

Université de Montréal

Formation de la phase liquide-ordonnée dans des matrices lipidiques

par

Chantal Paré

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

Mars, 2000

© Chantal Paré, 2000



QD

3

US4

2000

v. 009



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Formation de la phase liquide-ordonnée dans des matrices lipidiques

présentée par:

Chantal Paré

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Professeur François Brisse      Président-rapporteur

Professeur Michel Lafleur      Directeur de recherche

Professeur Thomas Ellis      Membre du Jury

Professeur James H. Davis      Examineur externe

*Professeur Robert Lemire      Représentant du doyen de la FES*

Thèse acceptée le:.....*16 juillet 2000*.....

## SOMMAIRE

Le cholestérol est un élément important des membranes plasmiques de cellules de mammifères. Nous savons que le cholestérol modifie le polymorphisme de phospholipides zwitterioniques, les phosphatidylcholines, et induit la formation de la phase liquide-ordonnée, une phase ayant certaines caractéristiques de la phase gel (chaînes ordonnées) et de la phase liquide-cristalline (diffusions rotationnelle et translationnelle relativement rapides). Nous avons voulu, dans le cadre de cette thèse, caractériser l'influence du cholestérol sur le polymorphisme de matrices lipidiques, à savoir des phosphatidyléthanolamines (phospholipides zwitterioniques formant des phases non-lamellaires), des phosphatidylsérines (phospholipides chargés négativement) et un acide gras, l'acide palmitique, pour comprendre si la formation de la phase liquide-ordonnée est un cas particulier aux phosphatidylcholines ou s'il s'agit plutôt d'un phénomène plus général.

Nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire du  $^2\text{H}$  pour effectuer cette caractérisation. Nous avons observé, qu'à hauts pourcentages de cholestérol, les trois matrices étudiées formaient la phase liquide-ordonnée (à des contenus en cholestérol qui dépendent du type de lipide). Pour le mélange acide palmitique/cholestérol, le pH a une influence importante, puisqu'à un pH de 8,8, on arrive à obtenir la phase liquide-ordonnée sur tout le domaine de température étudié, alors qu'à un pH de 5,5, on obtient cette phase uniquement à partir de 50° C. Nous avons aussi examiné si la présence de cholestérol influence d'autres transitions que la transition de phase gel à liquide-cristalline. Nous avons remarqué que la température de transition de phase fluide à hexagonale de la 1-palmitoyl 2-oléoyl-*sn*-phosphatidyléthanolamine et son amplitude variaient de façon non monotone avec l'ajout de cholestérol. De plus, le cholestérol a un effet de rigidification des chaînes acyles du phospholipide en phase hexagonale, comme en phase liquide-cristalline. Le cholestérol influence aussi la transition de phase gel anhydre à liquide-cristalline de deux



phosphatidyléthanolamines, la 1,2-distéaroyl-*sn*-phosphatidyléthanolamine et la 1,2-dimyristoyl-*sn*-phosphatidyléthanolamine, en diminuant la température de transition de phase et l'amplitude de la transition. Cependant, contrairement à ce que certaines études suggèrent, il n'y a pas de découplage entre l'hydratation de la tête polaire et la fusion des chaînes qui se produiraient de façon indépendante sur l'échelle de température lors de la transition.

Dans l'étude avec la phosphatidylsérine, deux résultats connexes méritent d'être soulignés. L'ajout d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  à des vésicules de phosphatidylsérine provoque la formation de cochléates. Nous avons montré, par RMN du  $^2\text{H}$ , que les chaînes lipidiques dans cette phase sont très ordonnées. Deuxièmement, la préparation des échantillons DPPS/cholestérol semble être critique puisqu'on obtient des thermotropismes différents pour un mélange 1,2-dipalmitoyl-*sn*-phosphatidylsérine/cholestérol préparé dans le chloroforme seulement ou dans un mélange de solvants.

Nous avons aussi exploré l'utilisation d'une technique de résonance magnétique nucléaire en deux dimensions, le "wideline separation" (WISE), pour caractériser le cholestérol cristallisé dans la membrane. Nous montrons, qualitativement, que les spectres WISE permettent d'obtenir des signaux différents pour le cholestérol cristallin et pour le cholestérol solubilisé dans la membrane.

Finalement, nous avons étudié l'impact de la topologie de la surface de peptides transmembranaires formant des hélices- $\alpha$  insérées dans la membrane lipidique sur les chaînes acyles des lipides. Nous avons, pour ce faire, étudié l'influence des peptides  $\text{L}_{24}$  (dont la section hydrophobe est composée de groupements leucines) et  $(\text{LA})_{12}$  (dont la section hydrophobe est composée d'une alternance de groupements leucines et alanines), sur des phosphatidylcholines. Malgré la topologie de la surface de l'hélice différente pour les deux peptides, nous avons observé une rigidification des chaînes acyles du lipide en présence des deux peptides. Ceci confirme l'hypothèse que la surface des segments transmembranaires de peptides et de protéines est malléable et accommodée par

les chaînes lipidiques. Dans ce cas, la topologie de surface de l'additif membranaire est beaucoup moins importante que pour le cholestérol.

***Mots-clés:*** Cholestérol, lipides, polymorphisme, spectroscopie infrarouge, résonance magnétique nucléaire, peptides.

## TABLE DES MATIÈRES

|   |       |
|---|-------|
| Sommaire.....   | i     |
| Table des matières.....                                       | iv    |
| Liste des figures.....  | ix    |
| Liste des abréviations.....                                   | xvi   |
| Remerciements .....   | xviii |
| <br>  |       |
| CHAPITRE 1: INTRODUCTION .....                                | 1     |
| <br>  |       |
| 1.1 La membrane biologique et le cholestérol.....             | 2     |
| 1.2 Les membranes modèles.....                                | 6     |
| 1.3 Les peptides .....  | 20    |
| <br>  |       |
| CHAPITRE 2: TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES.....                  | 25    |
| <br>  |       |
| 2.1 Spectroscopie IR .....                                    | 25    |
| 2.2 Spectroscopie RMN .....                                   | 28    |
| 2.2.1 Spectroscopie RMN du $^2\text{H}$ .....                 | 30    |
| 2.2.1.1 Cas d'un seul site deutéré sur une molécule .....     | 32    |
| 2.2.1.2 Cas de plusieurs sites deutérés sur une molécule..... | 37    |
| 2.2.1.3 Cas du cholestérol deutéré.....                       | 41    |
| 2.2.2 Technique WISE.....                                     | 45    |
| <br>  |       |
| CHAPITRE 3: PARTIE EXPÉRIMENTALE .....                        | 50    |
| <br>  |       |
| 3.1 Provenance des produits.....                              | 50    |
| 3.2 Spectroscopie IR .....                                    | 50    |
| 3.2.1 Préparation des échantillons.....                       | 50    |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.2 Expériences .....  | 51 |
| 3.3 Spectroscopie RMN .....  | 52 |
| 3.3.1 Préparation des échantillons en RMN du $^2\text{H}$ .....                | 52 |
| 3.3.2 Préparation des cochléates .....   | 53 |
| 3.3.3 Expériences en RMN du $^2\text{H}$ .....                                 | 53 |
| 3.3.4 Préparation des échantillons en RMN $^{13}\text{C}$ -CP/MAS et WISE..... | 56 |
| 3.3.5 Expériences de RMN $^{13}\text{C}$ -CP/MAS et WISE .....                 | 56 |

## CHAPITRE 4: ÉTUDE DU POLYMORPHISME DE SYSTÈMES LIPIDES/CHOLESTÉROL.....

|   |    |
|---|----|
| 4.1 Systèmes phosphatidyléthanolamine/cholestérol.....              | 57 |
| 4.1.1 Système POPE/cholestérol.....                                 | 57 |
| 4.1.1.1 Introduction.....   | 57 |
| 4.1.1.2 Résultats .....   | 57 |
| <i>Spectroscopie IR</i> .....                                       | 57 |
| <i>Spectroscopie RMN du <math>^2\text{H}</math></i> .....           | 63 |
| 4.1.1.3 Discussion.....   | 71 |
| <i>Phases lamellaires</i> .....                                     | 72 |
| <i>Transition de phase lamellaire à hexagonale</i> .....            | 78 |
| 4.1.2 Systèmes DMPE- $d_{54}$ /cholestérol et DSPE/cholestérol..... | 81 |
| 4.1.2.1 Introduction.....   | 81 |
| 4.1.2.2 Résultats .....   | 82 |
| <i>Système DMPE-<math>d_{54}</math>/5 mol% chol.</i> .....          | 82 |
| <i>Système DSPE/chol.</i> .....                                     | 86 |
| 4.1.2.3 Discussion.....   | 89 |
| <i>Système DMPE-<math>d_{54}</math>/5 mol% chol.</i> .....          | 89 |
| <i>Système DSPE/chol.</i> .....                                     | 92 |
| 4.2 Système DPPS/chol.....  | 94 |
| 4.2.1 Introduction .....  | 94 |
| 4.2.2 Résultats .....   | 94 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.2.2.1 Spectroscopie IR .....   | 94  |
| 4.2.2.2 Spectroscopie RMN du $^2\text{H}$ .....  | 97  |
| 4.3 Système acide palmitique/cholestérol .....   | 105 |
| 4.3.1 Introduction .....   | 105 |
| 4.3.2 Résultats .....  | 106 |
| 4.3.2.1 Étude de mélanges PA- $\text{d}_{31}$ /cholestérol .....                               | 106 |
| <i>Spectroscopie IR</i> .....  | 106 |
| <i>Spectroscopie RMN du <math>^2\text{H}</math></i> .....                                      | 108 |
| 4.3.2.2 Étude de mélanges PA/[2,2,4,4,6- $\text{d}_5$ ]cholestérol (chol- $\text{d}_5$ ) ..... | 113 |
| 4.3.2.3 Étude de l'effet du pH .....   | 116 |
| 4.3.3 Discussion .....   | 117 |
| 4.4 Conclusion .....   | 128 |

## CHAPITRE 5: ÉTUDE DE SYSTÈMES PHOSPHOLIPIDES/ CHOLESTÉROL PAR LA TECHNIQUE RMN DE WIDELINE SEPARATION .....

|                        |     |
|------------------------|-----|
| 5.1 Introduction ..... | 131 |
| 5.2 Résultats .....    | 132 |
| 5.3 Discussion .....   | 141 |
| 5.4 Conclusion .....   | 144 |

## CHAPITRE 6: ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES PEPTIDES $\text{L}_{24}$ ET $(\text{LA})_{12}$ SUR LA STRUCTURE DES BICOUCHES DE DPPC- $\text{d}_{62}$ ET POPC- $\text{d}_{31}$ .....

|                        |     |
|------------------------|-----|
| 6.1 Introduction ..... | 145 |
| 6.2 Résultats .....    | 147 |
| 6.3 Discussion .....   | 157 |
| 6.4 Conclusion .....   | 161 |

|   |     |
|---|-----|
| CHAPITRE 7: CONCLUSION ET TRAVAUX FUTURS..... | 162 |
| RÉFÉRENCES .....                              | 164 |

## LISTE DES TABLEAUX

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| Tableau I   | Composition en lipides (en % de lipides totaux) des membranes de différents organes du rat .....   | 2   |
| Tableau II  | Solubilité maximale du cholestérol dans différentes matrices de phospholipides. ....   | 19  |
| Tableau III | Largeurs de bande et fréquence des bandes $\nu_{C=O}$ et $\nu_{PO_2^-}$ pour la DMPE-d <sub>54</sub> pure dans différentes phases.....   | 83  |
| Tableau IV  | Attribution des bandes et éclatements quadrupolaires obtenus pour le cholestérol deutéré dans le mélange PA/75 mol% chol-d <sub>5</sub> à 55 et 65° C, DMPC/30 mol% chol-d <sub>6</sub> à 30, 55 et 65° C. ....  | 116 |
| Tableau V   | Position des liens deutérés, angle entre le lien C-D et l'axe de rotation de la molécule, $S_{mol}$ calculé, éclatement quadrupolaire expérimental et calculé pour le cholestérol deutéré dans une membrane de PA/75 mol% chol-d <sub>5</sub> à 65° C..... | 123 |
| Tableau VI  | Déplacements chimiques et attribution partielle des bandes des spectres <sup>13</sup> C-CP/MAS du cholestérol cristallin anhydre et hydraté. ....  | 134 |
| Tableau VII | Déplacements chimiques des bandes des spectres <sup>13</sup> C-CP/MAS de la POPC pure, des mélanges POPC/60 mol% chol et 90 mol% chol et du cholestérol cristallin hydraté. ....   | 136 |

**LISTE DES FIGURES**

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figure 1.1  | Représentation schématique d'une membrane biologique.....  | 3  |
| Figure 1.2  | Structure du cholestérol.....  | 5  |
| Figure 1.3  | Structure des phospholipides étudiés. ....   | 7  |
| Figure 1.4  | Représentation schématique de différentes phases adoptées par les phospholipides. ....   | 8  |
| Figure 1.5  | Diagramme de phase du mélange DPPC-d <sub>62</sub> /cholestérol. ....  | 11 |
| Figure 1.6  | Description schématique de la balance amphiphile. ....   | 17 |
| Figure 1.7  | Représentation schématique de quelques-unes des conséquences possibles d'une non-concordance des segments hydrophobes du lipide et du peptide. ....              | 23 |
| Figure 2.1  | Spectre infrarouge d'un lipide en phase liquide-cristalline.....   | 26 |
| Figure 2.2  | Représentation schématique du déplacement des niveaux d'énergie provoqué par l'effet quadrupolaire et exemples de spectres avec et sans effet quadrupolaire..... | 33 |
| Figure 2.2a | Représentation schématique d'un phospholipide et identification des différents angles considérés en RMN du <sup>2</sup> H.....                                   | 34 |



|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figure 2.3  | Exemples de spectres RMN du $^2\text{H}$ pour a) un seul lien C-D sur la molécule immobile b) une distribution aléatoire de molécules immobiles avec un lien C-D c) la phase gel d) la phase liquide-cristalline e) la phase hexagonale et f) une raie étroite. .... | 35 |
| Figure 2.4  | Exemples de spectres RMN du $^2\text{H}$ pour un lipide deutéré sur plusieurs sites. ....  | 38 |
| Figure 2.5  | Spectre de la POPE- $\text{d}_{31}$ pure à $32^\circ\text{C}$ et spectre déconvolué par la méthode de dePakeing. ....  | 40 |
| Figure 2.6  | Profil d'ordre lissé de la POPE- $\text{d}_{31}$ pure à $32^\circ\text{C}$ . ....  | 42 |
| Figure 2.6a | Représentation schématique des angles considérés en RMN du $^2\text{H}$ pour la molécule de cholestérol. ....  | 44 |
| Figure 2.7  | Influence de la vitesse de rotation sur la résolution du spectre en $^{13}\text{C}$ -CP/MAS. ....  | 47 |
| Figure 2.8  | Séquence d'impulsion de la technique RMN WISE. ....  | 49 |
| Figure 3.1  | Profil d'ordre lissé de la DPPC- $\text{d}_{62}$ pure selon les trois méthodes essayées. ....  | 55 |
| Figure 4.1  | Variation de la fréquence de $\nu_{\text{C-H}}$ avec la température pour la POPE pure et les mélanges POPE/20 mol% chol et POPE/45 mol% chol. ....   | 58 |
| Figure 4.2  | Influence du cholestérol sur la température de transition de phase lamellaire à hexagonale et sur le déplacement de la fréquence de $\nu_{\text{C-H}}$ pendant la transition. ....   | 61 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figure 4.3  | Région d'élongation des groupements carbonyles pour la POPE pure et pour les mélanges POPE/20 mol% chol et POPE/45 mol% chol en phase gel (5° C), fluide lamellaire (40° C) et H <sub>II</sub> (78° C).....                      | 62 |
| Figure 4.4  | Variation de la fréquence de la bande d'élongation antisymétrique des PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> de la POPE pure en fonction de la température. ....   | 64 |
| Figure 4.5  | Spectres RMN du <sup>2</sup> H de la POPE-d <sub>31</sub> contenant plusieurs proportions de cholestérol enregistrés à différentes températures.....   | 65 |
| Figure 4.6  | Spectres RMN du <sup>2</sup> H des mélanges POPE-d <sub>31</sub> /10 mol% chol et POPE-d <sub>31</sub> /15 mol% chol et spectres de différence.....  | 67 |
| Figure 4.7  | Profil d'ordre orientationnel lissé obtenu à 32° C et 70° C pour la POPE-d <sub>31</sub> pure et les mélanges POPE-d <sub>31</sub> /10 mol% chol, POPE-d <sub>31</sub> /25 mol% chol et POPE-d <sub>31</sub> /45 mol% chol. .... | 70 |
| Figure 4.8  | Variation du <S <sub>C-D</sub> > en fonction du contenu en cholestérol en phase lamellaire pour la POPE-d <sub>31</sub> et la POPC-d <sub>31</sub> et en phase H <sub>II</sub> pour la POPE-d <sub>31</sub> . ....               | 71 |
| Figure 4.9  | Diagramme température-composition proposé pour le système POPE/chol.....   | 74 |
| Figure 4.10 | Variation de ν <sub>C-D</sub> avec la température pour la DMPE-d <sub>54</sub> pure.....   | 84 |
| Figure 4.11 | Bandes ν <sub>C=O</sub> et ν <sub>PO<sub>2</sub><sup>-</sup></sub> pour la DMPE-d <sub>54</sub> pure pour la phase gel hydratée, gel anhydre et liquide-cristalline.....   | 85 |
| Figure 4.12 | Variation de la fréquence de ν <sub>C-D</sub> et des largeurs des bande ν <sub>C=O</sub> et ν <sub>PO<sub>2</sub><sup>-</sup></sub> en fonction de la température pour le mélange DMPE-d <sub>54</sub> /5 mol% chol.....         | 87 |

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| Figure 4.13 | Bandes $\nu_{C=O}$ et $\nu_{PO_2^-}$ pour le mélange DMPE-d <sub>54</sub> /5 mol% chol à 30° C et 60° C. ....  | 88  |
| Figure 4.14 | Variation de la fréquence de $\nu_{C-H}$ et des largeurs des bandes $\nu_{C=O}$ et $\nu_{PO_2^-}$ en fonction de la température pour la DSPE pure et pour les mélanges DSPE/5 mol% chol et DSPE/15 mol% chol.....  | 90  |
| Figure 4.15 | Variation de la fréquence de $\nu_{C-H}$ en fonction de la température pour le mélange DPPS/30 mol% chol préparé à partir du chloroforme seulement et d'un mélange chloroforme:méthanol (80:20). ....  | 96  |
| Figure 4.16 | Variation de la fréquence de $\nu_{C-H}$ en fonction de la température pour la DPPS pure et pour le mélange DPPS/30 mol% chol préparé à partir du chloroforme.....   | 98  |
| Figure 4.17 | Spectres RMN du <sup>2</sup> H de la DPPS-d <sub>62</sub> contenant différents proportions de cholestérol, enregistrés à différentes températures. ....  | 99  |
| Figure 4.18 | Profil d'ordre de la DPPS-d <sub>62</sub> pure et du mélange DPPS-d <sub>62</sub> /30 mol% chol à 60° C.....   | 101 |
| Figure 4.19 | Spectres RMN du <sup>2</sup> H de la DPPS-d <sub>62</sub> en présence de 10 mM d'ions Ca <sup>2+</sup> (sans EDTA dans le tampon) enregistrés à 40, 50 et 60° C.....   | 102 |
| Figure 4.20 | Thermotropisme de l'acide palmitique obtenu à partir de la fréquence de $\nu_{C-D}$ pour le PA-d <sub>31</sub> pur et pour les mélanges PA-d <sub>31</sub> /5 mol% chol, PA-d <sub>31</sub> /25 mol% chol, PA-d <sub>31</sub> /50 mol% chol et PA-d <sub>31</sub> /75 mol% chol..... | 107 |
| Figure 4.21 | Variation des fréquences de $\delta_{CD_2}$ avec la température pour le PA-d <sub>31</sub> pur et les mélanges PA-d <sub>31</sub> /25 mol% chol, PA-d <sub>31</sub> /50 mol% chol et PA-d <sub>31</sub> /75 mol% chol. ....  | 109 |

- Figure 4.22 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  du PA-d<sub>31</sub> contenant différentes proportions de cholestérol, enregistrés à différentes températures..... 110
- Figure 4.23 Pourcentage de phase solide, lamellaire et de raie étroite en fonction de la température pour le PA-d<sub>31</sub> dans les mélanges PA-d<sub>31</sub>/25 mol% chol, PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol, PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol et PA-d<sub>31</sub>/83 mol% chol. .... 112
- Figure 4.24 Profil d'ordre des mélanges PA-d<sub>31</sub>/25 mol% chol, PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol, PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol et PA-d<sub>31</sub>/83 mol% chol à 55° C. .... 114
- Figure 4.25 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  du cholestérol deutéré dans le mélange PA/75 mol% chol-d<sub>5</sub>, avec un temps de recyclage de 300 ms ou de 30 s, et du PA-d<sub>31</sub> dans le mélange PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol. .... 115
- Figure 4.26 Région du spectre IR présentant les bandes d'élongation C=O pour le mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à pH 5,5 et 8,8..... 118
- Figure 4.27 Variation des fréquences de  $\nu_{\text{C-D}}$  et  $\delta_{\text{CD}_2}$  en fonction de la température pour le mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à un pH de 8,8..... 119
- Figure 4.28 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  du mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à un pH de 8,8 à 30° C et 60° C. .... 120
- Figure 4.29 Profil d'ordre du mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à un pH de 8,8 à 60° C..... 121
- Figure 4.30 Diagramme température-composition proposé pour le système PA/chol. .... 125
- Figure 4.31 Profil d'ordre des mélanges POPE-d<sub>31</sub>/32 mol% chol à 32° C, PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à 67° C et DPPS-d<sub>62</sub>/30 mol% chol à 60° C. .... 129

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Figure 5.1 | Spectres $^{13}\text{C}$ -CP/MAS du cholestérol cristallin hydraté et anhydre. ....   | 133 |
| Figure 5.2 | Spectres $^{13}\text{C}$ -CP/MAS du cholestérol hydraté, du mélange POPC/90 mol% chol, du mélange POPC/60 mol% chol et de la POPC pure. ....  | 135 |
| Figure 5.3 | Spectres $^1\text{H}$ du cholestérol cristallin, anhydre et hydraté, et du mélange DPPC- $d_{62}$ /30 mol% chol à différentes vitesses de rotation du porte-échantillon.....  | 138 |
| Figure 5.4 | Spectre WISE du cholestérol cristallin anhydre. ....  | 139 |
| Figure 5.5 | Spectre WISE du mélange POPC/60 mol% chol.....  | 140 |
| Figure 5.6 | Dimension $^{13}\text{C}$ des spectres WISE A) de la figure 5.4 (Cholestérol cristallin anhydre) et B) de la figure 5.5 (POPC/60 mol% chol).....  | 142 |
| Figure 5.7 | Tranches proton des spectres WISE des figures 5.4 et 5.5 pour deux bandes caractéristiques du cholestérol en $^{13}\text{C}$ à 19,9 ppm et 43,2 ppm pour le cholestérol cristallin anhydre et le mélange POPC/60 mol% chol..... | 143 |
| Figure 6.1 | Représentation de l'hélice- $\alpha$ des peptides $L_{24}$ et $(LA)_{12}$ .....   | 146 |
| Figure 6.2 | Spectres RMN du $^2\text{H}$ de la POPC- $d_{31}$ pure et des mélanges POPC- $d_{31}$ : $(LA)_{12}$ (20:1) et POPC- $d_{31}$ : $L_{24}$ (20:1) à 30° C.....   | 148 |
| Figure 6.3 | Profil d'ordre lissé obtenu pour la POPC- $d_{31}$ pure et pour les mélanges POPC- $d_{31}$ : $(LA)_{12}$ (20:1) et POPC- $d_{31}$ : $L_{24}$ (20:1) à 15 et 30° C.....   | 150 |
| Figure 6.4 | Variation de la fréquence de $\nu_{\text{C-D}}$ avec la température pour la DPPC- $d_{62}$ pure et les mélanges DPPC- $d_{62}$ : $(LA)_{12}$ (20:1) et DPPC- $d_{62}$ : $L_{24}$ (20:1).....                                    | 151 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| Figure 6.5 | Spectres RMN du $^2\text{H}$ de la DPPC- $\text{d}_{62}$ pure et des mélanges DPPC- $\text{d}_{62}$ :(LA) $_{12}$ (20:1) et DPPC- $\text{d}_{62}$ :L $_{24}$ (20:1), enregistrés à différentes températures. ....  | 153 |
| Figure 6.6 | Profil d'ordre lissé pour la DPPC- $\text{d}_{62}$ pure et les mélanges DPPC- $\text{d}_{62}$ :(LA) $_{12}$ (20:1) et DPPC- $\text{d}_{62}$ :L $_{24}$ (20:1) à 50 et 60° C. ....  | 155 |
| Figure 6.7 | Paramètre d'ordre moyen, $\langle S_{\text{C-D}} \rangle$ , en fonction de la température pour la POPC- $\text{d}_{31}$ pure et les mélanges POPC- $\text{d}_{31}$ :(LA) $_{12}$ (20:1) et POPC- $\text{d}_{31}$ :L $_{24}$ (20:1) et pour la DPPC- $\text{d}_{62}$ pure et les mélanges DPPC- $\text{d}_{62}$ :(LA) $_{12}$ (20:1) et DPPC- $\text{d}_{62}$ :L $_{24}$ (20:1). .... | 156 |
| Figure 6.8 | Différence absolue des paramètres d'ordre déterminés selon les pics résolus du phospholipide en présence du peptide (LA) $_{12}$ ( $S_{\text{PEP-PC}}$ ) et du phospholipide pur ( $S_{\text{PC}}$ ) pour la DPPC- $\text{d}_{62}$ à 50, 55, 60 et 65° C et pour la POPC- $\text{d}_{31}$ à 15, 30, 35 et 50° C. ....  | 158 |
| Figure 6.9 | Différence absolue des paramètres d'ordre déterminés selon les pics résolus du phospholipide en présence du peptide L $_{24}$ ( $S_{\text{PEP-PC}}$ ) et du phospholipide pur ( $S_{\text{PC}}$ ) pour la DPPC- $\text{d}_{62}$ à 50, 55 et 60° C et pour la POPC- $\text{d}_{31}$ à 15, 30, 35 et 50° C. ....   | 159 |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

