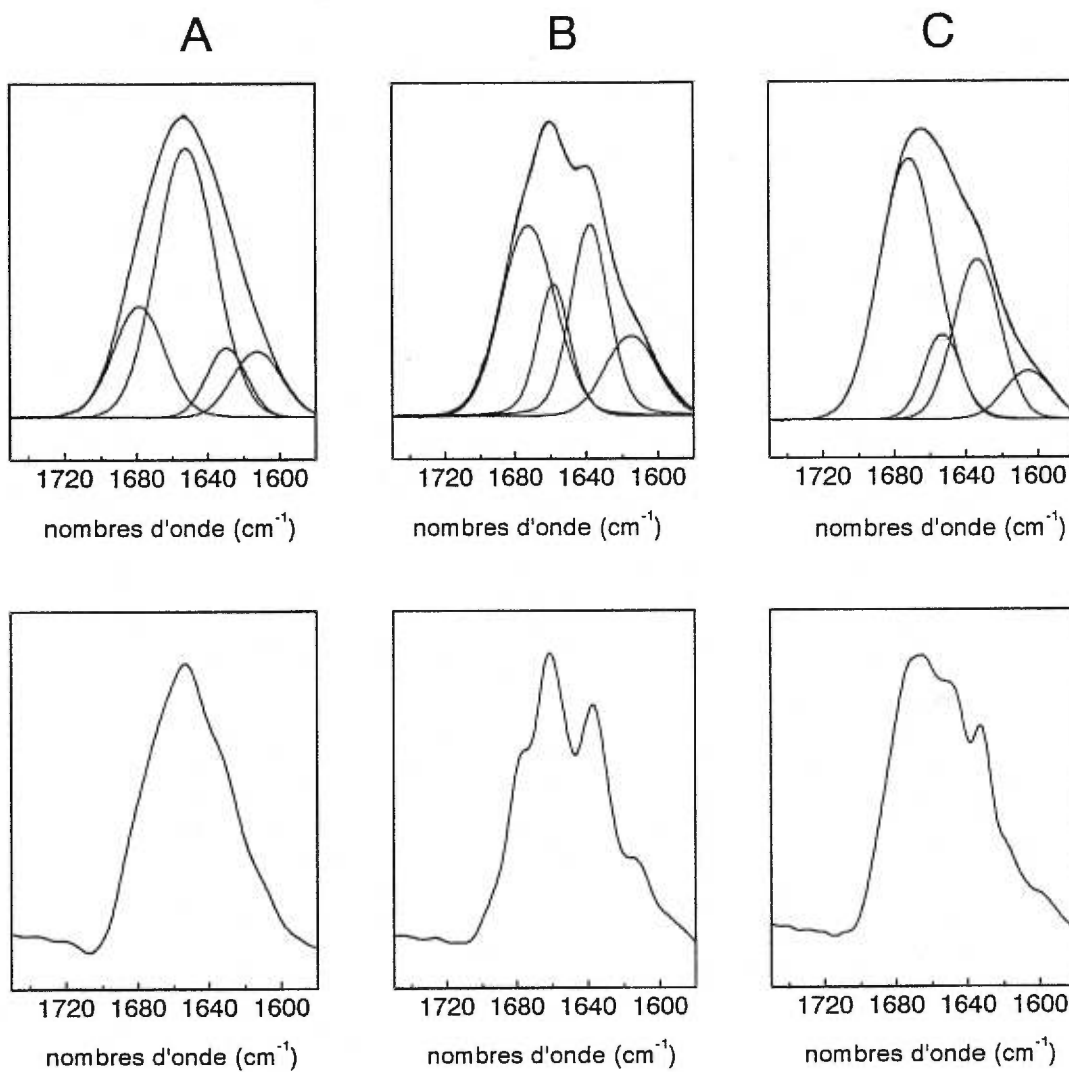


Figure 2.1 La bande amide I de la nisine dissoute dans (A) H₂O, (B) H₂O/TFE 50:50 et (C) TFE. En haut figurent les spectres expérimentaux et simulés ainsi que les quatre composantes obtenues à partir de la simulation spectrale. En bas, les spectres déconvolués sont montrés. Les spectres sont enregistrés à 25° C.

et simulés sont également montrés. La bande amide I inclut quatre composantes qui sont autour de 1673 ± 3 , 1656 ± 2 , 1636 ± 3 et $1612 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$. Ces moyennes ainsi que les écarts-types sont calculés à partir des valeurs obtenues pour les spectres décomposés enregistrés dans dix différents mélanges eau/TFE. La composante à 1656 cm^{-1} est représentative d'hélice α et/ou structure désordonnée (Olinger et coll., 1986; Surewicz et coll., 1987). La bande située autour de 1673 cm^{-1} est attribuée à des structures en coude β (Surewicz et Mantsch, 1988). La composante à 1636 cm^{-1} est attribuée soit à des feuillets β (Surewicz et Mantsch, 1988), soit à des coudes β (Hollósi et coll., 1994). Finalement, la bande située à 1612 cm^{-1} n'est pas due à la vibration amide I (Susi et Byler, 1983). Ces composantes sont clairement identifiées sur le spectre déconvolué. Il est également possible de simuler la bande en utilisant quatre composantes et les positions obtenues à partir des simulations coïncident toujours (avec $\pm 3 \text{ cm}^{-1}$) avec les fréquences mesurées sur les spectres déconvolués. Lors de la simulation de la bande, la position de la composante de basse fréquence a été restreinte entre 1600 et 1615 cm^{-1} . Une composante dans cette région a été identifiée dans les spectres déconvolués et simulés de la nisine en solution avec une proportion en TFE supérieure à 75%. Cette composante, même si elle est encore détectable dans le spectre déconvolué de la nisine dans un solvant contenant une faible proportion de TFE, n'était pas toujours présente dans la solution mathématique de la simulation spectrale. Par conséquent, nous avons imposé une limite à la position de cette composante. Cette restriction a permis d'améliorer grandement la reproductibilité des solutions de la décomposition de bandes pour des échantillons

indépendants dans les mêmes conditions. Les résultats indiquent que la structure secondaire de la nisine est sensible au solvant. Ceci est montré de façon directe par le déplacement du maximum de la bande amide I de 1653 cm^{-1} dans l'eau à 1663 cm^{-1} dans le TFE. Comme le montrent les spectres simulés, ce déplacement est concomitant avec les changements dans l'intensité relative des composantes, principalement les bandes à 1673 et 1656 cm^{-1} . Les fréquences de ces composantes sont insensibles au solvant, comme le montrent les spectres déconvolués et les spectres simulés tandis que leurs proportions relatives le sont. Une série de mélanges de $\text{H}_2\text{O}/\text{TFE}$ a été préparée, et la bande amide I de la nisine dissoute dans ces solvants a été analysée par simulation spectrale; les figures 2.2 et 2.3 montrent les résultats de cette étude. Pour établir sans aucun doute que la bande amide I de la nisine dépend de la nature du solvant, la figure 2.2 montre que le maximum de la bande est progressivement déplacé de 1653 à 1663 cm^{-1} avec l'augmentation de la proportion de TFE dans le mélange. L'origine de ce déplacement vers les hautes fréquences peut être associée à l'augmentation de l'intensité de la bande à 1673 cm^{-1} relativement à celle située à 1656 cm^{-1} , comme le montre la figure 2.3. La composante à 1656 cm^{-1} domine le spectre de la nisine dans l'eau alors qu'elle représente moins que 10% de la bande quand ce peptide est dissout dans le TFE. En revanche, la contribution de la composante à 1673 cm^{-1} augmente d'environ 20% dans l'eau à 50% dans le TFE. Les variations dans les intensités relatives de ces bandes sont principalement observées entre 0% et 50% de TFE dans l'eau. Quand la proportion de TFE est supérieure à 50%, la contribution relative de ces deux

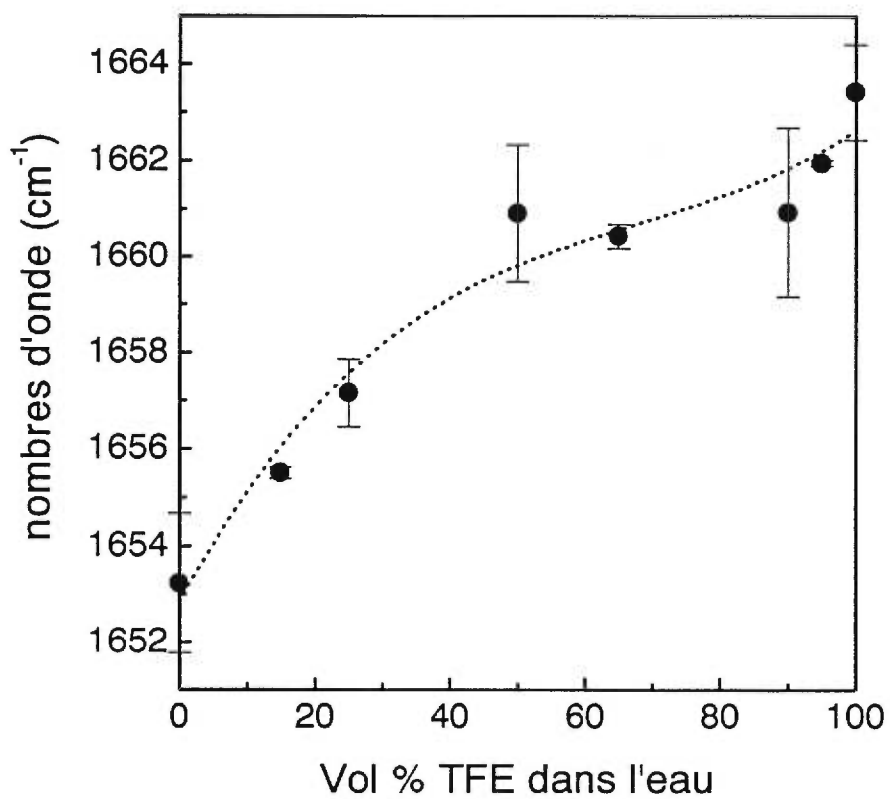


Figure 2.2 Effet du solvant sur la position de la bande amide I de la nisine. Les barres représentent l'écart-type sur trois expériences.

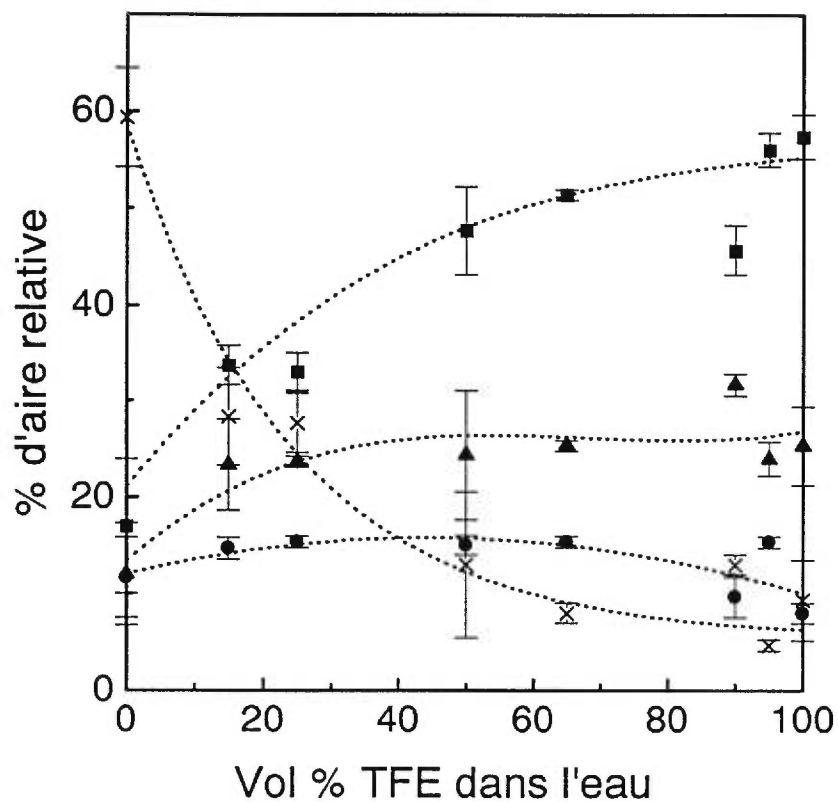


Figure 2.3 La variation de l'aire relative des quatre composantes de la bande amide I en fonction de la proportion de TFE dans le mélange TFE/H₂O. (■) La composante à 1673 cm⁻¹, (x) la composante à 1656 cm⁻¹, (▲) la composante à 1636 cm⁻¹ et (●) la composante à 1612 cm⁻¹. Les barres représentent l'écart-type sur trois expériences.

composantes reste relativement constante. Les aires relatives des deux autres composantes, à 1636 et 1612 cm^{-1} ne sont pas très affectées par la variation du solvant, et leurs contributions respectives restent autour de 20 et 10% respectivement.

Nous avons également enregistré le spectre de la nisine dissoute dans D_2O . Le spectre de la région amide I' (notation de la vibration amide I lorsque le squelette peptidique est deutéré) est similaire à celui obtenu dans H_2O et montre également quatre composantes après déconvolution (figure 2.4). La décomposition spectrale avec quatre composantes donne lieu à des bandes à 1671 cm^{-1} , 1649 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} et 1593 cm^{-1} avec des aires respectives de 25%, 49%, 20% et 6% (figure 2.4).

La figure 2.5 montre la bande amide I de la nisine en présence des vésicules de DPPC ou DPPG. Le rapport molaire d'incubation phospholipide/nisine (R_i) était de 5 de manière à ce que toute la nisine soit pratiquement liée. Le maximum de la bande amide I est autour de 1660 cm^{-1} . Cette valeur est proche de celle observée pour la nisine dissoute dans le mélange TFE/ H_2O 50:50. En fait, en comparant la forme de la bande amide I de la nisine en présence des lipides avec celle de la bande amide I du peptide dans les différents solvants, on remarque que le spectre de la nisine liée aux lipides se rapprochent plus du spectre de la bande amide I dans le mélange TFE/ H_2O que de celui du peptide dans le TFE ou dans l'eau. Les spectres déconvolués montrent également quatre composantes observées pour la nisine libre, et les aires relatives des bandes résultant de la simulation spectrale sont semblables

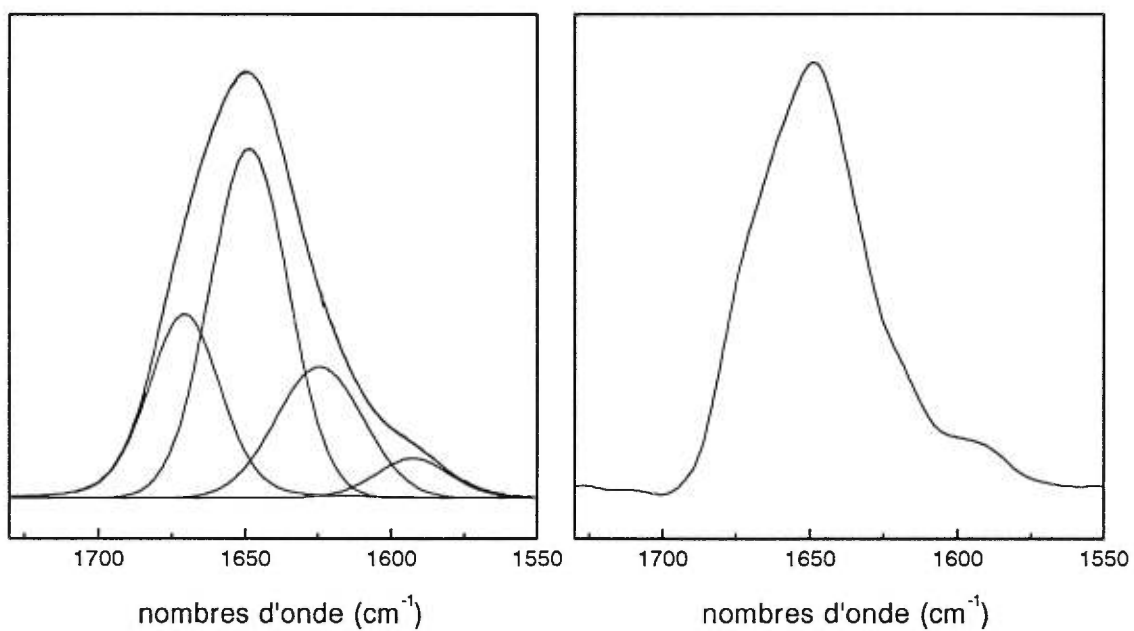


Figure 2.4 Bande amide I' de la nisine dissoute dans D₂O, à 25° C. À gauche sont présentés le spectre expérimental, le spectre simulé ainsi que les quatres composantes obtenues à partir de la simulation spectrale. À droite, le spectre déconvolué est montré.

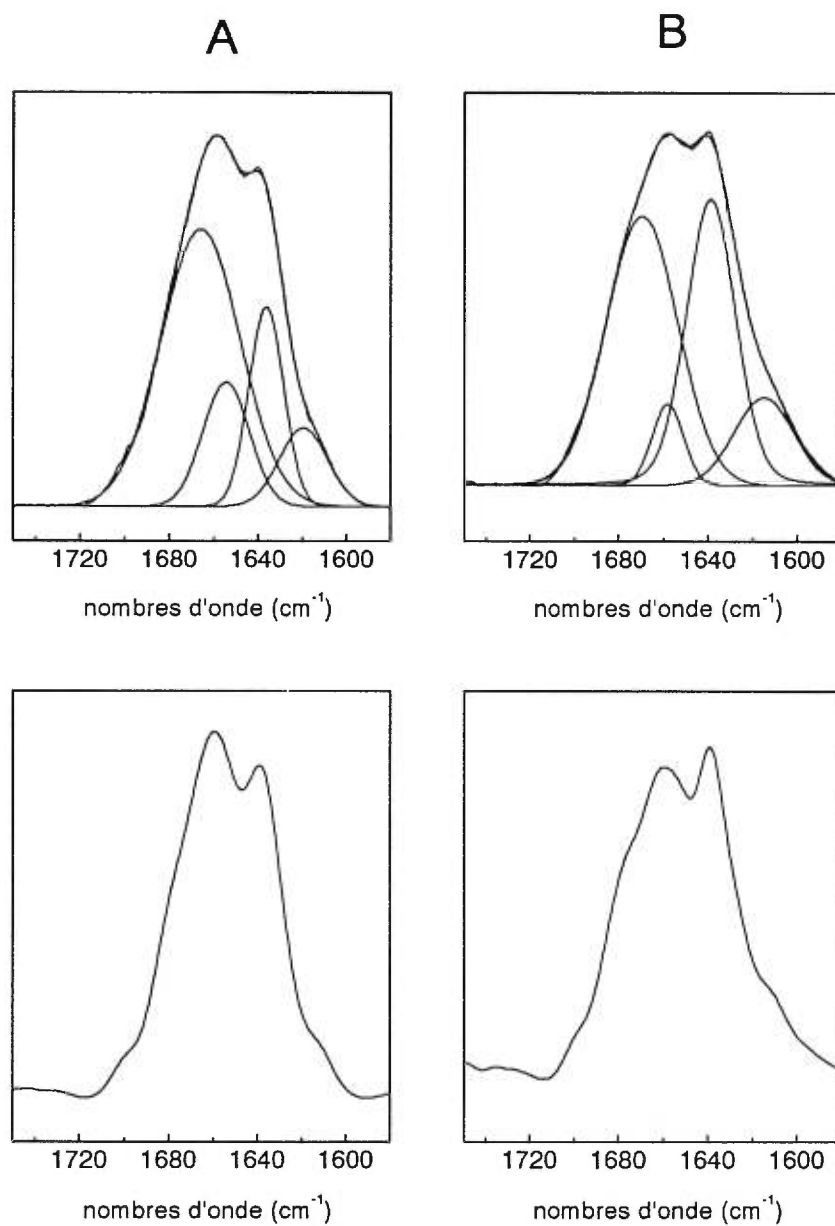


Figure 2.5 La bande amide I de la nisine liée à (A) DPPC, et (B) DPPG, à $R_i=5$, à 25° C. En haut sont présentés les spectres expérimentaux et simulés ainsi que les quatre composantes de la simulation. En bas, les spectres déconvolués sont présentés.

à celles obtenues dans le cas où la nisine est dissoute dans le mélange TFE/H₂O 50:50. Les aires relatives de ces bandes situées à 1669, 1657, 1638 et 1615 cm⁻¹ sont 55%, 15%, 22% et 8%, respectivement pour la nisine liée à la DPPC, et 46%, 6%, 36% et 12%, respectivement, pour la nisine liée au DPPG.

2.3 Discussion

Nous avons montré dans une étude précédente que la nisine peut se lier aux membranes lipidiques et que cette affinité dépend fortement de la présence de charge négative à la surface de la bicouche (El Jastimi et Lafleur, 1997). Nous venons de voir que l'interaction de la nisine avec les membranes induit un changement de structure secondaire du peptide comme le montre la bande amide I. Pour faire une analyse structurale, nous avons examiné la bande amide I dans les mélanges H₂O/TFE et comparé la description structurale obtenue avec la littérature. Nos résultats montrent que, malgré la présence de 5 cycles qui pourrait induire une certaine rigidité dans le peptide, la structure secondaire de la nisine est sensible au milieu où elle se trouve. La bande amide I est constituée de quatre composantes comme le montrent les spectres déconvolués et la simulation raisonnable des spectres expérimentaux. La bande à 1656 cm⁻¹, qui est la composante principale quand la nisine est dissoute dans l'eau, est représentative d'hélice α et/ou structure désordonnée (Olinger et coll., 1986; Surewicz et coll., 1987; Surewicz et Mantsch, 1988); ces deux structures donnent lieu

à deux composantes dans la bande amide I difficiles à résoudre dans un spectre enregistré dans l'eau. Plus de renseignements sont obtenus lorsqu'on travaille dans le D₂O. Dans le D₂O, la composante principale est déplacée vers 1649 cm⁻¹, et cette fréquence est associée à une conformation désordonnée (Surewicz et Mantsch, 1988). Donc, la bande à 1656 cm⁻¹ observée dans H₂O est attribuée à des segments désordonnés. La bande autour de 1673 cm⁻¹ a été attribuée à des structures en coude β (Surewicz et Mantsch, 1988; Haris et coll., 1986). La bande observée à 1636 cm⁻¹ est généralement attribuée à des feuillets β (Surewicz et Mantsch, 1988; Byler et Susi, 1986). Ceci est plutôt surprenant étant donné qu'aucune structure en feuillet β n'a été rapportée pour la nisine en solution aqueuse. Plus récemment, une étude a montré que la présence de structures en coude β peut donner lieu à des bandes amide I dans la région 1630-1640 cm⁻¹ (Hollósi et coll., 1994). Cette composante observée dans la nisine pourrait être attribuée elle aussi aux coudes β. La contribution située à 1612 cm⁻¹ n'est probablement pas due à la vibration amide I mais elle est plutôt associée à l'absorption du mode d'élongation antisymétrique du groupement carboxylique terminal ou à des vibrations des chaînes latérales des résidus histidine (Susi et Byler, 1983). Ceci est cohérent avec le fait que la contribution relative de cette bande est plus ou moins sensible au solvant. La bande amide I indique que la nisine adopte principalement, en solution aqueuse, des structures désordonnées et des coudes β. Ces résultats sont en accord avec la littérature. Des études de RMN et de simulation faites sur la nisine en milieu aqueux ont suggéré la présence de coude β dans la région 8-11 du cycle B (Palmer et coll., 1989; Van de Ven et coll., 1991), pour les résidus 22-23

(Chan et coll., 1989), et dans le cycle D et E (Van de Ven et coll., 1991). On a également rapporté l'existence de structure dite 'coude hélicoïdale' pour les résidus 16-19 (Lian et coll., 1992). Il faut cependant noter que la fréquence de la bande amide I de ce genre de structure reste encore confuse.

L'addition du TFE à l'eau fait la promotion de structure en coude β tel qu'indiquent les changements d'intensité relative de la composante à 1673 cm^{-1} comparée à celle située à 1656 cm^{-1} . Ceci est en accord avec le pouvoir du TFE à induire dans les peptides des structures régulières telles des coudes β (Hollósi et coll., 1994; Sönnichsen et coll., 1992). Ce phénomène a été associé à la constante diélectrique du TFE ($\epsilon = 27$) qui est inférieure à celle de l'eau et proche de celle de l'intérieur des protéines (Sönnichsen et coll., 1992). Les variations structurales induites par le TFE dans l'eau sont plus prononcées entre 0% et 50% de TFE. De manière similaire, une étude RMN a montré que les changements que le TFE induit dans la nisine sont plus prononcés entre 0 et 70% de TFE dans l'eau (Van den Hooven et coll., 1993). En conclusion de cette partie, l'analyse structurale de la bande amide I suggère que la structure de la nisine dans l'eau est principalement désordonnée et en coude β et que la proportion de ces composantes est sensible à la polarité du solvant; le TFE fait la promotion de coude β au dépend de la composante désordonnée.

La bande amide I de la nisine est également affectée quand le peptide est lié

aux membranes lipidiques. Les changements causés par cette liaison sont similaires à ceux induits par le TFE. En effet, le maximum de la bande, les positions et les intensités relatives des composantes sont très proches de celles observées dans le cas de la nisine en solution dans le mélange H₂O/TFE 50:50. Il est donc fort probable que la nisine liée aux membranes lipidiques contienne une grande proportion de coude β comparée à la structure libre dans l'eau, en accord avec l'augmentation de la bande à 1673 cm⁻¹. Dans la littérature, il a été rapporté que la nisine change de structure lors de son adsorption sur une surface amphiphile (une micelle, dans ce cas-là) (Van den Hooven et coll., 1993; Van den Hooven et coll., 1996a). L'augmentation de structure β que l'on observe est en accord avec les changements observés dans le cas de la nisine liée à des micelles. Le segment ²¹Met-²⁴Ala adopte une forme en coude β dans la forme liée de la nisine, un élément structural que l'on ne retrouve pas dans la nisine libre dans l'eau (Van den Hooven et coll., 1996a). Les cycles B, D et E de ce peptide adoptent une conformation en coude β (Van den Hooven et coll., 1996a). De plus, il a été montré par RMN du proton que les groupements hydrophobes de la partie N-terminale de la nisine sont insérés dans la micelle (Van den Hooven et coll., 1996b). D'autres changements conformationnels ont été rapportés dans le cycle A. Même si nos résultats ne permettent pas d'identifier les acides aminés impliqués dans la réorganisation structurale, les changements associés à la liaison de ce peptide aux membranes lipidiques peuvent être suivis par la spectroscopie infrarouge; ces changements sont similaires à ceux observés en présence du mélange TFE/H₂O. Des résultats d'études par RMN et par dichroïsme circulaire ont également montré que la

structure de la nisine liée à des micelles est similaire à celle obtenue dans le cas du mélange TFE/H₂O mais différente de celle du peptide dans l'eau (Van den Hooven et coll., 1993). Nous avons montré auparavant (El Jastimi et Lafleur, 1997) que la nisine a une grande affinité envers les lipides négatifs comparés aux lipides zwitterioniques. Malgré cette différence d'affinité, la nature de l'interface de la membrane ne semble pas avoir d'effet sur la structure secondaire de la nisine liée comme le montre la bande amide I du peptide lié à DPPC et à DPPG. Ceci est en accord avec des études de RMN qui indiquent qu'il n'y a pas de différences significatives dans la structure de la nisine liée à des micelles chargées ou neutres (Van den Hooven et coll., 1993; Van den Hooven et coll., 1996a). Il est important de noter que la forme liée de la nisine est observée dans le cas de la DPPC à cause de la grande concentration de lipide nécessaire pour l'étude infrarouge qui déplace l'équilibre du côté du peptide lié; le complexe peut même être isolé par centrifugation. Quant à la nisine liée au DPPG, aucune centrifugation n'a été effectuée sur l'échantillon. La faible différence de proportions de structures observée entre le complexe DPPC/nisine et le complexe DPPG/nisine pourrait donc être due à la présence de nisine libre dans les échantillons DPPG/nisine.

Nous avons caractérisé pour la première fois la structure de la nisine dans un environnement membranaire. Nos résultats montrent que l'association à l'interface de la membrane affecte la conformation du peptide. Cette liaison fait la promotion des coudes β (~ 75% de toutes les autres structures) aux dépens de la structure

désordonnée qui ne dépasse pas 15%. Ces résultats confirment également l'hypothèse que le mélange TFE/H₂O et les micelles sont des systèmes appropriés pour mimer les membranes phospholipidiques dans l'étude conformationnelle de la nisine liée.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE LA NISINE ET LES MEMBRANES LIPIDIQUES MODÈLES

3.1 Introduction

Nous avons vu au chapitre précédent que la nisine interagit avec les lipides. Ceci se manifestait par un changement de structure secondaire de la nisine en présence des membranes lipidiques. Nous avons montré également dans des travaux antérieurs que l'affinité de ce peptide envers les lipides est fortement augmentée en présence de lipides chargés négativement (El Jastimi et Lafleur, 1997). Dans ce chapitre, nous allons examiner si la nisine induit des changements au niveau des membranes lipidiques et si oui, comment la composition en lipide affecte les perturbations. Deux grands types de perturbations seront considérés. Dans un premier temps, par la technique de fluorescence, nous étudierons la capacité de la nisine à perturber la perméabilité des membranes lipidiques de POPC et examinerons l'influence des charges négatives et du cholestérol sur la lyse induite par la nisine. Deuxièmement, par RMN du deutérium et du phosphore et par cryo-microscopie électronique, nous allons examiner si la nisine est capable d'affecter la morphologie des membranes. Nous examinerons d'abord cet aspect sur des bicouches de DPPC.

Le rôle du cholestérol dans la stabilité de la structure membranaire face à la nisine sera également examiné. Ensuite, par RMN du phosphore, nous étudierons les changements que la nisine induit sur la macrostructure de PE insaturées. Ces lipides ont la propriété de former des phases non-lamellaires sous l'influence de plusieurs facteurs notamment la température, le pH, la force ionique, etc (Cullis et de Kruijff, 1978-1979; Tilcock et Cullis, 1982). Nous allons examiner si la nisine est également un facteur capable de moduler la formation de phases non-lamellaires dans cette catégorie de lipides. L'effet du cholestérol sur le polymorphisme des complexes nisine/PE sera également étudié.

3.2 Partie expérimentale

3.2.1 Matériels

La nisine purifiée (50 000 U/mg) a été gracieusement fournie par la compagnie Applin & Barrett (Trowbridge, Wilts, Royaume Uni). Le cholestérol (chol) est acheté de la compagnie Sigma (St. Louis, Mo, É.U.) et utilisé sans purification ultérieure. L'eau légère, utilisée en RMN du ^2H , le Triton X-100 sont également achetés de la même compagnie. La calcéine est obtenue de Molecular Probes (Eugene, Or., É.U.). L'origine des autres produits est donnée à la section 2.2.1.

3.2.2 *Mélanges des lipides*

Des quantités de lipides purs sont dissoutes dans la solution benzène-méthanol (95/5, v/v). Des volumes appropriés sont ensuite prélevés et mélangés pour obtenir des solutions de lipides dans les proportions désirées. Les mélanges sont lyophilisés et laissés sous vide toute la nuit pour s'assurer de l'élimination de toute trace de solvant organique.

3.2.3 *Expériences de fluorescence*

a) Technique des fuites

Les lipides purs ou les mélanges de lipides sont hydratés avec un tampon interne contenant la calcéine, une sonde fluorescente, à 80 mM, 50 mM MES, 30 mM NaCl, 5 mM EDTA, ajusté au pH = 6 avec une solution NaOH 5 N. L'échantillon est ensuite gelé dans l'azote liquide et réchauffé à la température ambiante, cinq fois. Ce processus permet d'obtenir des vésicules larges multilamellaires (MLV) bien hydratées.

Pour obtenir de grosses vésicules unilamellaires dites LUV (large unilamellar vesicles), on fait passer cette suspension lipidique au travers deux filtres de polycarbonates dont le diamètre des pores est de 100 nm (Nuclepore, Pleasanton, CA,

É.U) à l'aide d'extrudeur d'Avestin (Ottawa, ON, Canada). Cette opération est répétée 10 fois. On obtient ainsi des LUV d'environ 100 nm de diamètre et qui encapsulent de la calcéine à l'intérieur.

Pour se débarrasser de la calcéine libre qui reste à l'extérieur, on utilise la chromatographie d'exclusion. On fait passer les vésicules à travers une colonne de gel Sephadex G-50 gonflé dans un tampon isotonique au tampon interne (150 mM NaCl, 50 mM MES, 5 mM EDTA ajusté à pH=6 avec NaOH 2 N). L'osmolalité de toutes les solutions (internes et externes) est mesurée avec un osmomètre Advanced DigiMatic calibré avec un standard à 290 mOsm/kg. On récolte à la sortie de la colonne les vésicules unilamellaires renfermant 80 mM de sonde à l'intérieur. La concentration exacte en lipide est obtenue à partir du test de phosphore (Fiske et Subbarow, 1925).

Dans une cuvette en quartz, on met 2,5 mL de LUV diluées dans le tampon externe. L'intensité de fluorescence résiduelle provenant de la calcéine encapsulée à haute concentration (I_B) est mesurée. La nisine est ensuite ajoutée dans un rapport molaire lipide/nisine désiré. Si des fuites sont produites par le peptide, il y a relargage de la sonde à l'extérieur, menant ainsi à sa dilution. Ceci est caractérisé par une augmentation d'intensité de fluorescence, (I_F). Après 800 secondes, on ajoute du Triton X-100 (10 μ L d'une solution 0.1%) pour détruire toutes les vésicules. On obtient de cette manière l'intensité de fluorescence correspondant à 100% de relargage

(I_T) et ceci permet de normaliser les courbes. Le pourcentage de relargage est calculé à partir de la formule:

$$\% \text{ de relargage} = \left(\frac{I_F - I_B}{I_T - I_B} \right) \times 100 \quad (4)$$

b) Détermination du mécanisme de relargage

Une série de vésicules de POPC est formée dans des tampons (50 mM MES, 30 mM NaCl, 5 mM EDTA ajustés à pH=6 avec NaOH 5 N) contenant des concentrations différentes de calcéine: 5, 10, 20 et 25 mM. L'osmolalité à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules est la même, balancée en variant la concentration de NaCl du tampon extérieur. Pour chaque type de vésicules, I_B et I_T sont mesurées et l'efficacité de l'extinction (Q) est calculée comme suit:

$$Q = \left(1 - \frac{I_B}{I_T} \right) \times 100 \quad (5)$$

Pour établir le mécanisme par lequel la nisine induit le relargage des vésicules de POPC et POPC/chol, on mesure l'efficacité de l'auto-extinction de la calcéine encapsulée avant et après incubation avec la nisine. Deux types extrêmes de processus peuvent avoir lieu:

i) un relargage *graduel* où la nisine vide un peu le contenu en calcéine de toutes les vésicules. Dans ce cas, l'efficacité Q diminue quand le pourcentage de relargage augmente.

ii) un relargage *tout ou rien* où seule une portion de vésicules relargue tout son contenu laissant les autres intactes. Un tel processus donne lieu à un coefficient Q constant quelque soit le pourcentage de relargage de la calcéine.

Une quantité de nisine est ajoutée à la dispersion de LUV où la calcéine est encapsulée à 25 mM. Après 800 secondes, la dispersion est passée à travers le gel Sephadex pour se débarrasser des sondes libérées par la nisine. On récolte à la sortie les vésicules. I_B et le I_T sont ensuite mesurées pour calculer Q.

Toutes les expériences de fluorescence ont été effectuées sur un spectrofluorimètre SPEX Fluorolog-2. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la calcéine sont 490 et 513 nm respectivement. Les bandes passantes du monochromateur à l'excitation et à l'émission sont de 2,2 et 1,9 nm respectivement. Le spectromètre est équipé d'un agitateur magnétique.

3.2.4 Expériences de RMN

a) Préparation des échantillons

30 mg de lipides ou lipide/chol sont hydratés avec 700 μL de tampon (50 mM MES, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA ajusté à pH=6 avec NaOH 2 N). En RMN du ^2H , le tampon est préparé avec de l'eau légère. L'échantillon subit ensuite une série de cinq gels dans l'azote liquide et dégels à une température supérieure à la T_m du phospholipide pour permettre d'homogénéiser les dispersions multilamellaires. À cause de la faible solubilité du peptide, la nisine solide est ajoutée aux MLV préformées. Dans le cas de la DPPC ou des mélanges DPPC/chol, l'échantillon est incubé à 50°C pendant 2 heures. Dans le cas de la DOPE et la POPE, l'échantillon est incubé à une température supérieure à la température de transition de phase liquide cristalline- H_{II} du lipide (T_h). Les complexes PE/nisine subissent ensuite une série de gels et dégels (5 fois) avant d'enregistrer les spectres.

b) Aquisition des données

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker DSX-300 opérant à une fréquence de 300 MHz pour les protons, 46 MHz pour le deutérium et 121 MHz pour le phosphore. Pour l'enregistrement des spectres RMN du deutérium, une sonde avec une bobine horizontale de 10 mm de diamètre a été

utilisée. Les spectres en RMN du ^2H ont été enregistrés avec une séquence d'écho quadripolaire utilisant une impulsion de 90° entre 4 et $4,2 \mu\text{s}$, un délai entre les impulsions de $54 \mu\text{s}$ et un temps de relaxation de 500 ms. Après la seconde impulsion, l'acquisition de 8192 points est effectuée en mode de détection quadrature, avec un temps entre deux points consécutifs de $5 \mu\text{s}$. Le nombre de balayages est 20 000.

Les temps de relaxation spin-spin, T_2 , ont été mesurés avec une séquence d'écho utilisant 12 délais τ entre les impulsions variant entre 54 à $994 \mu\text{s}$. Les T_2 sont ensuite calculés à partir de la décroissance de l'intensité de l'aire du spectre en fonction de 2τ , en simulant une monoexponentielle décroissante.

Les spectres en RMN du ^{31}P ont été enregistrés sur le même appareil en utilisant une sonde munie d'une bobine de 10 mm (Morris Instrument Inc). Une seule impulsion à 70° de $10 \mu\text{s}$ est utilisée pour obtenir le spectre. Le découplage des protons de type "inverse gated decoupling" est effectué. Le délai de relaxation est de 5 s. La largeur spectrale est de 411 ppm. Le nombre d'acquisitions est 2 000. Le déclin de magnétisation est multiplié par une fonction exponentielle permettant d'augmenter le rapport signal/bruit (LB=50).

La décomposition des spectres en RMN du ^{31}P a été effectuée en utilisant "edplot", (Bruker Standard Software).

La température de l'échantillon est contrôlée avec un contrôleur Bruker.

3.2.5 Expériences de cryo-microscopie électronique

Des échantillons en films minces (10-500 nm) sont préparés sous des conditions contrôlées de température et d'humidité à l'intérieur d'une chambre. Les films sont ensuite vitrifiés en les gelant rapidement dans l'éthane liquide et transférés pour observation dans un microscope électronique à transmission Zeiss EM 902. Pour préserver l'état des échantillons de toutes perturbations et prévenir la formation des cristaux de glace, leur température a été maintenue en bas de 108 K durant les procédures de transfert et d'observation. Toutes les observations ont été faites en mode champ clair et à une tension d'accélération de 80 kV. Les photos typiques (observées plusieurs fois de façon reproductible) sont présentées.

3.2.6 Expériences de spectroscopie infrarouge

Quelques microlitres de l'échantillon préparé pour la RMN sont transférés dans une cellule faite de fenêtres de CaF_2 , séparées par un espaceur de Téflon de 5 μm d'épaisseur. Les spectres sont ensuite enregistrés en fonction de la température croissante. L'appareil et les paramètres utilisés sont les mêmes que ceux de l'étude de la structure secondaire de la nisine (voir section 2.2.2), sauf le nombre de balayages qui est égal à 100.

Dans la région des modes ν_{C-H} , la contribution de l'eau vers 3400 cm^{-1} est associée au mode d'élongation O-H. Comme cette contribution est très intense, un polynôme simulant le flanc de cette bande est déterminé par moindres carrés en utilisant des points de part et d'autre de l'absorption due au lipide puis ensuite soustrait au spectre dans la région ν_{C-H} .

3.3 Influence de la nisine sur la perméabilité des membranes lipidiques

Dans cette partie, nous allons étudier, par fluorescence, l'effet de la nisine sur la perméabilité des membranes lipidiques. Nous verrons comment les charges négatives et le cholestérol présents dans la membrane peuvent moduler cette activité lytique de la nisine.

3.3.1 Résultats

3.3.1.1 Effet de la nisine sur la perméabilité des vésicules de POPC

La nisine ajoutée à des LUV de POPC dans un rapport molaire d'incubation nisine/lipide ($1/R_i$) égal à 0,67 provoque le relargage de la calcéine (figure 3.1A). La courbe obtenue peut être partagée en trois parties. Le premier palier obtenu avant l'ajout de la nisine dans le milieu, correspond à l'extinction non totale de la

fluorescence à l'intérieur des vésicules (I_B). Cette intensité est normalisée à 0 % de relargage. Au temps choisi égal à zéro, on ajoute une quantité de nisine à la cuvette contenant des vésicules unilamellaires de POPC. On observe dans cette seconde partie de la courbe, une augmentation de l'intensité de fluorescence due au relargage de la calcéine en milieu aqueux (I_F). Après 800 secondes, le Triton X-100 est ajouté pour provoquer la lyse de toutes les LUV. L'intensité de fluorescence à ce plateau correspond à 100 % de relargage (I_T). Ce premier résultat montre donc que la nisine affecte la perméabilité des vésicules de POPC et produit le relargage de 59% de calcéine à $1/R_i = 0,67$. Un relargage similaire a été observé dans le cas de la nisine Z, (où l'histidine à la position 27 est remplacée par une asparagine) ajoutée à des vésicules de DOPC (Breukink et coll., 1997).

La figure 3.1B montre la variation du pourcentage de relargage de la calcéine obtenu 800 secondes après l'addition de la nisine en fonction de $1/R_i$. L'intégrité des membranes de POPC est affectée par la présence de la nisine. Plus on ajoute ce peptide aux vésicules, plus on lyse les vésicules jusqu'à atteindre un plateau à environ 85%. Quand on compare la lyse induite par la nisine dans les vésicules de POPC avec le pouvoir lytique d'autres peptides, on se rend compte qu'il faut une quantité énorme de nisine pour perturber l'intégrité de la membrane de POPC. À titre de comparaison, la mélittine, une toxine extraite du venin d'abeille, peut induire 75% de relargage des vésicules de POPC à des concentrations 300 fois plus petites que la nisine (Benachir et Lafleur, 1995).

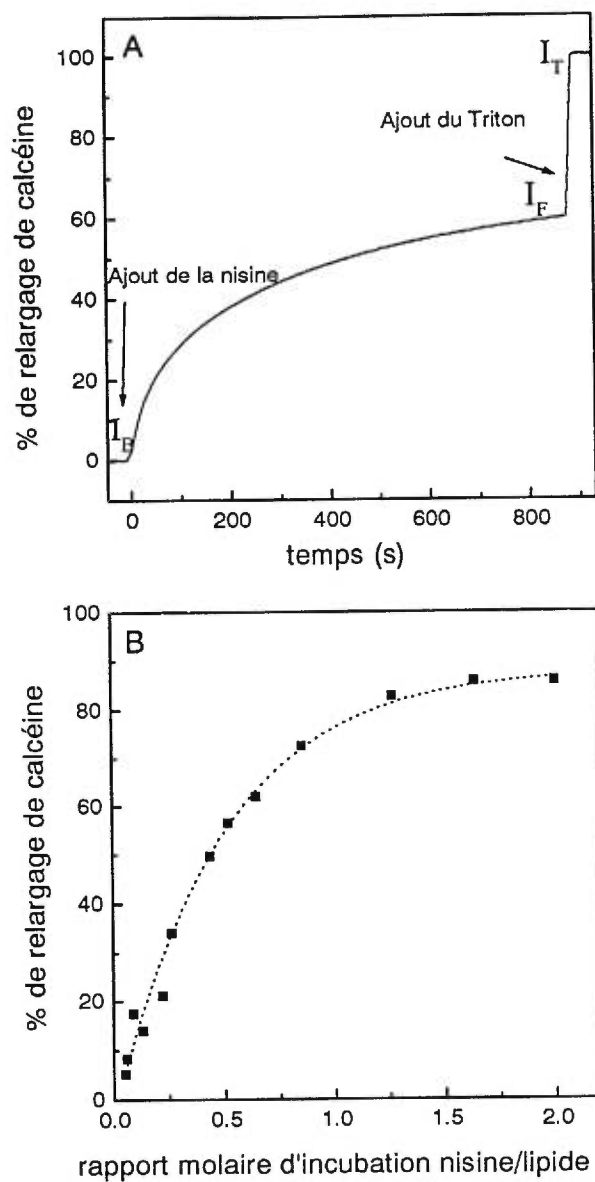


Figure 3.1 (A) Les trois parties d'une courbe de relargage: le plateau (I_B) avant l'ajout de la nisine aux vésicules de POPC, I_F correspondant à l'intensité de fluorescence due au relargage de la calcéine induit par la nisine ($1/R_i = 0,67$) et I_T , l'intensité totale de fluorescence. (B) Le pourcentage de relargage de la calcéine des vésicules de POPC en fonction de $1/R_i$.

Il semble que le relargage maximal que nous pouvons obtenir plafonne autour de 87% et le relargage complet (100%) de liposomes de POPC n'a jamais été observé même à des concentrations très élevées de nisine. Cette saturation, dont l'origine est pour le moment inconnue, a déjà été rapportée dans la littérature pour la nisine en présence des liposomes formés de lipides extraits d'*Escherichia coli* (García Garcerá et al., 1993) et pour la toxine α -haemolysine, une protéine sécrétée par des souches pathogènes d'*Escherichia coli* (Ostolaza et al., 1993).

3.3.1.2 Effet des charges négatives sur l'activité lytique de la nisine

L'affinité de la nisine envers les lipides est fortement augmentée en présence de charges négatives dans la bicouche (El Jastimi et Lafleur, 1997). Nous avons voulu déterminer si cette augmentation d'affinité envers les membranes lipidiques amène la nisine à induire plus de lyse dans les vésicules chargées négativement.

La figure 3.2A montre le relargage induit par la nisine des vésicules unilamellaires de POPG, un lipide négatif, à $1/R_i = 0,14$. On remarque d'abord un relargage initial très rapide de la calcéine durant la première minute, comparé à celui de la POPC. L'intensité de fluorescence continue à augmenter mais très faiblement avec le temps, après cette première phase. Le relargage obtenu a été quantifié en fonction de la quantité de nisine (figure 3.2B). Quand la nisine est ajoutée à des

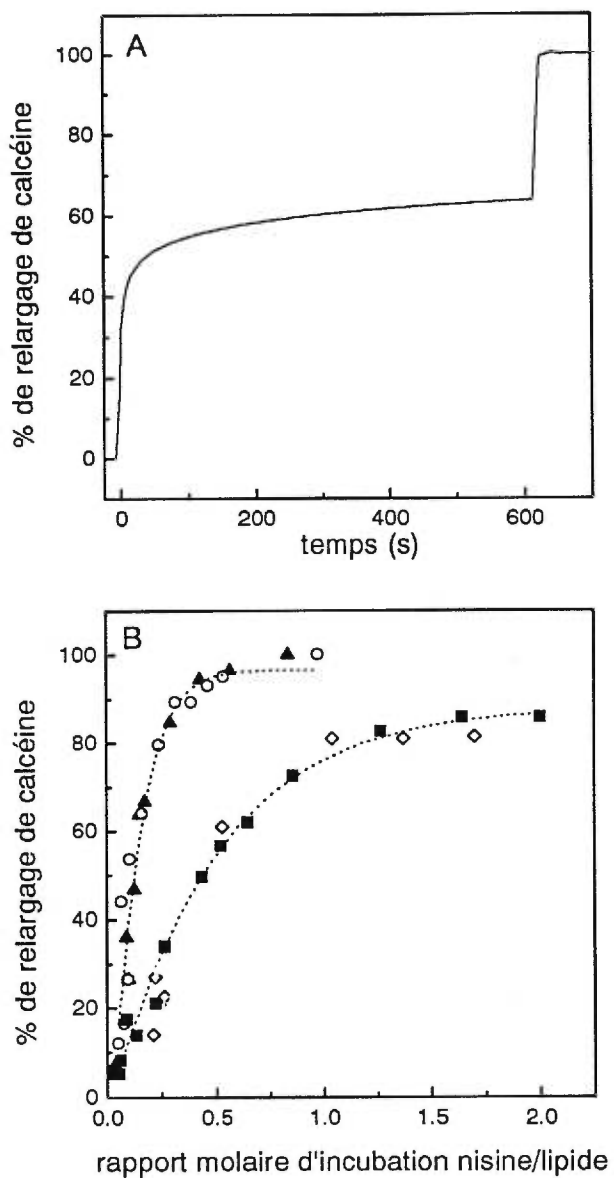


Figure 3.2 (A) Le relargage de la calcéine induit par la nisine dans les vésicules de POPG à $1/R_i = 0,14$. (B) Le pourcentage de relargage de la calcéine des vésicules de POPG (▲), de POPG:POPC (70:30) (○), de POPG:POPC (15:85) (◇) et de POPC (■) en fonction de $1/R_i$.

vésicules de POPG, le relargage de calcéine est déjà observé à $1/R_i = 0,01$. Une nisine par 6 molécules de POPG provoque, par exemple, plus de 60 % de lyse des vésicules, alors qu'elle n'induit pas plus de 15% de lyse dans les vésicules zwitterioniques de POPC, aux mêmes proportions. Ces résultats montrent donc que les charges négatives présentes dans la bicouche augmentent le pouvoir lytique de la nisine. Ces résultats viennent confirmer ceux publiés récemment et qui montrent que l'activité de la nisine est fortement stimulée en présence de lipides négatifs (Giffard et coll., 1997; Breukink et coll., 1997). On remarque également sur le graphique 3.2B la lyse complète (100%) des vésicules de POPG et l'absence de plafonnement à 87 % observé avec les vésicules de POPC.

Pour déterminer dans quelle mesure le POPG conserve sa capacité de promouvoir la lyse induite par la nisine une fois en présence de POPC, deux mélanges ont été étudiés: POPC:POPG (3:7) et POPC:POPG (8,5:1,5). La courbe de relargage de la calcéine des vésicules de POPC:POPG (3:7) est superposable à celle de POPG (Figure 3.2B). La capacité que la nisine a pour induire des fuites est similaire pour les vésicules faites de lipides chargés négativement et celles en contenant 70%. De même, les vésicules de POPC contenant 15 mol% de POPG se comportent de la même façon, quant au pouvoir lytique de la nisine, que les vésicules de POPC pure.

3.3.1.3 Effet du cholestérol sur le relargage induit par la nisine

a) Cas du lipide neutre POPC

Pour déterminer si le cholestérol peut moduler le pouvoir lytique de la nisine, deux mélanges de lipides ont été étudiés: POPC/15 mol% chol et POPC/30 mol% chol.

La figure 3.3A montre une courbe de relargage (en trait plein) des vésicules de POPC contenant 30 mol% chol à $1/R_i = 3,3$. La vitesse de relargage de la sonde pour ces vésicules est similaire à celle observée pour les vésicules de POPC pures pour un pourcentage de relargage équivalent. Cependant, on a besoin de cinq fois plus de nisine avec les vésicules de POPC/30mol% chol qu'avec les vésicules de POPC pour induire environ 60% de relargage de calcéine. Les vésicules de POPC qui contiennent du cholestérol sont donc plus résistantes à la nisine.