|                        |  |
|------------------------|--|
| A:                     | Alanine  |
| AED:                   | Analyse enthalpique différentielle   |
| chol:                  | Cholestérol  |
| chol-d <sub>5</sub> :  | [2,2,4,4,6-d <sub>5</sub> ] cholestérol  |
| chol-d <sub>6</sub> :  | [2,2,3,4,4,6-d <sub>6</sub> ] cholestérol  |
| CP/MAS:                | Cross-Polarization with magic angle spinning (Technique RMN de polarisation croisée avec rotation à l'angle magique) |
| $\Delta\nu_Q$ :        | Éclatement quadrupolaire   |
| DEPE:                  | 1,2-diélaïdoyl- <i>sn</i> -phosphatidyléthanolamine  |
| DLPE:                  | 1,2-dilauroyl- <i>sn</i> -phosphatidyléthanolamine   |
| DMPC:                  | 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine  |
| DMPE:                  | 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -phosphatidyléthanolamine   |
| DMPE-d <sub>54</sub> : | 1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -phosphatidyléthanolamine deutérée sur les deux chaînes                                   |
| DOPC:                  | 1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine   |
| DPPC:                  | 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine  |
| DPPC-d <sub>62</sub> : | 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine deutérée sur les deux chaînes  |
| DPPE:                  | 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -phosphatidyléthanolamine   |
| 2[4,4-2H]DPPE:         | 2[4,4- <sup>2</sup> H]dipalmitoyl- <i>sn</i> -phosphatidyléthanolamine spécifiquement deutérée                       |
| DPPS:                  | 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -phosphatidylsérine   |
| DPPS-d <sub>62</sub> : | 1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -phosphatidylsérine deutérée sur les deux chaînes   |
| DSPE:                  | 1,2-distéaroyl- <i>sn</i> -phosphatidyléthanolamine  |
| EDTA:                  | Acide éthylènediaminetétracétique  |
| H <sub>II</sub> :      | Phase hexagonale inverse   |
| HEPES:                 | Acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique]   |
| IR:                    | Infrarouge   |
| L:                     | Leucine  |
| L <sub>24</sub> :      | Ac-K <sub>2</sub> GL <sub>24</sub> K <sub>2</sub> A-amide  |

|                        |  |
|------------------------|--|
| (LA) <sub>12</sub>     | Ac-K <sub>2</sub> G(LA) <sub>12</sub> K <sub>2</sub> A-amide                                     |
| L <sub>α</sub> :       | Phase liquide-cristalline  |
| L <sub>β</sub> :       | Phase gel  |
| l <sub>o</sub> :       | Phase liquide-ordonnée   |
| MCT:                   | Mercury-cadmium telluride (Tellure de mercure et de cadmium)                                     |
| MES:                   | Acide 2-[N-morpholino] éthanesulfonique  |
| PA:                    | Acide palmitique   |
| PA-d <sub>31</sub> :   | Acide palmitique deutéré sur la chaîne   |
| PC:                    | Phosphatidylcholine  |
| PE:                    | Phosphatidyléthanolamine   |
| POPC:                  | 1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine   |
| POPC-d <sub>31</sub> : | 1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -phosphatidylcholine perdeutérée sur la chaîne <i>sn</i> -1      |
| POPE:                  | 1-palmitoyl 2-oléoyl- <i>sn</i> -phosphatidyléthanolamine  |
| POPE-d <sub>31</sub> : | 1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -phosphatidyléthanolamine perdeutérée sur la chaîne <i>sn</i> -1 |
| PS:                    | Phosphatidylsérine   |
| R <sub>c</sub> :       | Rayon de courbure spontané du plan lipidique   |
| RMN:                   | Résonance magnétique nucléaire   |
| Th:                    | Température de transition de phase lamellaire à hexagonale                                       |
| T <sub>m</sub> :       | Température de transition de phase gel à liquide-cristalline                                     |
| WISE:                  | Wideline separation (Technique RMN en deux dimensions de type wideline separation)               |



## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier tout spécialement mon directeur de recherche, Michel Lafleur, pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire, pour ses nombreux conseils, sa disponibilité et son enthousiasme. Je remercie également les membres du Laboratoire Régional de RMN: Minh Tan Phan Viet, Robert Mayer et Sylvie Bilodeau pour les séquences d'impulsion, les solutions aux nombreux problèmes, les discussions et leur disponibilité. Mes remerciements vont à M. Ronald McElhaney qui a fourni les peptides (LA)<sub>12</sub> et L<sub>24</sub>. Tous les membres de l'atelier de mécanique et d'électronique sont remerciés pour leur rapidité d'exécution, leur dextérité et surtout leur gentillesse. Je désire aussi remercier tous les membres du laboratoire, présents et passés, particulièrement: Rachida, Aline, Vera, Lucie, Iren, SungJong et Paul Sauvageau, mais aussi trois anciens étudiants de Christian Reber: Carole Savoie, Yanick Pelletier et Benoit Crompt. Merci à tous pour votre joie de vivre, pour votre aide et pour les discussions animées, sérieuses ou pas.

Je tiens également à remercier trois très grandes et très bonnes amies, Sylvie, Julie et Marie-Andrée, qui, chacune à leur manière, m'ont encouragée pendant mes études graduées. J'exprime une gratitude spéciale à ma mère, Jacqueline, et à ma sœur, Nathalie, pour leur amour et leur soutien pendant toutes mes études, malgré la distance géographique des quatre dernières années. Finalement, j'adresse un merci particulier à mon copain, Jean-François, pour son support constant, son encouragement et surtout pour sa compréhension (stress des pré-doc, du séminaire de doctorat et de la rédaction de thèse). Merci aussi pour la question "graphique" de la thèse.

*A maman*

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

Le cholestérol (chol) est une composante fondamentale des membranes plasmiques de cellules de mammifères. Pour comprendre son impact sur les propriétés des membranes, son effet sur les phosphatidylcholines (PC), les phospholipides les plus abondants des membranes cellulaires de mammifères, a été grandement étudié dans les années antérieures. Nous savons, par exemple, qu'à hauts pourcentages de cholestérol, les PC forment une phase fluide, mais que leurs chaînes sont rigides. Cette thèse vise à décrire l'influence du cholestérol sur des lipides autres que les PC. Nous avons voulu, dans un premier temps, caractériser l'influence du cholestérol sur des phospholipides tels les phosphatidyléthanolamines (PE) (1-palmitoyl 2-oléoyl-*sn*-phosphatidyléthanolamine (POPE), 1,2-dimyristoyl-*sn*-phosphatidyléthanolamine (DMPE) et 1,2-distéaroyl-*sn*-phosphatidyléthanolamine (DSPE)) et la phosphatidylsérine (PS) (1,2-dipalmitoyl-*sn*-phosphatidylsérine (DPPS)), de même qu'un lipide très simple, l'acide palmitique (PA), pour déterminer si la formation de cette phase fluide mais ordonnée est une propriété générale pour tous les lipides ou s'il s'agit plutôt d'un trait spécifique aux PC. Dans un deuxième temps, nous avons exploré une méthode de résonance magnétique nucléaire (RMN) en deux dimensions permettant de quantifier la solubilité du cholestérol dans la membrane. La précipitation du cholestérol est un phénomène important étant donné l'existence de cholestérol cristallin dans certaines membranes, mais aussi lors de certaines pathologies. Finalement, l'influence du cholestérol sur les bicouches de PC a été associée aux faces relativement planes du stérol (Bloch, 1983). Au niveau moléculaire, nous avons examiné si la topologie de segments transmembranaires a une influence particulière au niveau de l'ordre orientationnel des chaînes acyles du phospholipide. Nous avons donc comparé l'influence sur les chaînes lipidiques de deux peptides formant des hélices- $\alpha$  transmembranaires, mais dont la topologie diffère, l'un formant une hélice ayant une surface "lisse" et l'autre ayant une surface plutôt "rugueuse". Pour examiner ces questions, la spectroscopie infrarouge (IR) et la RMN ont été utilisées pour caractériser la structure et la dynamique des lipides.

## 1.1 La membrane biologique et le cholestérol

La membrane biologique est une composante essentielle des cellules. Elle agit, entre autres, comme une barrière semi-perméable entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Elle est composée d'une bicouche de lipides, structure de base des membranes biologiques, à laquelle sont associées les protéines nécessaires au fonctionnement des membranes. Il a été proposé par Bothorel et Lussan (1968) et Singer et Nicholson (1972) que la membrane forme une mosaïque fluide (Figure 1.1). Deux types de protéines dessinent une mosaïque sur la membrane: les protéines intrinsèques, qui traversent la membrane lipidique, et les protéines périphériques, attachées à la surface de la bicouche par des interactions ioniques ou des liaisons hydrogène. La notion de fluidité vient du fait qu'il est proposé que les protéines intrinsèques diffusent librement dans la bicouche lipidique.

La composition en lipide des membranes de cellules de mammifères est complexe et variable. On peut voir, dans le tableau I, la composition en lipides des membranes de différents organes du rat.

|                          | Cerveau | Cœur | Foie | Poumons |
|--------------------------|---------|------|------|---------|
| Phosphatidylcholine      | 36,8    | 36,6 | 52,2 | 46,2    |
| Phosphatidyléthanolamine | 36,4    | 29,7 | 25,2 | 22,2    |
| Phosphatidylsérine       | 11,8    | 3,2  | 3,4  | 9,0     |
| Phosphatidylglycérol     | 2,2     | 12,2 | 4,8  | 3,3     |

Tableau I Composition en lipides (en % de lipides totaux) des membranes de différents organes du rat (Rawn, 1989).

Bien que les phospholipides soient les lipides les plus abondants de la majorité des membranes de mammifères, certaines membranes contiennent des lipides particuliers. Par exemple, le stratum corneum, la couche supérieure de la peau, contient, en plus du cholestérol et des sphingolipides, environ 25% d'acide gras, principalement

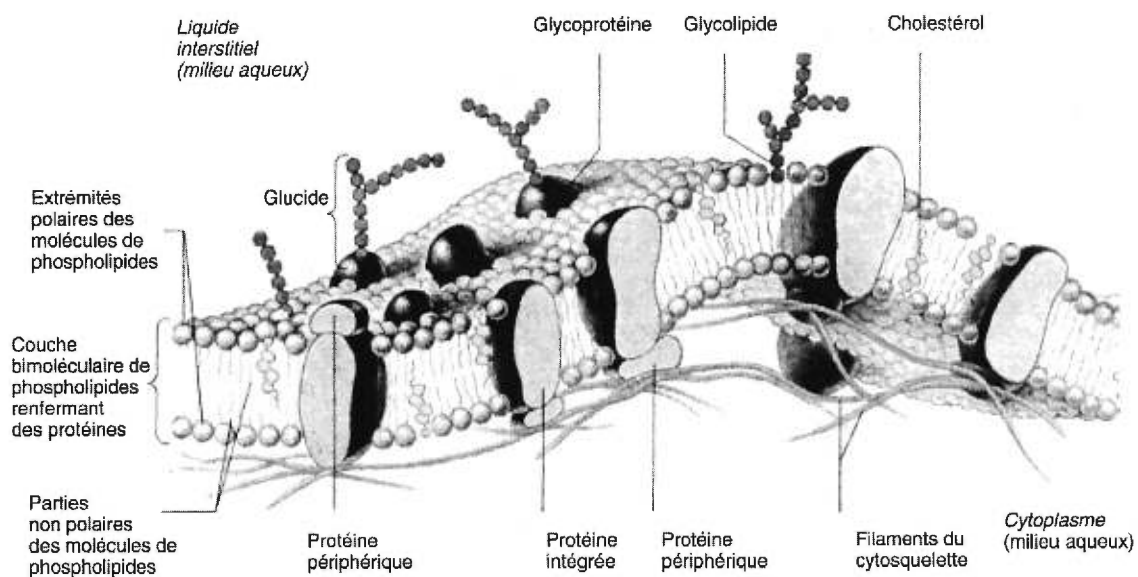


Figure 1.1 Représentation schématique d'une membrane biologique (Marieb et Laurendeau, 1993).

les acides palmitique et oléique (Elias, 1990; Lieckfeldt et al., 1994).

Le cholestérol est également un constituant majeur des membranes des cellules de mammifères. Il peut, par exemple, représenter jusqu'à 25 mol% de la fraction lipidique de la membrane d'érythrocyte humain ou 22 mol% de la gaine de myéline du foie de rat. Seules les cellules d'eucaryotes animales sont pourvues de cholestérol. Cependant, les plantes possèdent d'autres types de stérols, tel le stigmastérol, dont la différence avec le cholestérol ne réside que dans la composition de la chaîne acyle, et qui pourraient avoir un rôle similaire à celui du cholestérol. Les cellules de procaryotes ne possèdent aucun stérol dans leur membrane. La structure du cholestérol est composée de quatre cycles rigides et d'une chaîne acyle, composant le noyau hydrophobe, et d'un groupement hydroxyle, constituant le noyau hydrophile. À cause de son ensemble de cycles, une grande partie du cholestérol est rigide et plane (Figure 1.2).

Le cholestérol semble avoir une grande influence sur les propriétés de la membrane biologique. Par exemple, l'étude de l'influence du cholestérol sur une membrane naturelle, la membrane plasmique de *Acholeplasma laidlawii* de souche B, a permis de mettre en évidence une rigidification des chaînes acyles des lipides de la membrane avec l'ajout de cholestérol (Monck et al., 1993). Ce stérol a aussi un effet sur l'activité de plusieurs protéines membranaires. C'est le cas de la phospholipase A<sub>2</sub>, une enzyme de la membrane externe des mitochondries, dont la fonction est d'hydrolyser les lipides. La présence de cholestérol dans les membranes inhibe l'activité de cette enzyme à des pourcentages de cholestérol supérieurs à 35 mol% pour plusieurs phosphatidylcholines (Op Den Kamp et al., 1975). Le cholestérol empêche aussi parfois la dénaturation de certaines protéines, dont la rhodopsine (Albert et al., 1996). On observe également une augmentation d'activité des enzymes adénosine triphosphatase (ATP-ase) et nicotinamide-adénine-dinucléotide pyrophosphate glycohydrolase (NAD<sup>+</sup>-ase) avec l'ajout de cholestérol dans les membranes plasmiques des synapses extraites du cerveau du chien (Alivisatos et al., 1977).

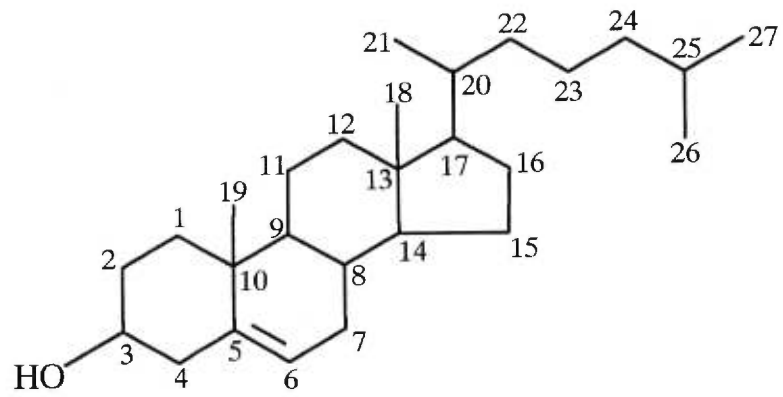


Figure 1.2 Structure du cholestérol.

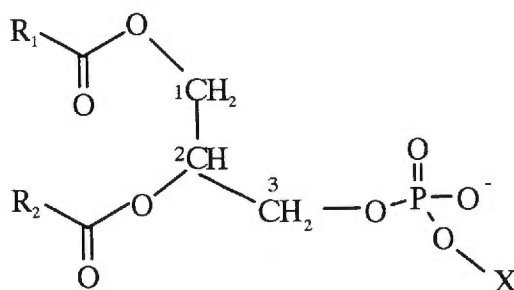
Pour rationaliser ces effets, une grande quantité d'études a été faite sur des membranes modèles qui sont en fait des représentations simplifiées des membranes biologiques. On étudie principalement ici l'influence du cholestérol (ou d'un peptide) sur un seul phospholipide à la fois, ce qui simplifie l'interprétation des résultats et permet de dégager les lois moléculaires qui régissent l'assemblage.

## 1.2 Les membranes modèles

Il y a plusieurs types de lipides dans les membranes et le plus commun est le phospholipide. Un phospholipide, de façon générale, est composé d'une tête polaire, contenant un groupement phosphate, et de deux chaînes hydrocarbonées. On peut voir à la figure 1.3 la structure générale d'un phospholipide, ainsi que les caractéristiques des différents phospholipides étudiés dans le cadre de cette thèse: la POPE, la DMPE, la 1,2-dipalmitoyl-*sn*-phosphatidylcholine (DPPC), la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-phosphatidylcholine (POPC) et la DPPS. Les PC et les PE sont des phospholipides zwitterioniques, alors que la PS est un lipide chargé négativement. Le caractère amphiphile des lipides conduit à leur agrégation dans l'eau, presque toujours en bicouches. De façon générale, les lipides existent, aux basses températures, en phase gel lamellaire (ou  $L_{\beta}$ ). Dans cette phase, les chaînes acyles du lipide sont très ordonnées et les diffusions rotationnelle et translationnelle des molécules sont peu importantes, la première étant de l'ordre de  $10^4$  Hz (Meier et al., 1986) et la seconde d'environ  $10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s (Rubenstein et al., 1979).

À une température caractéristique pour chacun des phospholipides (qui dépend, entre autres, de la nature de la tête polaire et des chaînes acyles), le lipide passe en phase liquide-cristalline (ou  $L_{\alpha}$ ), où les chaînes acyles sont beaucoup plus désordonnées et où les diffusions rotationnelle et translationnelle sont plus importantes, de l'ordre de  $10^7$  à  $10^{10}$  Hz pour la première et de  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s pour la seconde (Rubenstein et al., 1979; Lindblom et al., 1981). À la figure 1.4, on peut voir une représentation de ces phases formées par les phospholipides. Lors du passage de la phase gel à liquide-cristalline, il y a introduction de désordre dans les chaînes, diminution de l'épaisseur de la bicouche et augmentation de l'aire moléculaire à l'interface puisque la bicouche peut être considérée

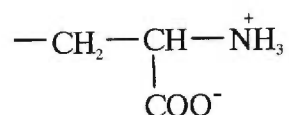
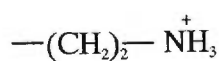
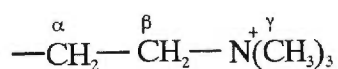




X = choline

X = éthanolamine

X = sérine



| Phospho-lipide | R <sub>1</sub>                                     | R <sub>2</sub>  | X            |
|----------------|--|---|--------------|
| POPC           | (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> - CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - CH = CH - (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - CH <sub>3</sub> | Choline      |
| POPE           | (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> - CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - CH = CH - (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - CH <sub>3</sub> | Éthanolamine |
| DPPC           | (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> - CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> - CH <sub>3</sub>  | Choline      |
| DPPS           | (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> - CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> - CH <sub>3</sub>  | Sérine       |
| DMPE           | (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> - CH <sub>3</sub> | (CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> - CH <sub>3</sub>  | Éthanolamine |

Figure 1.3 Structure des phospholipides étudiés.

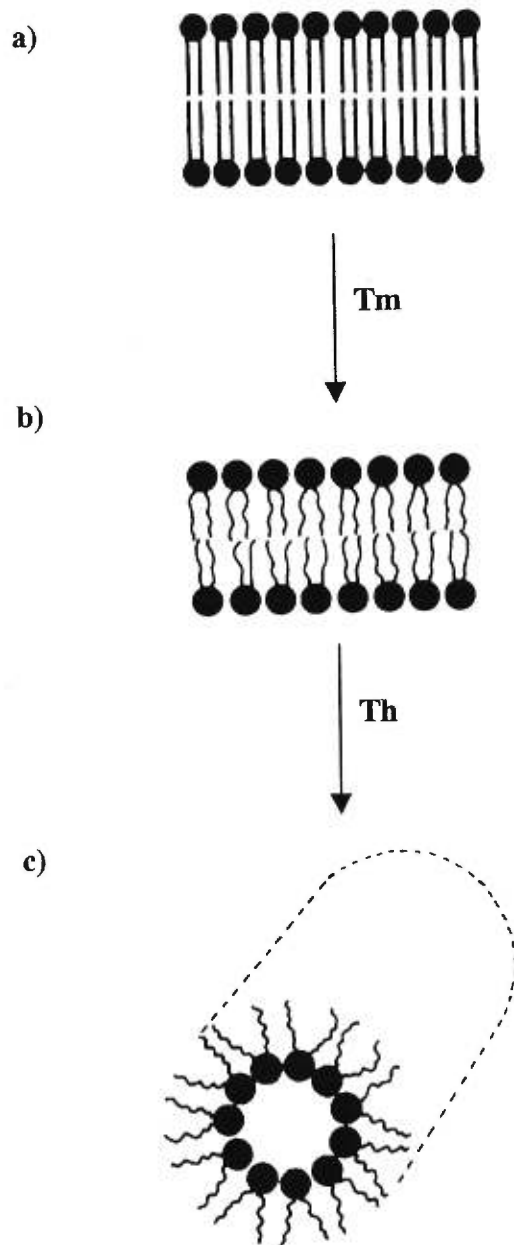


Figure 1.4 Représentation schématique de différentes phases adoptées par les phospholipides: a) phase gel ( $L_{\beta}$ ), b) phase liquide-cristalline ( $L_{\alpha}$ ) et c) phase hexagonale inverse ( $H_{II}$ ). ● représente la tête polaire.

comme un fluide incompressible (Ipsen et al., 1990). Certains lipides forment une phase intermédiaire aux phases gel et liquide-cristalline. Cette phase est dite ondulée ou "ripple" ( $P_{\beta}$ ). Les chaînes acyles y sont ordonnées et les diffusions rotationnelle et translationnelle peu importantes. De plus, la membrane a une interface ondulée.

C'est son caractère amphiphile qui permet à la molécule de cholestérol de s'insérer dans la bicouche de lipides. En 1972 (Darke et al., 1972), une étude en RMN du proton a mis en évidence la position relative du cholestérol dans la membrane. La largeur des bandes associées aux groupements méthylènes et au groupement méthyle de la chaîne a permis de constater que les dix premiers groupements méthylènes de la chaîne acyle du phospholipide étaient restreints dans leurs mouvements en présence de cholestérol, ce qui a été interprété par la présence du squelette hydrophobe du cholestérol dans cette région. Les modèles moléculaires placent le groupement hydroxyle près du groupement phosphate de la tête polaire du phospholipide. Une autre étude propose que le groupement hydroxyle du cholestérol établit en fait des liaisons hydrogène avec l'eau, donc est situé à l'interface (Demel et De Kruffyff, 1976). C'est en 1984 (Dufourc et al., 1984) qu'une étude en RMN du  $^2\text{H}$  du cholestérol deutéré a montré l'orientation relative du cholestérol dans la membrane, avec la partie hydrophobe vis-à-vis les chaînes acyles des phospholipides et le groupement hydroxyle vis-à-vis les groupements carbonyles des phospholipides: le cholestérol s'oriente de façon perpendiculaire au plan de la bicouche.

L'insertion du cholestérol dans la bicouche lipidique influence de façon importante le polymorphisme des membranes. En effet, il est connu que le cholestérol ordonne les chaînes acyles des PC en phase liquide-cristalline et qu'il les désordonne en phase gel (pour une revue du sujet, voir l'introduction de Vist et Davis, 1990). Ceci implique que l'aire moléculaire des PC augmente à une température inférieure à la température de transition de phase gel à liquide-cristalline ( $T_m$ ), alors qu'à des  $T > T_m$ , elle diminue (Demel et de Kruffyff, 1976; Needham et al., 1988; Ipsen et al., 1990). Une autre façon d'exprimer ceci est que la présence de cholestérol diminue l'épaisseur de la bicouche à des  $T < T_m$  (désordonne les chaînes), alors qu'il l'augmente à des

températures supérieures à  $T_m$  (ordonne les chaînes) (Ipsen et al., 1990). Également, comme le cholestérol ordonne les chaînes en phase  $L_{\alpha}$ , on remarque une diminution de l'hydratation des lipides à l'interface. Ceci a été remarqué pour les phosphatidylcholines (Jendrasiak et Hasty, 1974; Lundberg et al., 1978; Ter-Minassian-Sagara et Madelmont, 1982; Bach et Miller, 1998), les phosphatidyléthanamines (Marinov et Dufourc, 1996) et les phosphatidylsérines (Bach et Miller, 1998). En phase  $L_{\beta}$ , c'est le contraire qui se produit et l'hydratation de la tête polaire des lipides augmente. Le cholestérol induit aussi un changement au niveau de la perméabilité de la bicouche aux ions ou à l'eau. La perméabilité à l'eau diminue en phase fluide (Bloom et al., 1991) et augmente en phase  $L_{\beta}$  (Demel et De Kruyff, 1976). Ce facteur peut être relié à l'épaisseur de la bicouche.