La figure 3.3B montre l'effet du cholestérol sur le relargage de la calcéine des vésicules de POPC induit par la nisine. À 15 mol% de cholestérol, la perméabilité des vésicules est légèrement moins affectée par la nisine que celle des vésicules de POPC pure. L'inhibition de la lyse devient beaucoup plus importante quand le pourcentage de cholestérol dans la membrane atteint 30 mol%. Par exemple, pour induire 50 % de lyse, on a besoin, comparé à la POPC pure, de 1,5 fois plus de

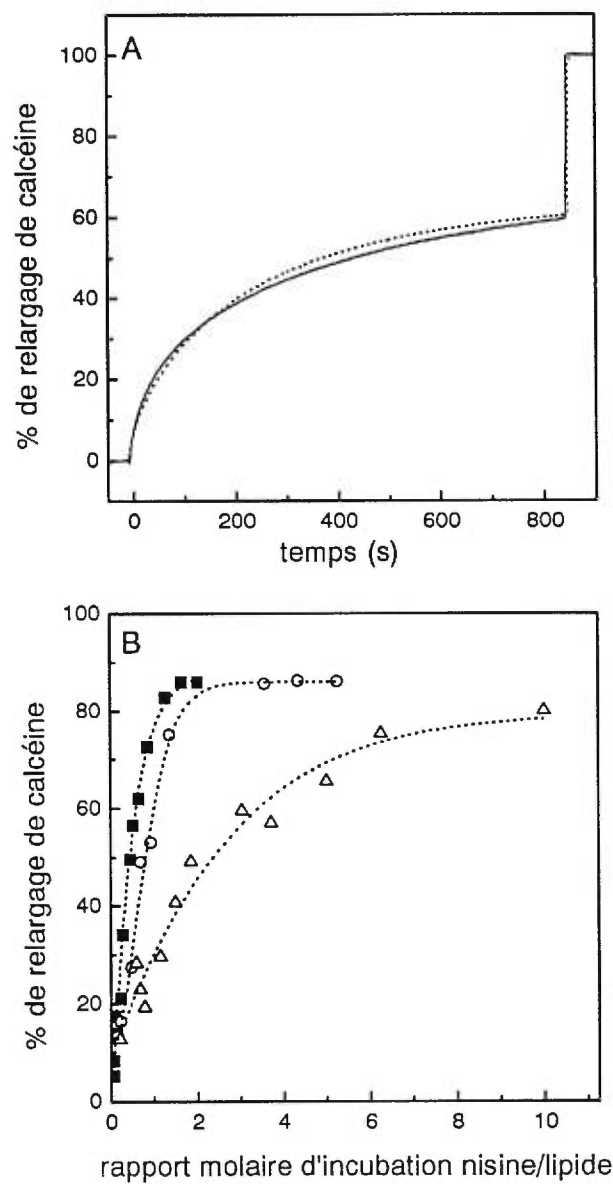


Figure 3.3 (A) Le relargage de la calcéine induit par la nisine des vésicules de POPC/30 mol% chol (—) à $1/R_i = 3,3$ et des vésicules de POPC (...) à $1/R_i = 0,67$. (B) Le pourcentage de relargage de la calcéine des vésicules de POPC (■), de POPC/15 mol% chol (○) et de POPC/30 mol% chol (△) en fonction de $1/R_i$.

nisine dans le cas des vésicules de POPC contenant 15 mol% de cholestérol et de 5,5 fois plus dans le cas des vésicules de POPC/30 mol% chol. Ces résultats montrent donc que l'activité lytique de la nisine est inhibée par la présence du cholestérol dans la membrane lipidique neutre de POPC.

b) Cas du mélange POPC:POPG (3:7)

Nous avons déjà montré que la présence des charges négatives augmente le pouvoir lytique de la nisine dans les membranes de POPC (voir section 3.3.1.2). Dans cette section, nous allons examiner si l'effet inhibiteur du cholestérol observé dans le cas de la POPC pure est maintenu dans le cas des membranes comportant des lipides négatifs.

Le relargage de calcéine des vésicules POPC/POPG (3:7) contenant 30 mol% de cholestérol (figure 3.4A) montre un léger délai de relargage durant les cinq premières secondes qui suivent l'ajout de la nisine. Le relargage devient ensuite très rapide et son taux devient semblable à celui de POPC/POPG (3:7). Le relargage atteint son maximum au bout de la première minute. À $1/R_i = 0,2$, on voit que le taux de relargage se situe autour de 65 % pour POPC/POPG (3:7) indépendamment de la présence ou de l'absence du cholestérol. Le relargage de calcéine a été comparé pour les vésicules de POPC/POPG (3:7) avec et sans cholestérol (figure 3.4B). Nous remarquons la disparition de l'effet inhibiteur du cholestérol observé dans le cas de

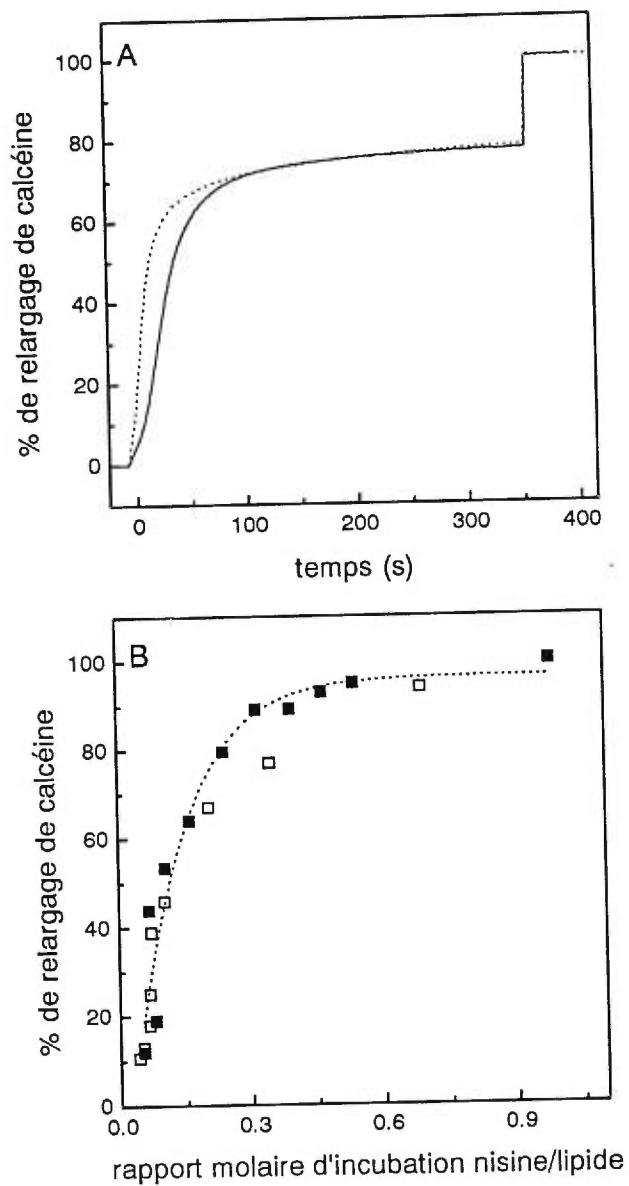


Figure 3.4 (A) Le relargage de la calcéine induit par la nisine des vésicules de POPC:POPG (3:7) contenant 30 mol% chol (□) et des liposomes de POPC:POPG (3:7) (●) à $1/R_i = 0,2$. (B) Le pourcentage de relargage de la calcéine des liposomes de POPC:POPG (3:7) (■) et de ceux de POPC:POPG:30 mol% chol (□) en fonction de $1/R_i$.

POPC.

3.3.1.4 Mécanisme de relargage induit par la nisine dans les vésicules de POPC et POPC/30 mol% chol

La lyse induite par la nisine des membranes de POPC est réduite en présence du cholestérol. D'autre part, pour un pourcentage de relargage donné, la cinétique est la même. Nous avons alors décidé d'établir le mécanisme de lyse induite par la nisine des vésicules de POPC et POPC/30 mol% chol.

La figure 3.5 montre d'abord la courbe de calibration de sonde qui rapporte l'efficacité de l'auto-extinction en fonction de la concentration de la calcéine à l'intérieur des liposomes (l'axe inférieur des x). Le coefficient Q augmente avec l'augmentation de la concentration en calcéine à l'intérieur des liposomes tel que décrit auparavant (Allen, 1984). La même figure (l'axe supérieur des x) présente le pourcentage de relargage de la calcéine des vésicules qui ont été (i) incubées avec différentes concentrations de nisine pendant 800 sec. (ii) purifiées sur un gel pour enlever la calcéine libérée, et (iii) réanalysées pour mesurer le coefficient Q indiqué (l'axe des y). Nous remarquons que le Q de la calcéine toujours encapsulée après l'action de la nisine est à peu près constant indiquant un mécanisme "tout ou rien" aussi bien pour les vésicules de POPC que celles contenant 30 mol% cholestérol.

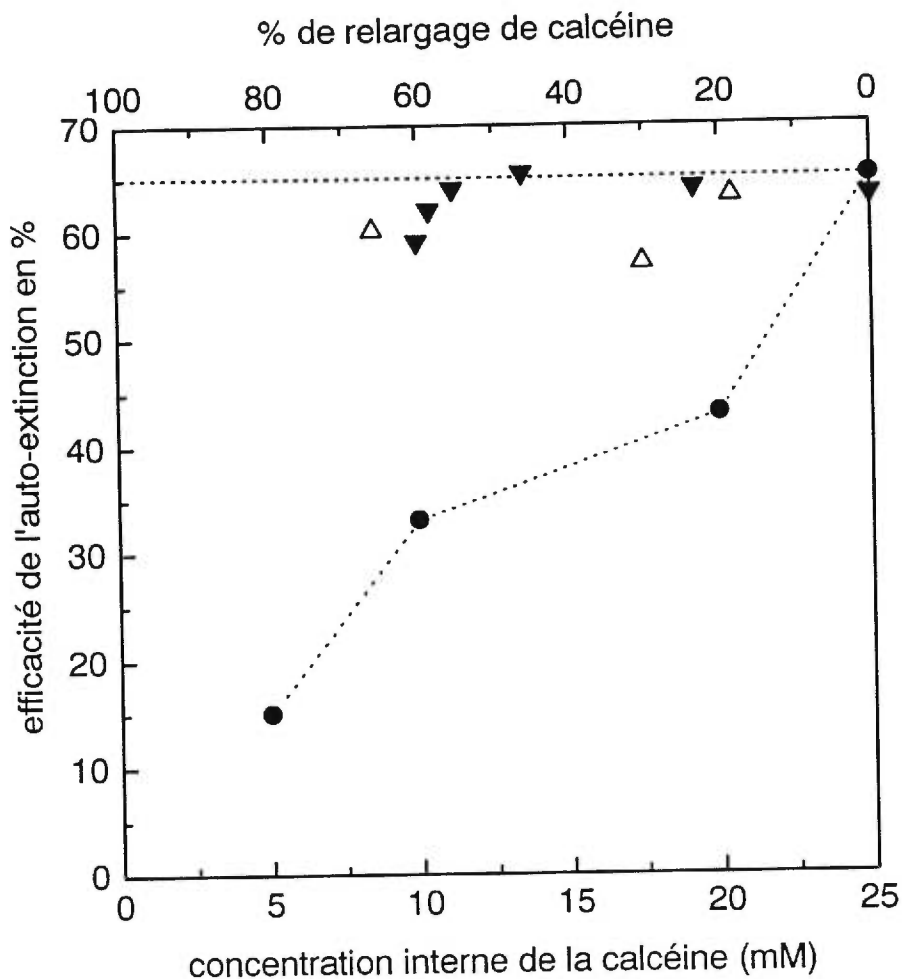


Figure 3.5 Mesure de l'efficacité de l'auto-extinction de fluorescence (Q) pour déterminer le mécanisme de relargage de la calcéine induit par la nisine des vésicules de POPC (▼) et de POPC/30 mol% chol (△). L'efficacité Q est représentée en fonction du relargage de sonde (l'axe supérieur des x). (●) Le Q de la calcéine encapsulée dans les vésicules de POPC en fonction de la concentration interne en sonde (l'axe inférieur des x) pour illustrer un relargage partiel. La courbe pointillée horizontale représente le comportement prévu pour un relargage tout-ou-rien.

3.3.2 Discussion

Les résultats ci-dessus montrent que la nisine affecte la perméabilité des membranes. Cette propriété est grandement influencée par la composition en lipides des membranes et met en relief la nature des interactions nisine/lipides.

L'introduction des charges négatives dans la membrane stimule fortement le pouvoir lytique de la nisine. Il existe une controverse concernant l'effet des charges négatives sur le pouvoir lytique de la nisine. Certaines études (Giffard et coll., 1997; Breukink et coll., 1997; Martin et coll., 1996) montrent que la présence de lipides négatifs dans la membrane fait la promotion du pouvoir lytique de la nisine. Par contre, d'autres études (García Garcerá et coll., 1993; Driessen et coll., 1995) montrent que la nisine n'affecte pas la perméabilité des membranes constituées de phosphatidylglycérol (PG). Notre étude supporte la conclusion que les charges négatives dans la membrane augmentent le pouvoir lytique de ce peptide. Les études de la littérature (Driessen et coll., 1995; Giffard et coll., 1997; Breukink et coll., 1997) s'accordent sur le fait que la nisine possède une grande affinité envers les lipides chargés négativement comparativement aux lipides neutres. Ceci s'explique par les interactions électrostatiques entre la nisine et les membranes lipidiques. Les résidus chargés positivement de la nisine sont attirés par la surface lipidique négative. Ces interactions attractives augmenteraient l'affinité du peptide pour la membrane. Une plus grande quantité de peptide à la surface pourrait être à l'origine de

l'augmentation de la lyse observée. Cet effet de promotion par les charges négatives a été observé dans le cas de la magainine, un peptide cationique antibactérien, (Matsuzaki et al., 1995). Ce peptide a en commun avec la nisine une très faible affinité envers les membranes de PC et ses interactions avec les membranes sont gouvernées principalement par les effets électrostatiques. Ce comportement est différent de celui de la mélittine, une toxine du venin d'abeille. Dans ce cas, le peptide a beaucoup d'affinité pour les membranes neutres, à cause de son segment hydrophobe important (Dufourcq et Faucon, 1977) et il possède une activité lytique considérable pour ces membranes (Benachir et Lafleur, 1995). Bien que la présence de lipides chargés négativement vienne accroître l'affinité de la mélittine pour la membrane, elle inhibe le pouvoir lytique de la mélittine (Benachir et Lafleur, 1995). Ceci est interprété par un ancrage du peptide à l'interface limitant ainsi la relocalisation du peptide qui mène à la formation de défauts dans la bicouche. La comparaison de nos résultats avec d'autres systèmes de la littérature nous amène à dégager deux classes de peptides lytiques. La première qui inclut la nisine, interagirait principalement via des interactions électrostatiques et la présence de lipides négatifs augmenterait leur activité lytique car elle augmenterait l'affinité du peptide pour la membrane. La deuxième classe de peptides impliquerait une contribution considérable des interactions hydrophobes et dans ce cas, la lyse serait réduite par l'addition de lipides chargés négativement car ceux-ci restreindraient l'insertion du peptide dans la membrane.

La stimulation de lyse associée aux lipides négatifs n'est pas linéaire avec leur concentration dans la bicouche. En effet, la présence de 15 mol% de POPG dans une membrane de POPC n'augmente pas le pouvoir lytique de la nisine. Par contre, la lyse est augmentée en présence d'une membrane de POPC contenant 70 mol% de POPG, à un niveau comparable à celui des vésicules formées essentiellement de POPG. Ces résultats sont en accord avec des études (Breukink et al., 1997) faites sur la nisine Z qui ont montré que le pouvoir lytique de la nisine Z est constant pour des membranes de DOPC contenant entre 0 et 20% de lipide négatif.

Nos résultats montrent que le relargage induit par la nisine dans les liposomes de POPC contenant du cholestérol est fortement inhibé comparé à POPC pure. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce phénomène est une faible affinité du peptide pour une bicouche en phase liquide ordonnée l_o . Comme les chaînes sont plus ordonnées et l'empilement des lipides est plus compacte dans cette phase, la pénétration du peptide à l'intérieur d'une telle membrane serait peu favorable et la diminution d'affinité pourrait être à l'origine de l'inhibition observée. Ceci a d'ailleurs été proposé pour d'autres peptides incluant la magainine (Matsuzaki et al., 1995), le peptide GALA (Nicol et al., 1996) et la mélittine (Benachir et al., 1997).

Cependant, la présence du cholestérol dans une membrane qui contient une densité importante de charge négative n'affecte pas considérablement le pouvoir lytique de la nisine. Les charges négatives à la surface de POPG augmente l'affinité

de la nisine pour la membrane (El Jastimi et Lafleur, 1997; Breukink et al., 1997) à cause des interactions électrostatiques attractives qui dominent les interactions nisine/lipides. Les interactions hydrophobes jouent alors un rôle secondaire, tel qu'illustré par la très faible affinité de la nisine pour la POPC (El Jastimi et Lafleur, 1997). Les résultats obtenus montrent que lorsque les effets électrostatiques sont encouragés par la présence des lipides chargés négativement, la modification de l'ordre du coeur hydrophobe par le cholestérol a peu de conséquence; le taux de relargage est alors similaire à celui obtenu pour les vésicules de PG sans cholestérol. Il faut cependant souligner qu'à ce point, peu de choses sont connues quant à l'effet du cholestérol sur les bicouches contenant les lipides chargés négativement (la formation de la phase l_o n'est pas établie, par exemple) et ceci limite l'interprétation de ces résultats.

Il est à noter qu'on observe un temps de latence (lag) qui suit l'ajout de la nisine au système POPC/POPG/chol; très peu de renseignements sont connus à ce sujet. Il se pourrait qu'une séparation de phase des lipides se produise sous l'effet de la nisine qui agirait ensuite aux endroits riches en PG mais pauvres en cholestérol. On pourrait aussi proposer que l'insertion de la nisine est retardée à cause de la compacité de la membrane contenant 30 mol% de cholestérol. D'autres expériences sont nécessaires pour éclaircir ce phénomène.

En conclusion, ces résultats montrent que la présence du cholestérol dans la

membrane zwitterionique inhibe fortement cette activité. Ce phénomène peut être relié à la faible action de la nisine sur les cellules d'érythrocytes humains car leurs membranes plasmiques contiennent une grande proportion de phosphatidylcholine et de cholestérol et peu de lipides négatifs (Gennis, 1989). La perturbation de la nisine implique également de fortes interactions électrostatiques. Les charges négatives à la surface de la bicouche augmentent la lyse provoquée par la nisine et ce, sans égard pour le cholestérol.

3.4 Caractérisation de la dynamique et de la morphologie des complexes DPPC/nisine. Effet inhibiteur du cholestérol

Après avoir caractérisé l'effet de la nisine sur la perméabilité des membranes, nous allons examiner les effets de ce peptide sur la dynamique moléculaire des lipides par RMN du deutérium. Par RMN du ^{31}P ainsi que par cryo-microscopie électronique, nous étudierons les changements de morphologie que la nisine peut induire dans les membranes de DPPC. L'effet du cholestérol sera également étudié.

3.4.1 Résultats

À 26° C, la DPPC- d_{62} pure est en phase gel (la figure 3.6). Le spectre est large, constitué d'une composante large et d'un doublet plus étroit. Il est

caractéristique de vésicules de grosse taille en phase gel ordonnée (Davis, 1979). À cause de la rotation des CD_3 autour du lien C-C, leurs deutériums donnent lieu à la composante spectrale plus fine comparée aux deutériums du reste de la chaîne acyle qui sont associés à la composante large. À 50 °C, le spectre est une superposition de plusieurs spectres de poudre, dont plusieurs sont partiellement résolus. Le signal est typique de lipides possédant des mouvements avec une symétrie axiale. On observe une réduction de l'éclatement quadripolaire par rapport aux spectres de la phase gel. Ce profil est typique d'une phase liquide cristalline. Le spectre de poudre central, avec un éclatement quadripolaire de 2 kHz, représente les groupements méthyles terminaux. Les autres pics sont associés aux spectres de poudre correspondant aux groupements CD_2 des chaînes. Ceux-ci n'ont pas tous le même écart quadripolaire $\Delta\nu_Q$ puisqu'il existe un gradient de mouvement le long des chaînes acyle des lipides (Lafleur et coll., 1990b).

La figure 3.6 montre également les spectres des complexes DPPC- d_{62} /nisine à $R_i=15$ et $R_i=5$. En phase gel, la nisine a peu d'effet sur la partie large du spectre. Cependant, les pics correspondant aux deutériums des méthyles terminaux sont de moins en moins résolus avec l'augmentation de la quantité de nisine. On observe également l'apparition d'une raie isotrope. Son intensité est cependant limitée puisqu'elle représente moins que 3% du spectre total dans le cas du complexe DPPC- d_{62} /nisine $R_i=15$.

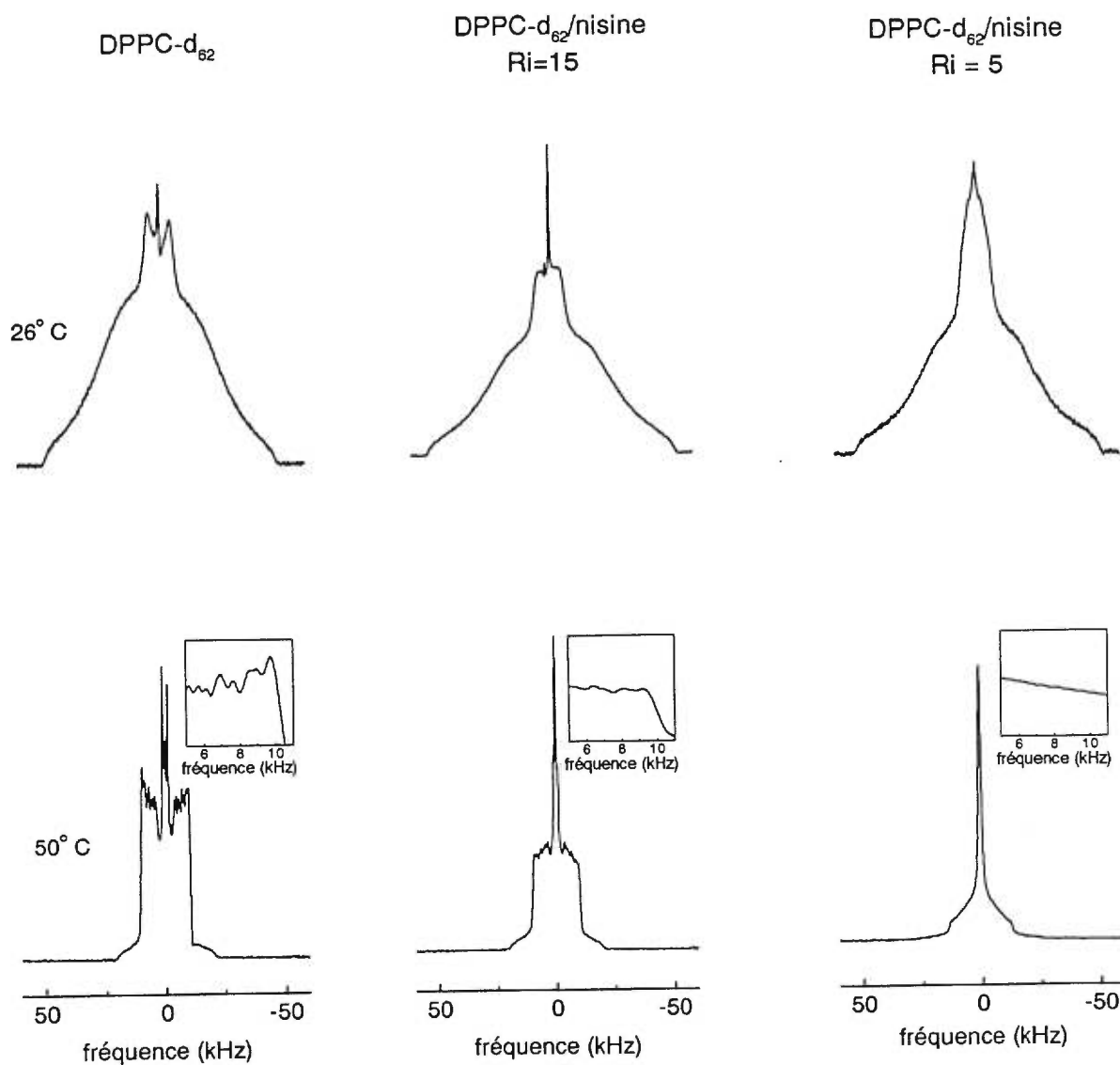


Figure 3.6 Spectres RMN du ^2H de DPPC- d_{62} en absence et en présence de la nisine. Le Ri et les températures sont indiqués en haut et à gauche, respectivement. Les encadrés représentent un agrandissement des spectres entre 5 et 11 kHz à 50°C .

En phase liquide cristalline, le spectre du complexe DPPC-d₆₂/nisine Ri=15 montre trois choses. Il y a d'abord l'apparition d'une raie isotrope. Ensuite, on note l'élargissement des pics dans le spectre. Finalement, la partie attribuable aux spectres de poudre a sensiblement la même largeur que celle obtenue pour le lipide pur. À Ri=5, les deux premiers phénomènes s'accroissent. Aucune composante associée aux différents CD₂ ne peut être résolue dans le spectre (voir encadré à la figure 3.6). Deux composantes sont observables dans le spectre: une composante symétrique large d'environ 25 kHz, et une raie fine d'environ 1,5 kHz de large.

La perte de résolution observée dans les spectres pourrait être due à des différences de temps de relaxation spin-spin T₂ (Fenske et Cullis, 1993; Bayerl et Bloom, 1990). Nous avons mesuré T₂ pour la DPPC-d₆₂ à 50°C en absence et en présence de la nisine à un rapport molaire Ri=15. Pour le lipide pur, T₂ est égal à 370 ± 6 μs, en accord avec la littérature (Dico et al., 1997). Pour le complexe DPPC-d₆₂/nisine Ri=15, T₂ est évalué à 220 ± 23 μs. Une réduction similaire du T₂ a été observée dans le cas de la protéine pulmonaire SP-B. Celle-ci a un faible impact sur l'ordre des chaînes de DPPC-d₆₂/DPPG (7:3) mais diminue considérablement le temps de relaxation spin-spin du lipide (Dico et al., 1997). Cette étude montre également la perte de résolution dans les spectres des lipides en présence de cette protéine.