Cette influence du cholestérol sur les propriétés physiques des phospholipides conduit à l'abolition de la transition de phase  $L_{\beta}$  à  $L_{\alpha}$  à hauts pourcentages de cholestérol. Ce phénomène a été expliqué lors d'études sur le mélange DPPC/chol par la formation d'une nouvelle phase, la phase liquide-ordonnée (*lo*) (Ipsen et al., 1987; Vist et Davis, 1990; McMullen et McElhaney, 1995). Selon Vist et Davis (1990), cette phase existe de manière exclusive à des pourcentages de cholestérol supérieurs à 22 mol%. Deux diagrammes de phase pour le système DPPC/chol ont été proposés (Vist et Davis, 1990 (Figure 1.5); McMullen et McElhaney, 1995). Malgré les divergences qui existent surtout aux basses températures, ils indiquent tous deux la présence d'une telle phase à hauts pourcentages de cholestérol. Huang et al. (1993) proposent aussi la formation d'une phase "liquide-gel" à hauts pourcentages de cholestérol, mais montrent que la longueur des chaînes acyles du phospholipide influence cette formation, des chaînes plus longues nécessitant plus de cholestérol pour la former. La formation de cette phase est expliquée par un effet ambivalent du cholestérol. Le cholestérol peut être considéré comme une impureté dans la membrane, impureté qui déstabilise la phase gel en agissant comme un espaceur entre les molécules de lipides. En même temps, il favorise la rigidification des chaînes acyles des phospholipides de manière à maximiser les interactions de van der Waals entre celles-ci et les faces planes du réseau de cycles du stéroïde. La forme plane du cholestérol serait à l'origine de ce phénomène (Demel et De Kruyff, 1976; Bloch, 1983). Cette proposition est supportée par le fait que le lanostérol, un

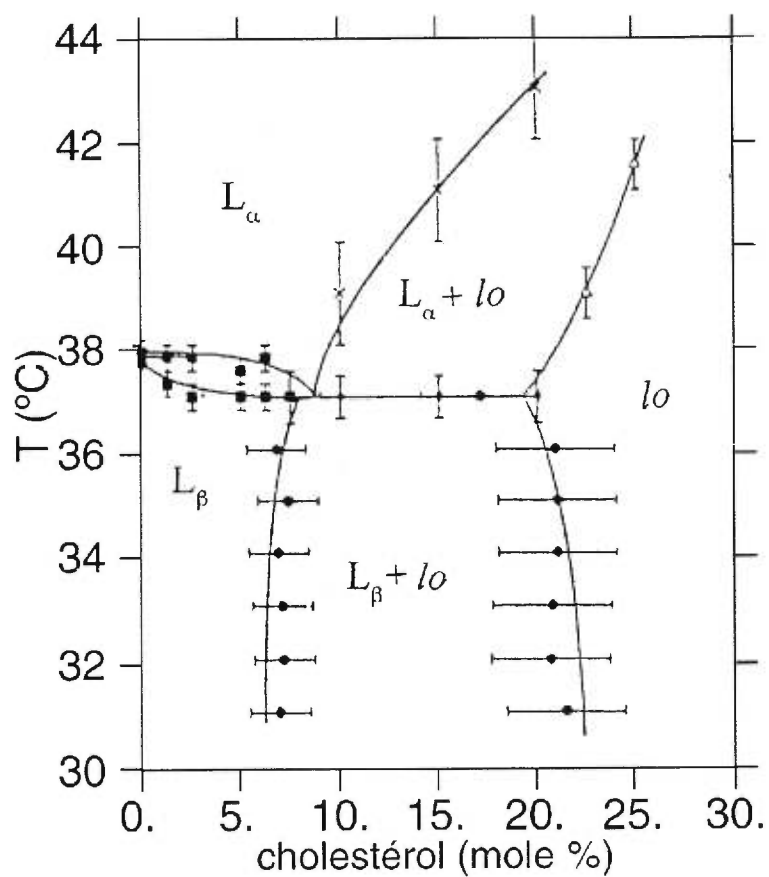


Figure 1.5 Diagramme de phase du mélange DPPC-d<sub>62</sub>/cholestérol, tel que suggéré par Vist et Davis (1990).

précurseur du cholestérol possédant trois groupements méthyles supplémentaires au niveau des cycles stéroïdes, ne présente pas une forme aussi plane et son influence sur l'ordre et la dynamique des chaînes acyles de PC est moins importante que le cholestérol (Urbina et al., 1995). La biosynthèse du cholestérol à partir du lanostérol nécessite plus de 20 réactions enzymatiques (Rawn, 1989), ce qui laisse supposer que l'élimination de ces trois groupements méthyles est vraiment importante pour que le stérol remplisse bien ses fonctions dans la membrane.

La phase liquide-ordonnée possède à la fois des propriétés des phases liquide-cristalline et gel. En effet, elle est caractérisée par un mouvement à symétrie axiale et une diffusion latérale similaires à ceux de la phase liquide-cristalline, mais un ordre orientationnel important des chaînes acyles, comme en phase gel. Également, en phase liquide-ordonnée, la surface est beaucoup moins compressible qu'en phase  $L_{\alpha}$ . En effet, la présence de 50 mol% de cholestérol réduit la compressibilité de la membrane de 1,2-dimyristoyl-*sn*-phosphatidylcholine (DMPC) (Needham et al., 1988) et celle de la 1-stéaroyl-2-oléoyl-*sn*-phosphatidylcholine (Needham et Nunn, 1990) d'un facteur 4, alors que pour la 1,2-diarachidonyl-*sn*-phosphatidylcholine, on constate une diminution de la compressibilité d'un facteur 2 (Needham et Nunn, 1990). De façon inverse, la tension à la rupture augmente de façon significative en présence de cholestérol (Needham et al., 1988; Needham et Nunn, 1990; Bloom et al., 1991). Cette phase liquide-ordonnée existe sur un large intervalle de température dans le cas de la DPPC contenant plus de 22 mol% de cholestérol (Ipsen et al., 1987; Vist et Davis, 1990), même si certains changements structuraux peuvent se produire avec l'augmentation de la température (Reinl et al., 1992; McMullen et McElhaney, 1995). La formation d'une phase liquide-ordonnée similaire a été proposée pour d'autres systèmes phosphatidylcholine/cholestérol (Thewalt et Bloom, 1992; Linseisen et al., 1993). Cette phase est d'un intérêt particulier parce qu'elle pourrait être plus représentative de l'organisation des membranes plasmiques de mammifères étant donné leur important contenu en cholestérol. Il est donc fondamental d'examiner si la formation de cette phase liquide-ordonnée est une tendance générale d'un système lipide/cholestérol ou s'il s'agit d'un comportement particulier aux PC. C'est pourquoi nous avons examiné si le cholestérol conduit à la

formation de cette phase *lo* avec des phosphatidyléthanolamines, des phosphatidylsérines et l'acide palmitique.

Les PE sont les deuxièmes phospholipides en abondance dans les membranes cellulaires des animaux. Le comportement de mélanges PE/chol a déjà été étudié par analyse enthalpique différentielle (AED) (Blume, 1980; Ghosh et Seelig, 1982; Epanand et Bottega, 1987; Cheetham et al., 1989; Takahashi et al., 1996; McMullen et McElhaney, 1997), par RMN à l'état solide (Brown et Seelig, 1978; Blume et Griffin, 1982; Ghosh et Seelig, 1982; Marinov et Dufourc, 1995; Marinov et Dufourc, 1996) et par diffraction des rayons-x (Cheetham et al., 1989; Takahashi et al., 1996). La présence du cholestérol déplace la transition de phase  $L_{\beta}$  à  $L_{\alpha}$  vers les basses températures et cette dernière devient moins coopérative. La transition est abolie à haute concentration de cholestérol pour la plupart des PE (entre 30 et 50 mol%, dépendant du phospholipide) (Brown et Seelig, 1978; Blume et Griffin, 1982; Ghosh et Seelig, 1982; Marinov et Dufourc, 1996; Takahashi et al., 1996; McMullen et McElhaney, 1997). Pour des contenus en cholestérol intermédiaires, la coexistence des phases gel et fluide est présente sous la  $T_m$  de la PE pure (Blume et Griffin, 1982; Takahashi et al., 1996). Cependant, la formation proprement dite de la phase *lo* n'a jamais été rapportée.

En plus de la présence de cholestérol, des facteurs comme la température, la présence d'insaturations dans les chaînes acyles, le type de tête polaire, la présence d'ions dans le milieu et la préparation des échantillons, influencent le polymorphisme des lipides. Les conditions de préparation et d'incubation des échantillons peuvent conduire à la formation de phases thermodynamiquement plus stables. En effet, quelques phases solides plus ou moins hydratées se forment à basses températures (plutôt que la phase  $L_{\beta}$ ). Pour les phosphatidylcholines, une phase subgel se forme lorsque l'échantillon est incubé à basse température pour plusieurs jours après son hydratation (Chen et al., 1980). Lors de la chauffe, le lipide passe de la phase subgel à la phase gel, pour enfin passer à la phase liquide-cristalline. La présence de cette phase a été observée initialement pour la DPPC (Chen et al., 1980). Dans les années subséquentes, plusieurs études ont montré que les phosphatidylcholines ayant des

chaînes acyles saturées de 10 à 18 carbones forment une phase subgel aux basses températures (Nagle et Wilkinson, 1982; Ruocco et Shipley, 1982; Church et al., 1986; Lewis et McElhaney, 1987; Slater et Huang, 1987; Lewis et McElhaney, 1990; Lewis et McElhaney, 1992; Koynova et al., 1995). Les caractéristiques de cette phase sont des chaînes acyles plus ordonnées qu'en phase gel hydratée, de conformation *trans*, et les têtes polaires moins hydratées.

Des études ont alors été réalisées afin de déterminer si les phosphatidyléthanamines formaient aussi des phases gel cristallines après incubation. Une phase gel anhydre (très peu hydratée en réalité) a effectivement été observée pour la DMPE (Mantsch et al., 1983; Mulukutla et Shipley, 1984; Wilkinson et Nagle, 1984; Silvius et al., 1986; Lewis et McElhaney, 1993; Salgado et al., 1995; Takahashi et al., 1997; Takahashi et al., 1997b), la 1,2-dilauroyl-*sn*-phosphatidyléthanamine (DLPE) (Mantsch et al., 1983; Seddon et al., 1983; Seddon et al., 1984; Lewis et McElhaney, 1993) et la 1,2-dipalmitoyl-*sn*-phosphatidyléthanamine (DPPE) (Mantsch et al., 1983; Lewis et McElhaney, 1993). Dans le cas de la DLPE, on rapporte que, dans la phase gel anhydre, environ 2 molécules d'eau se lient à chaque tête polaire, alors que dans la phase gel hydratée, ce nombre grimpe à 6 molécules d'eau par phospholipide (Seddon et al., 1984). Comme dans le cas des PC, ces phases gel anhydres peuvent être formées par une incubation à basse température pendant plusieurs jours. Contrairement à la phase gel hydratée, les PE forment très peu de liens hydrogène avec l'eau, mais plutôt entre elles (d'où la notion de phase gel anhydre). Il semblerait que les liens hydrogène entre les molécules de PE soient plus forts que ceux entre les molécules de PE et l'eau puisque, même en excès d'eau en phase gel, ce sont les liens hydrogène entre les PE qui sont dominants (Akutsu et al., 1981). À cause de ces liens hydrogène intermoléculaires plus forts, la phase gel anhydre est plus stable que la phase gel hydratée. Cette phase gel anhydre a quelques différences par rapport à la phase subgel des phosphatidylcholines. La phase gel anhydre formée par les PE demeure stable même à des températures dépassant la  $T_m$ , ce qui n'est pas le cas des PC (Silvius, 1991). Par exemple, la  $T_m$  de la DMPE pure est de 49° C et la transition de phase gel anhydre à liquide-cristalline se situe entre 53 et 58° C, selon différentes études (Mantsch et al., 1983; Silvius et al., 1986; Lewis et



McElhaney, 1993; Salgado et al., 1995; Takahashi et al., 1997; Takahashi et al., 1997b). La température de transition de phase plus élevée de cette dernière par rapport à la transition de phase gel hydratée à liquide-cristalline est attribuable au fait que, durant la transition, en plus de la fusion des chaînes acyles du lipide, les têtes polaires s'hydratent, entraînant alors le bris des liens hydrogène entre les molécules de PE. Un article faisant la synthèse de ces phases cristallines pour les PC et les PE peut être consulté pour plus d'informations (Silvius, 1991). Comme mentionné précédemment, le cholestérol peut à la fois moduler l'ordre des chaînes acyles et modifier l'hydratation des bicouches lipidiques. On peut alors se demander s'il a un effet sur la formation des phases gel anhydres de la PE et sur la transition vers la phase  $L_{\alpha}$ . Une étude par modélisation et simulations numériques suggère qu'en présence de 5 mol% de cholestérol, il y aurait découplage de la transition de phase gel anhydre à liquide-cristalline pour la DMPE (Lagüe, 1996). Il y aurait une transition à 20° C, résultat de l'hydratation des têtes, et une seconde transition à 49° C, correspondant à la fusion des chaînes. Une étude par AED a montré la présence d'une seule transition pour les PE avec des chaînes de 10 à 17 carbones, alors qu'on a observé deux transitions pour des phosphatidyléthanolamines avec des chaînes de 18 à 20 carbones saturées (Lewis et McElhaney, 1993). Nous avons donc examiné, par spectroscopie IR, si la présence d'une telle quantité de cholestérol dans une matrice de DMPE deutérée sur les deux chaînes (DMPE- $d_{54}$ ) découple effectivement la transition de phase gel anhydre à liquide-cristalline. Nous avons également examiné si les PE à chaînes longues présentaient effectivement deux transitions de phase, leur attribution le cas échéant, et l'influence du cholestérol sur ces transitions.

En plus des phases lamellaires, les lipides peuvent aussi former des phases non-lamellaires. Certains lipides membranaires, une fois isolés puis réhydratés, forment des phases hexagonales, dont la phase hexagonale inverse ( $H_{II}$ ). Dans cette phase, les lipides s'arrangent en couche autour d'un cylindre d'eau, avec les têtes polaires pointant vers le cylindre d'eau (Figure 1.4). Ces cylindres s'arrangent de façon hexagonale, ce qui explique le nom de cette phase. Dans la phase hexagonale normale ( $H_I$ ), ce sont plutôt les chaînes qui sont à l'intérieur du cylindre et les têtes polaires sont en contact avec l'eau à l'extérieur du cylindre. La phase hexagonale inverse pourrait avoir un

certain intérêt biologique puisqu'on pense qu'elle servirait d'intermédiaire dans la fusion membranaire (Verkleij et al., 1984). Un modèle simple a été développé pour rationaliser les tendances polymorphiques des lipides en se basant sur une forme effective de la molécule (Israelachvili et al., 1976). Cette notion est traduite en termes quantitatifs par le paramètre d'empilement ( $p$ ) qui dépend de l'aire interfaciale ( $a$ ) et du volume ( $v$ ) occupés par le lipide, ainsi que de la longueur de ses chaînes ( $\ell$ ) (Israelachvili et al., 1976) et qui se définit de cette façon:

$$p = \frac{v}{a \times \ell} \quad (1)$$

Selon la valeur du paramètre d'empilement, le lipide est associé à une forme effective différente (cylindre, cône) (Figure 1.6), ceci menant à la formation de différentes géométries d'agrégats lipidiques. Dans le cas des phosphatidyléthanolamines, la taille effective de leur tête polaire est petite par rapport à celle des phosphatidylcholines, étant donné que les trois groupements méthyles présents sur la tête polaire des phosphatidylcholines sont remplacés par des atomes d'hydrogène sur la phosphatidyléthanolamine. Ceci leur confère une forme plutôt conique, tandis que les phosphatidylcholines ont plutôt une forme cylindrique. La forme conique est accentuée si, en plus, la phosphatidyléthanolamine possède des chaînes acyles insaturées. Cette forme moléculaire est associée à l'assemblage en phase  $H_{II}$ . Une autre approche décrit le polymorphisme lipidique en termes du rayon de courbure spontané du plan lipidique,  $R_0$ , c'est-à-dire du rayon de courbure d'une couche lipidique en absence d'autres contraintes (Gruner, 1989). La phase formée est principalement dictée par la déformation du plan lipidique par rapport à ce rayon de courbure spontané et la contribution énergétique défavorable associée à la création d'espaces intercylindriques vides lors de la formation de phase non-lamellaires. Une membrane sous forme de bicouche plane aura un rayon de courbure à l'infini.  $R_0$  diminue généralement avec la température (Gruner, 1989). La présence d'insaturations sur les chaînes acyles de la PE diminue  $R_0$  et favorise la formation de la phase  $H_{II}$ .

Le cholestérol favorise la formation de la phase hexagonale. Des études précédentes ont rapporté qu'une quantité limitée de cholestérol conduisait à une

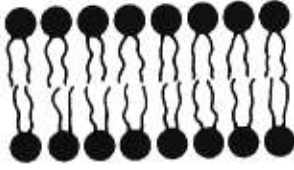

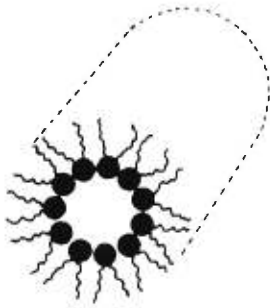
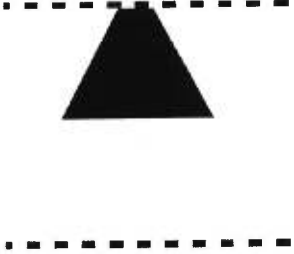
| PHASE  | FORME MOLÉCULAIRE  |
|--|--|
|  <p data-bbox="532 835 652 865">Bicouche</p>      |  <p data-bbox="1047 835 1167 865">Cylindre</p> |
|  <p data-bbox="516 1360 669 1390">Hexagonale</p> |  <p data-bbox="1084 1360 1156 1390">Cône</p>  |

Figure 1.6 Description schématique de la balance amphiphile.

diminution de la température de transition de la phase lamellaire à hexagonale ( $T_h$ ), alors que des proportions en cholestérol supérieures à 30 mol% dans la PE font l'effet inverse et augmentent la  $T_h$  (Epanand et Bottega, 1987; Cheetham et al., 1989; Takahashi et al., 1996). La présence de cholestérol déplace la balance amphiphile puisque cette molécule a une petite tête polaire et une portion hydrophobe importante. En terme du modèle de la forme moléculaire, le cholestérol a un paramètre d'empilement très élevé (Israelachvili et al., 1976). En termes du modèle de courbure, le cholestérol réduit le rayon de courbure spontané de la couche lipidique,  $R_0$ . On a effectivement observé une réduction de l'espace intercyllindrique en phase hexagonale en présence de cholestérol (Cheetham et al., 1989; Takahashi et al., 1996; Chen et Rand, 1997). Pour mieux comprendre l'influence du cholestérol sur la phase  $H_{II}$ , nous avons étudié son effet sur la POPE. Nous avons voulu, entre autres, caractériser son influence sur l'ordre des chaînes acyles de ce phospholipide.

Le cholestérol, à de hautes concentrations, atteint un seuil de solubilité et cristallise dans les membranes. La présence de cholestérol cristallin a déjà été observée en milieu biologique. Par exemple, il y a accumulation de cholestérol dans les lésions artériosclérotiques (Small, 1987). Certaines études faites sur des membranes modèles de stratum corneum ont également montré la présence de cholestérol cristallin dans certaines conditions (Fenske et al., 1994). De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer la solubilité du cholestérol dans différentes membranes pour évaluer en quoi la composition en lipides influençait cette solubilité (Tableau II). La solubilité du cholestérol semble varier en fonction de la tête polaire étudiée. Par exemple, une étude par diffraction des rayons-x rapporte un seuil de solubilité du cholestérol de 66 mol% pour les phosphatidylcholines et de 51 mol% pour les phosphatidyléthanolamines (Huang et al., 1999). Les membranes composées de lipides chargés négativement, comme la phosphatidylsérine, semblent solubiliser encore moins de cholestérol que les membranes de phosphatidyléthanolamine. Par diffraction des rayons-x et AED, on a constaté la présence de cholestérol cristallin à partir d'environ 30 mol% pour différentes PS (Bach, 1984; Wachtel et Bach, 1987; Bach et Wachtel, 1989; Bach et al., 1992; Bach et al., 1998). Dans le cas des PC et des PE, la solubilité du cholestérol ne semble pas être influencée par la longueur de chaîne (Huang et al., 1999). Cependant, il semblerait, dans le cas des PS, que

| Phospholipide             | $\chi_{\text{CHOL}}$ |
|---------------------------|----------------------|
| DLPC <sup>b</sup>         | 0,66                 |
| DMPC <sup>a</sup>         | 0,45                 |
| DPPC <sup>b</sup>         | 0,66                 |
| Egg-PC <sup>a</sup>       | 0,45-0,55            |
| POPC <sup>b</sup>         | 0,66                 |
| DSPC <sup>a</sup>         | > 0,5                |
| di-22:1PC <sup>b</sup>    | 0,66                 |
| Egg-PE <sup>a</sup>       | 0,35-0,40            |
| POPE <sup>b</sup>         | 0,51                 |
| DOPE <sup>a</sup>         | 0,33                 |
| DEPE <sup>a</sup>         | 0,35-0,40            |
| DMPS <sup>a</sup>         | 0,37                 |
| POPS <sup>a</sup>         | 0,36                 |
| SOPS <sup>a</sup>         | 0,2                  |
| PS naturelle <sup>a</sup> | 0,3                  |

Tableau II Solubilité maximale du cholestérol ( $\chi_{\text{CHOL}}$ ) dans différentes matrices de phospholipides. Données obtenues <sup>a</sup>de Bach et al., 1998 et <sup>b</sup>de Huang et al., 1999.

la longueur des chaînes acyles ait une influence sur la solubilité du cholestérol puisqu'avec la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-phosphatidylsérine une solubilité maximale est atteinte à 36 mol% de cholestérol, alors qu'avec la 1-stéaroyl-2-oléoyl-*sn*-phosphatidylsérine, on obtient une solubilité maximale à 20 mol% de cholestérol (Bach et al., 1992).

Récemment, Huang et al. (1999) ont montré que certaines méthodes de préparation des échantillons peuvent conduire à des artefacts et influencer la limite de solubilité du cholestérol dans les membranes lipidiques. Un autre problème se pose dans la caractérisation de la limite de solubilité du cholestérol: la difficulté technique de la détermination. Par la diffraction des rayons-x, le seuil de solubilité est identifié à partir de l'apparition du patron de diffraction du cholestérol cristallin. Dans ce cas, les cristaux doivent être suffisamment gros et nombreux pour mener à un patron détectable. L'AED, autre technique utilisée dans la mesure de la limite de solubilité du cholestérol dans les membranes lipidiques, est aussi peu sensible. Une transition cristal-cristal du cholestérol apparaît à environ 38° C quand il y a présence de cholestérol cristallin. Cette transition implique peu d'énergie, il faut donc qu'il y ait une quantité appréciable de cholestérol cristallisé pour l'observer. On peut aussi utiliser le marquage isotopique avec le deutérium puisque l'échantillon cristallin donne un spectre caractéristique. Le problème est que le cholestérol deutéré est cher et que l'acquisition de spectres est longue, vu le temps de relaxation spin-réseau très long pour le cholestérol cristallin. C'est pourquoi nous voulons développer une méthode en RMN à deux dimensions qui ne nécessiterait aucun marquage isotopique.

### 1.3 Les peptides

La membrane cellulaire contient aussi des protéines. Plusieurs de ces protéines possèdent des segments transmembranaires. Ces segments sont souvent constitués de séquences d'acides aminés hydrophobes formant des hélices- $\alpha$  suffisamment longues pour traverser la portion hydrophobe de la membrane lipidique. Les peptides sont souvent utilisés pour modéliser ces segments transmembranaires des protéines.

Dans les années 70, on a remarqué dans les membranes de bactérie que la présence de protéines, qui constituaient jusqu'à 50% en poids, n'affectait pas, ou très peu, l'ordre orientationnel des chaînes acyles des phospholipides de la membrane (Bloom, 1979). Deux phénomènes sont proposés pour expliquer ce fait. D'abord, malgré une structure relativement rigide du cœur de l'hélice, la région périphérique des segments transmembranaires serait plutôt déformable ("squishy"), ce qui permettrait une jonction mécanique relativement douce entre le peptide et la membrane lipidique en phase liquide-cristalline (Bloom, 1979). Deuxièmement, quelques années plus tard, Mouritsen et Bloom (1984) ont proposé que c'est la concordance entre les longueurs des régions hydrophobes de la bicouche et des segments transmembranaires des protéines qui est à l'origine de l'absence d'influence des protéines sur le changement d'ordre orientationnel au niveau des chaînes acyles du phospholipide. Ils ont identifié l'élasticité comme paramètre-clé dans les interactions entre les hélices- $\alpha$  transmembranaires et les bicouches lipidiques dans le cadre du modèle du "matelas". Dans ce modèle, on représente les peptides transmembranaires comme une distribution de ressorts avec une constante de ressort,  $A_P$ , dans une matrice lipidique avec une constante de ressort,  $A_L$ , possédant une valeur beaucoup plus petite que  $A_P$ . Dans ce modèle, le lipide s'adapte au peptide et non le contraire. Pour minimiser la contribution hydrophobe à l'énergie,  $H_E^{\text{hydrophobe}}$ , la différence de longueur des sections hydrophobes du peptide,  $d_P$ , et du lipide,  $d_L$ , tend vers 0:

$$H_E^{\text{hydrophobe}} = \frac{n_L n_P}{n_L + n_P} B_{LP} |d_P - d_L| \quad (2)$$

où  $n_L$  et  $n_P$  représentent le nombre de molécules de lipide et de peptide, respectivement, et où  $B_{LP}$  représente le paramètre d'interaction hydrophobe. Ceci entraîne une énergie de déformation élastique,  $H_E^{\text{élastique}}$ , qui dépend de la différence entre la longueur du segment hydrophobe,  $d$ , et de sa longueur à l'équilibre,  $d^0$ , pour les lipides (avec l'indice L) et les peptides (avec l'indice P):

$$H_E^{\text{élastique}} = n_L A_L (d_L - d_L^0)^2 + n_P A_P (d_P - d_P^0)^2 \quad (3)$$

S'il y a concordance entre les longueurs des régions hydrophobes du peptide et du lipide (c'est-à-dire si  $d_L^0 = d_P^0$ ), aucune déformation élastique et, par conséquent, aucun

changement d'ordre orientationnel des chaînes acyles des phospholipides n'est observé. Par contre, l'inégalité entre la portion hydrophobe des lipides et des protéines peut conduire à des modifications de l'ordre des chaînes lipidiques (Nezil et Bloom, 1992) ou à une réorganisation de l'assemblage peptide/lipide, tel que résumé à la figure 1.7 (Killian, 1998).

Il est proposé que, durant l'évolution, la nature a sélectionné les protéines dont les segments hydrophobes correspondent à l'épaisseur de la membrane où elles sont reconstituées, ce qui explique qu'on ne voit aucun effet des protéines sur l'ordre orientationnel des chaînes acyles des lipides (Mouritsen et Bloom, 1984). Plus récemment, le modèle du matelas a été évoqué pour expliquer une étape du tri des protéines (Bretscher et Munro, 1993). En effet, ces auteurs ont remarqué que les sections hydrophobes moyennes des protéines du Golgi sont plus courtes que celles des protéines de la membrane plasmique. L'appareil de Golgi sert de lieu de transit pour les protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique avant d'aboutir à la membrane plasmique. Ces protéines doivent donc quitter sélectivement l'appareil de Golgi, laissant derrière elles les protéines qui y sont associées. Comme on l'a vu précédemment, le cholestérol rend la membrane lipidique plus épaisse en rigidifiant les chaînes acyles des lipides. Les auteurs suggèrent qu'il existe dans la membrane de l'appareil de Golgi une séparation de phase où coexistent des régions riches en cholestérol (donc épaisses) et pauvres en cholestérol (donc plus minces). Les protéines du Golgi et celles destinées à la membrane plasmique se distribueraient donc dans ces domaines selon la longueur de leur segment hydrophobe. Les protéines de la membrane plasmique quitteraient de façon sélective l'appareil de Golgi sur des radeaux lipidiques ("lipid rafts") riches en cholestérol.

Inspirés par la différence d'effet sur les lipides du cholestérol et du lanostérol, nous nous sommes demandé si, en plus de la longueur de la portion hydrophobe, la topologie de la surface de l'hélice a un effet sur l'ordre des chaînes des lipides. Pour étudier ce point, nous avons examiné l'effet sur les bicouches lipidiques de deux peptides avec la même longueur hydrophobe, mais de topologies de surface différentes. La RMN



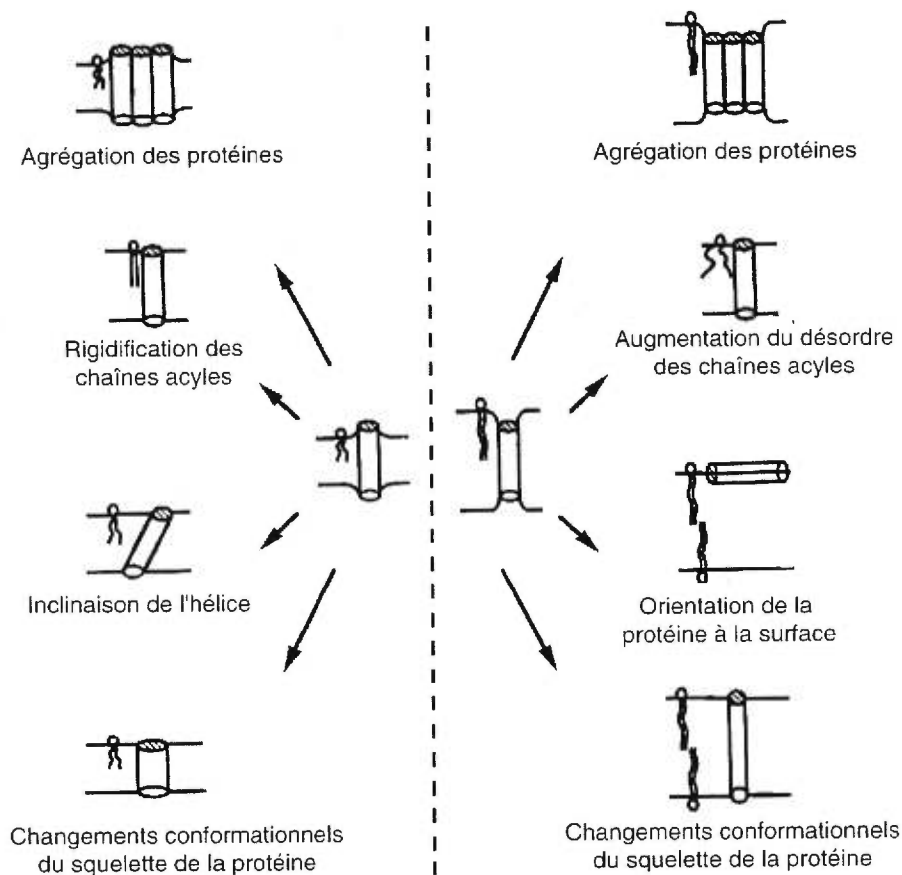


Figure 1.7 Représentation schématique de quelques-unes des conséquences possibles d'une non-concordance des segments hydrophobes du lipide et du peptide quand le segment hydrophobe de la protéine est plus long (gauche) ou plus court (droite) que l'épaisseur hydrophobe de la bicouche lipidique (Killian, 1998).

du  $^2\text{H}$  a été utilisée pour déterminer les changements d'ordre des chaînes des lipides induits par l'ajout de l'un ou l'autre des peptides,  $\text{L}_{24}$  ou  $(\text{LA})_{12}$ .

Les études présentées dans cette thèse cherchent à répondre à plusieurs des questions posées tout au long de cette introduction. Avant de détailler les projets, le chapitre 2 est consacré à la théorie associée aux deux techniques spectroscopiques utilisées, soit les spectroscopies IR et RMN. Le chapitre 3 décrit les détails des expériences effectuées. Le chapitre 4 décrit l'influence du cholestérol sur des phosphatidyléthanamines, une phosphatidylsérine et l'acide palmitique. Plus particulièrement, nous examinons si la formation de la phase liquide-ordonnée est possible dans ces matrices. Le chapitre 5 est consacré à la technique RMN 2D "wideline separation" pour examiner si cette approche peut donner, sans marquage isotopique, de l'information sur la cristallisation du cholestérol. Enfin, au chapitre 6, nous étudions deux peptides transmembranaires ayant la même longueur mais des topologies de surface différentes. Dans sa région hydrophobe, l'un sera composé exclusivement de leucines ( $\text{L}_{24}$ ), tandis que l'autre sera une alternance de leucines et d'alanines ( $(\text{LA})_{12}$ ). Ceci confère au premier une surface "lisse", alors que le second possède une surface plus "rugueuse".

## CHAPITRE 2

### TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

#### 2.1 Spectroscopie IR

L'utilisation de la spectroscopie infrarouge permet d'obtenir de l'information rapidement, nécessite peu d'échantillon et aucun marquage isotopique, d'où son intérêt. Plusieurs bandes de vibration peuvent être étudiées pour obtenir de l'information sur les chaînes acyles (ordre conformationnel) ou la tête polaire (principalement sur son hydratation) des phospholipides. Un spectre caractéristique d'un lipide en phase  $L_\alpha$  est présenté à la figure 2.1.

L'étude de la région des vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique des  $\text{CH}_2$  des chaînes acyles du lipide ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), bandes situées à environ  $2850$  et  $2920 \text{ cm}^{-1}$  (Mantsch et McElhaney, 1991), respectivement, nous renseigne sur l'ordre conformationnel des chaînes du lipide. Par exemple, la transition de la phase gel à liquide-cristalline se traduit par une augmentation abrupte de la fréquence de  $\nu_{\text{C-H}}$  puisqu'une augmentation du nombre de conformères *gauche* y est associée. La fréquence de ces bandes est principalement sensible à l'isomérisation *trans/gauche*, mais aussi au couplage vibrationnel intermoléculaire et aux mouvements de librotorsion des chaînes (Kodati et al., 1994). Nous pouvons donc étudier par spectroscopie IR l'impact de constituants sur le thermotropisme de phospholipides. La région d'élongation symétrique et antisymétrique des  $\text{CD}_2$ , bandes situées à  $2090 \text{ cm}^{-1}$  et  $2195 \text{ cm}^{-1}$ , respectivement, peut également être utilisée pour caractériser le polymorphisme dans le cas de lipides portant des chaînes deutérées.

La bande de déformation des groupements  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{CH}_2}$ ) des chaînes acyles du lipide peut aussi être étudiée afin d'obtenir de l'information sur l'arrangement des chaînes acyles selon la température. En effet, l'éclatement de la bande en deux composantes (centrées à environ  $1466$  et  $1474 \text{ cm}^{-1}$ ) résulte d'un arrangement orthorhombique, alors

## CHAPITRE 2

### TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES

#### 2.1 Spectroscopie IR

L'utilisation de la spectroscopie infrarouge permet d'obtenir de l'information rapidement, nécessite peu d'échantillon et aucun marquage isotopique, d'où son intérêt. Plusieurs bandes de vibration peuvent être étudiées pour obtenir de l'information sur les chaînes acyles (ordre conformationnel) ou la tête polaire (principalement sur son hydratation) des phospholipides. Un spectre caractéristique d'un lipide en phase  $L_{\alpha}$  est présenté à la figure 2.1.

L'étude de la région des vibrations d'élongation symétrique et antisymétrique des  $\text{CH}_2$  des chaînes acyles du lipide ( $\nu_{\text{C-H}}$ ), bandes situées à environ  $2850$  et  $2920 \text{ cm}^{-1}$  (Mantsch et McElhaney, 1991), respectivement, nous renseigne sur l'ordre conformationnel des chaînes du lipide. Par exemple, la transition de la phase gel à liquide-cristalline se traduit par une augmentation abrupte de la fréquence de  $\nu_{\text{C-H}}$  puisqu'une augmentation du nombre de conformères *gauche* y est associée. La fréquence de ces bandes est principalement sensible à l'isomérisation *trans/gauche*, mais aussi au couplage vibrationnel intermoléculaire et aux mouvements de librotorsion des chaînes (Kodati et al., 1994). Nous pouvons donc étudier par spectroscopie IR l'impact de constituants sur le thermotropisme de phospholipides. La région d'élongation symétrique et antisymétrique des  $\text{CD}_2$ , bandes situées à  $2090 \text{ cm}^{-1}$  et  $2195 \text{ cm}^{-1}$ , respectivement, peut également être utilisée pour caractériser le polymorphisme dans le cas de lipides portant des chaînes deutérées.

La bande de déformation des groupements  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{CH}_2}$ ) des chaînes acyles du lipide peut aussi être étudiée afin d'obtenir de l'information sur l'arrangement des chaînes acyles selon la température. En effet, l'éclatement de la bande en deux composantes (centrées à environ  $1466$  et  $1474 \text{ cm}^{-1}$ ) résulte d'un arrangement orthorhombique, alors

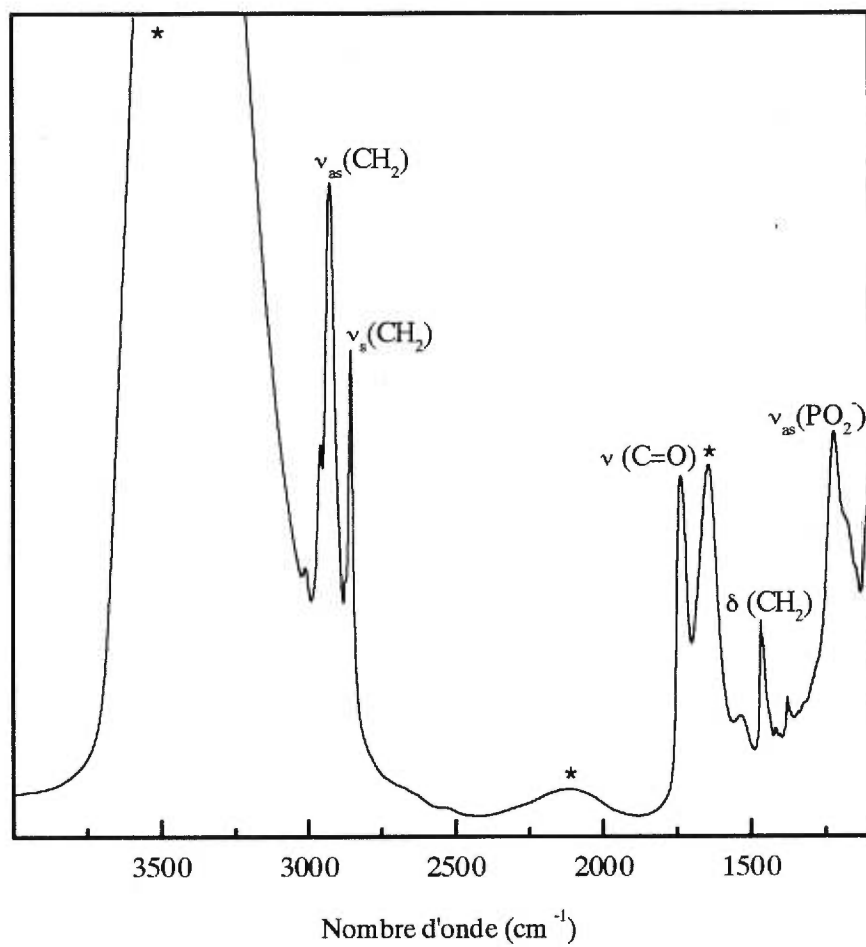


Figure 2.1 Spectre infrarouge d'un lipide en phase liquide-cristalline.

\* bandes de l'eau

qu'une seule bande (centrée à environ  $1468\text{ cm}^{-1}$ ) résulte plutôt d'un arrangement hexagonal ou d'un empilement sans symétrie définie (Cameron et al., 1980). Par la suite, on a montré que l'éclatement de la bande de déformation des groupements  $\text{CD}_2$  ( $\delta_{\text{CD}_2}$ ) s'effectue aussi, et pour les mêmes raisons, dans le cas de lipides deutérés (Snyder et al., 1992; Snyder et al., 1995). Les deux composantes se situent autour de  $1086$  et  $1091\text{ cm}^{-1}$ , alors que s'il n'y a qu'une composante, elle est centrée à environ  $1088\text{ cm}^{-1}$ . La division de la bande résulte d'un couplage vibrationnel interchaîne, les deux composantes venant des vibrations en phase et hors-phase des deux chaînes. L'éclatement entre les deux composantes de la bande dépend de la grandeur des domaines cristallins pour devenir maximal lorsque ceux-ci atteignent 100 molécules et plus (Snyder et al., 1992; Snyder et al., 1995). De plus, la présence des deux composantes est une indication que la fréquence de vibration de déformation de la molécule considérée est semblable à celle des molécules voisines; ce paramètre constitue donc une sonde de séparation de phase si le système étudié est constitué de lipides hydrogénés et deutérés.

La bande d'élongation des groupements carbonyles ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) est une sonde sensible pour l'étude de l'hydratation de l'interface. Il est bien connu que cette bande a deux composantes, bien mises en évidence par l'auto-déconvolution de Fourier. La composante de haute fréquence, observée à  $1740\text{ cm}^{-1}$ , est associée aux groupements carbonyles libres, alors que la composante de basse fréquence, observée à  $1725\text{ cm}^{-1}$ , est associée aux groupements carbonyles formant des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau (Blume et al., 1988; Lewis et al., 1994). Une augmentation de l'intensité relative de la bande de basse fréquence par rapport à celle de haute fréquence indique que les groupements carbonyles deviennent plus accessibles à l'eau: c'est ce qui est généralement observé lors de la transition de phase  $L_\beta$  à  $L_\alpha$  (Blume et al., 1988). De façon inverse, une augmentation de l'intensité relative de la bande de haute fréquence par rapport à celle de basse fréquence indique une déshydratation au niveau de l'interface du lipide. Ceci est observé pour la comparaison entre les PE et les PC puisque les têtes polaires des PE sont généralement moins hydratées que celles des PC (Mantsch et al., 1983) à cause des liens hydrogène entre les PE qu'elles forment. Certains auteurs ont

constaté avec certaines PE la présence d'une troisième composante vers  $1714 \text{ cm}^{-1}$  (Lewis et McElhaney, 1993) dans la région  $\nu_{\text{C=O}}$ . Ils suggèrent, qu'en plus de la bande correspondant aux groupements carbonyles libres, il y aurait deux populations de groupements carbonyles formant des liaisons hydrogène: celle impliquant des liens hydrogène avec l'eau et celle impliquant des liens hydrogène entre les PE. Ces liens hydrogène seraient plus forts et donneraient lieu à une bande à une fréquence plus faible (Lewis et McElhaney, 1993).

La bande d'élongation antisymétrique des  $\text{PO}_2^-$  de la tête polaire du lipide, bande située autour de  $1222 \text{ cm}^{-1}$ , nous renseigne également sur l'hydratation de la tête polaire du lipide. Un déplacement vers les hautes fréquences a été associé aux groupements phosphates formant moins de liaisons hydrogène avec l'eau (Sen et al., 1988; Wong et Mantsch, 1988).

## 2.2 Spectroscopie RMN

La spectroscopie RMN est une autre technique très utile dans l'étude de la structure et de la dynamique des phospholipides. C'est une technique plus coûteuse et moins sensible que l'IR, mais elle apporte de l'information complémentaire très importante. Faisons d'abord un survol rapide de la théorie de la RMN en général, pour ensuite s'attarder aux méthodes spécifiques utilisées dans le cadre de cette thèse.

Un noyau ayant un spin  $I$  non nul possède un moment magnétique,  $\mu$ . En absence de champ magnétique, l'orientation des moments magnétiques est aléatoire. Par contre, en présence d'un champ magnétique  $\vec{B}$ , seules certaines orientations sont permises. L'interaction entre ce moment magnétique et le champ magnétique, l'effet Zeeman, est décrite par:

$$E_z = -\mu_z B = -m_I \gamma \hbar B \quad (4)$$

où  $\gamma$  est le rapport gyromagnétique, un scalaire reliant le spin nucléaire et le moment magnétique, dont la valeur est caractéristique pour chacun des noyaux. Selon le spin du noyau étudié, le moment magnétique aura un nombre d'orientations (et donc de niveaux

d'énergie) possibles correspondant à  $2I + 1$ . Chacune de ces différentes orientations possède donc une valeur propre,  $m_I(I, -I+1, \dots, I-1, I)$ . La précession du moment magnétique autour de l'axe z (axe du champ magnétique) se fait à une fréquence caractéristique, la fréquence de Larmor ( $\nu_0$ ), définie par:

$$\nu_0 = \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (5)$$

La différence d'énergie entre deux niveaux consécutifs sera fonction de cette fréquence  $\nu_0$  selon

$$\Delta E = h\nu_0 \quad (6)$$

Dans l'approximation d'un champ fort, l'énergie d'un noyau ayant un moment magnétique peut être écrit comme suit:

$$E = E_Z + \Delta E_D + \Delta E_{CSA} + \Delta E_{SC} + \Delta E_Q \quad (7)$$

$E_Z$ , l'effet Zeeman, est l'interaction dominante. Son énergie est de l'ordre de  $10^7$  à  $10^9$  Hz pour des noyaux  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  dans un champ de 7 T. L'énergie  $\Delta E_{CSA}$  correspond à l'anisotropie du déplacement chimique. Le champ magnétique ressenti par le noyau dépend du champ magnétique imposé par l'aimant, mais aussi de celui généré par les électrons autour du noyau qui, dans l'aimant, se déplacent selon des directions privilégiées. Cette densité électronique autour du noyau est anisotrope, ce qui fait que le champ généré dépend donc de l'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique. En conditions isotropes (en solution, par exemple), le mouvement rapide des molécules cause un moyennage et une bande étroite est obtenue. La fréquence associée à cette bande nous permet d'identifier les groupements composant la molécule étudiée. Par contre, en RMN à l'état solide, comme les molécules sont plus statiques, les différentes orientations de la molécule par rapport au champ magnétique contribuent à différentes fréquences dans le spectre et le signal est donc large pour un échantillon de poudre. L'énergie associée à cette interaction varie de 0 à  $10^4$  Hz. Le couplage spin-spin,  $\Delta E_{SC}$ , est à l'origine des multiplets en conditions isotropes. Il résulte du couplage entre les spins nucléaires à travers ceux des électrons impliqués dans les liaisons covalentes et est indépendant de l'orientation des molécules par rapport au champ



magnétique. La plupart du temps, en RMN à l'état solide, cette interaction est négligeable, son énergie variant de 0 à  $10^3$  Hz.

L'interaction dipolaire,  $\Delta E_D$ , représente l'interaction à travers l'espace entre le dipôle magnétique du noyau étudié et les dipôles magnétiques voisins. Les champs magnétiques associés à ceux-ci s'ajoutent ou s'opposent localement au champ magnétique de l'aimant. Son énergie varie de 0 à  $10^4$  Hz et dépend de l'orientation des noyaux par rapport au champ magnétique, de la distance entre deux noyaux, ainsi que de leur rapport gyromagnétique. En présence de mouvements rapides isotropes, cette contribution est moyennée à zéro et ne contribue qu'à la relaxation. Par contre, en RMN à l'état solide, les couplages dipolaires ont pour conséquence d'élargir les bandes, ce qui donne de l'information sur la dynamique.

Finalement, l'interaction quadrupolaire,  $\Delta E_Q$ , existe pour des noyaux dont le spin est plus grand que 1/2. Elle n'est pas négligeable dans certains cas, pouvant varier de 0 à  $10^9$  Hz. Pour ces noyaux, il existe un moment quadrupolaire électrique,  $eQ$  ( $e$  est la charge élémentaire et  $Q$ , le quadrupôle du noyau) provenant de la distribution non sphérique des charges positives du noyau. C'est l'interaction entre ce quadrupôle et un gradient de champ électrique qui se nomme l'interaction quadrupolaire. Dans le cas des chaînes acyles deutérées, par exemple, il existe un gradient de champ électrique associé à la distribution de densité électronique le long du lien C-D. L'énergie associée à cette interaction dépend de l'orientation du moment magnétique du noyau par rapport à la direction du gradient de champ électrique, donc de l'orientation de la molécule par rapport au champ magnétique. Ici aussi, en solution, les interactions quadrupolaires sont moyennées à zéro à cause des mouvements rapides, mais sont observables à l'état solide.

### 2.2.1 Spectroscopie RMN du $^2\text{H}$

Dans le cas de la RMN du  $^2\text{H}$ , à part l'effet Zeeman, c'est l'interaction quadrupolaire qui domine. Comme le couplage quadrupolaire conduit à des variations maximales de fréquences de l'ordre de 250 kHz, comparativement à l'effet Zeeman, qui

est de l'ordre du MHz, on peut en fait considérer l'interaction quadrupolaire comme une perturbation de l'interaction Zeeman. L'interaction dipolaire et l'anisotropie du déplacement chimique sont considérées comme négligeables, donnant un déplacement maximal de 4 kHz et 1 kHz, respectivement (Davis, 1983). Elles conduisent tout au plus à un élargissement des bandes. Si on ne considère qu'un seul noyau deutérium, trois orientations du moment magnétique par rapport au champ magnétique sont possibles et l'énergie associée à chacune se traduit par:

$$E_m = -\gamma\hbar B m_I + \frac{e^2 q Q}{4} \left( \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) (3m_I^2 - 2) \quad (8)$$

le premier terme décrivant l'interaction Zeeman et le deuxième, l'interaction quadrupolaire.  $\theta$  représente l'angle entre le gradient de champ électrique et le champ magnétique. Si l'on remplace les valeurs propres des orientations possibles ( $m_I = -1, 0$  et  $1$ ), les énergies spécifiques associées à chacun des niveaux sont:

$$E_{(m=+1)} = -\gamma\hbar B + \frac{1}{4} e^2 q Q \left[ \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right] \quad (9)$$

$$E_{(m=0)} = -\frac{1}{2} e^2 q Q \left[ \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right] \quad (10)$$

$$E_{(m=-1)} = \gamma\hbar B + \frac{1}{4} e^2 q Q \left[ \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right] \quad (11)$$

Deux transitions d'énergie sont possibles puisque la règle de sélection est  $\Delta m_I = 1$  pour l'absorption, soit de  $m_I = +1$  à  $m_I = 0$  et de  $m_I = 0$  à  $m_I = -1$ . L'énergie impliquée dans ces deux transitions est:

$$\Delta E_- = \gamma\hbar B + \frac{3}{4} e^2 q Q \left[ \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right] \quad (12)$$

et

$$\Delta E_+ = \gamma\hbar B - \frac{3}{4} e^2 q Q \left[ \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right] \quad (13)$$

Si on ne considère que l'interaction Zeeman, ces deux transitions sont de même énergie,  $\gamma\hbar B$ . Par contre, l'interaction quadrupolaire déplace les niveaux d'énergie et les deux

transitions n'impliquent alors plus la même énergie et on observe un doublet (Figure 2.2). Ce doublet sera séparé par ce qu'on appelle l'éclatement quadrupolaire,  $\Delta\nu_Q$ :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3 e^2qQ}{2 h} \left( \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right) \quad (14)$$

où  $e^2qQ/h$  représente la constante de couplage quadrupolaire statique; elle est de 167 kHz pour un lien C-D aliphatique (Davis, 1983).

### 2.2.1.1 Cas d'un seul site deutéré sur une molécule

Dans le cas d'un seul site immobile, on aura un seul doublet dont l'éclatement quadrupolaire dépend de l'angle que fait le lien C-D avec le champ magnétique (Figure 2.3a). Si on a une poudre de ces molécules immobiles, elles ont des orientations différentes par rapport au champ magnétique (différent angle  $\theta$ ) et on obtient ce qu'on appelle un spectre de poudre (Figure 2.3b). Comme la probabilité d'orientations de la molécule par rapport au champ magnétique varie comme  $\sin\theta d\theta$  pour une poudre (i.e. une distribution aléatoire), l'intensité du spectre est différente selon l'orientation, la plus importante étant à un angle  $\theta$  de  $90^\circ$ .