Nous avons également étudié par RMN du phosphore l'effet de la nisine sur le polymorphisme des membranes de phosphatidylcholine. Nous avons étudié les

complexes de DPPC/nisine à $R_i = 5$ de manière à obtenir des changements significatifs. La figure 3.7 montre le spectre de poudre d'une dispersion multilamellaire de DPPC en fonction de la température. À 26° C, le spectre est large caractéristique du lipide en phase gel avec une $\Delta\sigma = 51$ ppm. À 45°C et 50°C, la DPPC est en phase liquide cristalline; ceci se traduit par une légère diminution de $\Delta\sigma$ qui passe à 42 ppm en accord avec la littérature (Seelig, 1978).

Le spectre du complexe DPPC/nisine $R_i = 5$, enregistré à 26° C, est similaire à celui du lipide pur suggérant que le peptide n'a pas d'effet sur le lipide en phase gel. Ceci est en accord avec les résultats en RMN du ^2H où l'on n'a pas trouvé d'effet notable de la nisine sur les membranes de DPPC- d_{62} dans ces conditions. À 45 °C, on remarque la disparition du spectre de poudre représentatif de dispersions multilamellaires. Le complexe DPPC/nisine ($R_i=5$) donne lieu à une raie légèrement asymétrique, dont la largeur à la mi-hauteur est égale à 13,5 ppm. Cette largeur diminue avec l'augmentation de la température pour atteindre 8,6 ppm à 50° C. Ce changement avec la température est réversible et le refroidissement de l'échantillon donne lieu à un spectre identique à celui pris à 26°C .

Il y a donc formation d'un complexe nisine/DPPC dont le spectre en RMN du ^{31}P est distinctif. Nous avons étudié l'équilibre menant à la formation du complexe DPPC-nisine. La figure 3.8 montre que la formation du complexe est sensible à la concentration des espèces. Au fur et à mesure que l'échantillon est dilué, on observe

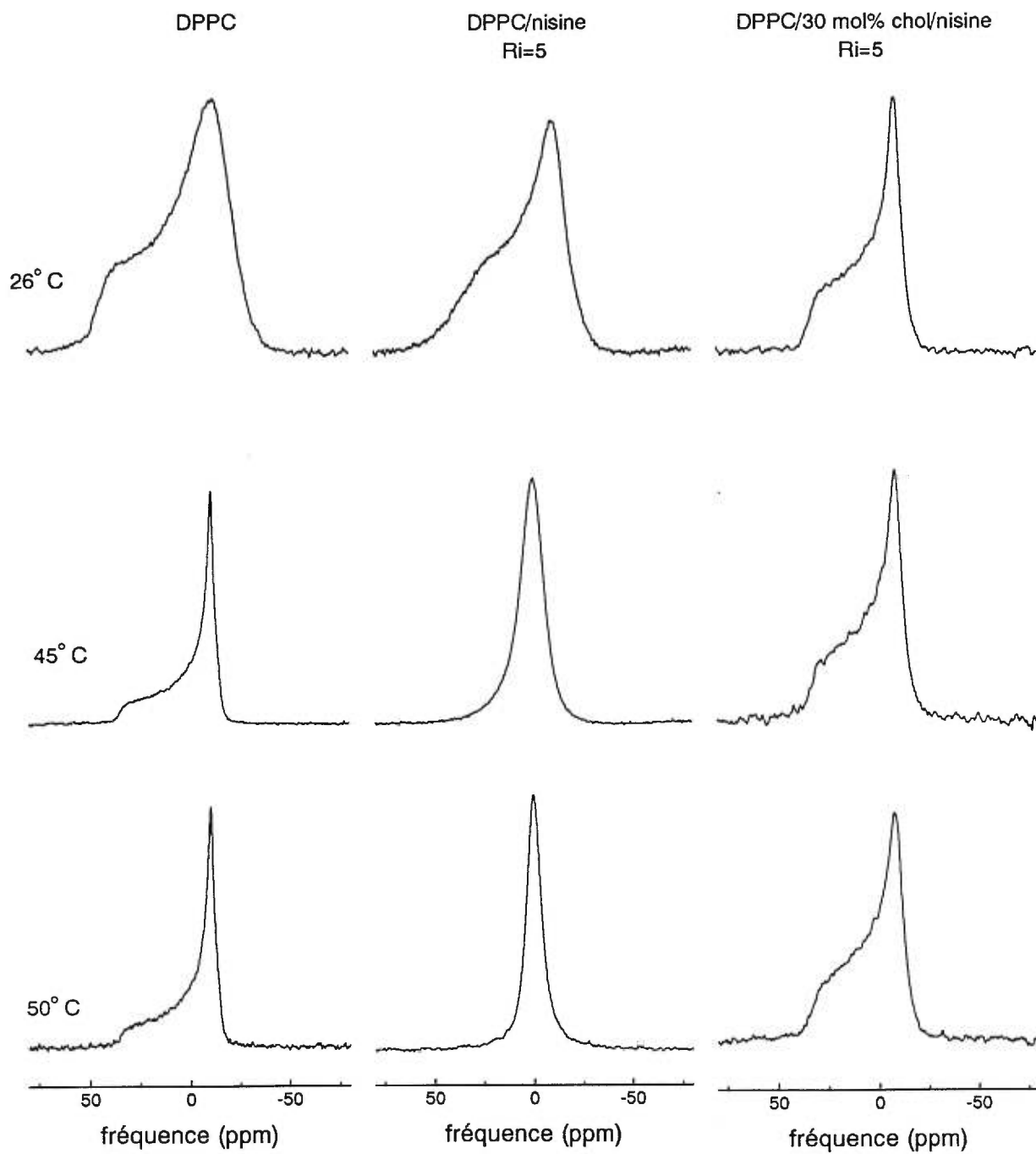


Figure 3.7 Spectres RMN du ^{31}P de DPPC, DPPC/nisine et DPPC/30 mol% chol/nisine. Le R_i et les températures sont indiqués en haut et à gauche respectivement.

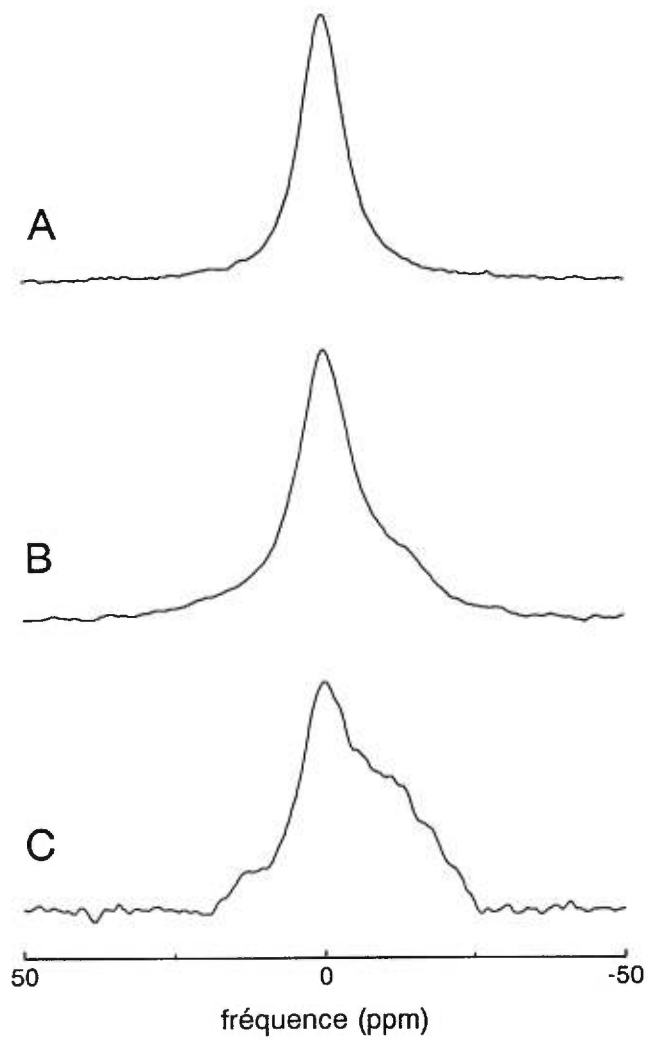


Figure 3.8 Effet de la concentration des espèces sur la dissociation du complexe DPPC/nisine $R_i = 5$. La concentration en DPPC est: A) 58 mM, B) 24 mM et C) 12 mM. Les spectres sont enregistrés à 45° C.

la formation d'une composante large qui possède l'aspect d'un spectre de poudre, au dépend de la raie isotrope. Une proportion importante de spectre de poudre apparaît lorsque la concentration en lipide du départ est divisée par un facteur 6. La largeur spectrale observée montre que ces lipides ne subissent pas de mouvements isotropes.

La RMN est une technique moléculaire qui ne permet pas d'établir directement la macrostructure des agrégats lipidiques. Ceci est encore plus vrai lorsque les molécules subissent des mouvements rapides isotropes conduisant à l'absence de signal large. Pour avoir une meilleure idée de la structure des complexes PC/nisine, nous avons eu recours à la microscopie électronique pour obtenir plus d'informations microscopiques sur les structures lipidiques formées en présence de la nisine.

Les images obtenues au microscope électronique des complexes DPPC/nisine $R_i=5$, qui ont été gelés à partir de 50° C, montrent trois espèces d'agrégats (figure 3.10B). Il y a d'abord la présence de quelques liposomes associés au signal de spectre de poudre obtenu en RMN du ^{31}P . Ensuite, on note, la présence d'agrégats sans géométrie bien définie. À l'intérieur de ces structures, on peut distinguer des petites particules de matériel dense. On note finalement la présence de structures en filaments (en arrière-plan de la photo). À 25° C, la morphologie de l'échantillon change de façon considérable (figure 3.10A). On observe alors la présence d'agrégats d'apparence plus cristalline qui contiennent un grand nombre de petites particules denses. Ceci donne lieu à des espèces de structures tubulaires d'environ 10 nm de

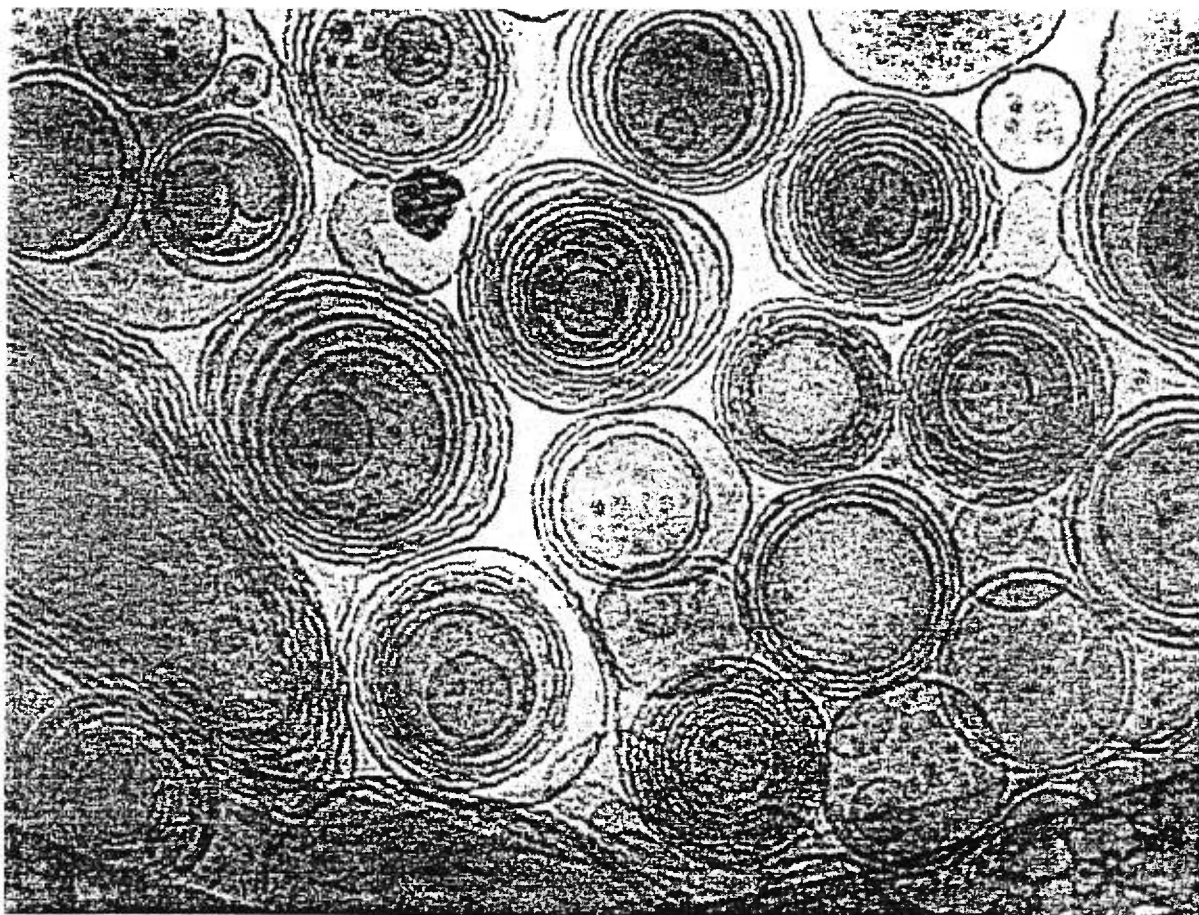


Figure 3.9 Un exemple de structure lipidique multilamellaire observée par cryomicroscopie électronique. Cette image a été gracieusement fournie par le Dr. Katarina Edwards (Université d'Uppsala).

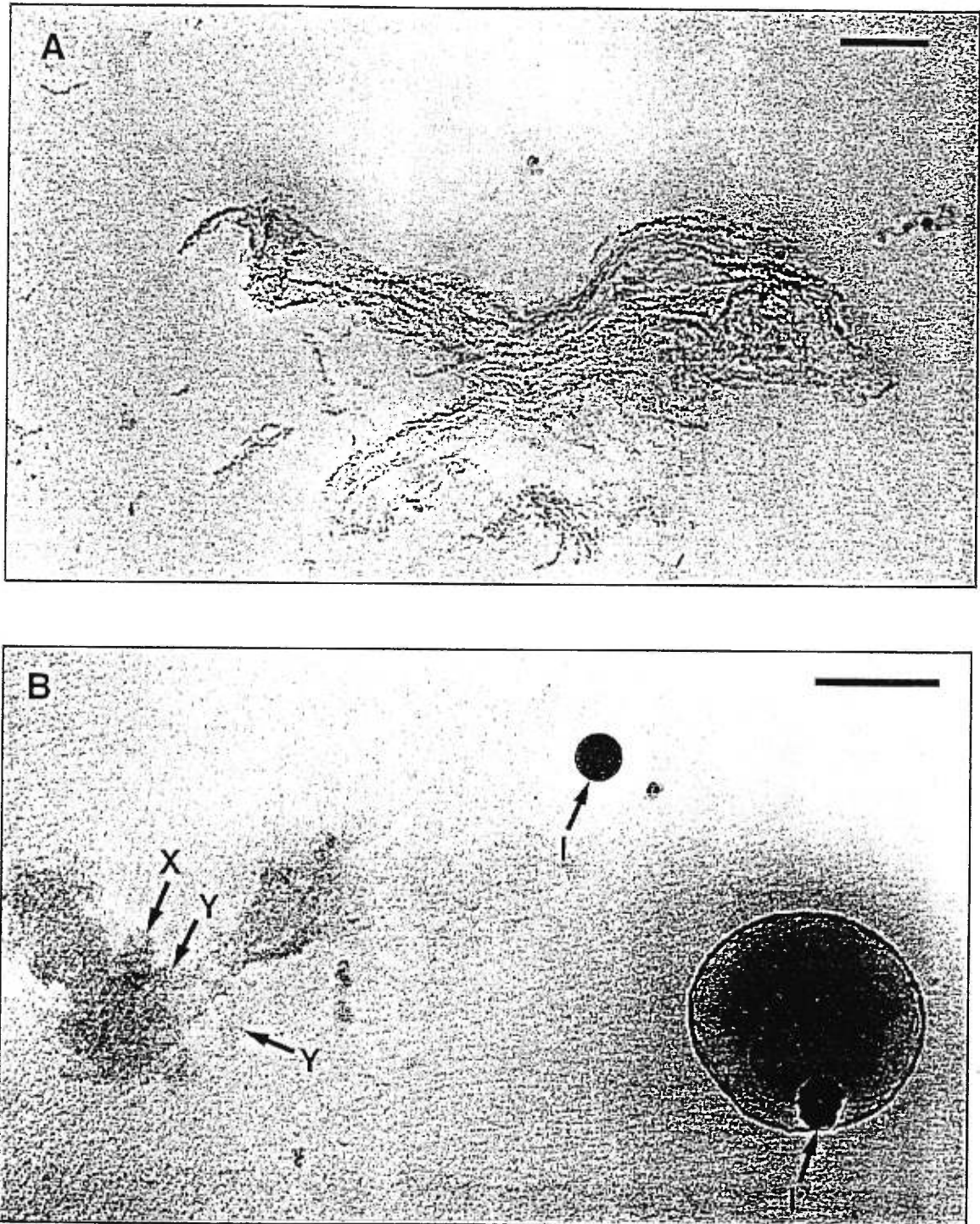


Figure 3.10 Cryo-microscopie électronique des complexes de DPPC/nisine $R_i = 5$. A) en phase gel (25°C); B) en phase liquide cristalline (50°C). X représente le matériel amorphe, Y représente des structures globulaires denses et I indique les cristaux d'eau formés lors de la vitrification de l'échantillon. Les barres représentent 200 nm.

diamètre. On note également l'absence de liposomes ou des structures lamellaires que le lipide adopte généralement en milieu aqueux (figure 3.9) ainsi que du fond strié que l'on observait à 50° C.

Dans les études de perméabilité, nous avons montré que la présence du cholestérol dans les membranes de POPC protège celles-ci contre la lyse provoquée par la nisine. Dans cette section, nous allons examiner si la nisine affecte le polymorphisme et la dynamique des membranes de DPPC contenant du cholestérol.

L'effet du cholestérol sur les membranes de DPPC a été bien caractérisée (Vist et Davis, 1990). La présence de cholestérol dans des membranes de DPPC à une concentration de 30 mol% abolit la transition gel \leftrightarrow liquide cristalline et le lipide est en phase liquide ordonnée sur une vaste gamme de température. La figure 3.11 illustre bien ce phénomène. À 26 °C, le spectre de la DPPC-d₆₂ en présence de 30 mol% cholestérol est large, indiquant un ordre élevé des chaînes. L'éclatement quadrupolaire du doublet résolu le plus large est de 61 kHz. Bien que large, le spectre présente une structure fine comparable à celle que l'on trouve en phase liquide cristalline et caractéristique d'un mouvement de symétrie axiale (Vist et Davis, 1990). La membrane est ordonnée et fluide. À 50° C, le spectre est moins large qu'à 26 °C dû à l'agitation thermique, mais demeure plus large que celui de la DPPC pure en phase liquide désordonnée. Contrairement au lipide pur, il n'y a pas de changement drastique dans le spectre en fonction de la température, en accord avec l'abolition de

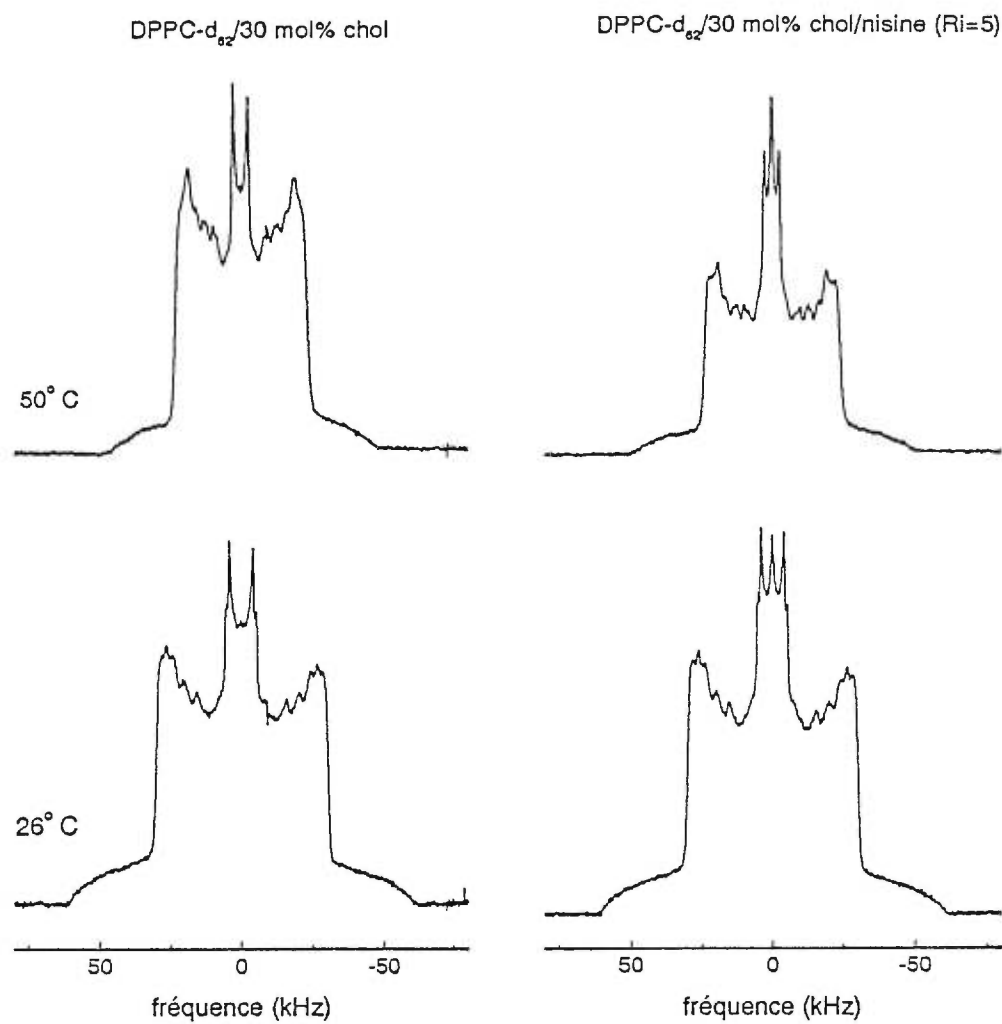


Figure 3.11 Spectres RMN du deutérium des complexes DPPC-d₆₂/30 mol% chol et de DPPC-d₆₂/30 mol% chol/nisine (Ri = 5) à 26 et à 50° C.

la transition déjà rapportée (Vist et Davis, 1990). Quand la nisine est ajoutée au mélange DPPC/cholestérol (30 mol%) à un rapport molaire lipide/nisine $R_i=5$, on n'observe aucun effet notable sur les spectres de ce mélange, aussi bien à 26 qu'à 50° C. On remarque l'apparition d'une raie isotrope en fonction de la température, mais son intensité relative ne dépasse pas 5 %. Les spectres obtenus en RMN du ^{31}P confirme l'absence de l'effet de la nisine sur les membranes de DPPC/30 mol% cholestérol (figure 3.7). Cet effet protecteur est en accord avec l'inhibition de relargage en présence du cholestérol.

3.4.2 Discussion

Un des objectifs de cette section est de déterminer si la nisine affecte l'architecture du macroassemblage de la DPPC. Les résultats RMN du ^{31}P et du ^2H ainsi que les images obtenues grâce à la cryo-microscopie électronique montre qu'effectivement la nisine affecte la structure lipidique. En phase fluide, la nisine réduit grandement l'anisotropie du déplacement chimique observé pour les MLV de DPPC en RMN du ^{31}P . Ce phénomène peut être attribuable à plusieurs facteurs. Par exemple, il se pourrait que la tête polaire devienne beaucoup plus mobile ou se réoriente de façon à ce que l'anisotropie se moyenne presque complètement à cause de la rotation du lipide. La nature des changements induits par la nisine dans les spectres de ^2H ne supporte pas ces hypothèses. Le moyennage des interactions peut être dû à certains mouvements qui conduisent à un changement d'orientation de la

molécule par rapport au champ magnétique externe. Des modèles ont été développés pour décrire l'effet de tels mouvements dans le cas des vésicules (Burnell et coll., 1980). Deux mouvements principaux sont pris en compte pour le moyennage des interactions: la diffusion du lipide le long du plan lipidique courbe de la vésicule et la rotation Brownienne de cette vésicule. Le temps de corrélation de ces deux mouvements est relié au rayon de la particule par:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{6 (D_t + D_{diff})}{r^2} \quad (6)$$

$$D_t = \frac{kT}{8\pi r \eta} \quad (7)$$

où

k = constante de Boltzmann

T = température

r = rayon de la vésicule

D_t = constante décrivant la rotation Brownienne des vésicules

D_{diff} = constante de diffusion des lipides dans la bicouche

η = viscosité du milieu

Ce temps de corrélation doit être comparé avec l'échelle de temps de la technique RMN (τ_{RMN}). Le temps RMN est à peu près équivalent à l'inverse de la largeur

spectrale (Fenske et Cullis, 1993). Dans le cas du ^{31}P , le $\Delta\sigma$ est d'environ 6 kHz, le temps de RMN est donc estimé à 150 μs . En RMN du ^2H , la fenêtre spectrale est plus large (environ 120 kHz), ce qui conduit à un τ_c de l'ordre de 8 μs . Trois régimes peuvent être distingués. Si τ_c est très court par rapport à τ_{RMN} , on obtient un moyennage isotrope des interactions; on parle alors du régime rapide. C'est le cas des lipides en solution organique. Si τ_c est beaucoup plus long que τ_{RMN} , les mouvements lipidiques n'ont pas d'effet sur le spectre; on est dans un régime lent. C'est le cas de la diffusion des lipides dans les MLV. Lorsque les mouvements ont un τ_c du même ordre de grandeur que τ_{RMN} , on est dans un régime intermédiaire. À partir des spectres RMN du ^{31}P du complexe DPPC/nisine, les mouvements rapides sur cette échelle de temps conduisent à un moyennage important des interactions menant à l'anisotropie du déplacement chimique. Dans ce cas, ces mouvements ne semblent pas suffisamment rapides pour conduire à un signal isotrope en RMN du ^2H . Ceci peut être expliqué en considérant les τ_{RMN} associés à ces noyaux. Il se peut que les lipides des complexes DPPC/nisine possèdent des mouvements dont les temps de corrélation sont *effectivement* plus rapides sur l'échelle de temps du ^{31}P qu'en ^2H , en considérant leur τ_{RMN} de 150 μs et 8 μs respectivement. Ce phénomène a d'ailleurs été observé pour des vésicules unilamellaires d'environ 120 nm de diamètre. Celles-ci donnent lieu à des raies larges isotropes en RMN du ^{31}P tandis qu'en RMN du ^2H , elles donnent lieu à un moyennage incomplet qui se traduit principalement par une perte de résolution dans ce spectre (Fenske et Cullis, 1993). L'allure des spectres RMN du ^2H et du ^{31}P suggère que la structure des complexes DPPC/nisine est telle

que des mouvements possédant des temps de corrélation intermédiaires entre 8 et 150 μ s existent. Ceci est cohérent avec les changements de T_2 dans le cas de la DPPC- d_{62} en présence de la nisine indiquant que ce peptide affecte les mouvements responsables de la relaxation transversale comme la diffusion du lipide le long de la surface de la bicouche (Fenske et Cullis, 1993). Il a été montré que la diminution du diamètre des vésicules lipidiques provoquait une réduction des T_2 (Fenske et Cullis, 1993; Bayerl et Bloom, 1990). Les changements de T_2 observés peuvent donc être associés à la diffusion latérale des phospholipides le long des surfaces de membrane plus courbés.

Les résultats obtenus par cryo-microscopie électronique des échantillons de DPPC/nisine montrent que la nisine n'induit pas, de manière générale, la formation de vésicules de taille menant à des τ_c intermédiaires bien que quelques unes soient observées. Les photographies montrent qu'une partie des lipides forme de grosses structures isomorphes qui pourraient être responsables des modifications des spectres RMN. Il est à souligner que les structures qui se dispersent mal en milieu aqueux sont sous représentées dans les photographies. Il est aussi possible que l'autre type de structure observée qui a l'aspect de cylindres que l'on voit sur le fond (figure 3.9) soit dérivé de ces structures isomorphes et soit formé lorsqu'un papier buvard est glissé sur l'échantillon pour éliminer l'excès d'eau.

En phase gel, les micrographes montrent l'absence des dispersions

multilamellaires et la présence de macroassemblages dont l'aspect est plus cristallin (par exemple, les bords sont mieux définis), comparé aux structures observées à hautes températures. Les objets isomorphes observés à 50° C et ces objets cristallins semblent correspondre aux complexes DPPC/nisine pour lesquels il y aurait une transition de phase. Cette transition de phase est d'ailleurs observée par RMN du ^2H . Dans la phase de basses températures, il est possible que la diffusion latérale des lipides soit plus lente (la diffusion axiale est certainement ralentie si on se réfère aux spectres RMN du ^2H) et que la diffusion des lipides le long des surfaces très courbées de l'assemblage se retrouve dans le régime lent des mouvements et n'influence pratiquement pas les spectres RMN du ^2H et du ^{31}P tel qu'observé. On peut imaginer, par exemple, qu'une bicouche de lipide enrobe la nisine ou un amas de nisine (possiblement les points noirs de hautes densités sur les photos) générant une surface très courbée. La diffusion des lipides le long de la surface courbe à l'intérieur de ces objets pourrait expliquer les résultats RMN et la structure en bicouche donnerait lieu à la transition gel-cristal liquide. Des systèmes comme le surfactant pulmonaire SP-B en présence des membranes de DPPC/DPPG (Dico et coll., 1997) et certains odorants en présence des membranes de dimyristoylphosphatidylcholine (Bouchard et coll., 1996), montrent la perte de résolution en RMN du ^2H . La formation de la structure décrite plus haut pourrait expliquer de tels changements.

Le complexe formé entre la nisine et la DPPC se dissocie lorsqu'on dilue l'échantillon. Nous avons montré dans des travaux antérieurs que la nisine a une

faible affinité envers les membranes de DPPC (El Jastimi et Lafleur, 1997). Le complexe DPPC/nisine observé est dû à la concentration élevée en lipide nécessaire pour obtenir un bon signal RMN qui déplace l'équilibre vers le complexe. L'obtention de deux signaux distincts dans le spectre RMN du ^{31}P et le fait qu'une des composantes semble correspondre à un spectre de lipide en dispersion multilamellaire indiquent que les lipides dans le complexe ne s'échangent pas rapidement (sur l'échelle de temps RMN) avec ceux formant des phases lamellaires classiques.

La composition lipidique des membranes module également l'action de la nisine. Une membrane de DPPC contenant du cholestérol résiste à la réorganisation induite par ce peptide. Comme pour le cas des fuites, il est très probable que l'empilement compacte des chaînes lipidiques en présence du cholestérol défavorise l'insertion de la nisine dans la membrane et de ce fait, inhibe les changements morphologiques produits par la nisine. Un effet inhibiteur du cholestérol similaire a été aussi observé dans le cas de la mélittine (Monette et coll., 1993). La présence de concentration importante de cholestérol dans une membrane de DPPC inhibe fortement la formation de bicelles induite par ce peptide.

3.5 Effet de la nisine sur le polymorphisme des membranes de phosphatidyléthanolamine. Promotion de phases non-lamellaires

Dans la section précédente, nous avons montré que la nisine brise les structures en MLV des membranes de phosphatidylcholine. Dans la présente section, nous nous intéresserons aux lipides ayant tendance à former des phases non-lamellaires. Plus précisément, nous présenterons les résultats de la RMN du ^{31}P qui nous ont permis de mettre en évidence les changements morphologiques que la nisine induit dans cette classe de lipides.

3.5.1 Résultats

3.5.1.1 Induction de la phase hexagonale dans les membranes de DOPE

Avant d'étudier les effets de la nisine sur le polymorphisme de la DOPE, le comportement de ce lipide en absence de la nisine est présenté. Les spectres de la DOPE en fonction de la température sont montrés à la figure 3.12. À 2° C, le spectre montre une $\Delta\sigma$ de 43 ppm, caractéristique de phospholipides en phase liquide cristalline (Tilcock et coll., 1982). À 5° C, on remarque qu'une partie du lipide commence à adopter la phase hexagonale. À 10° C, tout le lipide est en phase hexagonale et montre une $\Delta\sigma$ de 21 ppm.

Il est possible de suivre l'évolution de la phase hexagonale et de la phase

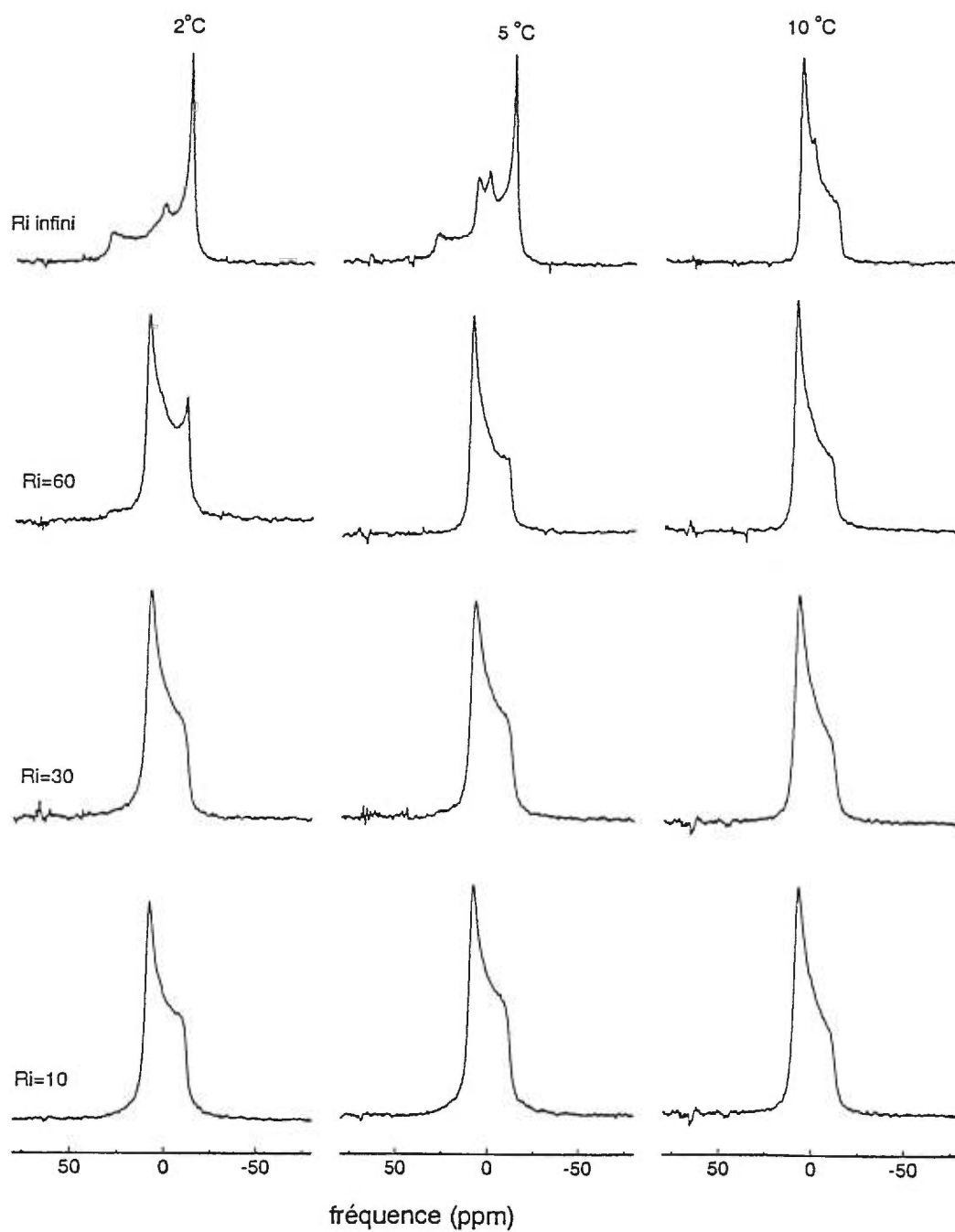


Figure 3.12 Spectres RMN du phosphore des échantillons de DOPE et de DOPE/nisine. Les températures sont indiquées en haut de chaque colonne et les R_f sont montrés à gauche.

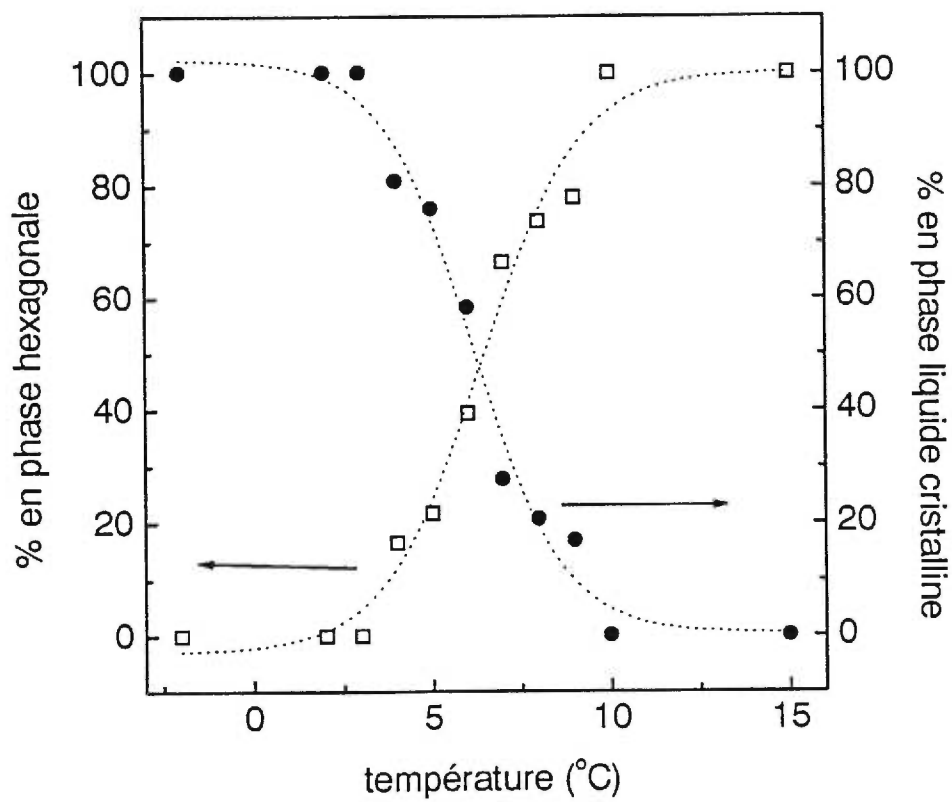


Figure 3.13 Variation du pourcentage de la phase hexagonale et de la phase liquide cristalline de la DOPE pure en fonction de la température.

lamellaire de ce lipide en fonction de la température en estimant l'aire relative des composantes après décomposition des spectres où il y a coexistence des deux phases (figure 3.13). Le passage de la phase lamellaire à la phase hexagonale se produit entre 3 et 8° C. La température à laquelle une proportion égale de L_{α} et H_{II} est observée est 6° C. Cette température de transition lamellaire- H_{II} (T_{II}) est en accord avec la littérature (Tilcock et coll., 1982). La raie isotrope que l'on observe dans la DOPE peut être due à de petites vésicules formées lors de l'hydratation du lipide. Son aire relative est toujours entre 2 et 5 % sur tout l'intervalle de température étudié.

Pour caractériser l'influence de la nisine sur le polymorphisme de la DOPE, nous avons enregistré les spectres RMN du phosphore de différents complexes de DOPE/nisine (figure 3.12). La présence de la nisine dans les membranes de DOPE à un Ri de 60 est suffisante pour induire la phase hexagonale, à 2° C. À 5 et à 10° C, le lipide existe seulement sous forme de phase hexagonale. Une plus grande quantité de nisine induit une organisation complètement en phase H_{II} pour $T \geq 2^{\circ} \text{C}$. L'évolution de la phase non lamellaire en présence de la nisine est comparée à celle du lipide pur (figure 3.14). L'effet de la nisine sur la DOPE est de favoriser la phase H_{II} car à une température donnée, ce peptide augmente le pourcentage de la phase hexagonale. De plus, la transition lamellaire- H_{II} semble moins coopérative et son point milieu est déplacé vers les basses températures par rapport au lipide pur. Ces résultats montrent clairement que la nisine affecte fortement le macroassemblage de la DOPE en induisant la formation de la phase hexagonale.

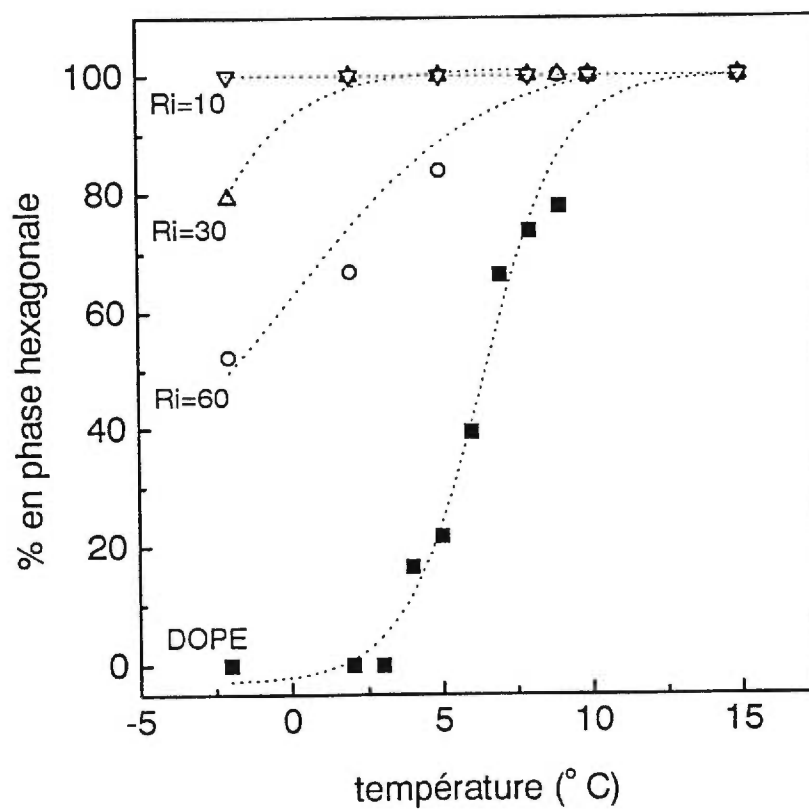


Figure 3.14 Variation du pourcentage de la phase hexagonale de la DOPE en absence et en présence de la nisine, en fonction de la température et à différents Ri.

3.5.1.2 Promotion de la phase cubique dans les membranes de POPE

Nous avons étudié par spectroscopie infrarouge le polymorphisme de la POPE pure et du complexe POPE/nisine Ri=10 (figure 3.15). Pour le lipide pur, à des températures inférieures à 25° C, la bande d'élongation symétrique ν_{C-H} est à 2851,5 cm^{-1} , une valeur typique de la phase gel (Mantsch et McElhaney, 1991). La T_m de la POPE pure observée à 25° C par une augmentation soudaine de la fréquence du mode d'élongation symétrique ν_{C-H} d'environ 2 cm^{-1} est en accord avec la littérature (Epanand et Bottega, 1987; Paré et Lafleur, 1998). Les valeurs de fréquence de ν_{C-H} de 2854 cm^{-1} sont d'ailleurs typiques de la phase fluide. Une deuxième transition est observée vers 70° C correspondant au passage du lipide de la phase liquide cristalline à la phase hexagonale (Epanand et Bottega, 1987; Paré et Lafleur, 1998). On remarque que l'amplitude de cette transition est plus petite par rapport à celle de la transition gel \leftrightarrow liquide cristalline. Ceci s'explique par le fait que l'ordre des chaînes acyle est moins perturbé durant cette transition (Mantsch et coll., 1981). L'ajout de la nisine à un Ri égal à 10 ne semble pas affecter considérablement l'ordre des chaînes acyle du lipide que ce soit en phase gel ou en phase liquide cristalline, ni la transition gel-liquide cristalline des lipides. Cependant, la nisine perturbe la transition lamellaire-hexagonale. Cette transition devient moins coopérative, et elle est déplacée vers les basses températures. Ces résultats établissent que la transition impliquant un changement au niveau de la courbure du film lipidique est beaucoup plus sensible

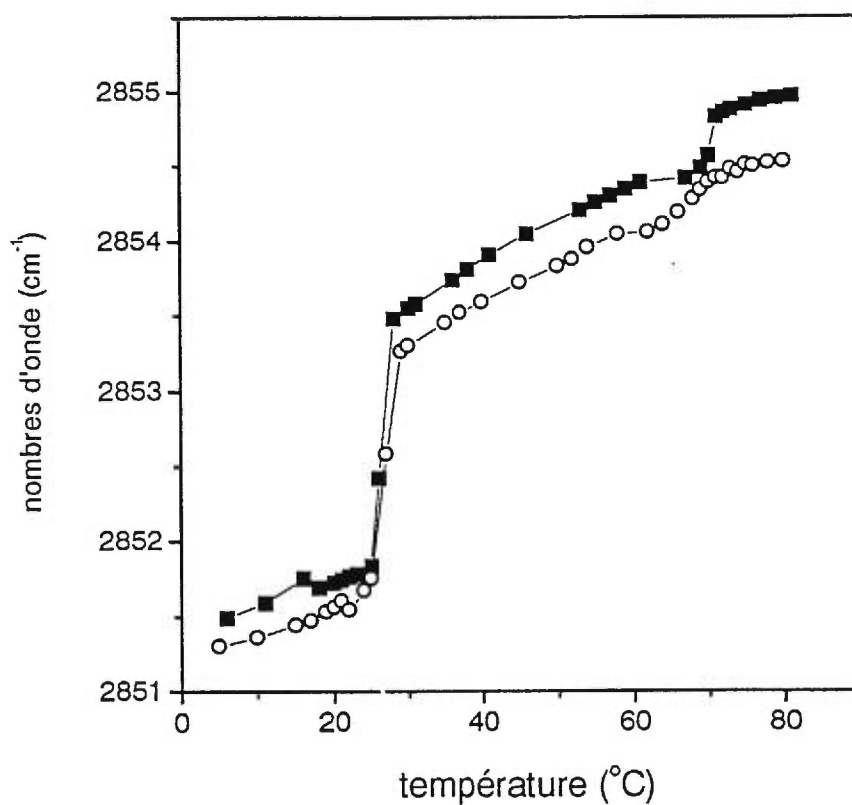


Figure 3.15 Effet de la température sur la fréquence du mode d'élongation symétrique des méthylènes de la POPE pure (■) et du complexe POPE/nisine $R_i = 10$ (○).

à la présence de la nisine que celle associée à la fluidification de la membrane.

Nous avons utilisé la RMN du phosphore pour examiner les changements structuraux de la POPE induits par la nisine (figure 3.16). Pour la POPE pure, à des températures inférieures à 65° C, la forme du spectre montre que le lipide est en phase cristal liquide avec une anisotropie du déplacement chimique d'environ 41 ppm. À 70 et 75° C, le spectre est caractéristique de la phase hexagonale. Ceci est en accord avec la transition lamellaire-hexagonale observée en infrarouge (figure 3.15) ainsi que la littérature (Paré et Lafleur, 1998). Le refroidissement du lipide à 29° C mène à un spectre caractéristique de la phase lamellaire, indiquant la réversibilité de la transition. Quand on ajoute la nisine à la POPE à un R_i égal à 10, on n'observe aucun effet notable du peptide sur le lipide à 29° C. À 60° C, le spectre montre qu'une portion du lipide subit un mouvement isotrope à cause de la raie fine observée à 0 ppm. La contribution de cette raie augmente avec l'augmentation de la température pour atteindre 46% du signal total à 65° C. À 70 et à 75° C, on remarque l'apparition du signal typique de la phase hexagonale qui coexiste avec la phase isotrope dans des proportions similaires. La transition lamellaire- H_{II} n'est plus réversible. Le refroidissement de l'échantillon à 29° C montre que la contribution de la raie est augmentée davantage. La presque totalité du lipide adopte une structure où les mouvements moyennent les interactions responsables de l'anisotropie du déplacement chimique. Quand l'échantillon est refroidi à 20° C ($T < T_m$), on remarque la disparition totale de la raie isotrope et le

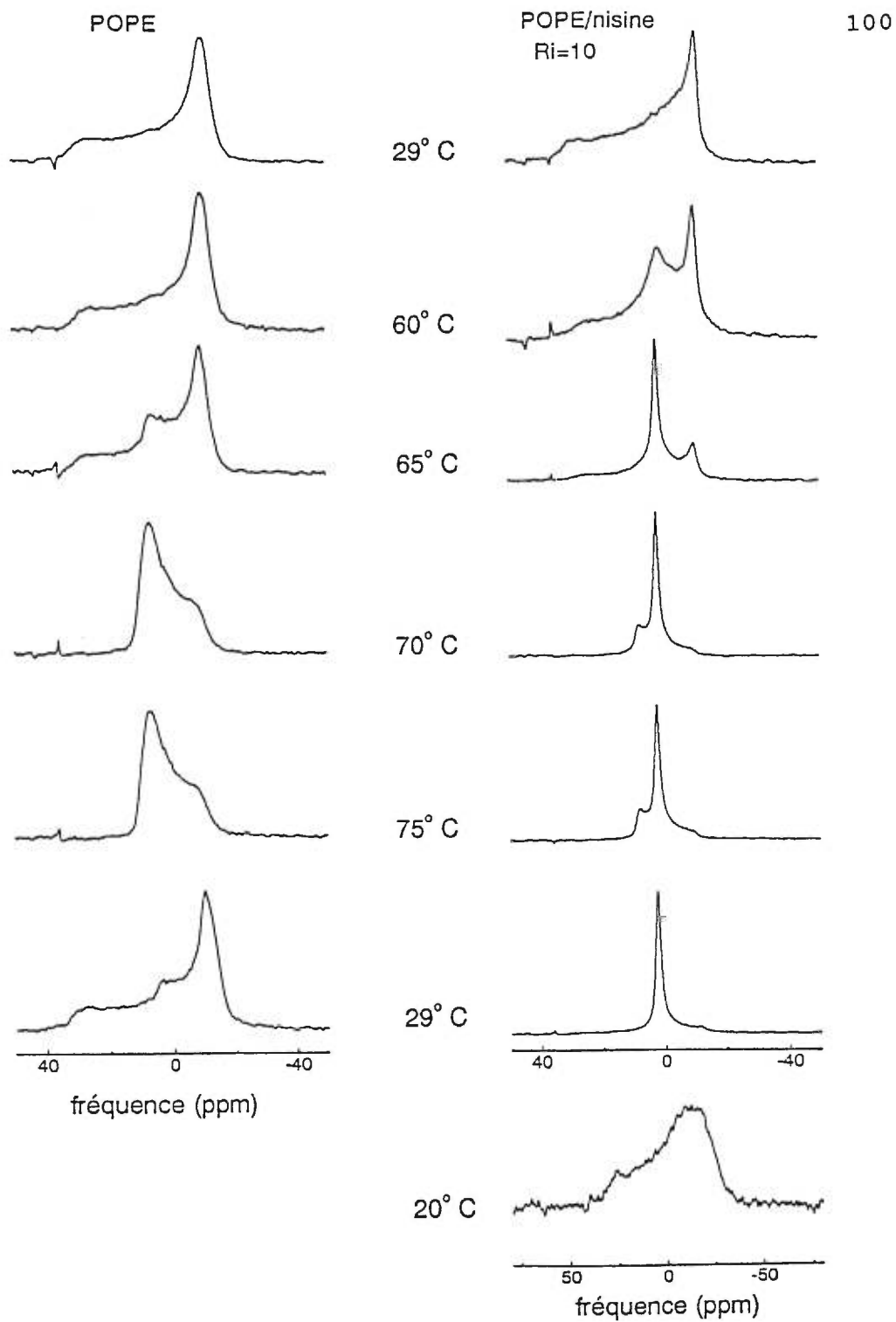


Figure 3.16 Spectres RMN du phosphore de la POPE pure et du complexe POPE/nisine Ri=10, à différentes températures. On note que l'échelle du spectre à 20° C est différente des autres.

spectre correspond à celui d'un lipide en phase gel, avec un $\Delta\sigma$ d'environ 50 ppm.