Si on considère un système pour lequel la molécule tourne rapidement autour d'un axe (un système à symétrie axiale), les interactions quadrupolaires sont partiellement moyennées par ce mouvement et ceci affecte l'éclatement quadrupolaire. Les lipides en phase fluide possèdent une rotation suffisamment rapide sur l'échelle de temps RMN pour qu'on obtienne un système à symétrie axiale. On peut alors diviser l'angle  $\theta$  en deux angles: l'angle entre le lien C-D et l'axe de symétrie de la rotation (généralement considéré comme la normale à la surface de la bicouche pour les lipides) (angle  $\beta'$ ) et l'axe de symétrie de la rotation par rapport au champ magnétique (angle  $\beta$ ). Ces différents angles sont schématisés à la figure 2.2a. Certains auteurs tiennent compte du balancement du lipide par rapport à la normale à la bicouche en introduisant un troisième angle dans la description de l'éclatement quadrupolaire. Le paramètre d'ordre

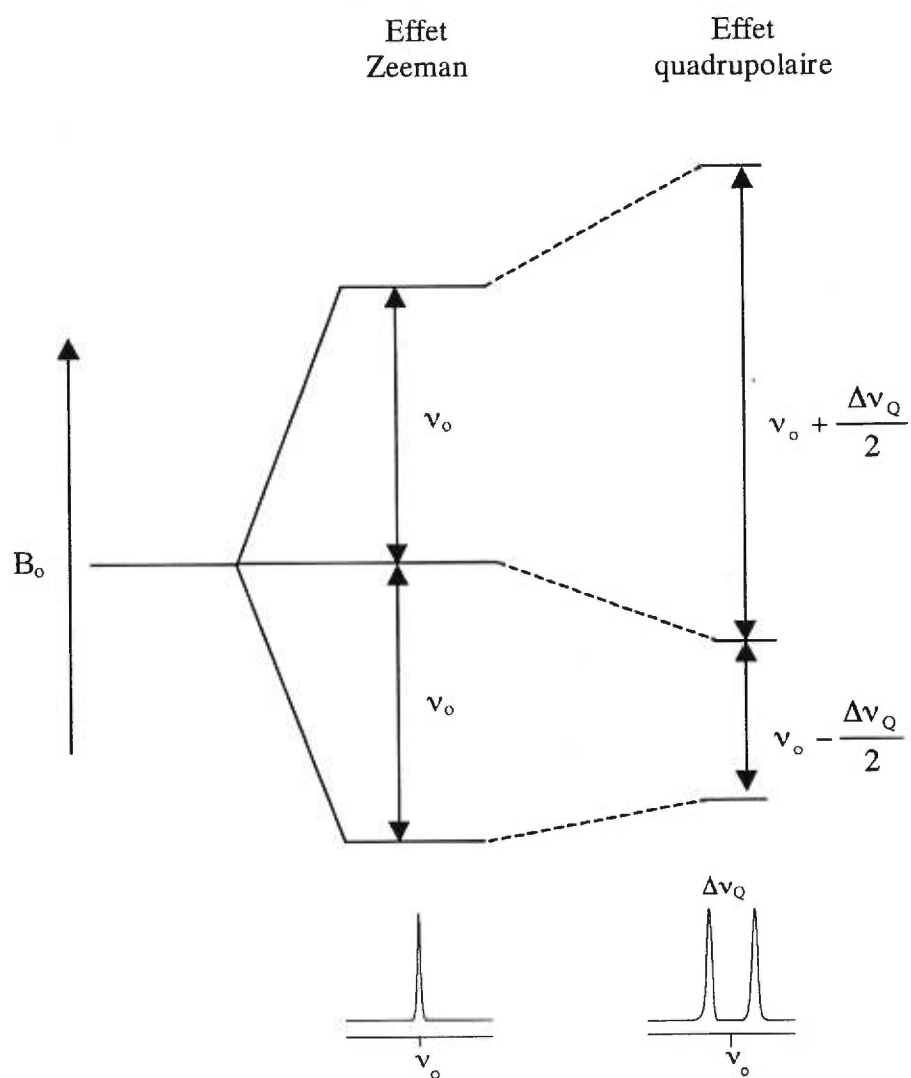


Figure 2.2 Représentation schématique du déplacement des niveaux d'énergie provoqué par l'effet quadrupolaire et exemples de spectres avec et sans effet quadrupolaire.

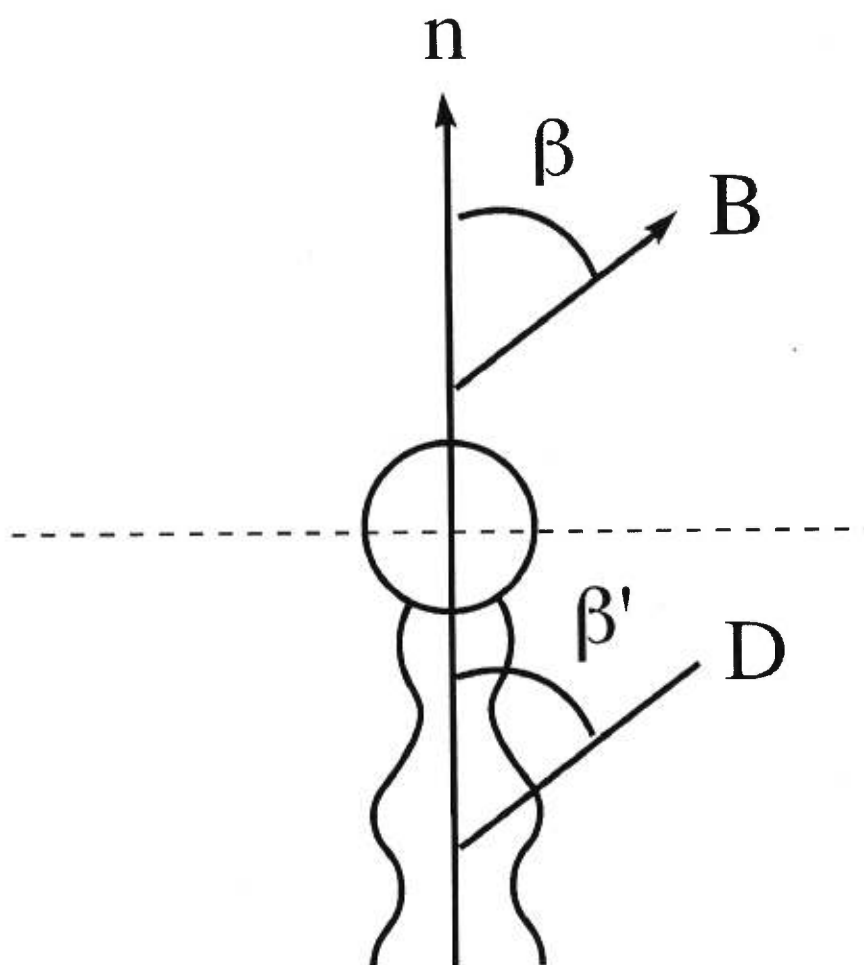


Figure 2.2a Représentation schématique d'un phospholipide et identification des différents angles considérés en RMN du  $^2\text{H}$ .

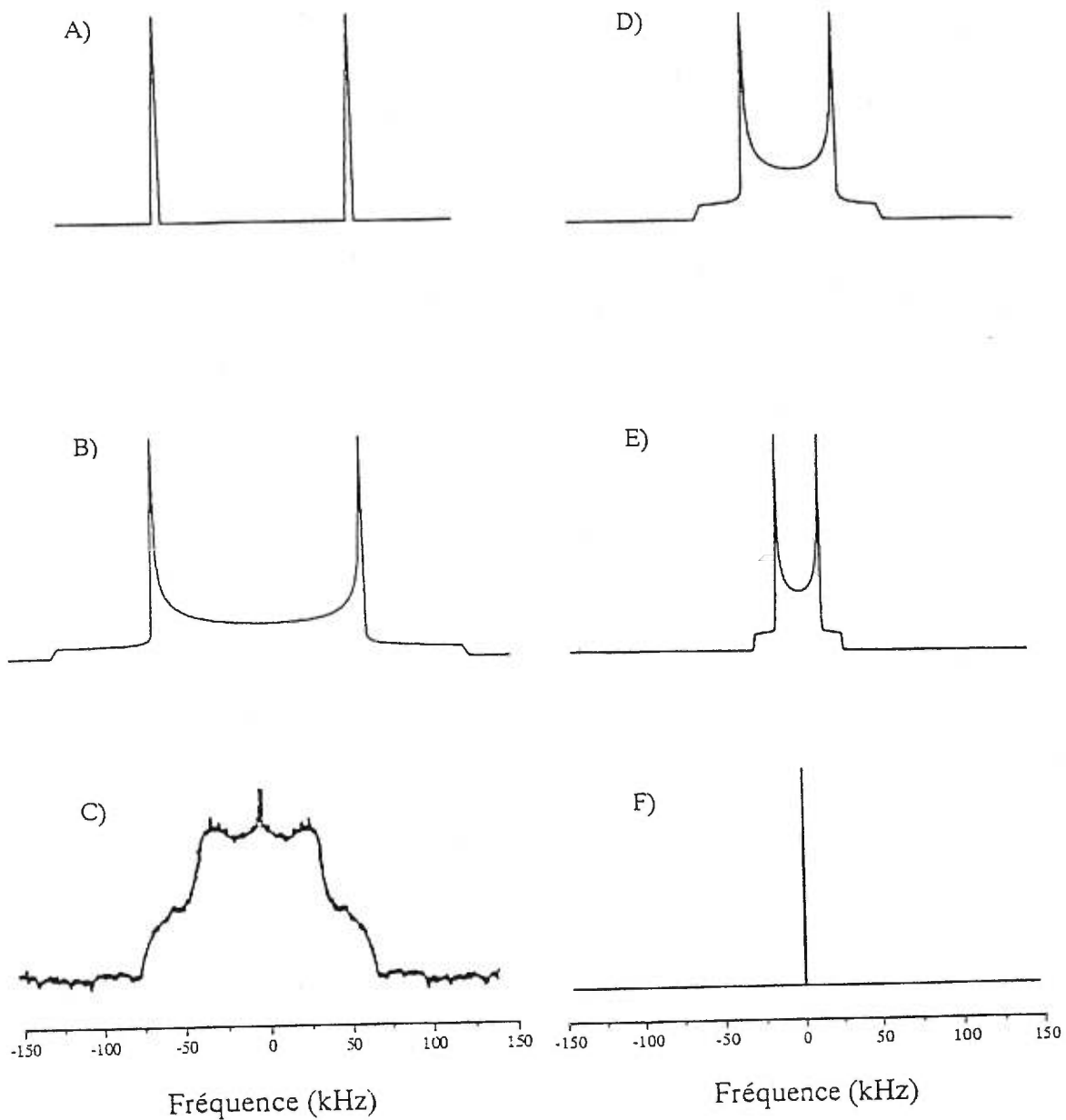


Figure 2.3 Exemples de spectres RMN du  $^2\text{H}$  pour a) un seul lien C-D sur la molécule immobile b) une distribution aléatoire de molécules immobiles avec un lien C-D c) la phase gel d) la phase liquide-cristalline e) la phase hexagonale et f) une raie étroite où les mouvements sont rapides et isotropes.

moléculaire,  $S_{\text{mol}}$ , est décrit par  $\frac{3\cos^2\gamma - 1}{2}$ , où  $\gamma$  est l'angle entre la normale à la bicouche et l'axe le long du lipide. Les chercheurs ne s'entendent pas sur la valeur de  $S_{\text{mol}}$  (Seelig et Seelig, 1974; Meraldi et Schlitter, 1981; Meier et al., 1986; Salmon et al., 1987) et nous avons inclus les mouvements de balancement d'axe moléculaire du lipide dans la mesure de l'éclatement quadrupolaire (i.e  $S_{\text{mol}}=1$ ), qui se traduit donc maintenant par

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2} \frac{e^2qQ}{h} \left( \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \left\langle \frac{3\cos^2\beta' - 1}{2} \right\rangle \quad (15)$$

Le terme impliquant  $\beta'$  est placé entre crochets parce qu'il s'agit d'une moyenne en fonction du temps, l'angle  $\beta'$  variant généralement rapidement sur l'échelle de temps RMN (de l'ordre de  $10^{-6}$  s), à cause des mouvements des lipides en phase fluide, tel l'isomérisation *trans/gauche* (qui est de l'ordre de  $10^{-10}$  s (Meier et al., 1986)). Ce terme est donc une mesure de l'ordre orientationnel de la chaîne acyle du lipide, terme que l'on nomme le paramètre d'ordre,  $S_{\text{C-D}}(n)$ :

$$S_{\text{C-D}}(n) = \left\langle \frac{3\cos^2\beta' - 1}{2} \right\rangle \quad (16)$$

où  $n$  est la position du méthylène deutéré sur la chaîne acyle, le premier carbone étant le groupement carbonyle à l'interface. Pour les chaînes de conformation *trans* et perpendiculaires à la bicouche,  $\beta'$  correspond à  $90^\circ$  et le paramètre d'ordre possède la valeur maximale de 0,5. Une augmentation de température augmente l'isomérisation *trans/gauche* le long de la chaîne et une diminution de l'éclatement quadrupolaire et de  $S_{\text{C-D}}(n)$  est observée.

Dans le cas d'un lipide en phase gel, la rotation du lipide n'est pas assez rapide pour obtenir un spectre à symétrie axiale: on est donc dans un régime intermédiaire, puisque la vitesse de rotation est quand même suffisante pour causer un certain moyennage des interactions quadrupolaires.

Pour une dispersion de lipides, plusieurs orientations des molécules par rapport au champ magnétique (angle  $\beta$ ) sont possibles et on obtient un spectre de poudre. Celui en phase liquide-cristalline est plus étroit que celui observé pour un solide étant donné le moyennage supplémentaire causé par la rotation du lipide et les mouvements des chaînes (voir Figure 2.3 c et d pour les spectres). Ce spectre est aussi plus étroit que celui obtenu en phase  $L_{\beta}$  puisque les mouvements dans cette dernière sont plus lents et causent donc un moyennage limité. En phase hexagonale, la diffusion rapide du lipide autour du cylindre d'eau cause un moyennage supplémentaire de l'éclatement quadrupolaire. On doit alors considérer trois angles: l'angle entre le cylindre et le champ magnétique ( $\beta_1$ ), celui entre la normale locale du plan lipidique et le cylindre ( $\beta_2$ ) et celui entre la normale locale du plan lipidique et le lien C-D ( $\beta'$ ). Comme l'axe de symétrie du cylindre est à angle droit avec la normale locale du plan lipidique, l'éclatement quadrupolaire est alors multiplié par  $\left| \frac{3 \cos^2 90^\circ - 1}{2} \right|$ , qui est égal à 1/2.

Ceci se traduit par une diminution de l'éclatement quadrupolaire d'un facteur de 2 du spectre de poudre obtenu (Figure 2.3e). Une augmentation des mouvements dans la chaîne associée avec la géométrie différente de la phase  $H_{II}$  amène un moyennage supplémentaire des interactions quadrupolaires, le facteur de diminution de l'éclatement quadrupolaire est ainsi un peu plus grand que 2 (Lafleur et al., 1990b). Il est également possible, comme en solution, d'obtenir une raie étroite si, entre autres, les mouvements de l'assemblage sont rapides et isotropes (Figure 2.3f), comme pour les bicelles, les micelles ou encore les petites vésicules unilamellaires (SUV). Dans le cas d'arrangements de lipides sous forme de phase cubique, les mouvements des lipides sont tels qu'on obtient aussi une raie étroite.

#### 2.2.1.2 Cas de plusieurs sites deutérés sur une molécule

Nous avons discuté, jusqu'à maintenant, du cas où seul un site du lipide est deutéré. Dans le cas d'un lipide possédant une chaîne acyle perdeutérée, le spectre est représentatif de tous les liens C-D présents sur la chaîne acyle. On obtient, en phase gel, un spectre très large (Figure 2.4a), les chaînes étant ordonnées. Comme les mouvements



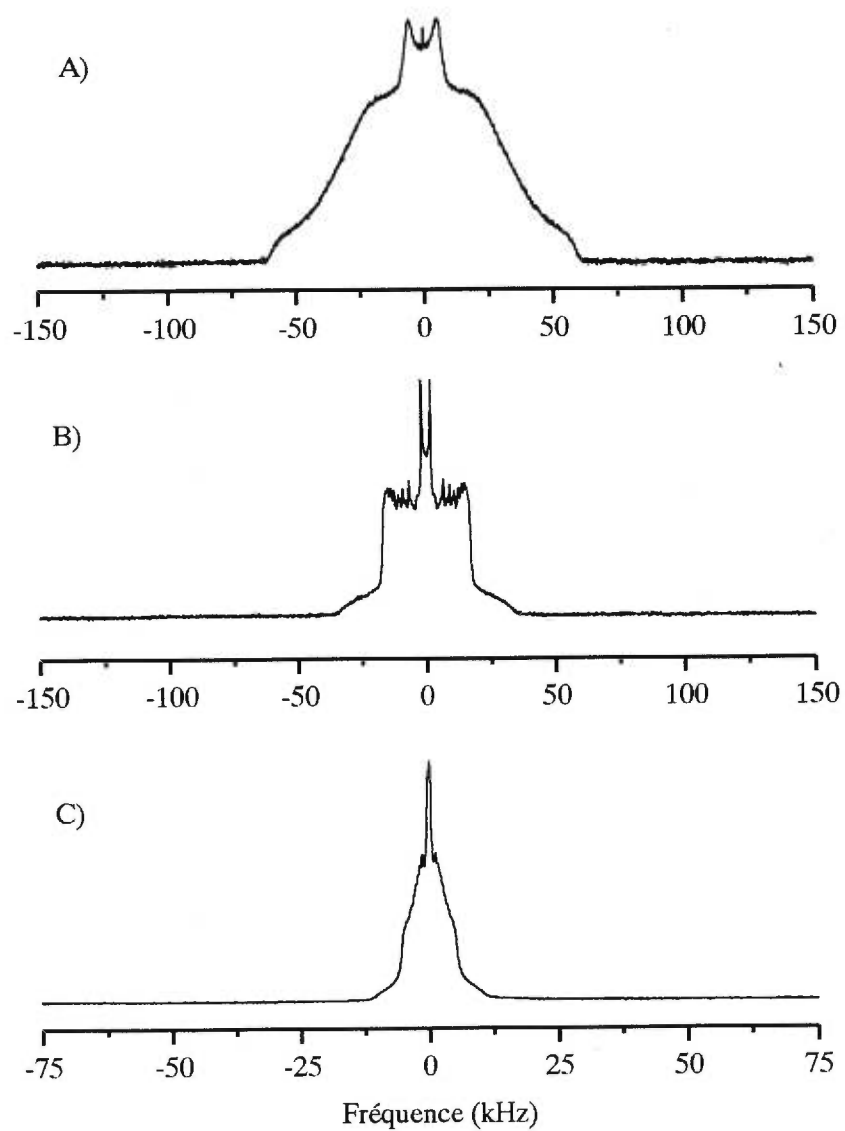


Figure 2.4 Exemples de spectres RMN du  $^2\text{H}$  pour un lipide deutéré sur plusieurs sites A) en phase gel B) en phase liquide-cristalline et C) en phase hexagonale (l'échelle est réduite d'un facteur 2 par rapport aux deux autres spectres).

de rotation sont dans un régime intermédiaire, il n'y a pas de symétrie axiale et on ne distingue aucun groupement méthylène spécifique. On distingue, en fait, seulement le groupement  $CD_3$  terminal parce que ce dernier, en bout de chaîne, a un mouvement de rotation suffisamment rapide pour avoir une symétrie axiale et il est associé au doublet étroit. En phase liquide-cristalline, le mouvement de rotation est suffisamment rapide pour que tous les groupements de la chaîne acyle aient une symétrie axiale. Le spectre final est donc une superposition des spectres de poudre à symétrie axiale associés à chacun des liens C-D de la chaîne, dont quelques-uns sont résolus (Figure 2.4b). En phase hexagonale, le spectre est aussi à symétrie axiale, avec une réduction de l'éclatement quadrupolaire d'un facteur légèrement supérieur à deux, tel que mentionné (Figure 2.4c).

L'intérêt de la RMN dans l'étude de membranes réside donc dans le fait qu'on peut identifier, pour des conditions données, la(les) phase(s) dans laquelle(es) se trouve(nt) le lipide. Un autre intérêt réside dans le fait que nous pouvons mesurer, pour un spectre à symétrie axiale, la variation du paramètre d'ordre ( $S_{C-D}(n)$ ) le long de la chaîne acyle (équation 16). Pour extraire ces valeurs de paramètre d'ordre, on doit éliminer les variations en  $\beta$ , i.e. des différentes positions de la molécule par rapport au champ magnétique. La première possibilité consiste à préparer des bicouches lipidiques orientées sur des lamelles de verre. Cette méthode est plutôt fastidieuse et laborieuse. La deuxième possibilité consiste à éliminer mathématiquement cette contribution. Le dePakeing (Sternin et al., 1983) est une méthode de déconvolution numérique du spectre de poudre permettant, dans le cas d'un spectre à symétrie axiale, d'obtenir un doublet correspondant à une orientation donnée (nous utilisons de manière arbitraire une orientation de  $0^\circ$ , c'est-à-dire que la normale à la bicouche est parallèle au champ magnétique) (Figure 2.5). Seul un certain nombre de doublets sont résolus sur le spectre dePaké. Pour obtenir le profil d'ordre le long de la chaîne, on pose l'hypothèse que les mouvements augmentent de l'interface vers le bout de la chaîne, ce qui entraîne une diminution de  $S_{C-D}(n)$  en fonction de la position du carbone ( $n$ ). Ce profil lissé reproduit les traits principaux du profil obtenu avec des lipides spécifiquement deutérés (Lafleur et al., 1989). Un exemple de variation du paramètre d'ordre avec la position du carbone le

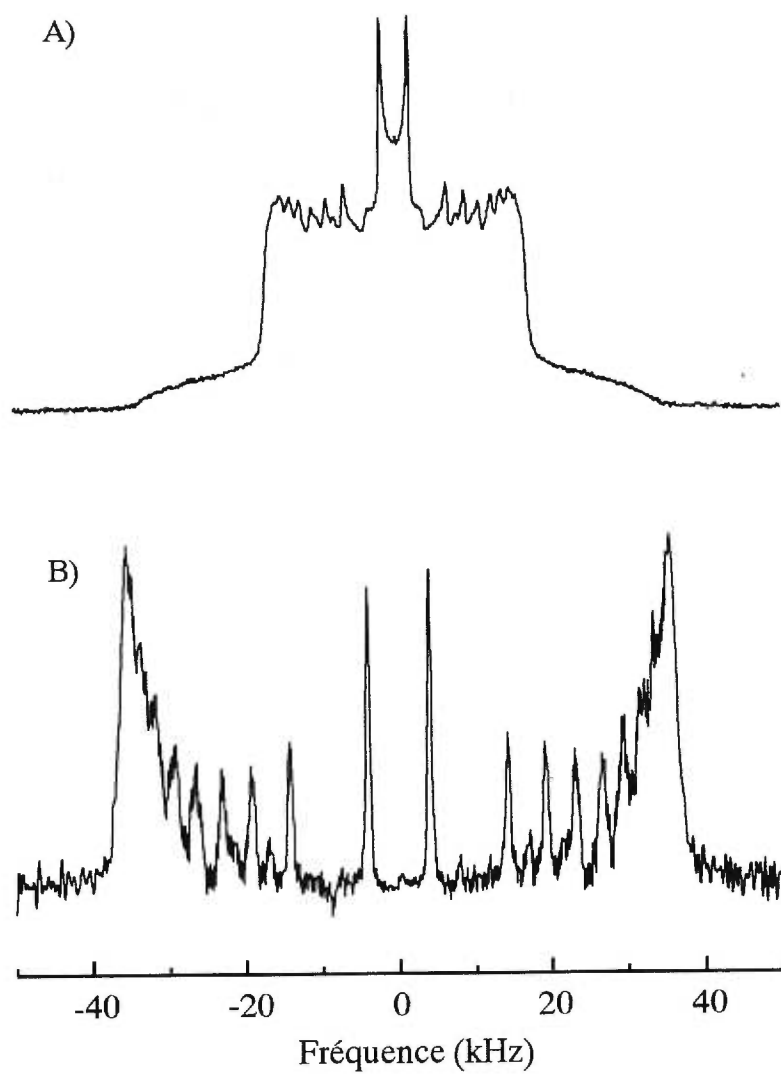


Figure 2.5 A) Spectre de la POPE-d<sub>31</sub> pure à 32° C B) spectre en A) déconvolué par la méthode de dePakeing.

long de la chaîne est représenté à la figure 2.6 pour la POPE-d<sub>31</sub> pure à 32° C. On y remarque une diminution lente pour les premières positions des carbones de la chaîne (correspondant aux carbones ayant moins de mouvement situé près de l'interface du lipide), suivi d'une diminution abrupte à mesure que l'on s'approche du groupement méthylène terminal, qui possède le paramètre d'ordre le plus faible en raison de ses mouvements plus importants. En phase H<sub>II</sub>, la variation d'ordre le long de la chaîne acyle se fait de façon plus linéaire que pour la phase L<sub>α</sub> (Lafleur et al., 1990b).

De plus, à partir des valeurs de S<sub>C-D</sub>(n) obtenues, il est possible de mesurer l'épaisseur de la bicouche (Ipsen et al., 1990; Thurmond et al., 1991; Douliez et al., 1995). En effet, le S<sub>C-D</sub>(n) d'un carbone donné de la chaîne est relié, par la géométrie des chaînes acyles, au paramètre d'ordre orientationnel du lien C-C correspondant. Comme le vecteur joignant les deux extrémités de la chaîne acyle est nécessairement la somme des vecteurs des liens C-C, il existe une corrélation entre les paramètres d'ordre le long de la chaîne et la longueur hydrophobe de la chaîne acyle:

$$\langle L \rangle = \langle l_{C-H} \rangle + 1,25 \left( \frac{1}{2} + \frac{S_n^{CC}}{S_{mol}} + \sum_{m=1}^{n/2-1} \left( 1 + \frac{2S_{2m}^{C-D}}{S_{mol}} \right) \right) \quad (17)$$

d'où on peut extraire l'épaisseur hydrophobe.  $\langle l_{C-H} \rangle$  représente la longueur moyenne d'un lien C-H et S<sub>n</sub><sup>CC</sup> le paramètre d'ordre du groupement CH<sub>3</sub>. Il est également possible d'extraire le coefficient d'expansion thermique de la bicouche (Bloom et al., 1991) par l'équation suivante:

$$\frac{-(\partial d / \partial T)}{d} = \frac{\alpha \langle |S_{CD}| \rangle / \Delta T}{\alpha \langle |S_{CD}| \rangle + \beta} \quad (17a)$$

où  $\alpha=1$  et  $\beta=0,5$ .

### 2.2.1.3 Cas du cholestérol deutéré

À partir de la RMN du <sup>2</sup>H du cholestérol deutéré, il est possible de déterminer si le cholestérol est sous forme cristalline ou solubilisé dans la membrane. Le cholestérol étudié ici comporte cinq sites deutérés en position 2, 2, 4, 4 et 6

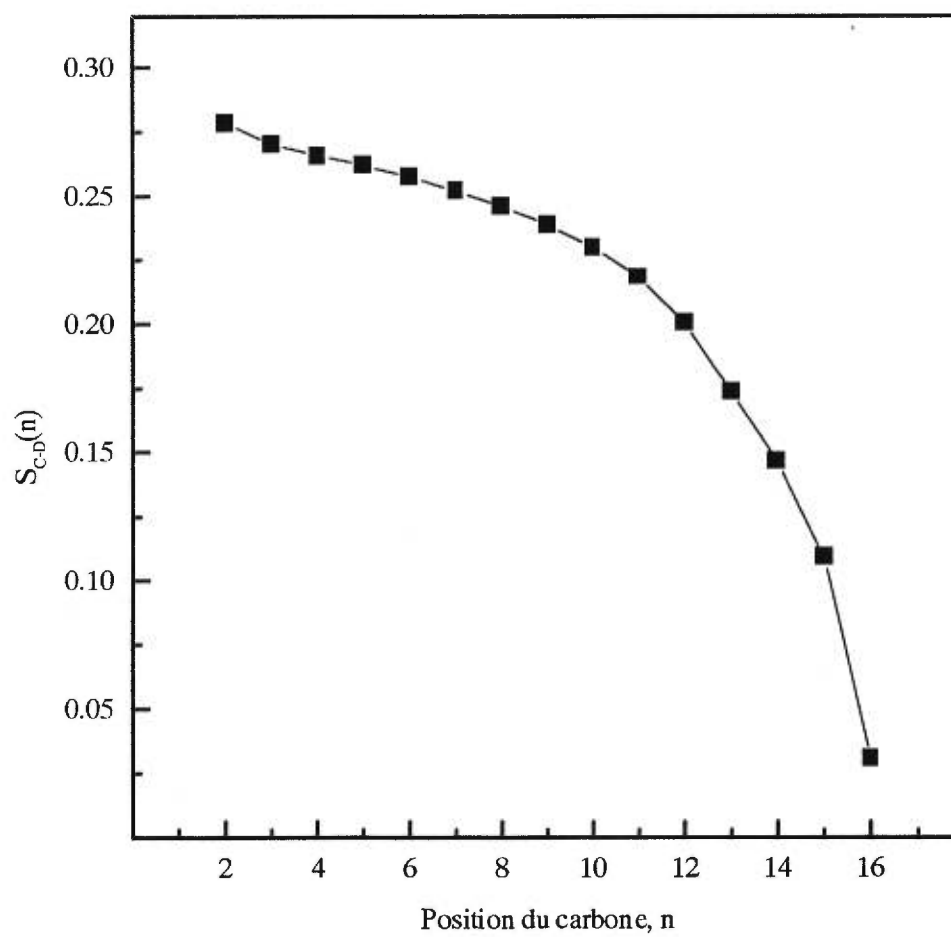
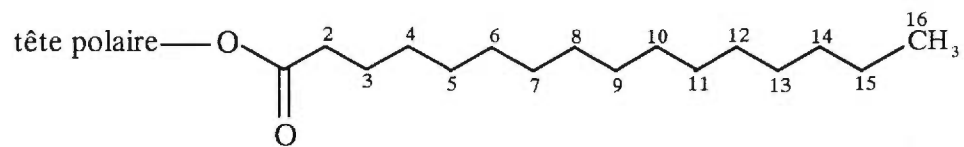


Figure 2.6 Profil d'ordre lissé de la POPE-d<sub>31</sub> pure à 32° C.

([2,2,4,4,6-d<sub>5</sub>]cholestérol (chol-d<sub>5</sub>)). Comme les spectres obtenus selon l'état du cholestérol sont caractéristiques et différents, il est même possible, dans le cas d'une coexistence, de déterminer la proportion de chacun. Dans le cas du cholestérol cristallin, le spectre de poudre obtenu est large (de l'ordre de 250 kHz, l'éclatement maximal obtenu pour un échantillon solide) puisque les molécules sont à toutes fins pratiques immobiles, et ressemble au spectre de la figure 2.3B. Dans le cas du cholestérol solubilisé dans la membrane, le spectre est plus étroit et mieux résolu. Une étude par RMN du <sup>2</sup>H sur un mélange de DMPC avec 30 mol% de [2,2,3,4,4,6-d<sub>6</sub>] cholestérol (chol-d<sub>6</sub>) a démontré que les spectres du cholestérol deutéré à des températures supérieures à 10° C étaient typiques de molécules ayant des mouvements à symétrie axiale (Dufourc et al., 1984). Les mesures d'éclatement quadrupolaire du cholestérol deutéré donnent de l'information sur l'orientation de la molécule de cholestérol dans une membrane. Cet éclatement quadrupolaire se définit par l'équation suivante:

$$\Delta\nu_Q = \frac{3}{2}A_Q \left( \frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \left\langle \frac{3\cos^2\gamma - 1}{2} \right\rangle \left( \frac{3\cos^2\beta' - 1}{2} \right) \quad (18)$$

où  $A_Q$  est de 170 kHz pour un lien C-C-D et de 175 kHz pour un lien C=C-D (Dufourc et al., 1984). La position 6 est reliée à une liaison double, alors que les deux autres positions sont aliphatiques. Le terme en  $\beta$  correspond à l'angle entre la normale à la bicouche et le champ magnétique. Le terme en  $\gamma$  correspond au paramètre d'ordre moléculaire,  $S_{mol}$ . Ce terme représente la fluctuation de l'axe de symétrie axiale de la molécule de cholestérol par rapport à la normale à la bicouche et a donc la même valeur pour tous les liens C-D de la molécule. Ce terme est considéré parce que les fluctuations moléculaires de cette molécule rigide peuvent être clairement identifiés. À cause de ces fluctuations dans le temps, l'angle  $\gamma$  change et on considère la moyenne de ce terme, représentée par les crochets dans l'équation. L'angle  $\beta'$  représente l'angle entre le lien C-D et l'axe de symétrie axiale de la molécule. Tous les angles discutés précédemment sont schématisés à la figure 2.6a. Le paramètre d'ordre local,  $S_{C-D}$ , comme pour les phospholipides, se définit à partir de cet angle:

$$S_{C-D}(n) = \left( \frac{3\cos^2\beta' - 1}{2} \right) \quad (19)$$

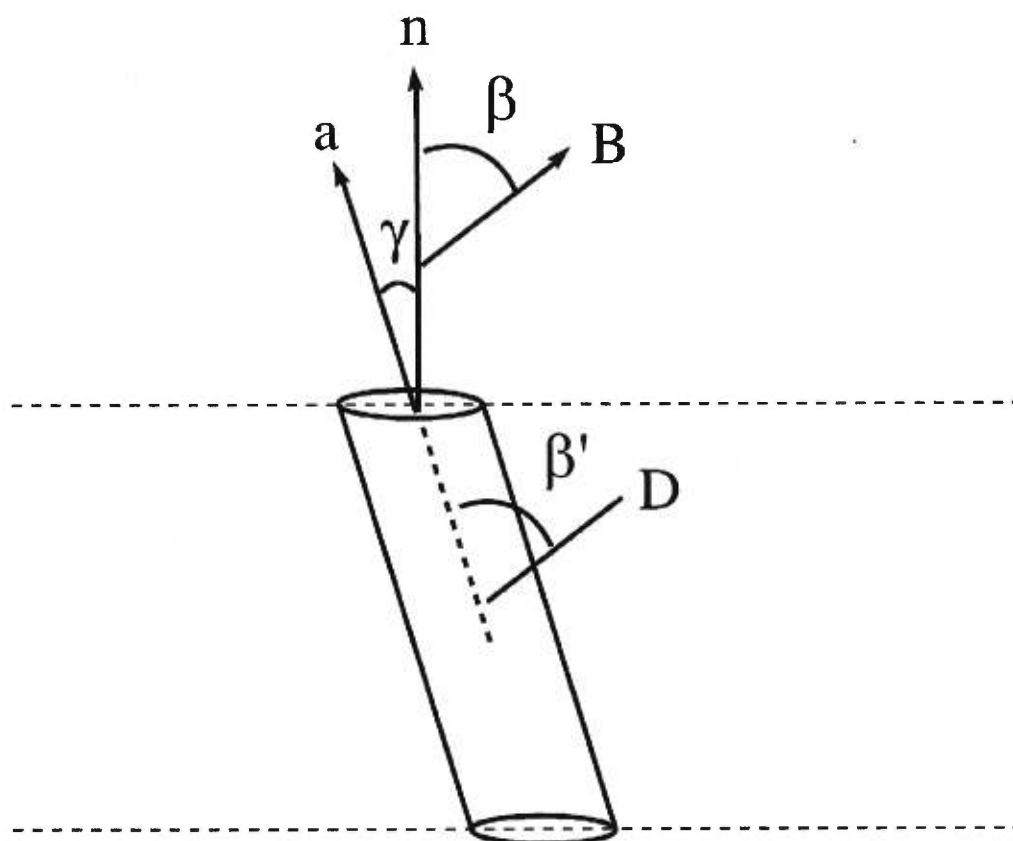


Figure 2.6a Représentation schématique des angles considérés en RMN du  $^2\text{H}$  pour la molécule de cholestérol.

Étant donné que les positions deutérées sont sur le noyau stérol, une partie rigide de la molécule, on peut supposer que chaque lien C-D a une géométrie fixe par rapport à l'axe de symétrie axiale de la molécule (Dufourc et al., 1983) et le terme en  $\beta'$  n'est pas moyenné en fonction du temps. Les différentes valeurs de  $S_{C-D}(n)$  ne sont donc pas associées à des dynamiques locales différentes, mais à des orientations locales différentes du lien C-D.

Plusieurs études ont été réalisées dans le but de déterminer la valeur de  $S_{mol}$  du cholestérol dans différents milieux lipidiques et son orientation dans la bicouche (Taylor et al., 1981; Dufourc et al., 1984; Marsan et al., 1999). L'approche consiste à enregistrer le spectre RMN du  $^2H$  du cholestérol deutéré sur le cycle. Le rapport des  $\Delta\nu_Q$  dépend essentiellement du rapport de leur  $S_{C-D}$  associé. En utilisant les coordonnées de dérivés du cholestérol obtenues par diffraction des rayons-x, il est possible de calculer les  $S_{C-D}$  en établissant de façon arbitraire l'axe de rotation de la molécule. L'orientation de cet axe de symétrie est alors modifiée par rapport à la molécule et les valeurs des rapports des  $\Delta\nu_Q$  sont calculées. Ces valeurs sont ensuite comparées à celles obtenues expérimentalement de manière à identifier des valeurs d'angle qui correspondent aux  $S_{C-D}$  obtenus par RMN du  $^2H$ . Nous avons alors l'orientation correcte de l'axe de rotation de la molécule. Comme on connaît l'orientation géométrique d'un lien C-D par rapport à l'axe de rotation de la molécule, il est possible de calculer un  $S_{mol}$ . Initialement, une valeur de 0,87 a été estimée pour le mélange PC extrait du jaune d'oeuf/50 mol% chol- $d_5$  (Taylor et al., 1981) et de 0,80 pour le mélange DMPC/30 mol% chol- $d_6$  à la température ambiante (Dufourc et al., 1984). Une étude plus récente base les coordonnées atomiques du cholestérol à partir d'une étude par diffraction des neutrons et obtient une valeur révisée de  $S_{mol}$  de 0,96 pour un mélange DMPC/30 mol% chol- $d_6$  à 30° C (Marsan et al., 1999).

### 2.2.2 Technique WISE

Les interactions dipôle-dipôle entre les protons élargissent énormément les spectres proton en RMN à l'état solide. La forme du spectre amène donc une



information utile quant à la dynamique. Cependant, la quantité importante de protons dans le système crée un réseau excessivement complexe de couplages et rend l'information impossible à extraire, à toutes fins pratiques. On peut simplifier ceci en obtenant des spectres de proton qui reflètent les couplages dipolaires des protons dans le voisinage d'un certain noyau  $^{13}\text{C}$  (en effectuant un transfert de magnétisation) (Clauss et al., 1992; Schmidt-Rohr et al., 1992). Cette approche est appelée séparation de signaux larges ("wideline separation" ou WISE). On obtient alors un spectre en deux dimensions, l'une étant le  $^{13}\text{C}$  et l'autre le  $^1\text{H}$ . À partir du déplacement chimique dans la dimension  $^{13}\text{C}$ , on peut identifier le noyau correspondant et obtenir le profil de la tranche proton qui y est associée. On utilise, dans la première dimension, le  $^{13}\text{C}$  pour obtenir de l'information sur la structure chimique et, dans la deuxième dimension, le  $^1\text{H}$  dont la largeur de bande est utilisée pour caractériser la mobilité des composantes.

L'intérêt de l'utilisation de la technique RMN de polarisation croisée avec rotation à l'angle magique (CP/MAS, pour "Cross Polarization with Magic Angle Spinning") permet d'avoir, en  $^{13}\text{C}$ , un spectre semblable à un spectre à haute résolution obtenu avec un liquide. La polarisation croisée permet de transférer la magnétisation d'un noyau abondant (comme le  $^1\text{H}$ ) et ayant une polarisation importante, à un noyau ayant une faible abondance naturelle (comme le  $^{13}\text{C}$ ) et faiblement polarisé. La condition Hartman-Hahn doit être respectée pour que le transfert puisse se faire: il faut que la fréquence de précession des deux noyaux soit identique. Si on veut restaurer une bonne résolution à ces spectres, il faut faire une rotation de l'échantillon à l'angle magique. Une rotation à un angle  $\theta$  de  $54,7^\circ$  (l'angle magique) permet d'éliminer les interactions ayant une dépendance angulaire de la forme  $\frac{3\cos^2\theta - 1}{2}$ , donc l'anisotropie du déplacement chimique et le couplage dipolaire. On peut voir à la figure 2.7 l'influence de la vitesse de rotation à l'angle magique sur la forme et la résolution du spectre. En A), nous voyons un spectre  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS du cholestérol cristallin sans rotation. Le spectre est constitué d'une seule bande très large. Par contre, quand on fait tourner l'échantillon à une vitesse de 2 kHz (B) et de 5 kHz (C), on voit très bien l'augmentation de la résolution du spectre.

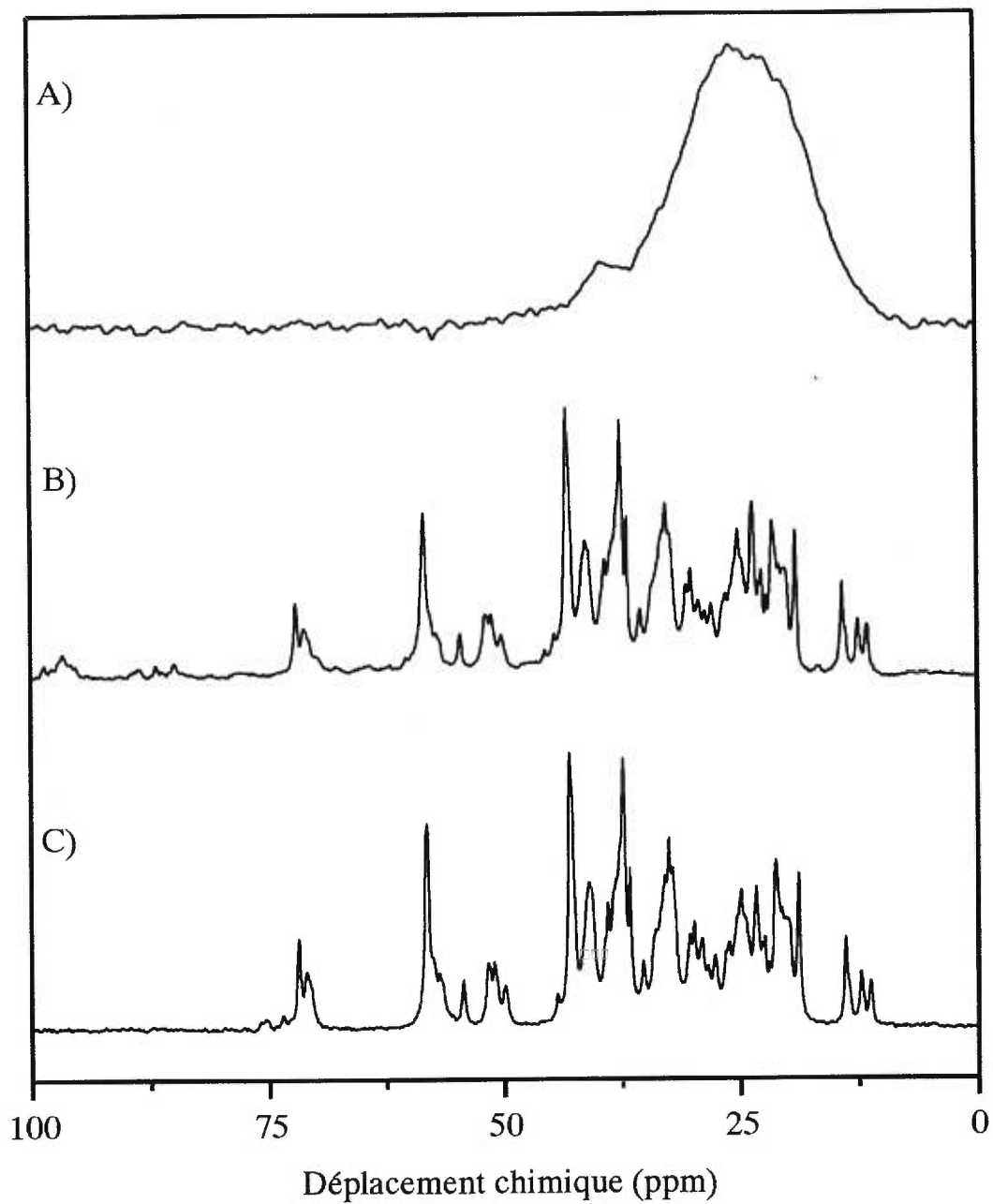


Figure 2.7 Influence de la vitesse de rotation ( $\nu$ ) sur la résolution du spectre en  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS A)  $\nu = 0$  kHz B)  $\nu = 2$  kHz et C)  $\nu = 5$  kHz.

La technique WISE exploite la polarisation croisée et la rotation à l'angle magique. Le WISE a une séquence d'impulsion tel que montré à la figure 2.8 (Schmidt-Rohr et al., 1992). Après une impulsion à  $90^\circ$  au niveau du proton, la magnétisation du proton évolue sous l'influence du couplage dipolaire pendant un temps  $t_1$ , le temps d'évolution. La polarisation croisée transfère ensuite la magnétisation résiduelle du  $^1\text{H}$  vers le  $^{13}\text{C}$ , qui est détectée pendant la période de détection,  $t_2$ . Pendant ce même temps, on effectue un découplage dipolaire dans les protons.

Le couplage dipolaire observable sur le spectre est plus ou moins moyenné, dépendant de la mobilité de la molécule. Ceci affecte la largeur du spectre obtenu qui constitue donc une mesure des interactions dipolaires résiduelles qui sont moyennées par la dynamique des molécules. Le déclin de magnétisation du  $^1\text{H}$  après la première impulsion de  $90^\circ$  est alors différent (Figure 2.8): pour une bande large, l'intervalle de fréquences plus important entraîne un déclin de magnétisation plus rapide. Dans le cas de groupements mobiles, une bande plus étroite conduit à un déclin de magnétisation plus lent. Si on fait le transfert de magnétisation du  $^1\text{H}$  vers le  $^{13}\text{C}$  après un temps  $t_1$ , l'intensité du signal  $^{13}\text{C}$  contient donc de l'information quant au déclin de magnétisation du  $^1\text{H}$  associé. Pour obtenir cette information, il faut que la fréquence de rotation à l'angle magique soit suffisamment rapide pour augmenter la résolution dans la dimension  $^{13}\text{C}$ , mais pas suffisamment rapide pour moyenniser les interactions dipolaires.

Récemment, une approche similaire a été utilisée pour examiner l'ordre des chaînes des lipides (Urbina et al., 1998). La technique WISE permet d'obtenir de l'information sur le couplage dipolaire total, c'est-à-dire sur le couplage entre les protons liés au même carbone ("intra-pair") et celui entre les protons situés sur des carbones différents ("inter-pair"). La nouvelle approche inclut un écho dipolaire avant la polarisation croisée, ce qui permet d'obtenir de l'information uniquement sur le couplage "inter-pair" et ainsi d'extraire un paramètre d'ordre des chaînes (Urbina et al., 1998). Dans notre cas, nous avons utilisé la RMN 2D dans le but d'établir l'état cristallin et/ou solubilisé du cholestérol dans la membrane et nous nous sommes limités à la technique plus simple du WISE.

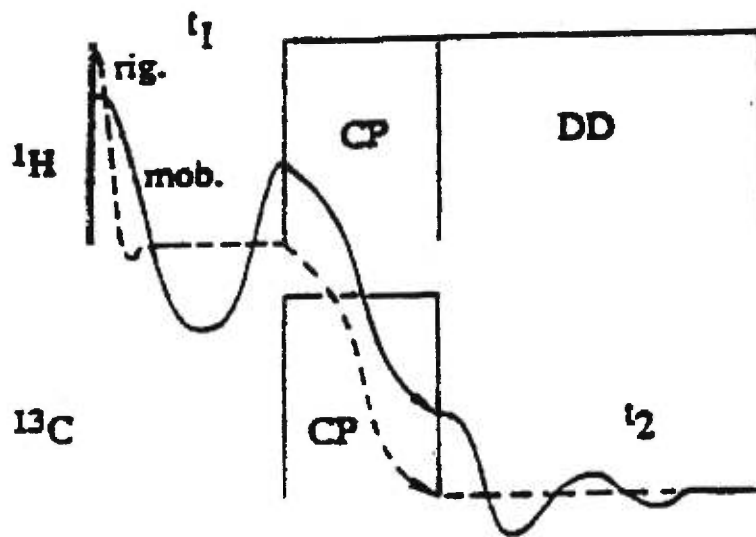


Figure 2.8 Séquence d'impulsion de la technique RMN WISE (Schmidt-Rohr et al., 1992). Les lignes en pointillé représentent le déclin de magnétisation du  $^1\text{H}$  après la première impulsion de  $90^\circ$  pour un groupement rigide et les lignes pleines représentent le même déclin pour un groupement mobile.

## CHAPITRE 3

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### 3.1 Provenance des produits

La POPE, la POPE perdeutérée sur la chaîne *sn*-1 (POPE-d<sub>31</sub>), la DMPE-d<sub>54</sub>, la DSPE, la DPPS, la DPPS perdeutérée sur les deux chaînes (DPPS-d<sub>62</sub>), la DPPC, la DPPC perdeutérée sur les deux chaînes (DPPC-d<sub>62</sub>), la POPC et la POPC perdeutérée sur la chaîne *sn*-1 (POPC-d<sub>31</sub>) ont été achetées chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) et utilisées sans purification. Le cholestérol et l'acide palmitique ont été obtenus de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). L'acide palmitique deutéré (PA-d<sub>31</sub>) a été obtenu de la deutération de l'acide palmitique selon la procédure décrite par Hsiao et al. (1974). Les peptides (LA)<sub>12</sub> et L<sub>24</sub> ont été gracieusement fournis par Ronald McElhaney. L'eau légère a été achetée chez Aldrich (Milwaukee, WI). Le cholestérol deutéré ([2,2,4,4,6-d<sub>5</sub>]cholestérol) a été obtenu de Medical Isotopes (Pelham, NH) et a été recristallisé deux fois dans l'éthanol avant l'utilisation.

#### 3.2 Spectroscopie IR

##### 3.2.1 Préparation des échantillons

Pour chaque échantillon, environ 5 mg de lipide sont dissous dans un mélange benzène:méthanol (96:04). Un volume de cholestérol dissous dans le même solvant est ajouté au lipide pour obtenir le pourcentage de cholestérol désiré. Le solvant est ensuite éliminé par lyophilisation. La poudre est dispersée dans 20 µL de tampon HEPES (20 mM d'acide N-[2-hydroxyéthyl] piperazine-N'-[2-éthanesulfonique] (HEPES), 100 mM NaCl, 2 mM d'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA), pH=7,4), afin d'obtenir une concentration de 20% en poids de lipide. On effectue plusieurs cycles de gel-dégel d'une température supérieure à la T<sub>m</sub> du lipide pur à celle de l'azote liquide; l'échantillon est vortexé périodiquement. Cette procédure permet d'homogénéiser le mélange.

Comme la DPPS n'est pas soluble dans le mélange benzène:méthanol, la préparation des échantillons a été différente. La DPPS et le cholestérol ont été dissous dans le chloroforme ou dans un mélange chloroforme:méthanol (80:20). Le solvant a été éliminé par évaporation sous jet d'azote. L'échantillon a ensuite été placé sous vide pour une nuit pour permettre l'élimination totale des solvants. L'hydratation des échantillons s'est faite comme décrit ci-haut.

La préparation de mélanges d'acide palmitique et de cholestérol s'est faite par lyophilisation, tel que décrit précédemment. Cependant, le tampon utilisé était un tampon MES à pH=5,5 (100 mM d'acide 2-[N-morpholino] éthanesulfonique (MES), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA).