Des études ont montré qu'on peut, dans certains types de phosphatidyléthanolamines insaturées comme la DEPE (diélaïdoylphosphatidyléthanolamine) et la DOPE, induire la formation de phase cubique en faisant subir à l'échantillon plusieurs cycles de chauffage entre la phase lamellaire et la phase hexagonale (Veiro et coll., 1990; Shyamsunder et coll., 1988). Nous avons fait subir à la POPE une série de 6 cycles de chauffage entre 60 et 75° C en absence et en présence de la nisine. La figure 3.17 montre les spectres obtenus à 60° C durant cette expérience. On observe l'augmentation de l'intensité relative du signal isotrope en fonction du nombre de cycles. Ce comportement est similaire à celui observé dans le cas de la DEPE et la DOPE (Veiro et coll., 1990; Shyamsunder et coll., 1988). Dans ces cas, la raie isotrope a été attribuée à l'adoption par le lipide d'une phase cubique tel qu'établi par diffraction des rayons X (Shyamsunder et coll., 1988; Keller et coll., 1996). Il est raisonnable de faire la même attribution pour notre système qui est similaire à ces derniers. En comparant la tendance des deux lipides DOPE et POPE à former des phases cubiques, il semble que la POPE a une plus grande tendance à adopter une structure cubique que la DOPE si l'on se fie à l'étude qui rapporte que des milliers de cycles sont nécessaires pour observer un signal distinct en diffraction des rayons X (Shyamsunder et coll., 1988).

Nous avons fait subir la même série de chauffage au complexe POPE/nisine.

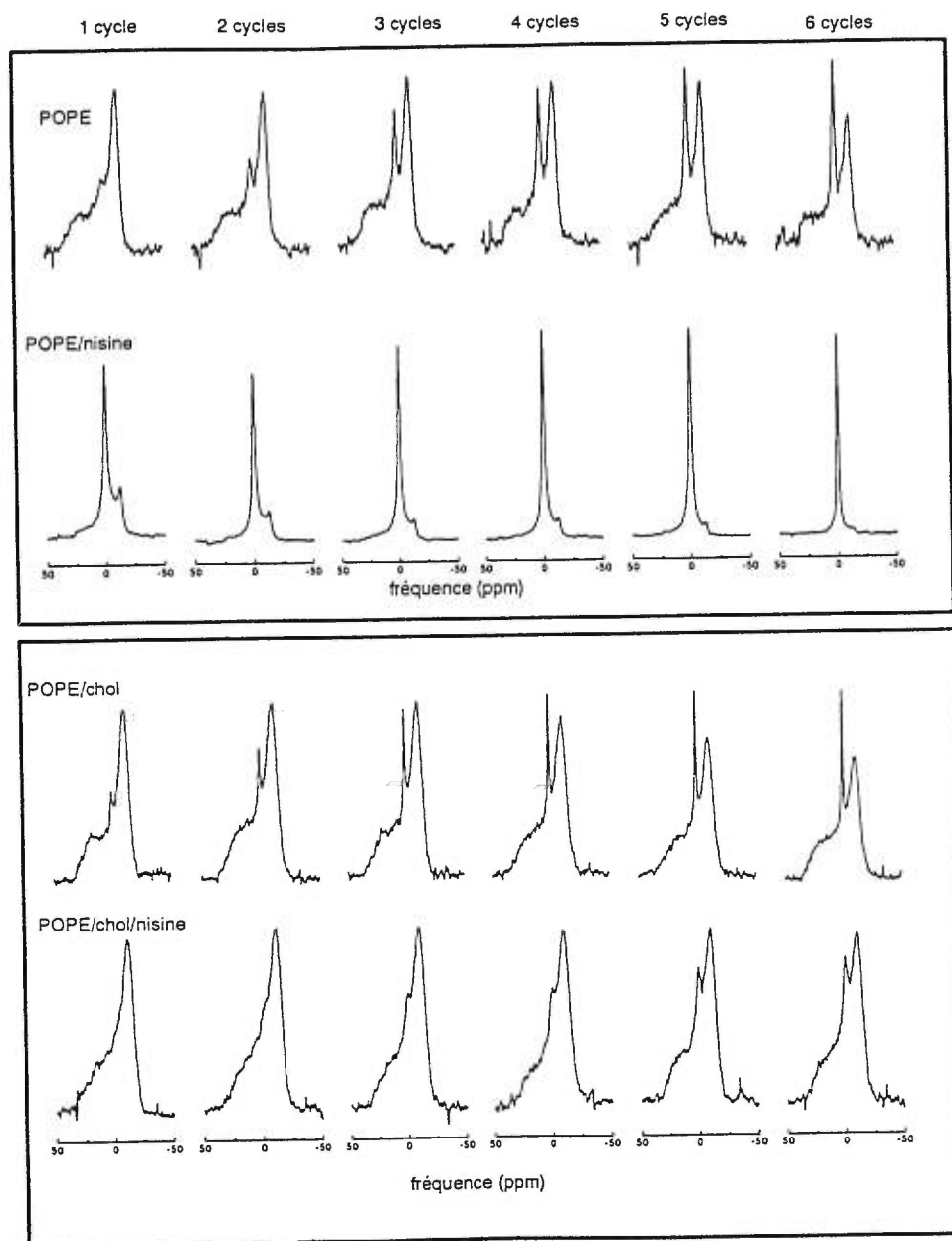


Figure 3.17 Spectres RMN du phosphore de la POPE et de POPE/nisine $R_i=10$, à 60°C (encadré en haut) et de POPE/30 mol% chol et POPE/30 mol% chol/nisine $R_i=10$ à 50°C (encadré en bas), après un nombre varié de cycles de chauffage de part et d'autre la température de transition de phase lamellaire-hexagonale.

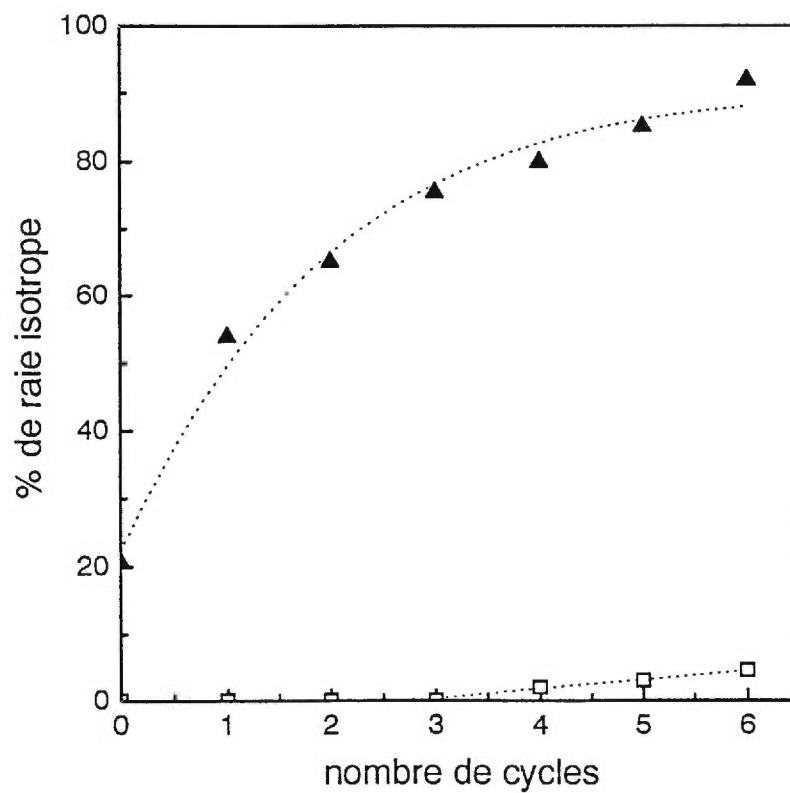


Figure 3.18 Le pourcentage de la raie isotrope en fonction du nombre de cycles de chauffage de part et d'autre la température de transition de phase lamellaire-hexagonale, pour les échantillons de POPE (\square) et de POPE/nisine $R_i=10$ (\blacktriangle).

Au premier cycle de chauffage, on remarque une importante proportion de la raie isotrope. Au fur et à mesure que le nombre de cycles augmente, l'aire relative de la raie augmente de plus en plus. L'évolution de l'intensité relative de la phase isotrope en fonction du nombre de cycle est montrée à la figure 3.18. Après six cycles de chauffage entre 60 et 75° C, la presque totalité du lipide donne lieu à un signal isotrope en présence de la nisine, tandis qu'en absence de ce peptide, la raie représente moins que 10% du spectre total. Cette raie est observée tant que la température de l'échantillon est maintenue en haut de la T_m de la POPE ($T_m=25^\circ$ C).

3.5.1.3 Effet du cholestérol sur les complexes POPE/nisine

Nous allons examiner maintenant l'influence du cholestérol sur le polymorphisme des complexes nisine/POPE. Le cholestérol est connu pour faire la promotion des phases H_{II} dans la POPE (Erand et Bottega, 1987; Paré et Lafleur, 1998). Nous désirons déterminer si ce stérol amplifie la tendance à former des phases non-lamellaires qu'induit la nisine ou si, au contraire, le cholestérol inhibe les changements apportés par la nisine sur la POPE, de manière similaire à ce qui a été observé pour les perturbations induites sur la DPPC.

Nous avons suivi le polymorphisme de POPE/30 mol% chol en absence et en présence de la nisine (figure 3.19). Pour le mélange POPE/30 mol% chol, on observe d'abord l'abolition de la transition gel-liquide cristalline. En effet, à ce pourcentage

en cholestérol, le lipide est en phase liquide ordonnée (Paré et Lafleur, 1998). Ensuite, on remarque que le cholestérol favorise la formation de la phase hexagonale. Ceci se traduit principalement par la diminution de la T_h qui passe de 70° C pour la POPE pure à 58° C lorsqu'elle contient 30 mol% de cholestérol, en accord avec la littérature (Epanand et Bottega, 1978; Paré et Lafleur, 1998). L'ajout de la nisine à un R_i égal à 10 semble avoir peu d'effet sur le mélange POPE/30 mol% chol, et ce, sur tout l'intervalle de température. On remarque également que la transition lamellaire- H_{II} est toujours coopérative et semble être peu influencée par la présence du peptide.

Finalement, nous avons examiné la formation de la phase cubique en présence du cholestérol. La T_h du mélange POPE/30 mol% cholestérol est à 58° C. Nous avons fait subir à ce mélange une série de 6 cycles de chauffage entre 50 et 65° C, puis enregistré les spectres à 50° C (figure 3.17). Tout comme la POPE pure, le signal isotrope augmente légèrement avec le nombre de cycles pour atteindre un peu moins que 10% après 6 cycles. La présence du cholestérol dans les membranes de POPE semble donc avoir peu d'effet sur la formation de la phase donnant lieu à la raie isotrope. La nisine affecte peu ce comportement. Après six cycles de chauffage, le signal isotrope représente à peu près 3 % du spectre total. La présence du cholestérol empêche la nisine d'induire la formation de phase cubique dans les membranes de POPE.

3.5.2 Discussion

Les résultats que nous venons d'exposer révèlent que la nisine fait la promotion des phases non-lamellaires dans les systèmes PE. D'abord, la nisine induit la formation de la phase hexagonale pour la DOPE, même à des concentrations en nisine relativement faibles ($R_i = 60$). Cette induction est d'autant plus importante que la quantité de la nisine augmente. Deuxièmement, ce peptide affecte la transition lamellaire- H_{II} de la POPE. D'une part, la nisine déplace légèrement cette transition vers les basses températures. D'autre part, le peptide favorise la formation d'une phase donnant lieu à un signal isotrope dans le spectre de RMN du ^{31}P . Tel que discuté au premier chapitre, plusieurs structures sont capables de donner lieu à une raie isotrope: ces structures incluent les petites vésicules (Nayar et coll., 1982), les particules lipidiques en micelles inversées (Verkleij et coll., 1979) ou les structures en phase cubique (Eriksson et coll., 1985). Les complexes POPE/nisine donnent lieu à une raie qui a les caractéristiques suivantes: l'intensité de la composante isotrope augmente avec le nombre de cycles de chauffage que subit l'échantillon de part et d'autre de la T_h , et cette phase disparaît complètement lorsque l'échantillon est refroidi à une température inférieure à la T_m pour donner lieu à un spectre typique de la phase gel d'un échantillon fraîchement préparé n'ayant jamais subi de cycles de chauffage. Ces propriétés sont les caractéristiques d'une phase cubique (Shyamsunder et coll., 1988; Veiro et coll., 1990). Nous proposons donc que la nisine induit donc la formation de la phase cubique dans les membranes de POPE.

La nisine est donc un peptide qui favorise la formation de phases non-lamellaires dans les PE insaturées. Au moins deux hypothèses peuvent être émises pour rationaliser ce phénomène. Premièrement, la nisine pourrait insérer son importante partie hydrophobe dans les membranes. Ceci mènerait à une augmentation importante de la contribution hydrophobe à la balance amphiphile et donc, à la tendance à former des phases non-lamellaires inversées (cubique, H_{II}). Ceci est supporté par une étude de fluorescence (Martin et coll., 1996) faite sur un analogue de la nisine, la (W30)nisine. Les auteurs ont montré que la localisation moyenne du tryptophane, qui remplace l'acide aminé Ile à la position 30 de la nisine, est près du centre de la bicouche dans les membranes lipidiques de PE d'oeuf/PC d'oeuf. Cette insertion est favorisée thermodynamiquement puisqu'elle élimine beaucoup de contacts hydrophobes défavorables. Tel que le montre la figure 1.2 du chapitre I, le segment 1-19 de la nisine est essentiellement hydrophobe, si on exclut la lysine de la position 12. À cause des groupements méthylène, la partie chargée de cette lysine pourrait éventuellement émerger en contact avec le milieu aqueux même si le peptide est inséré dans la membrane. Cet effet dit de "snorkel" a été proposé pour des peptides amphiphiles lors de leur insertion dans la membrane lipidique (Segrest et coll., 1990). L'insertion du peptide dans la matrice lipidique conduisant à l'induction de la phase H_{II} a déjà été proposée pour la mélittine dans les membranes de cardiolipine (Batenburg et coll., 1987). Il a été également montré que l'insertion de la cardiotoxine dans les membranes de cardiolipine provoque une augmentation de l'aire hydrophobe de la bicouche, ce qui conduit à la formation de

la phase inverse (Batenburg et De Kruijff, 1988). Des molécules non polaires telles la flunarizine (Thomas et Verkleij, 1990) ou le squalène (Lohner et coll., 1993) favorisent aussi les phases non-lamellaires. Ces substances semblent se retrouver dans le coeur hydrophobe de la membrane.

L'induction de phases non-lamellaires pourrait également être due à la déshydratation des têtes polaires du lipide provoquée par la nisine. Ceci diminuerait l'aire interfaciale effective des lipides favorisant ainsi l'adoption de structures non-lamellaires. Il a été montré, par exemple, que la déshydratation favorise la formation de la phase cubique dans les mélanges DOPC/alcanes (Sjölund et coll., 1987) et de la phase hexagonale dans les phosphatidyléthanolamines (Seddon et coll., 1984). Cependant, l'analyse des bandes d'élongation des carbonyles, par spectroscopie infrarouge, montre qu'il n'y a pas de différence quant à la fraction de carbonyle participant à des liaisons hydrogène entre la POPE et le complexe POPE/nisine. La déshydratation en présence de la nisine est donc très peu probable.

Dans un deuxième volet, nos résultats montrent que la présence du cholestérol dans les membranes de POPE inhibe la formation de phase non-lamellaire par la nisine sur ce type de membranes. En effet, même si le cholestérol favorise la formation de la phase hexagonale dans les membranes de POPE (Paré et Lafleur, 1998), il stabilise la phase lamellaire en présence de la nisine. Cet effet protecteur est comparable à celui observé dans le cas des membranes de phosphatidylcholines.

Il semble que, de manière générale, la phase I_o induite par le cholestérol diminue l'affinité des peptides pour les membranes, et ce phénomène pourrait être à l'origine de l'inhibition de la formation de la phase cubique pour POPE.

En conclusion, ces résultats montrent pour la première fois que la nisine affecte le macroassemblage des PE en induisant la formation de phases non-lamellaires (cubique ou hexagonale). Dans les membranes biologiques, les phospholipides sont organisés sous forme de bicouche. La déstabilisation de la structure lamellaire par la nisine tel que démontrée dans ce travail, constitue une piste pour déterminer le mécanisme de son action contre les bactéries dont la membrane cellulaire de certaines d'entre elles est principalement formée de phosphatidyléthanolamines (O'Leary et Wilkinson, 1988).

3.3. Discussion générale

Le but de ce travail est de mettre en évidence les effets de la nisine sur les membranes modèles de phospholipides afin de mieux comprendre son mode d'action. Les résultats montrent que la nisine perturbe ces membranes lipidiques. Ces interactions se manifestent d'abord par la perturbation de la perméabilité de la membrane comme l'ont montré les expériences de relargage. De plus, à fortes concentrations ($R_i=5$), la nisine détruit la structure en bicouche lipidique tel que le

montrent les résultats RMN et la cryo-microscopie électronique. L'effet de la nisine sur l'organisation macroscopique de la DPPC se manifeste par la formation d'agrégats où les lipides semblent graviter autour des régions riches en nisine. Dans la classe des phosphatidyléthanolamines, elle favorise la formation de structures lipidiques non- lamellaires inverses, en particulier la promotion de la phase hexagonale dans les membranes de DOPE et de la phase cubique dans les membranes de POPE. Ce changement de polymorphisme des PE ne semble pas être directement associé aux changements de perméabilité car PE stimule peu le relargage induit par la nisine (García Garcerá et coll., 1993; Giffard et coll., 1997). Des travaux (Märki et coll., 1991) ont montré que des lantibiotiques comme la duramycine et Ro090198 interagissaient de manière spécifique avec les PE. Ces interactions conduisent à l'agrégation des vésicules lipidiques de PE insaturées. Il est possible que la propriété d'encourager les interactions entre les vésicules (ce qui conduit même dans le cas de la nisine à une restructuration drastique de l'édifice lipidique, comme nous venons de montrer) soit commune à cette classe d'agents antimicrobiens.

La présence du cholestérol, aussi bien dans les membranes de PC que dans celles de PE, inhibe fortement l'action de la nisine et préserve la structure en bicouche des membranes. Des expériences ont montré que ni l'érythrocyte humain ni celui du mouton ne sont hémolysés par la nisine (Kordel et Sahl, 1986). Comme la membrane d'érythrocyte humain contient 25% de cholestérol et peu de charges négatives (Gennis, 1989), il est très possible que la composition lipidique de leur

membrane joue un rôle dans cette protection. Nous avons montré auparavant par des expériences d'affinité, que la liaison entre la nisine et les membranes lipidiques dépend de la présence des charges négatives à la surface de la bicouche, les interactions hydrophobes jouant un rôle secondaire (El Jastimi et Lafleur, 1997). Les expériences de relargage montrent le rôle important des interactions électrostatique dans ce phénomène.

CHAPITRE IV

MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE À DOUBLE SONDES POUR MONTRER LE CIBLAGE DES LIPIDES PAR DES AGENTS PERTURBATEURS

4.1 Introduction

Plusieurs processus biologiques impliquent des interactions entre une protéine ou un peptide et une membrane spécifique. Il a été suggéré que, dans certains cas, la composition lipidique des membranes est associée à cette spécificité. Par exemple, l'action *in vitro* de certains agents antibiotiques comme la nisine (García Garcerá et al., 1993), de certaines toxines comme le staphylocoque aureus (Tomita et al., 1992) et la mélittine (Benachir et Lafleur, 1995; Benachir et al., 1997) dépend de la composition lipidique de la membrane. La même dépendance a été proposée pour les peptides signaux de certaines protéines de mitochondrie. Par exemple, l'affinité du peptide signal d'ornithine transcarbamylase pour la membrane ainsi que les changements structuraux associés à ces interactions dépendent de la nature des lipides constituant la membrane (Myers et al., 1987; Epanand et al., 1986). Dans les systèmes modèles, Chonn et al. (1991) ont montré que l'affinité des protéines du système complément peut être modulée par la composition lipidique.

Pour mieux comprendre l'origine de l'insertion sélective ou préférentielle de peptide dans les membranes, plusieurs études ont été effectuées pour caractériser l'influence d'agents qui s'associent aux membranes sur la perméabilité de celles-ci, et comment cette influence est modulée par la composition lipidique (Torchilin et coll., 1992; Benachir et coll., 1997 pour ne citer que deux exemples). La technique commune qui caractérise la perméabilité des membranes est la technique où on suit le relargage d'une sonde fluorescente telle qu'utilisée au chapitre III. Cette méthode permet la caractérisation des fuites d'un seul type de vésicule. Pour mettre en évidence un relargage préférentiel ou spécifique, il est nécessaire de comparer les courbes de relargage des vésicules de différentes compositions obtenues à partir de différentes expériences. Jusqu'à maintenant, il n'y a aucune technique de fluorescence qui permet de caractériser de façon simultanée et indépendante le relargage de sonde de deux populations différentes de vésicules qui coexistent dans le même milieu. Une telle technique serait une méthode qui permettrait de mettre en évidence la perturbation sélective de la perméabilité des membranes.

Dans ce chapitre, nous présentons une nouvelle méthode qui permet d'étudier le relargage sélectif induit par un agent perturbateur quand deux populations de vésicules de différentes compositions sont présentes simultanément en solution. Cette méthode est basée sur l'utilisation de deux sondes fluorescentes pour lesquelles le relargage peut être suivi de façon indépendante. Ceci implique que les deux sondes possèdent les propriétés d'auto-extinction de fluorescence, peuvent être encapsulées

dans les liposomes, sont relarguées de manière similaire des vésicules, et que leur signal de fluorescence respectif peut être distingué. De plus, aucune interaction physique ou chimique ne doit avoir lieu entre les deux sondes. Étant donné tous ces prérequis, très peu de couples de sondes peuvent remplir toutes ces conditions. Nous avons identifié la calcéïne et la sulforhodamine B (SRB) comme étant un couple de sondes adéquat, et nous rapportons dans ce chapitre leurs propriétés. Les deux sondes ont déjà été utilisées, de manière individuelle, dans des études de relargage (Allen, 1984; Torchilin et al., 1992; Frost et al., 1994). Nous avons découvert qu'elles peuvent être excitées simultanément et leur émission donne lieu à des signaux qui peuvent être distingués l'un de l'autre. Il est donc possible de mesurer le relargage des deux sondes de façon individuelle en mesurant leur intensité de fluorescence respective à deux longueurs d'ondes différentes, en utilisant un fluorimètre possédant une géométrie en T. Cette méthode à double sondes est une approche originale, rapide et directe pour caractériser le relargage compétitif et le ciblage. Des exemples d'applications utilisant la mélittine et le Triton seront présentés. Cette méthode sera finalement utilisée pour l'étude du ciblage par la nisine.

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1 Matériel

La SRB a été achetée de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, EU) et est utilisée sans purification supplémentaire. La mélittine a été purifiée du venin d'abeille (Sigma) par chromatographie échangeuse d'ion (Lafleur et al., 1987). L'origine des autres produits est mentionnée à la section 3.2.1.

4.2.2 Préparation des vésicules

Les mélanges de lipides sont préparés de la même façon qu'au chapitre III. Pour hydrater les lipides, on utilise un tampon 30 mM NaCl, 50 mM MES, 5 mM EDTA ajusté au pH 6 avec NaOH 5 N contenant 80 mM de sondes fluorescentes calcéine et/ou SRB. La préparation de vésicules unilamellaires encapsulant la calcéine ou SRB est identique à celle utilisée au chapitre III.

Quand les deux sondes sont encapsulées dans une même vésicule, le tampon isotonique utilisé était 260 mM NaCl, 50 mM MES, 5 mM EDTA ajusté à pH 6 avec NaOH 5N. Les expériences de relargage ainsi que les mesures d'efficacité de l'intensité de fluorescence sont effectuées de la même façon qu'au chapitre III. La concentration totale en phospholipides utilisée est de 11 μM .

4.2.3 *Méthode spectroscopique*

Les mesures de fluorescence sont effectuées sur le même appareil que celui décrit au chapitre III. Ce fluorimètre possède une géométrie en T qui nous permet de mesurer simultanément l'intensité de fluorescence à deux longueurs d'onde différentes, utilisant deux systèmes de détection indépendants. Un côté a été trouvé légèrement plus lumineux que l'autre (environ 10 %), et une correction appropriée a été systématiquement effectuée. Le spectromètre est équipé d'un agitateur magnétique. Les expériences ont été effectuées à température ambiante.