Les échantillons constitués de la DPPC-d<sub>62</sub> en présence des peptides L<sub>24</sub> ou (LA)<sub>12</sub> ont été préparés de la façon suivante : le lipide (23 à 29 mg) et le peptide ont été dissous dans du méthanol et le solvant a été évaporé sous jet d'azote. Les échantillons ont ensuite été placés sous vide pour la nuit. L'hydratation des échantillons a été réalisée tel que décrit précédemment, avec 100 µL de tampon HEPES (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH=7,0).

### 3.2.2 Expériences

L'échantillon est placé entre deux fenêtres de fluorure de calcium (CaF<sub>2</sub>) séparées par un espaceur en Téflon de 5 µm. Les fenêtres sont ensuite placées dans un porte-échantillon en laiton dont la température est contrôlée par des thermopompes (Pézolet et al., 1983). Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre IR Bio-Rad FTS-25 équipé d'un détecteur MCT (tellure de mercure et de cadmium). Pour chaque spectre, 100 balayages sont collectés avec une résolution nominale de 2 cm<sup>-1</sup>.

Pour éliminer la contribution de l'eau ( $\nu_{\text{O-H}} \approx 3400 \text{ cm}^{-1}$ ) dans la région d'élongation des méthylènes, un polynôme simulant le flanc de cette bande est déterminé et ensuite soustrait dans la région  $\nu_{\text{C-H}}$ . Nous pouvons ensuite déterminer le centre de

gravité de la bande en utilisant un programme approprié. L'erreur sur la valeur de la fréquence mesurée est d'environ  $0,2 \text{ cm}^{-1}$ . La même procédure est effectuée pour éliminer la contribution de l'eau dans la région  $\nu_{\text{C-D}}$ . La contribution du cholestérol a aussi été éliminée dans la région  $\nu_{\text{C-H}}$  par la méthode développée par Kodati et Lafleur (1993) qui consiste à éliminer dans la région des "wagging", située entre 1400 et  $1360 \text{ cm}^{-1}$ , des bandes du cholestérol relativement bien résolues. Dans la région des groupements carbonyles, une correction pour la bande de déformation de l'eau a été réalisée par soustraction d'un spectre du tampon enregistré à la même température. L'algorithme de déconvolution, provenant du logiciel GRAMS (Galactic Industries Corp., Salem, NH) a été utilisé pour mettre en évidence les composantes des bandes carbonyles.

### 3.3 Spectroscopie RMN

#### 3.3.1 Préparation des échantillons en RMN du $^2\text{H}$

Les mélanges de phospholipide et de cholestérol pour la spectroscopie RMN du  $^2\text{H}$  sont préparés de façon similaire à ceux pour la spectroscopie infrarouge pour chacun des phospholipides. Cependant, la quantité de lipide pour les échantillons de POPE- $\text{d}_{31}$  et de DPPS- $\text{d}_{62}$  utilisée est de 27 à 30 mg et le phospholipide est deutéré sur une ou sur les deux chaînes acyles. Le tampon est préparé dans de l'eau légère. Le solvant utilisé pour solubiliser les mélanges de DPPS- $\text{d}_{62}$  et de cholestérol a été uniquement le chloroforme.

Dans le cas de la DPPC- $\text{d}_{62}$  en présence des peptides, les échantillons utilisés en RMN sont les mêmes que ceux utilisés en IR. Les mélanges de POPC- $\text{d}_{31}$  et des peptides ont été préparés de la même façon que les échantillons de DPPC- $\text{d}_{62}$  en présence des peptides.

Les mélanges PA- $\text{d}_{31}$ /chol ont été préparés différemment. Nous avons utilisé de 30 à 35 mg de PA- $\text{d}_{31}$  dans chacun des échantillons et la quantité de tampon utilisé pour l'hydratation variait de 400 à  $800 \mu\text{L}$ . Nous avons utilisé le tampon MES utilisé en IR,

mais préparé avec de l'eau légère. Pour l'échantillon PA/[2,2,4,4,6-d<sub>5</sub>] chol, nous avons utilisé 26 mg de cholestérol deutéré et l'échantillon a été hydraté avec 400  $\mu$ L de tampon.

La dispersion est placée dans un porte-échantillon en Téflon de 5 mm (POPE-d<sub>31</sub>/chol, DPPS-d<sub>62</sub>/chol, DPPC-d<sub>62</sub>/peptide et POPC-d<sub>31</sub>/peptide) ou de 10 mm (PA-d<sub>31</sub>/chol et PA/[2,2,4,4,6-d<sub>5</sub>] chol) de diamètre et d'environ 1 cm de long.

### 3.3.2 Préparation des cochléates

La formation des cochléates est induite par l'ajout d'ions Ca<sup>2+</sup>. Environ 25 mg de DPPS-d<sub>62</sub> sont hydratés avec 80  $\mu$ L de tampon HEPES (20 mM HEPES, 20 mM NaCl et 10 mM CaCl<sub>2</sub> à un pH de 7,4) sans EDTA. Plusieurs cycles de gel-dégel sont ensuite effectués et l'échantillon est incubé pendant 1 heure à 37° C, tel que décrit par Papahadjopoulos et al. (1975).

### 3.3.3 Expériences en RMN du <sup>2</sup>H

Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre de résonance magnétique nucléaire Bruker DSX-300. La sonde utilisée pour le deutérium possède deux bobines de 5 et 10 mm. Pour chaque spectre, de 1 000 à 20 000 acquisitions sont enregistrées avec une séquence d'impulsions conduisant à un écho quadrupolaire, dont l'impulsion à 90° est entre 2,7 et 3,0  $\mu$ s pour la bobine de 5 mm et de 4,2  $\mu$ s pour la bobine de 10 mm. Le délai entre les impulsions est de 35  $\mu$ s. Après la deuxième impulsion, 8192 points sont détectés en mode de détection quadrature, avec un temps entre deux points consécutifs de 0,5  $\mu$ s. Le temps de recyclage est de 0,5 s pour les lipides en dispersion aqueuse. Il est de 30 s pour le cholestérol deutéré, de 50 s pour la PA-d<sub>31</sub> et de 0,5 s pour les cochléates lorsque les échantillons possèdent une fraction de molécules sous forme solide. Ces délais correspondent approximativement à cinq fois la valeur de T<sub>1</sub> du solide.



La température est régularisée par un contrôleur Bruker VT-100. Pour des températures supérieures à 25° C, un jet d'air est utilisé. Pour des températures inférieures à 25° C, la circulation d'air est remplacée par un jet d'azote obtenu par l'évaporation d'azote liquide.

La méthode de DePakeing des spectres en RMN du  $^2\text{H}$  utilisée est celle développée par Sternin et al. (1983). Dans certains cas, seule la dernière moitié calculée du spectre est conservée pour obtenir le spectre dePaké. Le profil d'ordre lissé pour les lipides possédant une seule chaîne deutérée a été obtenu selon la méthode proposée par Lafleur et al. (1989). Dans le cas de phospholipides ayant deux chaînes deutérées, nous avons examiné 3 façons d'établir un profil d'ordre. D'abord, nous avons considéré les deux chaînes équivalentes et mesuré un paramètre d'ordre moyen pour chacune des positions en divisant le massif RMN en un nombre de tranches correspondant au nombre de méthylènes par chaîne. Deuxièmement, nous avons divisé le massif en un nombre de tranches correspondant au total du nombre de méthylènes dans les deux chaînes et attribué les  $S_{C-D}(n)$  de chacun des méthylènes en alternant entre les deux chaînes, le  $S_{C-D}(n)$  le plus grand étant initialement attribué à la chaîne *sn*-1 puisque cette position est plus ordonnée que le premier méthylène de la chaîne *sn*-2 (Douliez et al., 1996). L'hypothèse de la décroissance de  $S_{C-D}(n)$  vers le bout de la chaîne est maintenue. Il est connu que la position 2 de la chaîne *sn*-2 a une géométrie particulière (Engel et Cowburn, 1981) menant à un paramètre d'ordre petit (Seeling et Seelig, 1975). Dans une troisième approche, nous avons divisé le spectre comme à la méthode 2, puis identifié dans la liste le  $S_{C-D}(n)$  correspondant à celui de la position 2 de la chaîne *sn*-2 (Fenske et al., 1994). Celui-ci a été alors attribué directement à la position 2 de la chaîne *sn*-2. Les autres valeurs de  $S_{C-D}(n)$  ont été attribuées comme dans la méthode 2, c'est-à-dire en alternant la chaîne *sn*-1 et *sn*-2 et en supposant une diminution monotone de  $S_{C-D}$  le long de la chaîne. Ces différentes méthodes (Figure 3.1) donnent des résultats similaires. Nous avons utilisé par la suite les paramètres d'ordre moyens des deux chaînes (méthode 1) pour obtenir nos profils d'ordre lissés, sauf pour le système impliquant la PA-d<sub>31</sub>, où nous connaissons la valeur de  $\Delta\nu_Q$  de la position 2 de la chaîne (Fenske et al., 1994). Celle-ci a été identifiée de la liste et les autres valeurs de  $S_{C-D}(n)$

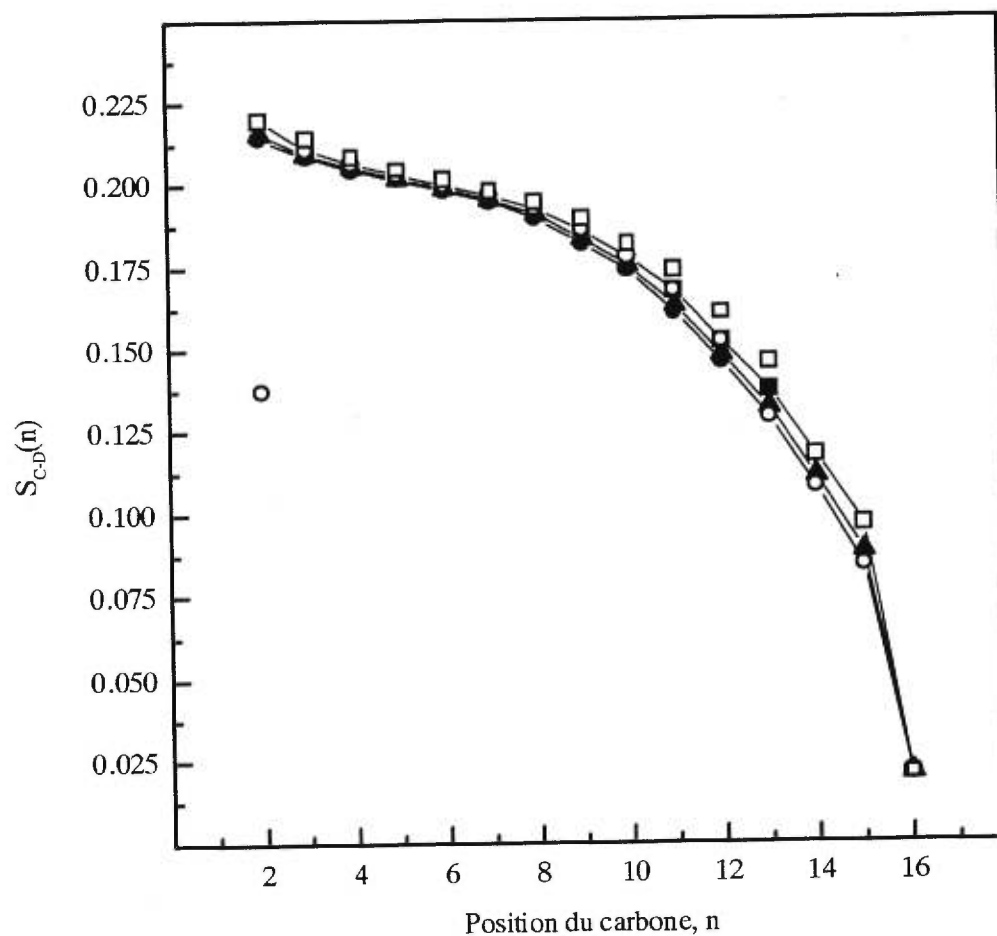


Figure 3.1 Profil d'ordre lissé de la DPPC- $d_{62}$  pure selon les trois méthodes essayées: première méthode (▲), deuxième méthode pour la chaîne *sn*-1 (■) et *sn*-2 (●) et troisième méthode pour la chaîne *sn*-1 (□) et *sn*-2 (○).

ont été attribuées à partir de la décroissance monotone de l'ordre le long de la chaîne. Dans tous les cas, l'incertitude sur la mesure de l'éclatement quadrupolaire est d'environ 0,5 kHz, alors que l'incertitude sur la longueur de chaîne mesurée est d'environ 0,5 Å.

#### 3.3.4 Préparation des échantillons en RMN $^{13}\text{C}$ -CP/MAS et WISE

Le cholestérol cristallin a été broyé pour donner une poudre fine et ensuite compressé dans un rotor de  $\text{ZrO}_2$  de 4 mm. Les mélanges de lipide et de cholestérol ont été préparés comme décrit dans la section précédente, à l'exception que le tampon était préparé dans le  $\text{D}_2\text{O}$  pour faciliter le travail en proton. L'échantillon a ensuite été placé dans le rotor de 4 mm.

#### 3.3.5 Expériences de RMN $^{13}\text{C}$ -CP/MAS et WISE

Les spectres sont aussi enregistrés sur le spectromètre RMN Bruker DSX-300. Le nombre d'acquisition varie de 300 à 3000. Les paramètres pour chacune des expériences seront mentionnés à mesure que nous les présenterons. En CP/MAS, nous avons travaillé avec une impulsion à  $90^\circ$  du proton de 3  $\mu\text{s}$  et une impulsion à  $180^\circ$  du  $^{13}\text{C}$  de 6  $\mu\text{s}$  et un temps de contact variant entre 0,1 et 10 ms. Les études que nous avons effectuées ne nous ont pas permis de remarquer des changements notables dans le spectre quand le temps de contact variait entre 0,1 et 10 ms. Le temps entre deux séquences d'impulsion est de 5 à 10 s. La vitesse de rotation variait selon les expériences de 0 à 5 kHz. Dans le cas du WISE, le nombre de tranches et le nombre de balayages par tranche sont variables et donnés dans les légendes des figures.

## CHAPITRE 4

### ÉTUDE DU POLYMORPHISME DE SYSTÈMES LIPIDES/CHOLESTÉROL

#### 4.1 Systèmes phosphatidyléthanolamine/cholestérol

##### 4.1.1 Système POPE/cholestérol

###### 4.1.1.1 Introduction

Jusqu'à maintenant, il existe peu d'études sur les détails des changements moléculaires induits par le cholestérol dans des matrices de PE. Dans cette partie du chapitre, nous utilisons la spectroscopie IR et la RMN du  $^2\text{H}$  pour étudier le polymorphisme du système POPE/chol. Ce phospholipide est particulièrement intéressant puisque les deux températures de transition de phase sont facilement accessibles ( $T_m = 25^\circ\text{C}$  et  $T_h = 71^\circ\text{C}$ ) (Epanand et Bottega, 1987). Également, la présence d'une chaîne acyle saturée perdeutérée en position *sn*-1 constitue une excellente sonde de l'ordre orientationnel le long des chaînes du lipide, que nous pouvons caractériser par la RMN du  $^2\text{H}$ . Nous examinerons l'effet du cholestérol sur l'ordre des chaînes acyles de la POPE et l'hydratation des groupements carbonyles dans les trois phases dans le but de relier ces changements moléculaires au polymorphisme. De plus, nous soulèverons la question à savoir si le cholestérol induit la formation de la phase liquide-ordonnée avec la POPE. Nos résultats nous amèneront à proposer un nouveau diagramme température-composition pour le système POPE/cholestérol.

###### 4.1.1.2 Résultats

###### *Spectroscopie IR*

Nous avons, dans un premier temps, étudié le thermotropisme de la POPE et de la POPE en présence de différents contenus en cholestérol. Nous retrouvons à la figure 4.1 la variation de la position de la bande d'élongation symétrique des  $\text{CH}_2$  ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) des

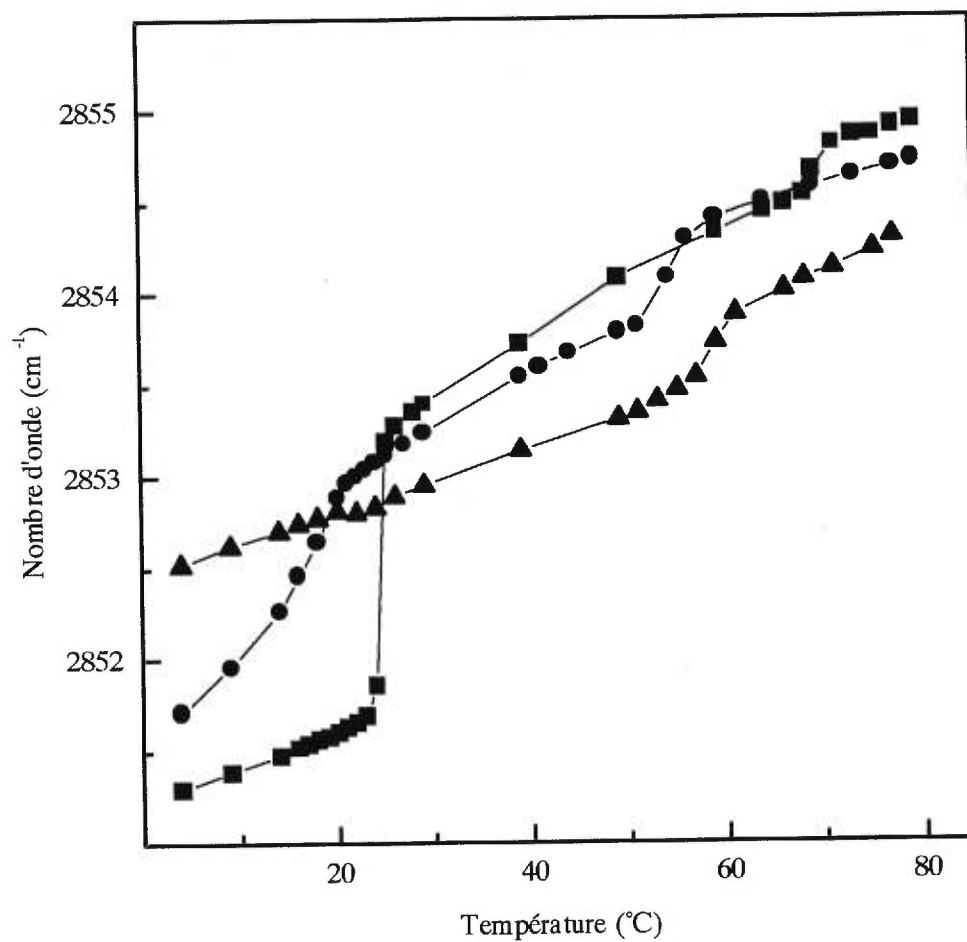


Figure 4.1 Variation de la fréquence de  $\nu_{C-H}$  avec la température pour la POPE pure (■) et les mélanges POPE/20 mol% chol (●) et POPE/45 mol% chol (▲).

chaînes acyles du lipide en fonction de la température pour la POPE pure, la POPE contenant 20 mol% et 45 mol% de cholestérol. La transition de phase gel à liquide-cristalline de la POPE est observée à 25° C, tel qu'illustré par l'augmentation d'environ 1,5 cm<sup>-1</sup> de la fréquence de  $\nu_{C-H}$ . La transition de la phase lamellaire à hexagonale se situe à 70° C et est associée à une légère augmentation de la fréquence de  $\nu_{C-H}$  à cette température (environ 0,2 cm<sup>-1</sup>). L'amplitude de cette transition est moins importante que celle observée pour la transition de la phase gel à liquide cristalline parce qu'elle implique une variation moins importante du nombre de conformères *gauche* (Mantsch et al., 1981). La présence de cholestérol modifie de façon importante le polymorphisme de la POPE. D'abord, il provoque une augmentation de la fréquence de  $\nu_{C-H}$  sous la T<sub>m</sub>, alors qu'il provoque une diminution de cette fréquence à une température supérieure à T<sub>m</sub>. Ce comportement est similaire à ce qui a déjà été observé pour des bicouches de PC (Umemura et al., 1980; Cortijq et Chapman, 1981). Ces changements conduisent à une diminution de l'amplitude de la transition de la phase gel à liquide-cristalline, qui n'est plus détectable pour l'échantillon contenant 45 mol% de cholestérol. À un contenu en cholestérol intermédiaire de 20 mol%, on note que l'amplitude de la transition est diminuée et que la température de la transition est déplacée vers les plus basses températures, vers 21° C. Ces changements au niveau de la T<sub>m</sub> de la POPE en présence de cholestérol sont en accord avec des études réalisées par AED avec des PE insaturées (Erand et Bottega, 1987; Takahashi et al., 1996; McMullen et McElhaney, 1997). La diminution de l'amplitude de la transition est expliquée par une réduction du désordre conformationnel lors de cette transition. On pourrait relier ceci à la diminution de la variation de l'enthalpie durant la transition de phase en présence de cholestérol, cette variation étant principalement associée à l'introduction de conformères *gauche* dans les chaînes acyles du lipide. Le cholestérol affecte aussi la transition de phase lamellaire à hexagonale. La température de transition est déplacée de 70° C pour la POPE pure à 55° C pour le mélange POPE/20 mol% chol. Ce déplacement est accompagné d'une augmentation de l'amplitude du déplacement de  $\nu_{C-H}$  pendant la transition de phase, passant de 0,2 à 0,5 cm<sup>-1</sup>. À 45 mol% chol, Th augmente de nouveau jusqu'à 58° C et l'amplitude du déplacement de  $\nu_{C-H}$  est maintenant de 0,4 cm<sup>-1</sup>. Il est intéressant ici de noter que ce contenu en cholestérol abolit la transition de phase gel à liquide-cristalline,

alors que la transition de phase lamellaire à hexagonale demeure coopérative. La figure 4.2 rapporte en détail les variations de  $T_h$  et de l'amplitude de  $\nu_{C-H}$  observées pour la POPE en présence de différents contenus en cholestérol. L'effet n'est pas monotone mais, pour les deux paramètres mesurés, il y a une inversion de la tendance à environ 30 mol% chol. Entre 0 et 30 mol% chol,  $T_h$  augmente et la variation de l'amplitude diminue, alors qu'entre 30 et 45 mol% chol,  $T_h$  diminue et la variation de l'amplitude augmente. La variation de  $T_h$  observée en présence de cholestérol est en accord avec des résultats d'AED obtenus pour la POPE (Erand et Bottega, 1987) et pour la 1,2-diélaïdoyl-*sn*-phosphatidyléthanolamine (DEPE) (Cheetham et al., 1989; Takahashi et al., 1996).

La figure 4.3 montre les bandes carbonyles déconvoluées de la POPE pure et de la POPE contenant 20 et 45 mol% de cholestérol. En phase gel (5° C), la bande  $\nu_{C=O}$  de la POPE pure est dominée par la composante de haute fréquence, ce qui indique un arrangement compact des lipides. Quand du cholestérol est ajouté, on remarque une augmentation de l'intensité de la composante de basse fréquence, suggérant que le cholestérol, à basse température, conduit à un arrangement plus fluide des lipides, une plus grande fraction des groupements carbonyles étant maintenant exposée à l'eau. En phase fluide (40° C), l'intensité relative de la composante de basse fréquence augmente de façon significative, si l'on compare à ce qui était observé en phase gel; ceci peut être associé à une plus grande pénétration de l'eau au niveau de l'interface de la bicouche en phase gel. En phase fluide, le cholestérol a l'effet opposé: le stérol conduit à une diminution de l'intensité relative de la composante de basse fréquence. Ceci peut être associé à une rigidification des chaînes en phase fluide, conduisant à un empilement plus compact des lipides et à une hydratation réduite de l'interface de la bicouche. En fait, dans le cas du mélange POPE/45 mol% chol, le chauffage de l'échantillon de 5 à 40° C a très peu d'effet sur la région d'élongation des groupements carbonyles du lipide. Ceci est en accord avec l'absence de transition de phase gel à liquide-cristalline rapporté par  $\nu_{C-H}$ . En phase hexagonale (78° C), l'intensité de la composante de basse fréquence de la POPE pure est diminuée relativement à ce qui était observé en phase lamellaire fluide, indiquant que la proportion de groupements carbonyles formant des liaisons hydrogène

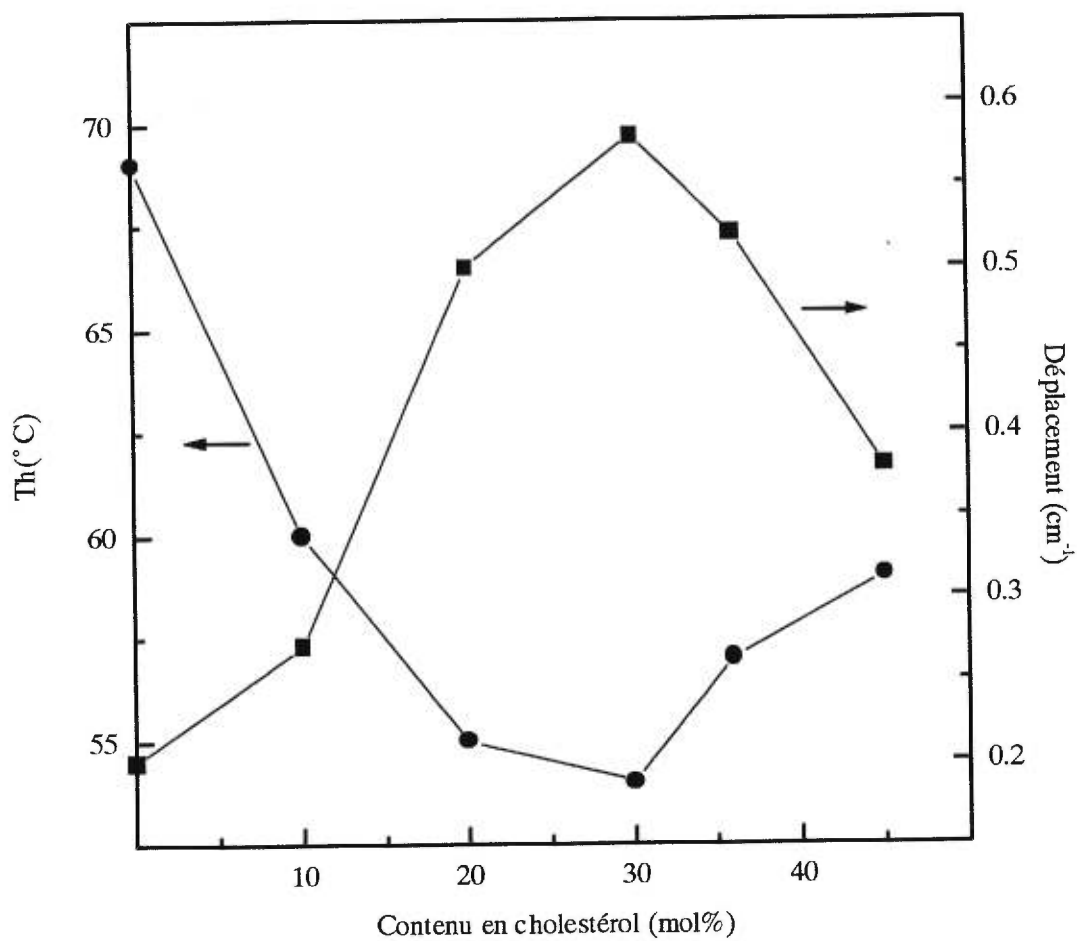


Figure 4.2 Influence du cholestérol sur la température de transition de phase lamellaire à hexagonale (●) et sur le déplacement de la fréquence de  $\nu_{C-H}$  pendant la transition (■).