4.3 **Résultats et Discussion**

Pour suivre le relargage simultané de la calcéine et de la SRB, les deux sondes doivent être excitées à la même longueur d'onde, tandis que leur fluorescence doit être séparée. Les spectres d'excitation et d'émission normalisés de la calcéine et de la SRB sont montrés à la figure 4.1. On peut voir que les spectres d'excitation des deux sondes se recouvrent dans la région 495 et 520 nm, ce qui constitue une fenêtre pour les exciter simultanément. Pour différencier spectroscopiquement les deux colorants, ceux-ci doivent avoir des spectres d'émission séparés. La figure 4.1 montre que les maximums de leurs spectres de fluorescence sont séparés par environ 75 nm. En se basant sur ces caractéristiques spectrales, nous avons établi un compromis pour

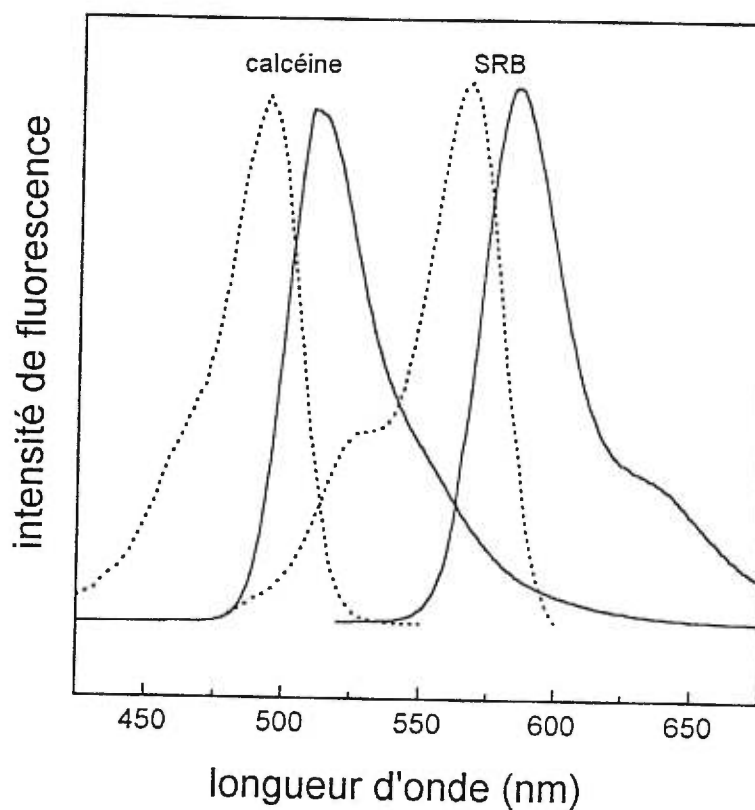


Figure 4.1 Spectres d'excitation et d'émission normalisés de la calcéine et de la SRB en solution aqueuse (pH6). Pour les spectres d'excitation, la longueur d'onde d'émission est 513 nm pour la calcéine et 583 nm pour la SRB. La calcéine et la SRB sont excitées à 490 et à 567 nm respectivement. La concentration des sondes est de 1 μM .

les longueurs d'onde d'excitation et de fluorescence. L'émission représentative de la calcéine a été mesurée à 525 nm; à cette longueur d'onde, la fluorescence de la SRB est négligeable. Donc, nous avons sélectionné:

$$I_{\text{calcéine}} = I_{525 \text{ nm}} \quad (4.1)$$

Comme compromis, nous avons choisi la longueur d'onde d'excitation à 510 nm car elle permet d'exciter les deux sondes simultanément. La longueur d'onde d'émission de la SRB est choisie à 590 nm car elle correspond au maximum d'émission de la SRB et la contribution de la calcéine y est relativement faible. En fait, l'émission de la calcéine à 590 nm correspond à 8.8 % de celle à 525 nm. On peut donc isoler la contribution de la SRB:

$$I_{\text{SRB}} = I_{590 \text{ nm}} - 0.088 I_{525 \text{ nm}} \quad (4.2)$$

La calcéine et la SRB possèdent des propriétés d'auto-extinction. La figure 4.2 montre l'efficacité de l'extinction d'une série de vésicules en fonction de la concentration en calcéine ou en SRB encapsulée. L'auto-extinction de la calcéine atteint 90 % quand sa concentration est supérieure à 80 mM, en accord avec la littérature (Benachir et Lafleur, 1995). La SRB montre une plus grande efficacité de l'auto-extinction; son efficacité est environ 90 % quand sa concentration est

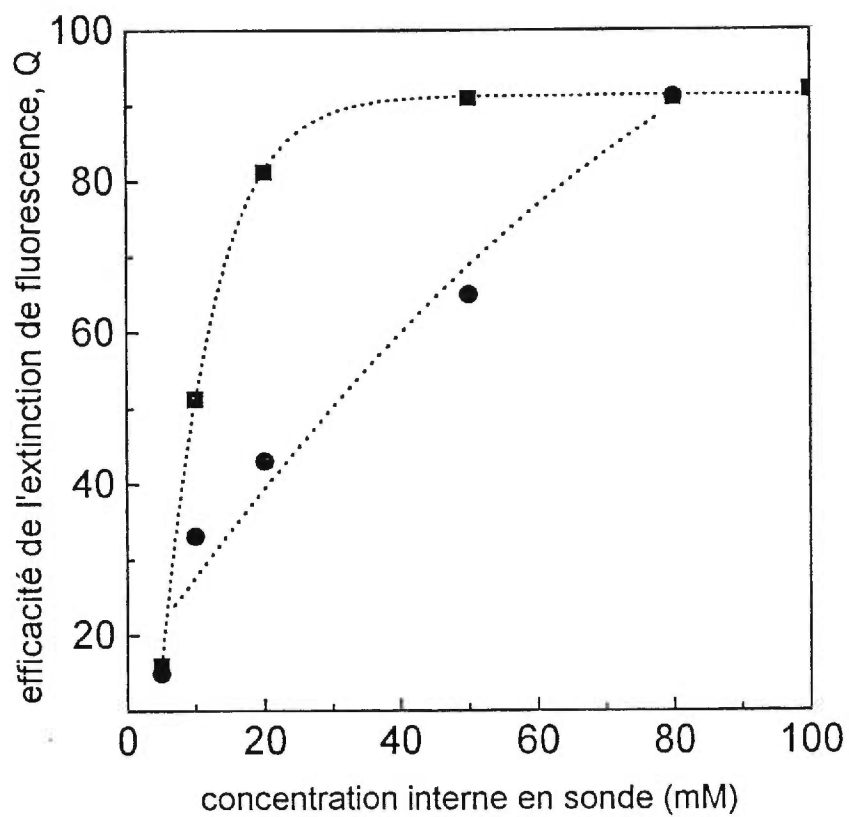


Figure 4.2 Variation de l'efficacité de l'auto-extinction de la calcéine (●) et de la SRB (■) encapsulées dans des vésicules de POPC en fonction de leur concentration interne (pH6).

supérieure à 40 mM, en accord avec la littérature (Torchilin et al., 1992). L'auto-extinction de la SRB à hautes concentrations est due à la formation de dimères non fluorescents (Chen et Knutson, 1988). Dans les expériences de relargage, nous avons utilisé une concentration interne en fluorophore de 80 mM, ce qui assure un niveau raisonnable d'auto-extinction. Il est à noter que les membranes lipidiques sont relativement imperméables à ces sondes chargées: l'efficacité de l'auto-extinction de ces sondes varie d'environ 5 % durant une période de 10 heures. Cette grande imperméabilité a déjà été rapportée dans le cas de la calcéine (Benachir et Lafleur, 1995) et de la SRB (Frost et al., 1994).

Il est important de déterminer s'il y a entre la calcéine et la SRB des interactions chimiques ou spectroscopiques (agrégation, transfert d'énergie, etc) qui pourraient induire des changements dans les caractéristiques spectrales des sondes. Des solutions aqueuses de 1 μM de calcéine et de 1 μM de SRB sont préparées séparément. Les spectres d'émission de ces sondes, libres en solution, sont montrés à la figure 4.3. Cette figure montre également le spectre d'émission obtenu d'une solution contenant la calcéine et la SRB, à une concentration de 1 μM . Ce spectre est reproduit de manière raisonnable par la somme mathématique des deux spectres d'émission des sondes individuelles, montrant ainsi l'absence des interactions significatives entre les sondes à cette concentration. Il est à noter que, dans toutes les expériences de relargage qui ont été effectuées, les concentrations en sonde dans la cuvette après la lyse totale étaient inférieures à 0.5 μM . Il est également important

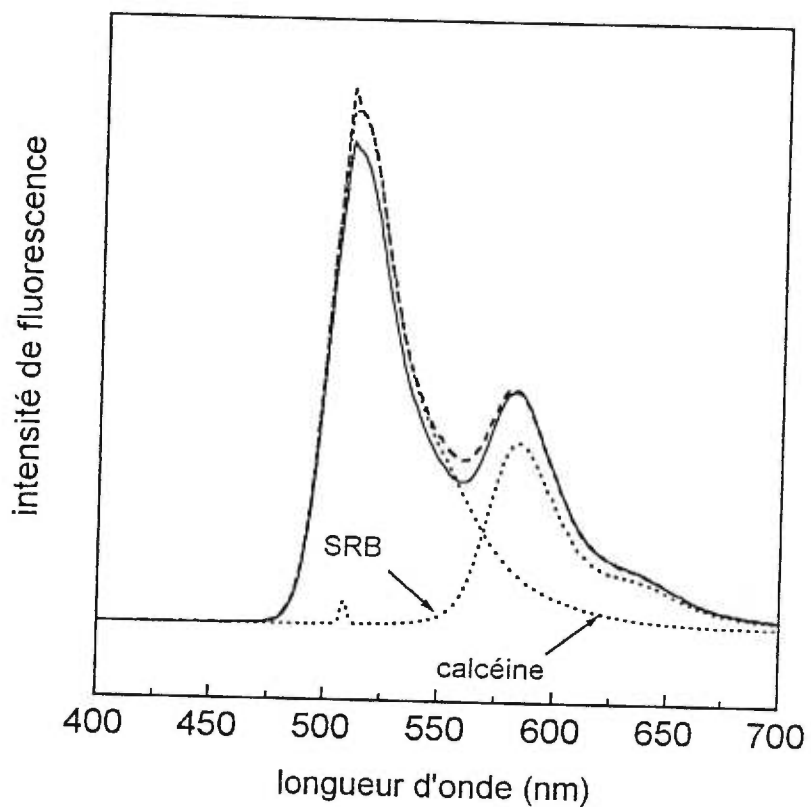


Figure 4.3 Spectres d'émission (...) de la calcéine et de la SRB en solution aqueuse, à pH 6, chacune à une concentration de $1 \mu\text{M}$. Spectre d'émission (—) de la calcéine et la SRB présentes simultanément en solution à une concentration de $1 \mu\text{M}$. La somme mathématique des deux spectres (calcéine+SRB) (---). La longueur d'onde d'excitation est de 510 nm.

de noter que les lipides (11 μM) et le Triton X-100 (0.1 vol%) ajouté pour obtenir 100% de relargage, n'affectent pas l'intensité de fluorescence des sondes à ces concentrations.

Le relargage peut également dépendre de la nature de la sonde. Par exemple, il a été montré que la taille des sondes peut affecter le relargage induit par certains peptides (Parente et coll., 1990; Rex, 1996). Pour la méthode que l'on propose dans ce chapitre, il est essentiel que les deux sondes soient relarguées des vésicules de manière similaire. Pour vérifier ce point, nous avons co-encapsulé la calcéine et la SRB dans les mêmes vésicules de POPC et examiné leur relargage individuel. La figure 4.4 montrent les courbes de relargage typiques de la calcéine (---) et la SRB (—) des vésicules de POPC auxquelles on a ajouté de la méllittine à un $R_i = 200$. Ces courbes normalisées indiquent que le relargage de la calcéine et celui de la SRB sont similaires; la lyse des vésicules contenant la calcéine et la SRB a été évaluée à 67 et 70 % respectivement. Donc, ces deux sondes montrent un relargage équivalent quand elles sont co-encapsulées dans une même vésicule.

Cette technique de deux fluorescents permet de mettre en évidence le ciblage d'un type de vésicules en caractérisant le relargage des vésicules spécifiques quand deux populations différentes de liposomes coexistent en solution. Nous avons examiné, à titre de contrôle, le relargage de la calcéine et de la SRB quand elles sont encapsulées chacune dans des vésicules différentes mais ayant la même composition

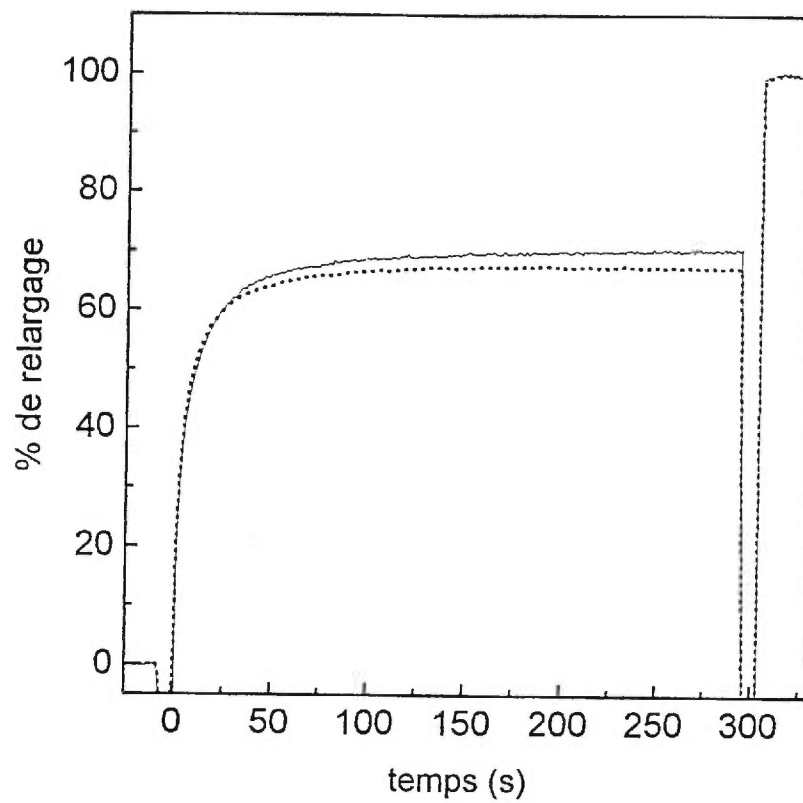


Figure 4.4 Le relargage induit par la mélittine, de la calcéine (...) et de la SRB (-) co-encapsulées dans les mêmes vésicules de POPC, à $R_i = 200$ (pH 6).

lipidique. Les vésicules de POPC encapsulant la calcéine ont été mélangées dans des proportions équimolaires avec les vésicules de POPC renfermant la SRB. Ensuite, la mélittine est ajoutée à un rapport molaire final $R_i = 126$. La figure 4.5A illustre le relargage de la calcéine (---) et de la SRB (—) induit par cette toxine. Environ 83 % de fluorophores est relargué. Un pourcentage similaire a été observé avec la calcéine pour un tel système (Portlock et coll., 1990 ; Benachir et Lafleur, 1995). Ce résultat indique que les deux sondes rapportent un relargage équivalent des vésicules de POPC. Le même comportement a été observé pour les membranes contenant du cholestérol. Il a été montré que le relargage induit par la mélittine des vésicules de phosphatidylcholine est inhibé par la présence du cholestérol dans la membrane (Benachir et coll., 1997). Ce phénomène a été associé à l'augmentation de la compacité des membranes qui contiennent du cholestérol, ce qui réduit l'affinité de la mélittine. Le relargage de la calcéine (---) et de la SRB (—) encapsulées séparément dans des vésicules de POPC/15 mol% chol est montré à la figure 4.5B. Le pourcentage de relargage, équivalent pour les deux sondes, est environ 70 %. Ces résultats montrent que la présence du cholestérol réduit le relargage induit par la mélittine tel que rapporté dans la littérature (Benachir et coll., 1997). Ils confirment également que la calcéine et la SRB sont relarguées d'une manière similaire pour une composition lipidique donnée. La figure 4.5C montre les courbes de relargage obtenues quand les deux sondes sont encapsulées dans des vésicules de composition différentes. Dans cette expérience, la calcéine et la SRB sont encapsulées dans les vésicules de POPC et POPC/15 mol% chol respectivement. Le relargage induit par la mélittine n'est pas identique pour les deux sondes: le relargage de la calcéine des

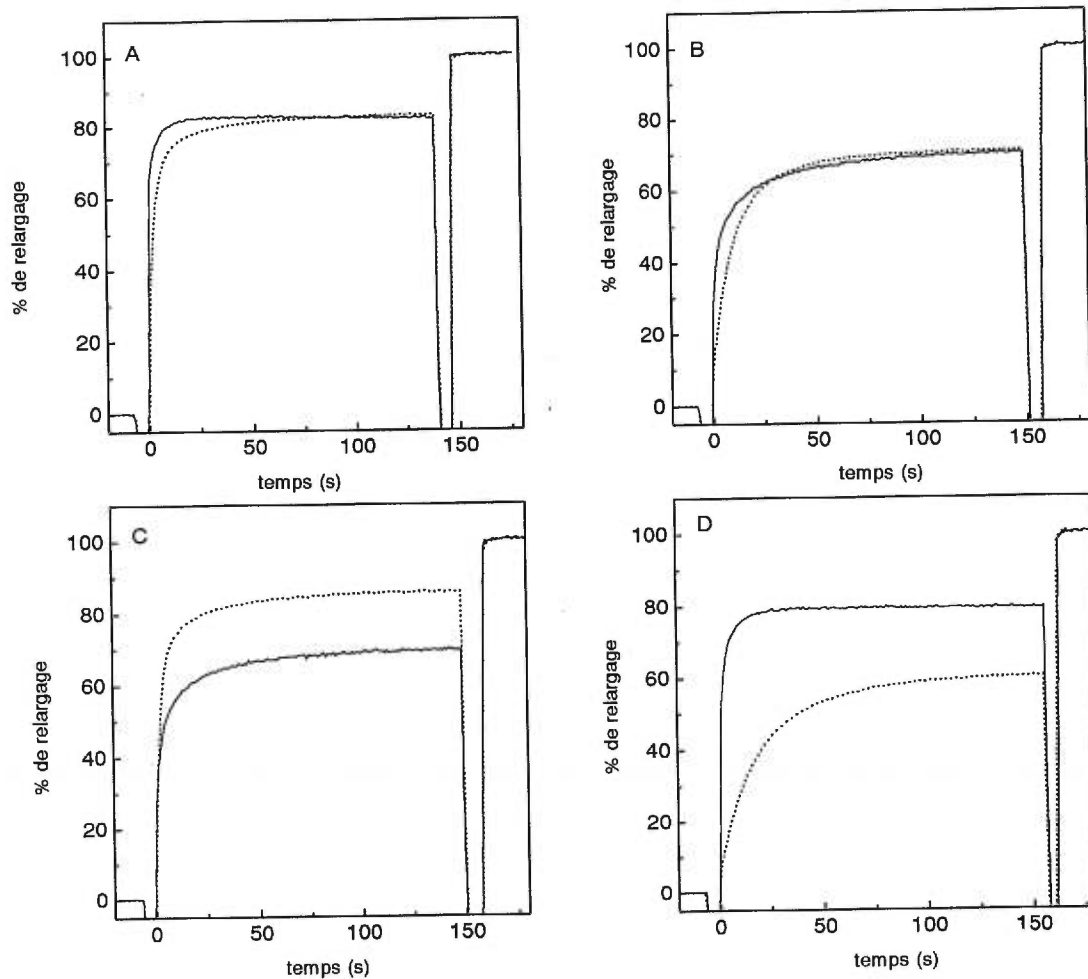


Figure 4.5 Le relargage induit par la mélittine, de la calcéine (...) et de la SRB (—) des différents systèmes de vésicules. A) Les vésicules de POPC contenant la calcéine sont mélangées avec les vésicules de POPC contenant la SRB. B) Les vésicules de POPC/15 mol% chol renfermant la calcéine sont en présence de vésicules de POPC/15 mol% chol contenant la SRB. C) Les vésicules de POPC contenant la calcéine sont mélangées avec des vésicules de POPC/15 mol% chol contenant la SRB. D) Les vésicules de POPC/15 mol% chol encapsulant la calcéine sont mélangées avec les vésicules de POPC contenant la SRB. Les deux populations de vésicules sont mélangées dans des proportions équimolaires. La mélittine est ajoutée à $Ri=126$.

vésicules de POPC est de 86% alors que celui de la SRB encapsulée dans POPC/15 mol% chol est d'environ 69%. Ces résultats obtenus à partir d'une seule expérience utilisant deux sondes montre la spécificité de la lyse induite par la mélittine relativement à la composition lipidique des vésicules. À titre de contrôle, nous avons inversé les sondes à l'intérieur des vésicules et on a encapsulé la calcéine dans les vésicules de POPC/15 mol% chol et la SRB dans les vésicules de POPC. La figure 4.5D montre le relargage obtenu pour un tel système. Les résultats mènent à la même conclusion obtenue de la figure 4.5C: les vésicules qui contiennent du cholestérol sont moins lysées en présence de la mélittine, que celles qui n'en contiennent pas. Ce contrôle reconferme que le pourcentage de relargage est indépendant de la nature de la sonde pour le couple calcéine/SRB.

Cette technique permet de caractériser le relargage compétitif entre deux populations de vésicules, une propriété que l'on ne peut pas examiner directement par une autre technique. La figure 4.6 illustre cet autre type d'information additionnelle que fournit la méthode. Les courbes de relargage obtenues à partir d'une population de vésicules de POPC ou POPC/ 30 mol% chol, en présence de la mélittine à $R_i = 54$, sont montrées à la figure 4.6A. À ce R_i , le relargage est de 100 et 78 % pour les vésicules dépourvues de cholestérol et les vésicules contenant du cholestérol respectivement. Ces valeurs sont en accord avec celles de la littérature (Benachir et coll., 1997) obtenues avec la calcéine comme sonde fluorescente. Sur la même figure, sont montrées les courbes de relargage obtenues à partir de la technique des deux sondes avec un mélange équimolaire

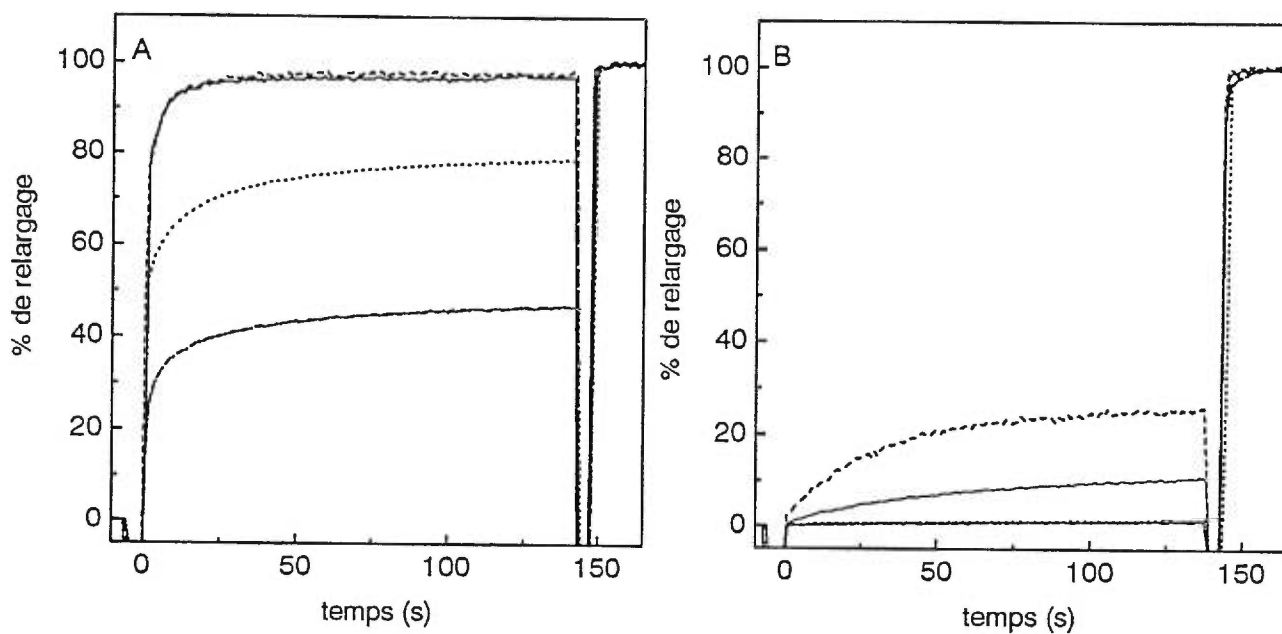


Figure 4.6 Le relargage induit par la mélistine, des vésicules de POPC (---) coexistant avec des vésicules de POPC/30 mol% chol (— · —) (pH 7,4). A) dans un rapport 1:1 à $R_i = 54$ et B) dans un rapport 4:1 (vésicules avec cholestérol : vésicules sans cholestérol) à $R_i = 819$. À titre de comparaison, le relargage induit par la mélistine d'une seule population de POPC (—) ou de POPC/30 mol% chol (...) est montré.

de POPC et POPC/30 mol% chol, utilisant la même quantité de méliittine. Dans ces conditions compétitives, il y a une diminution considérable du relargage des vésicules qui contiennent du cholestérol. Cette réduction est associée à la distribution non uniforme de la méliittine sur les vésicules due à la différence d'affinité pour les bicouches de différente composition lipidique (Benachir et coll., 1997). Il a été montré que la liaison de la méliittine aux vésicules de phosphatidylcholine est de l'ordre de ms (Sekharam et coll., 1991) et est presque irréversible (Benachir et Lafleur, 1995). En présence de deux populations, la méliittine s'associe préférentiellement avec les vésicules ne contenant pas de cholestérol. Ceci implique que la quantité de peptide disponible pour interagir avec les vésicules contenant du cholestérol diminue et par conséquent le relargage induit par la méliittine de ce type de vésicules diminue. La méthode à une sonde caractérise les perturbations de la perméabilité induit par la méliittine pour différents contenus en cholestérol. La méthode à deux sondes révèle un nouvel aspect, le relargage compétitif associé à la distribution non uniforme du peptide. Ce phénomène peut induire une diminution considérable du relargage, tel que le montre la figure 4.6A. Il peut bien sûr moduler la lyse dans l'autre sens. La figure 4.6B montre le relargage observé pour le même couple de vésicules mais dans différentes proportions (vésicules sans cholestérol: vésicules avec cholestérol 1:4) et à un R_i différent ($R_i = 819$). Étant donné la quantité limitée du peptide, les vésicules contenant du cholestérol restent pratiquement intactes. Cependant, le relargage induit des vésicules de POPC est de 10 et 26 % en absence et en présence du cholestérol, respectivement. Cette augmentation de lyse est encore une fois associée à l'interaction préférentielle de la

méllittine avec POPC. Cette nouvelle technique nous permet de conclure que la méllittine perturbe spécifiquement la perméabilité des membranes ne contenant pas de cholestérol dans un échantillon où des membranes qui contiennent du cholestérol et celles qui n'en contiennent pas coexistent. Cette conclusion a été proposée en comparant le relargage de la calcéine des vésicules dépourvues de cholestérol en absence et en présence de vésicules avec cholestérol vides (vides signifie ici qui ne contiennent pas de sonde fluorescente à l'intérieur). En plus d'être plus laborieux (deux séries d'expériences sont nécessaires, plusieurs types de vésicules doivent être préparées car les vésicules vides n'apportent aucune information), les résultats sont moins précis dû aux erreurs inhérentes à plusieurs expériences.

La figure 4.7 montre deux autres applications de la méthode à deux sondes pour des systèmes montrant des comportements extrêmes. D'abord, il a été montré que la présence d'une grande proportion de cholestérol dans les membranes de POPC peut inhiber considérablement le relargage induit par la méllittine (Benachir et coll., 1997). La figure 4.7A montre la lyse induite par la méllittine telle que mesurée par la technique à deux sondes pour les vésicules de POPC renfermant la calcéine mélangées avec des liposomes de POPC/40 mol% chol contenant la SRB. La méllittine a été ajoutée à un $R_i=52$. Dans ces conditions, la méllittine induit de manière spécifique le relargage quasi complet de sonde des vésicules de POPC tandis que les vésicules de POPC/40 mol% chol. sont restées pratiquement intactes, montrant, en une seule expérience, le ciblage par la méllittine des vésicules ne contenant pas de cholestérol.

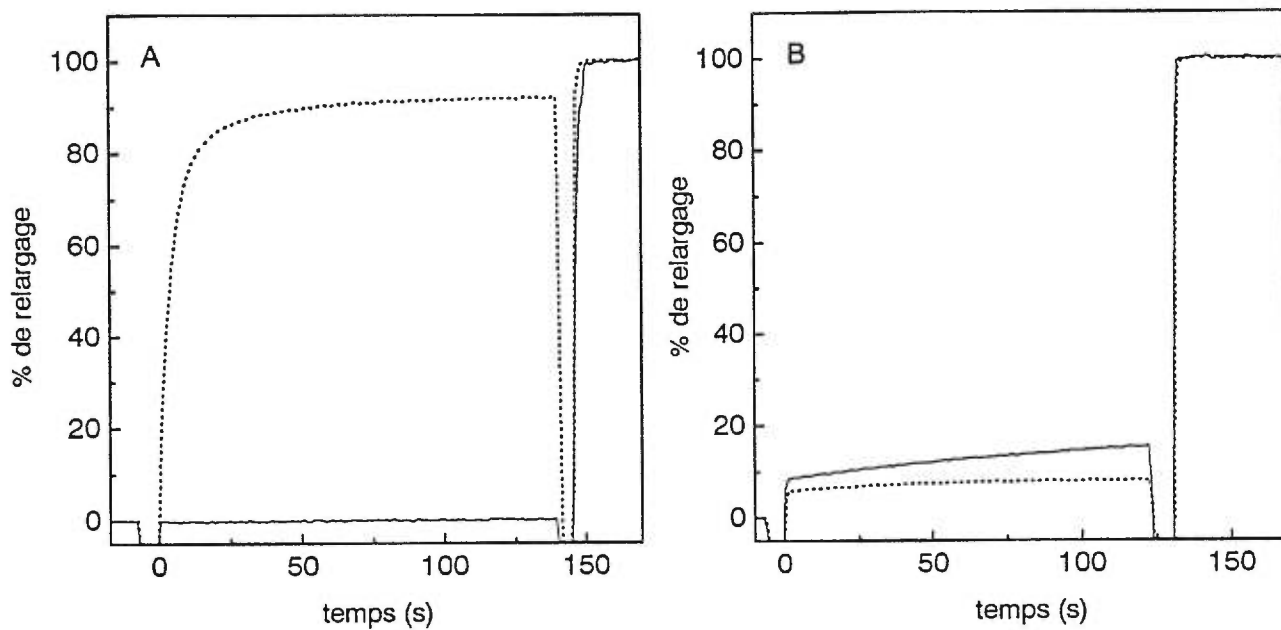


Figure 4.7 Le relargage de la calcéine (...) des vésicules de POPC et de la SRB (—) des vésicules de POPC/40 mol% chol induit par : A) la mélicitine ajoutée à un $R_i = 52$; et B) le Triton X-100 (50 μL d'une solution $\sim 2,5$ mg/mL) (pH 6).

que les vésicules de POPC/40 mol% chol. sont restées pratiquement intactes, montrant, en une seule expérience, le ciblage par la mélittine des vésicules ne contenant pas de cholestérol.

Cette technique n'est pas spécifique pour les peptides et elle peut s'appliquer également à n'importe quel agent qui perturbe la membrane. Un agent communément utilisé pour la perturbation des membranes est le Triton X-100 (Nagawa et Regen, 1991; Nagawa et Regen, 1992; Liu et Regen, 1993). Il a été montré que les perturbations du Triton X-100 sont relativement insensibles à la présence du cholestérol (Nagawa et Regen, 1991). La figure 4.7B montre le relargage induit par le Triton de la calcéine (--) dans les vésicules de POPC et de la SRB (□) des vésicules de POPC/40 mol% chol. Le pourcentage de relargage est, dans ce cas, relativement similaire; le relargage après 120 s est environ 8% et 14% pour les vésicules de POPC et POPC/chol, respectivement. Ces résultats montrent la dépendance limitée du relargage induit par le Triton sur la proportion de ce stérol dans la membrane, en accord avec des résultats antérieurs (Nagawa et Regen, 1991).

Nous avons appliqué cette méthode pour étudier la spécificité du relargage induit par la nisine. La figure 4.8 montre le relargage induit par la nisine des vésicules de POPC et POPC/30 mol% chol renfermant respectivement la SRB (•) et la calcéine (▲) qui coexistent dans le milieu. Nous remarquons que la lyse provoquée par la nisine dans les vésicules de POPC est plus importante que celle

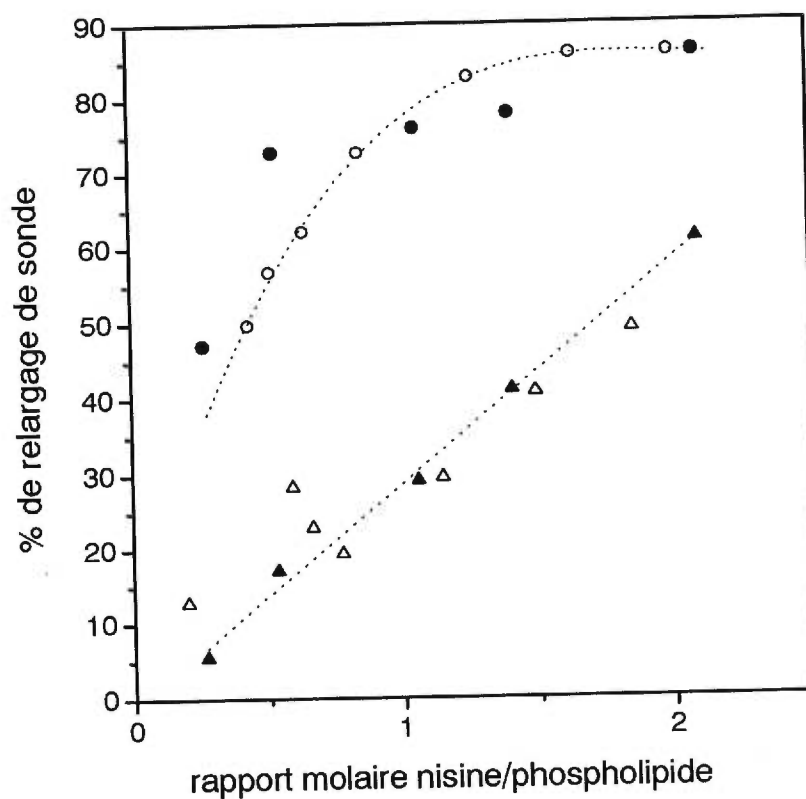


Figure 4.8 Comparaison entre la méthode à sonde unique et la méthode à deux sondes dans le cas de la nisine. Le relargage de sonde induit par la nisine des vésicules de POPC ((o) en utilisant la méthode à une seule sonde et (•) pour la méthode à deux sondes) et des liposomes de POPC/30 mol% chol ((Δ) dans le cas de la méthode à une sonde et (▲) dans le cas de deux sondes) en fonction de $1/R_i$. Pour les expériences de la méthode à deux sondes, les deux populations de vésicules étaient dans des proportions équimolaires.

induite dans les liposomes de POPC contenant 30 mol% chol. Ces résultats sont en accord avec ceux du chapitre III (section 3.3). À partir d'une seule expérience, nous montrons la spécificité de la lyse induite par la nisine. Le cholestérol protège les membranes de phosphatidylcholine contre l'effet de la nisine. Nous n'avons, cependant, pas observé de relargage compétitif entre ces deux populations: le pourcentage de relargage obtenu d'une population de POPC n'est pas affecté quand celle-ci est en présence de POPC/30 mol% chol, comparé aux vésicules de POPC seules dans le milieu. De même, les populations de POPC/30 mol% cholestérol ne sont pas moins lysées dans des conditions compétitives c'est-à-dire en présence des liposomes de POPC. Cette absence de relargage compétitif est probablement indicateur de la faible affinité de la nisine envers les membranes de POPC, ce qui laisse une quantité considérable de nisine libre en solution.

En conclusion, cette technique décrite dans ce chapitre, est un nouvel outil qui permet d'examiner la spécificité des agents perturbateurs de membrane envers la composition lipidique et permet de caractériser le relargage compétitif qui peut être parfois très différent du relargage mesuré à partir d'une seule population de vésicules. Cette approche apportera des informations importantes et nécessaires à la compréhension du ciblage dans les systèmes plus complexes et les modes d'action des agents perturbateurs. Dans le cadre plus spécifique de cette thèse, la méthode confirme l'effet protecteur du cholestérol contre l'effet de la nisine et révèle que le mécanisme de lyse ne permet pas d'obtenir un relargage compétitif.

CHAPITRE V

CONCLUSION

L'agent antibactérien nisine agit au niveau des membranes lipidiques. Il perturbe à la fois la perméabilité des membranes et leur morphologie. L'étude des interactions entre ce peptide avec les vésicules modèles de phospholipides montre que ces effets sont sensibles à la composition en lipides.

Ce travail montre donc que l'hypothèse d'un mécanisme d'action de la nisine sur la partie lipidique de la membrane est plausible. D'abord, la structure secondaire de la nisine liée aux lipides est différente de celle libre en milieu aqueux. Cette association avec les membranes fait la promotion des structures en coude β . D'autre part, nous avons montré que la nisine affecte l'intégrité des membranes lipidiques en induisant des fuites. Cet effet est particulièrement important quand la membrane est chargée négativement. Nous avons également montré que la morphologie des assemblages lipidiques de phosphatidylcholine et de phosphatidyléthanolamine est affectée par la présence de la nisine. Ce peptide induit la formation d'agrégats et la disparition des dispersions multilamellaires dans les membranes de 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine. Dans la 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine et la 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine, la nisine

favorise la formation de phases non-lamellaires hexagonale et cubique, respectivement. La présence du cholestérol a un effet protecteur contre ces réorganisations induites par la nisine.

Dans cette thèse, nous avons également présenté une nouvelle méthode de fluorescence pour mesurer de manière indépendante et simultanée le relargage de sondes à partir de deux populations de vésicules. Les résultats montrent que la distribution hétérogène de la mélittine sur des vésicules de POPC avec et sans cholestérol amène des variations dans les taux de relargage observés: il y a ciblage d'une population de vésicules, celle sans cholestérol, et relargage accru de celles-ci dans des conditions de compétition. Quant à la nisine, aucune lyse sélective n'a été observée. Effectivement, la présence ou l'absence dans le milieu de liposomes de POPC contenant du cholestérol n'affecte pas le relargage induit par la nisine dans les vésicules de POPC.

Les membranes des bactéries de *Clostridium*, pour lesquelles la nisine a un grand effet antibactérien, sont constituées essentiellement de PE et de PG, et ne contiennent pas de cholestérol (O'Leary et Wilkinson, 1988). Ce sont des conditions pour lesquelles la présente thèse suggère de grandes perturbations. La prochaine étape sera de caractériser les changements de morphologie que la nisine pourrait induire dans les membranes extraites de ce type de bactéries. D'autres organismes sont résistants à l'effet de la nisine (Jung, 1991). Il serait donc également intéressant

d'examiner les effets de la nisine sur la morphologie de leurs membranes et de vérifier si l'action de ce peptide est dépendante des paramètres tels que la proportion en PE et le degré d'insaturation des chaînes. Ces études permettraient de vérifier l'existence d'un lien entre son action antibactérienne et la composition lipidique des membranes de cellules cibles. Il est établi que la tendance à former des phases inverses non lamellaires est contrôlée dans les membranes de certains microorganismes procaryotes comme l'*Acholeplasma laidlawii* (McElhaney, 1989). Un débalancement de ce contrôle peut s'avérer fatal pour l'organisme.

RÉFÉRENCES

- Abee T, (1995) FEMS Microbiol. Lett 129, 1-10
- Allen, T.M. (1984) Dans "Liposome methodology" G. Gregoriadis, éditeur. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 177-182
- Batenburg A.M., Hibbeln J.C.L. et de Kruijff B. (1987) Biochim. Biophys. Acta 903, 155-165
- Batenburg A.M. et de Kruijff B. (1988) Biosci. Rep. 8, 299-307
- Batenburg A.M., van Esch J.H. et de Kruijff B. (1988) Biochemistry, 27, 2324-2331
- Bayerl T.M. et Bloom M. (1990) Biophys. J. 58, 357-362
- Benachir T. et Lafleur M. (1995) Biochim. Biophys. Acta 1235, 452-460
- Benachir T., Monette M., Grenier J. et Lafleur M. (1997) Eur. Biophys. J. 25, 201-210
- Bloom M. et Evans E. (1991) Dans "Biologically Inspired Physics" L. Peliti, éditeur. Plenum Press, New York, pp 137-147
- Bloom M. et Sternin E. (1987) Biochemistry 26, 466-468
- Bouchard M., Boudreau N. et Auger M. (1996) Biochim. Biophys. Acta 1282, 233-239
- Breukink E., van Kraaij C., Demel R.A., Siezen R.J., Kuipers O.P. et de Kruijff B. (1997) Biochemistry 36, 6968-6976

- Burnell E.E., Cullis P.R. et de Kruijff B. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 603, 63-69
- Byler D.M. et Susi, H. (1986) *Biopolymers* 25, 469-487
- Casal H.L., Cameron D.G., Smith I.C.P. et Mantsch H.H. (1980) *Biochemistry* 19, 444-451
- Chan W.C., Lian L.Y., Bycroft B.W., Roberts G.C.K. (1989) *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 2359-2367
- Chen R.F. et Knutson J.R. (1988) *Anal. Biochem.* 172, 61-77
- Chonn A., Cullis P.R. et Devine D.V. (1991) *J. Immunol.* 146, 4234-4241
- Cullis P.R. et de Kruijff B. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 513, 31-42
- Cullis P.R. et de Kruijff B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 559, 399-420
- Cullis P.R., Hope M.J., de Kruijff B., Verkleig A.J. et Tilcock C.P.S (1985) *phospholipids cell. Regulation* 1, 1-59
- Davis J.H. et Jeffrey K.R. (1977) *Chem. Phys. Lipids* 20, 87-90
- Davis J.H. (1979) *Biophys. J.* 27, 339-358
- Davis J.H. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 737, 117-171
- Demel R.A., Peelen T., Siezen R.J., de Kruijff B. et Kuipers O.P. (1996) *Eur. J. Biochem.* 235, 267-274
- Dico A.S., Hancock J., Morrow M.R., Stewart J., Harris S. et Keough K.M.W. (1997) *Biochemistry* 36, 4172-4177
- Dousseau F., Therrien M. et Pézolet M. (1989) *Appl. Spectrosc.* 43, 538-542

Driessen A.J.M., van den Hooden H.W., Kuiper W., van de Kamp M., Sahl H.-G.,

Konings R.N.H. et Konings W.N. (1995) *Biochemistry* 34, 1606-1614

Dufourcq J. et Faucon J-F. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 467, 1-11

Eberlyn T. (1994) Dans "Les antibiotiques. Classification, mode d'action, utilisation thérapeutique" éditions Nathan, Paris, pp 28

Eisenberg D., Weiss R.M., Terwilliger T.C. et Wilcox W. (1982) *Faraday Symp. Chem. Soc.* 17, 109-120

Elliott A. et Ambrose E.J. (1950) *Nature* 165, 921

El Jastimi R. et Lafleur M. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* 1324, 151-158

Epand R.M., Hui S.-W., Argan C., Gillespie L.L. et Shore G.C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 10017-10020

Epand R.M. et Bottega R. (1987) *Biochemistry* 26, 1820-1825

Eriksson P.O., Rilfors L., Lindblom G. et Arvidson G. (1985) *Chem. Phys. Lipids* 37, 357-371

Fiske C.H. et Subbarow Y. (1925) *J. Biol. Chem.* 66, 375-400

Fenske D.B. et Cullis P.R. (1993) *Biophys. J.* 64, 1482-1491

Frost S.J., Firth G.B. et Chakraborty J. (1994) *J. Liposome Res.* 4, 1159-1182

García Garcerá M.J., Elferink M.G.L., Driessen A.J.M. et Konings W.N. (1993) *Eur. J. Chem.* 212, 417-422

Gennis R.B. (1989) Dans "Biomembranes Molecular Structure and Function" édition Springer-Verlag, New York, pp 22-23

- Giffard C.J., Dodd H.M., Horn N., Ladha S., Mackie A.R., Parr A., Gasson M.J.
et Sanders D. (1997) *Biochemistry* 36, 3802-3810
- Haris P.I., Lee D.C. et Chapman D. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 874, 255-265
- Hollósi M., Majer Z.S., Rónal A.Z., Magyar A., Medzihradszky K., Holly S.,
Perczel A. et Fasman G.D. (1994) *Biopolymers* 34, 177-185
- Jung G. (1991) Dans "Nisin and Novel Lantibiotics" Jung G & Sahl H.G. éditeurs.
ESCOM. Leinden, pp1-34
- Keller S.L., Gruner S.M. et Gawrish K. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1278,
241-246
- Kodati, R., El Jastimi R. et Lafleur, M. (1994) *J. Phys. Chem.* 98, 12191-12197
- Kordel M. et Sahl H.G. (1986) *FEMS Microbiol. Lett.* 34, 139-144
- Kordel M., Schüller F. et Sahl H.G. (1989) *FEBS Lett.* 244, 99-102
- Lafleur M., Dasseux J.-L., Pigeon M., Dufourcq J. et Pézolet M. (1987)
Biochemistry 26, 1173-1179
- Lafleur M., Bloom M. et Cullis P.R. (1990a) *Biochem. Cell Biol.* 68, 1-8
- Lafleur M., Cullis P.R., Fine B. et Bloom M. (1990b) *Biochemistry* 29, 8325-8333
- Levin I.W. (1984) *Adv. Infrared Raman Spectrosc.* 11, 1-48
- Lian L.Y., Chan W.C., Morley S.D., Roberts G.C.K., Bycroft B.W. et Jackson D.
(1992) *Biochem. J.* 283, 413-420
- Lindblom G. et Rilfors L. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 988, 221-256
- Liu W. et Hansen N. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2551-2558
- Liu Y. et Regen S.L. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 708-713

- Lohner K., Degovics G., Laggner P., Gnamusch E. et Paltauf F. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1152, 69-77
- Luzzati V., Tardieu A., Gulik-Krzywicki T., Rivas E. et Riess-Husson F. (1968) *Nature (London)* 220, 485-488
- McElhaney R.N. (1989) *Crit. Rev. Microbiol.* 17, 1-32
- Mantsch H.H., Martin A. et Cameron D.G. (1981) *Biochemistry*, 20, 3138-3145
- Mantsch H.H. et McElhaney R. N. (1991) *Chem. Phys. Lipids* 57, 213-226
- Marieb E.N. et Laurendeau G. (1993) Dans "Anatomie et Physiologie Humaines" éditions du renouveau pédagogique Québec, pp 65
- Märki F., Hänni E., Fredenhagen A. et Oostrum J.V. (1991) *Biochem. Pharmacol.* 42, 2027-2035
- Marsh D. (1990) *Handbook of Lipid Bilayers*, CRC Press, Boca Raton, Florida
- Martin I., Ruyschaert J.-M., Sanders D. et Giffard C.J. (1996) *Eur. J. Biochem.* 239, 156-164
- Matsuzaki K., Sugishita K., Fujii N. et Miyajima K. (1995) *Biochemistry* 34, 3423-3439
- Molitor E. et Sahl H.G. (1991) Dans "Nisin and Novel Lantibiotics" Jung G & Sahl H.G. éditeurs. ESCOM Leinden, pp1-34
- Monette M. (1994) Thèse de doctorat, Département de chimie, Université de Montréal
- Monette M., Van Calsteren M.-R. et Lafleur M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1149, 319-328

- Myers M., Mayorga O. L., Emtage J. et Freire E. (1987) *Biochemistry* 26, 4309-4315
- Nagawa Y. et Regen S.L. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* 113, 7237-7240
- Nagawa Y. et Regen, S.L. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 1668-1672
- Nayar R., Schmid S.L., Hope M.J. et Cullis, P.R. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 688, 169-176
- Neidhardt F.C., Ingraham J.L. et Schaechter M. (1994) Dans "Physiologie de la cellule bactérienne. Une approche moléculaire." éditions Masson Paris, pp 34,106
- Nicol F., Nir S. et Szoka Jr.F.C. (1996) *Biophys. J.* 71, 3288-3301
- O'Leary W.M. et Wilkinson S.G. (1988) *Microbial Lipids* 1, 17-201
- Olinger J.M., Hill D.M., Jakobsen R.J. et Brody R.S. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 869, 89-98
- Ostolaza H., Bartolomé B., Ortiz de Zárate I., de la Cruz F. et Goñi F.M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1147, 81-88
- Palmer D.E., Mierke D.F., Pattaroni C., Goodman M., Wakamiya T., Fukase K., Kitazawa M., Fujita H. et Shiba T. (1989) *Biopolymers* 28, 397-408
- Paré C. et Lafleur M. (1998) *Biophys. J.* 74, 899-909
- Parente R.A., Nir S. et Szoka Jr.F.C. (1990) *Biochemistry* 29, 8720-8728
- Portlock S.H., Clague M.J. et Cherry R.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1030, 1-10
- Ramseier H.R. (1960) *Arch. Microbiol.* 37, 57-94

- Reisinger P., Seidel H., Tschesche H. et Hammes W.P. (1980) *Arch. Microbiol.* 127, 187-193
- Rex S. (1996) *Biophys. Chem.* 58, 75-85
- Seddon J.M., Cevc G., Kaye M.D. et Marsh D. (1984) *Biochemistry* 23, 2634-2644
- Seelig A. et Seelig J. (1977) *Biochemistry* 16, 45-50
- Seelig J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 515, 105-140
- Segrest J.P., De Loof H., Dohlman J.G., Brouillette C.G. et Anantharamaiah G.M. (1990) *Prot. Struct. Funct. Gen.* 8, 103-117
- Sekharam K.M, Bradrick T.D. et Georghiou S. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1063, 171-174
- Shyamsunder E., Gruner S.M., Tate M.W. et So P.T.C. (1988) *Biochemistry* 27, 2332-2336
- Sjölund M., Lindblom G., Rilfors L. et Arvidson G. (1987) *Biophys. J.* 52, 145-153
- Sönnichsen F.D., Van Eyk J.E., Hodges R.S. et Sykes B.D. (1992) *Biochemistry* 31, 8790-8798
- Surewicz W.K., Szabo A.G. et Mantsch H.H. (1987) *Eur. J. Biochem.* 167, 519-523
- Surewicz W.K. et Mantsch H.H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 952, 115-130
- Susi H. et Byler M. (1983) *Biochim. Biophys. Res. Com.* 115, 391-397
- Thomas P.G. et Verkleij A.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1030, 211-222

- Tilcock C.P.S., Bally M.B., Farren S.B. et Cullis P.R. (1982) *Biochemistry* 21, 4596-4601
- Tilcock C.P.S. et Cullis P.R. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 684, 212-218
- Tomita T., Watanabe M. et Yasuda T. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 13391-13397
- Torchilin V.P., Lukyanov A.N., Klibanov A.L. et Omelyanenko V.G. (1992) *FEBS Lett.* 305, 185-188
- Umemura J., Cameron D.G. et Mantsch H.H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 602, 32-44
- Van de Ven F.J.M., Van den Hooven H.W., Konings N.H. et Hilbers C.W. (1991) *Eur. J. Biochem.* 202, 1181-1188
- Van den Hooven H.W., Fogolari F., Rollema H.S., Konings R.N.H., Hilbers C.W. et Van de Ven F. J. M. (1993) *FEBS Lett.* 319, 189-194
- Van den Hooven H.W., Doeland C.C.M., Van De Kamp M., Konings R.N.H., Hilbers C.W. et Van de Ven F.J.M. (1996a) *Eur. J. Biochem.* 235, 382-393
- Van den Hooven H.W., Spronk C.A.E.M., Van De Kamp M., Konings R.N.H., Hilbers C.W. et Van de Ven F.J.M. (1996b) *Eur. J. Biochem.* 235, 394-403
- Veiro J.A., Khalifah R.G. et Rowe E.S. (1990) *Biophys. J.* 57, 637-641
- Verheul A., Russell N.J., Van't Hof R., Rombouts F. M. et Abee T. (1997) *App. Environ. Microbiol.* 63, 3451-3457
- Verkleij A.J., Mommers C., Leunissen-Bijvelt J. et Ververgaert P.H.J.Th. (1979) *Nature (London)* 279, 162-163
- Vist M.R. et Davis J.H. (1990) *Biochemistry* 29, 451-464

Wiedmann T., Salmon A. et Wong V. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1167, 114-

120

Yeagle P. (1986) *Biochemistry* 25, 7518-7522