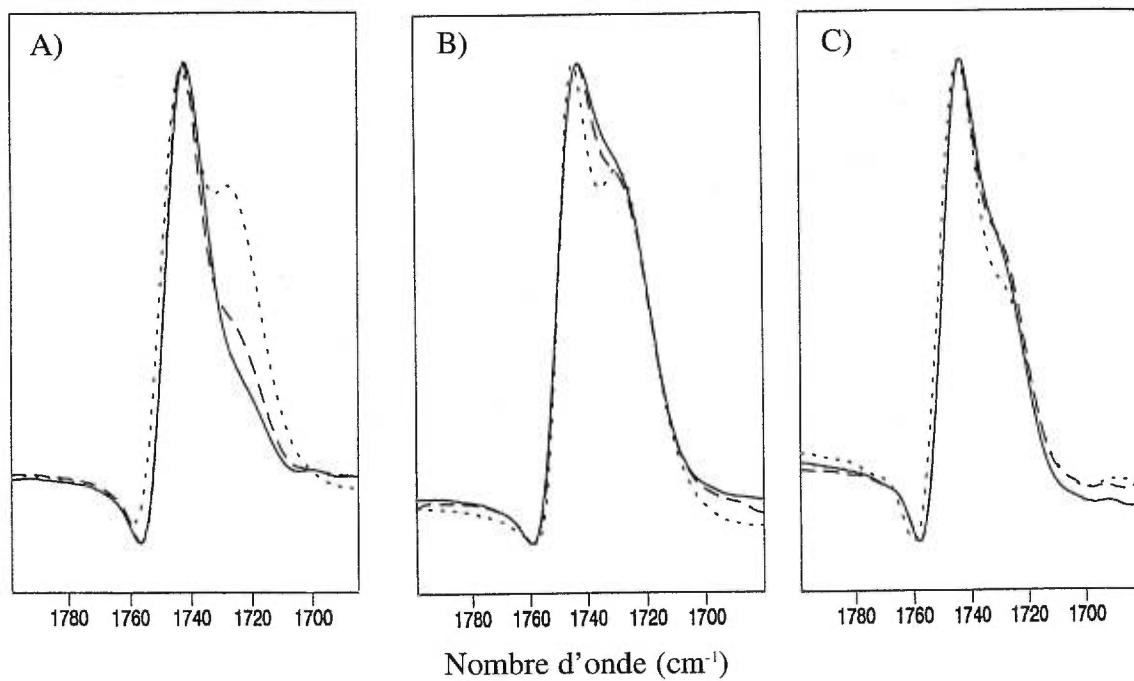


Figure 4.3 Région d'élongation des groupements carbonyles pour la POPE pure (—) et pour les mélanges POPE/20 mol% chol (---) et POPE/45 mol% chol (···) A) en phase gel (5° C) B) fluide lamellaire (40° C) et C) H<sub>II</sub> (78° C). Les spectres ont été corrigés pour la contribution de l'eau et auto-déconvolués, tel que décrit dans le chapitre 3.

diminue. Ce changement durant la transition de phase lamellaire à hexagonale coïncide avec un déplacement de la fréquence de la bande d'élongation antisymétrique des  $\text{PO}_2^-$ , qui passe de  $\sim 1221 \text{ cm}^{-1}$  dans la phase lamellaire à  $\sim 1225 \text{ cm}^{-1}$  en phase hexagonale (Figure 4.4). En fait, une augmentation abrupte de la fréquence de ce mode vibrationnel est observée pendant la transition de phase lamellaire à  $\text{H}_{\text{II}}$ , en accord avec de précédentes études sur egg-PE (Castresana et al., 1992). Un déplacement vers les hautes fréquences a été associé aux groupements phosphates formant des liaisons hydrogène plus faibles (Sen et al., 1988; Wong et Mantsch, 1988), ce qui est en accord avec la déshydratation de la tête polaire de la POPE, déduite de l'étude de la région d'élongation des groupements carbonyles. En présence de cholestérol, il y a une légère diminution de l'intensité de la composante de basse fréquence, suggérant une hydratation réduite. Une réduction de l'hydratation de la POPE en présence de cholestérol a déjà été reportée dans les phases fluide et hexagonale pour des échantillons peu hydratés (15 molécules d'eau par molécule de POPE) par des études de RMN du  $^2\text{H}$  du  $\text{D}_2\text{O}$  (Marinov et Dufourc, 1995).

### *Spectroscopie RMN du $^2\text{H}$*

L'utilisation de la RMN du  $^2\text{H}$  dans l'étude du système POPE/cholestérol nous apporte de l'information complémentaire à ce que nous venons de voir à l'aide de la spectroscopie IR. Comme chacune des phases formées par le lipide possède un spectre caractéristique en RMN (voir Chapitre 2, section 2.2.1), nous pouvons savoir de façon précise la phase dans laquelle le lipide se trouve à une température et un contenu en cholestérol donnés. De plus, nous pouvons obtenir de l'information sur l'ordre orientationnel le long de la chaîne acyle perdeutérée de la POPE.

La figure 4.5 montre des spectres typiques obtenus avec nos échantillons. Pour la POPE- $\text{d}_{31}$  pure (ligne du bas), trois profils différents sont observés. À 5 et 15° C, des spectres larges et sans résolution (hormis le signal du groupement  $\text{CD}_3$ ) sont obtenus; ces spectres sont typiques de la phase gel. À 32° C, le spectre est typique d'un lipide en phase fluide lamellaire. À 70° C, le spectre indique toujours des mouvements de

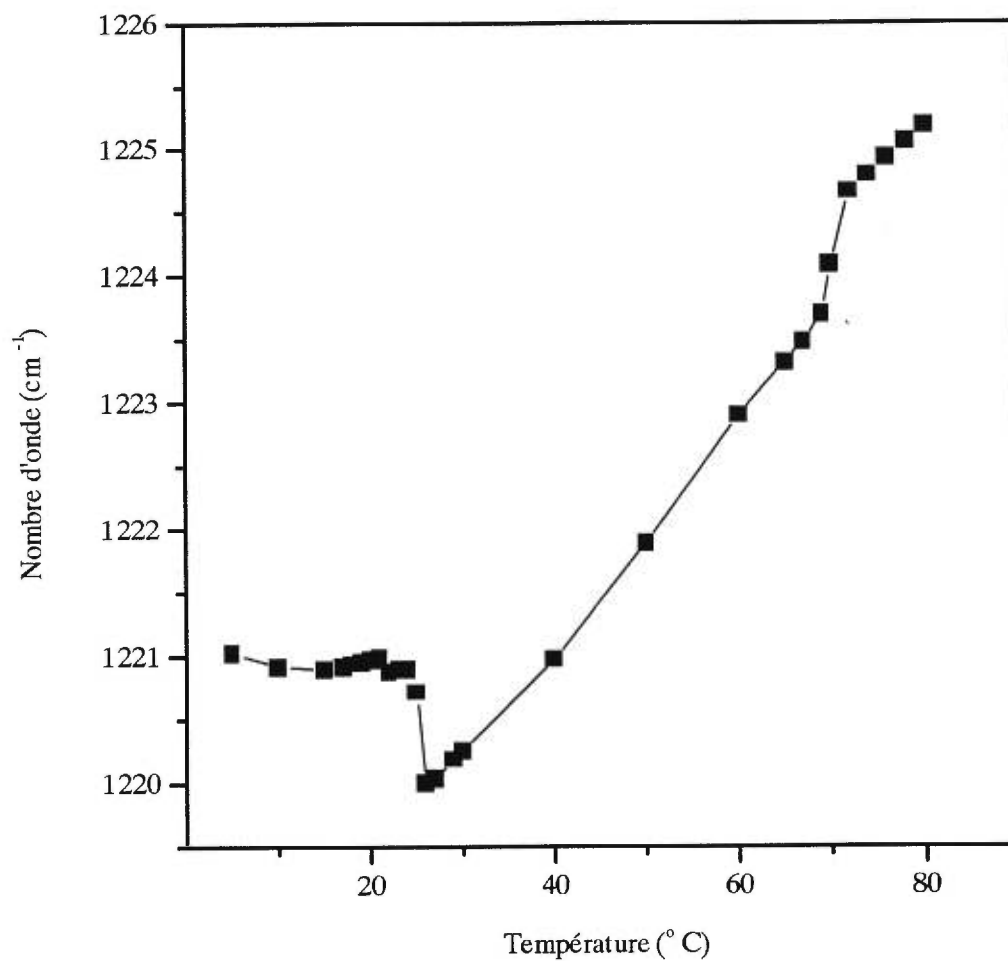


Figure 4.4 Variation de la fréquence de la bande d'élongation antisymétrique des  $\text{PO}_2^-$  de la POPE pure en fonction de la température.

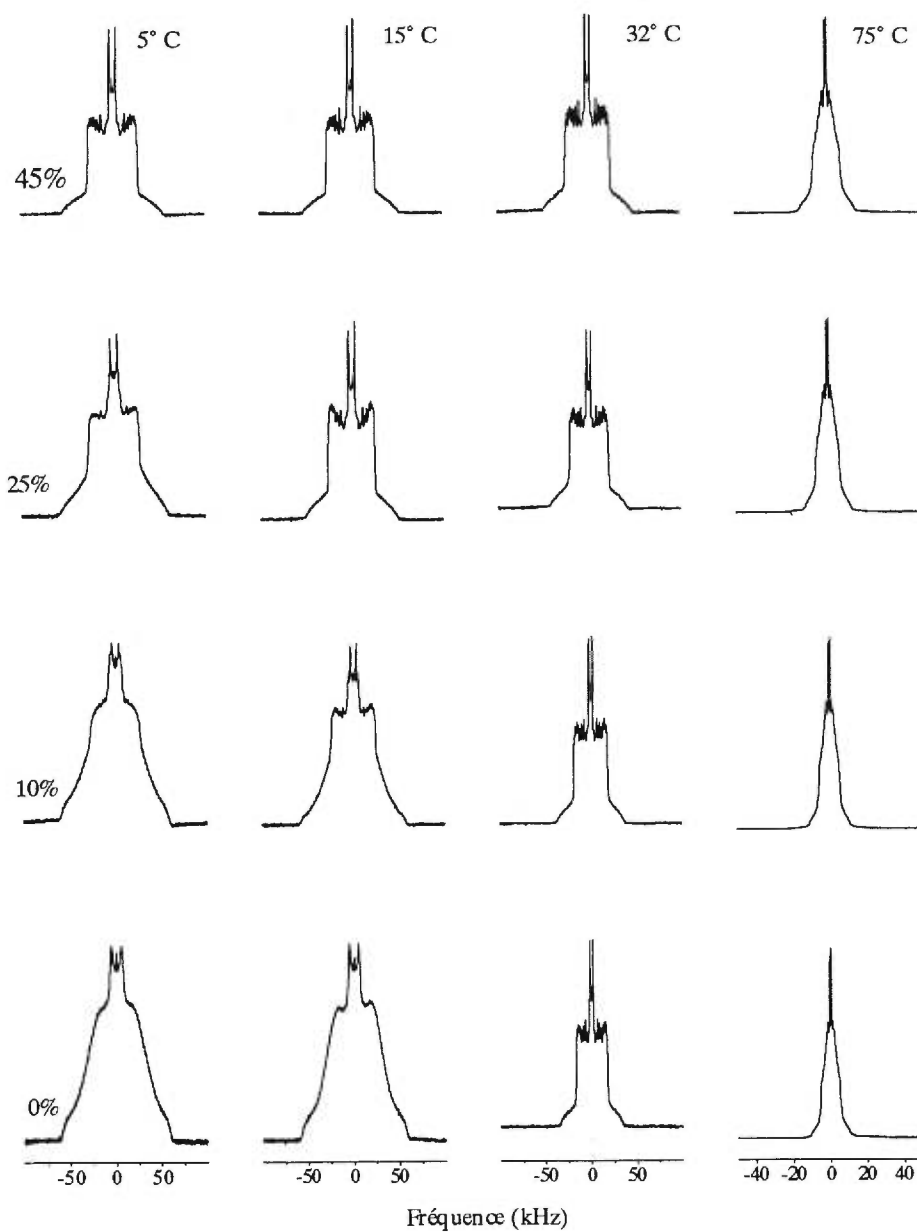


Figure 4.5 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  de la POPE- $\text{d}_{31}$  contenant plusieurs proportions de cholestérol (tel qu'indiqué pour chaque ligne), enregistrés à différentes températures (tel qu'indiqué dans le haut de chaque colonne). Il est à noter que l'échelle de fréquence est différente pour la colonne de droite.

symétrie axiale du lipide, mais la largeur du spectre est réduite par un facteur plus grand que deux; ceci suggère la formation d'une phase hexagonale. La résolution des spectres de poudre associés aux différents groupements  $CD_2$  le long de la chaîne perdeutérée dans cette phase est réduite à cause d'une diminution plus linéaire de l'ordre le long de la chaîne (Lafleur et al., 1990b). La présence de cholestérol conduit à plusieurs changements dans les spectres. À 5 et 15° C, le cholestérol conduit à la transformation du spectre large de la phase gel à un spectre large caractéristique de lipides ayant des mouvements à symétrie axiale. En fait, à 45 mol% de cholestérol, les spectres enregistrés à ces températures sont exclusivement composés d'une phase fluide. À 5° C et à ce contenu en cholestérol, le spectre possède un  $\Delta\nu_q$  de 50 kHz pour le doublet le plus large. Un changement similaire dans la forme du signal RMN a aussi été observé pour la 2[4,4- $^2H$ ]dipalmitoylphosphatidyléthanolamine spécifiquement deutérée (2[4,4- $^2H$ ]DPPE) en présence de cholestérol (Blume et Griffin, 1982). Nous remarquons aussi que plus le contenu en cholestérol est élevé, plus la transformation vers un spectre typique d'une phase fluide semble complétée à basse température (en comparant, par exemple, les spectres à 10 et 25 mol% de cholestérol à 15° C). À une température et un contenu en cholestérol intermédiaires, les spectres montrent une coexistence de phase gel et fluide (mélange POPE- $d_{31}$ /25 mol% chol à 5° C et POPE- $d_{31}$ /10 mol% chol à 15° C, par exemple). Les deux composantes de ces spectres peuvent être isolées par des différences de spectres, comme déjà démontré pour le système DPPC- $d_{62}$ /chol (Vist et Davis, 1990). La figure 4.6 illustre un exemple de ce procédé. Les spectres de POPE- $d_{31}$  contenant 10 et 15 mol% chol, enregistrés à 15° C, sont composés d'une portion fluide et d'une portion gel; ceci est particulièrement clair si l'on regarde les signaux centraux associés aux groupements méthyles terminaux. Si l'on effectue la soustraction du spectre de POPE- $d_{31}$ /10 mol% chol de celui du mélange POPE- $d_{31}$ /15 mol% chol, on peut éliminer la composante gel du spectre du mélange POPE- $d_{31}$ /15 mol% chol. La même chose peut être faite dans l'autre sens pour éliminer la portion de phase fluide du spectre de POPE- $d_{31}$ /10 mol% chol. Les composantes obtenues par différence de spectres sont montrées sur la droite de la figure. À partir des soustractions, il est possible d'estimer le contenu en cholestérol correspondant à chaque

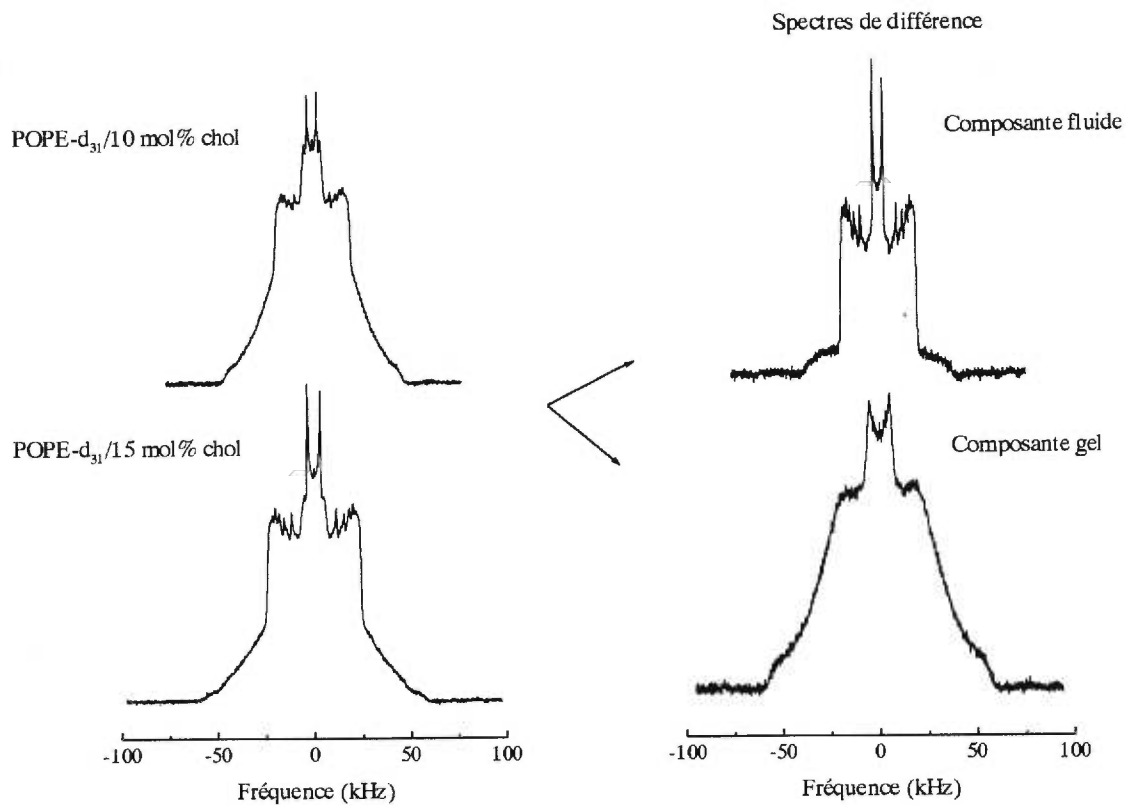


Figure 4.6 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  des mélanges POPE-d<sub>31</sub>/10 mol% chol et POPE-d<sub>31</sub>/15 mol% chol (gauche) et spectres de différence (droite). La composante gel est obtenue de la soustraction suivante: spectre de POPE-d<sub>31</sub>/10 mol% chol – 0,53\*le spectre de POPE-d<sub>31</sub>/15 mol% chol. La composante fluide a été obtenue de la soustraction suivante: le spectre de POPE-d<sub>31</sub>/15 mol% chol – 0,48\*le spectre de POPE-d<sub>31</sub>/10 mol% chol.

composante (Vist et Davis, 1990). Effectivement, à partir des facteurs de soustraction et des contenus en cholestérol des échantillons dont les spectres ont servi à la soustraction, nous pouvons calculer, grâce à la règle du levier, le contenu en cholestérol de chacune des composantes séparément, donc les limites de coexistence entre les phases gel ( $x_g$ ) et fluide ( $x_f$ ) de la façon suivante :

$$x_g = \frac{(1 - x_B)x_A - K(1 - x_A)x_B}{(1 - x_B) - K(1 - x_A)} \quad (20)$$

et

$$x_f = \frac{(1 - x_A)x_B - K'(1 - x_B)x_A}{(1 - x_A) - K'(1 - x_B)} \quad (21)$$

où  $x_A$  et  $x_B$  sont les contenus en cholestérol des échantillons dont nous soustrayons les spectres ( $x_A=0,10$  et  $x_B=0,15$ ) et  $K$  et  $K'$  sont les facteurs de soustraction. À 15° C, nos résultats indiquent un contenu en cholestérol de 5 et 20 mol% pour la portion gel et fluide, respectivement. Ces valeurs devraient correspondre aux limites de la région de coexistence entre les phases gel et fluide. Ces différences de spectres ont été réalisées à 5, 10 et 15° C (voir figure 4.9).

La troisième colonne de la figure 4.5 montre les spectres de plusieurs mélanges POPE-d<sub>31</sub>/chol enregistrés à 32° C. Tous ces spectres sont typiques de lipides en phase lamellaire qui ont des mouvements de symétrie axiale. Le cholestérol donne lieu à une augmentation des éclatements quadrupolaires. Par exemple, l'éclatement quadrupolaire du doublet le plus large augmente de 35 à 49 kHz quand le contenu en cholestérol passe de 0 à 45 mol%. Finalement, à 70° C, tous les spectres montrent une forme typique de la phase H<sub>II</sub>. De façon similaire au comportement en phase lamellaire fluide, la présence de cholestérol conduit à une augmentation des éclatements quadrupolaires, tel qu'illustré par l'élargissement du signal.

Des spectres obtenus en phase lamellaire fluide et en phase H<sub>II</sub>, il est possible d'extraire les profils d'ordre lissés qui décrivent la variation de l'ordre orientationnel le long des chaînes acyles (voir Chapitre 2, section 2.2.1.2) (Lafleur et al., 1989). Les

profils d'ordre sont représentés pour la phase fluide lamellaire (32° C, figure 4.7 A) et pour la phase H<sub>II</sub> (70° C, figure 4.7 B). Les profils d'ordre obtenus à 32° C sont typiques d'une phase lamellaire, formés d'un plateau, où le paramètre d'ordre ne varie pas considérablement, suivi d'une diminution rapide de l'ordre en se dirigeant vers le milieu de la bicouche. Le profil d'ordre de la POPE-d<sub>31</sub> est similaire à celui déjà publié (Lafleur et al., 1990a). Comme il a été observé pour les PC (Lafleur et al., 1990a; Vist et Davis, 1990), le cholestérol conduit à une augmentation de S<sub>C-D</sub>(n) le long de la chaîne de POPE-d<sub>31</sub>. Ce résultat est en accord avec une étude précédente sur la 2[4,4-<sup>2</sup>H]DPPE montrant une augmentation de Δv<sub>Q</sub> en présence de cholestérol pour une température supérieure à la T<sub>m</sub> du phospholipide (Blume et Griffin, 1982). Le changement du paramètre d'ordre moyen de la POPE-d<sub>31</sub>, <S<sub>C-D</sub>>, en fonction du contenu en cholestérol est représenté à la figure 4.8 A. <S<sub>C-D</sub>> représente la moyenne arithmétique de S<sub>C-D</sub>(n) pour 2 ≤ n ≤ 16, S<sub>C-D</sub>(16) étant extrapolé linéairement de S<sub>C-D</sub>(14) et de S<sub>C-D</sub>(15) pour éliminer la contribution des mouvements supplémentaires des groupements méthyles (CD<sub>3</sub>) terminaux. Les résultats obtenus pour la POPC-d<sub>31</sub> en présence de cholestérol (Lafleur et al., 1990a) sont reproduits pour comparaison. L'ordre de la POPE-d<sub>31</sub> pure est supérieur à celui observé pour la POPC-d<sub>31</sub>. Ceci s'explique par la plus petite tête polaire de la PE, ce qui conduit à un arrangement plus compact des lipides et, par conséquent, à des mouvements de chaînes plus restreints (Perly et al., 1985; Lafleur et al., 1990a). Le cholestérol provoque une rigidification des chaînes pour les deux phospholipides, mais l'augmentation de <S<sub>C-D</sub>> est plus prononcée pour la POPC-d<sub>31</sub> que pour la POPE-d<sub>31</sub>. De 0 à 45 mol% de cholestérol, <S<sub>C-D</sub>> augmente d'environ 37% pour la POPE-d<sub>31</sub> et d'environ 85% pour la POPC-d<sub>31</sub>. La POPE-d<sub>31</sub> pure et le mélange POPC-d<sub>31</sub>/20 mol% chol, à 32° C, présentent un ordre orientationnel similaire, avec une valeur de <S<sub>C-D</sub>> d'environ 0,215. L'addition de 10 mol% chol supplémentaire à ces deux bicouches conduit à une valeur de 0,232 et 0,250 pour le système POPE-d<sub>31</sub>/chol et POPC-d<sub>31</sub>/chol, respectivement. L'ordre des chaînes devient très similaire pour les deux lipides quand le contenu en cholestérol est d'environ 45 mol%. Dans ces conditions, <S<sub>C-D</sub>> est d'environ 0,29 et le paramètre d'ordre au plateau est d'environ 0,4, indiquant que les chaînes acyles du lipide sont très ordonnées.



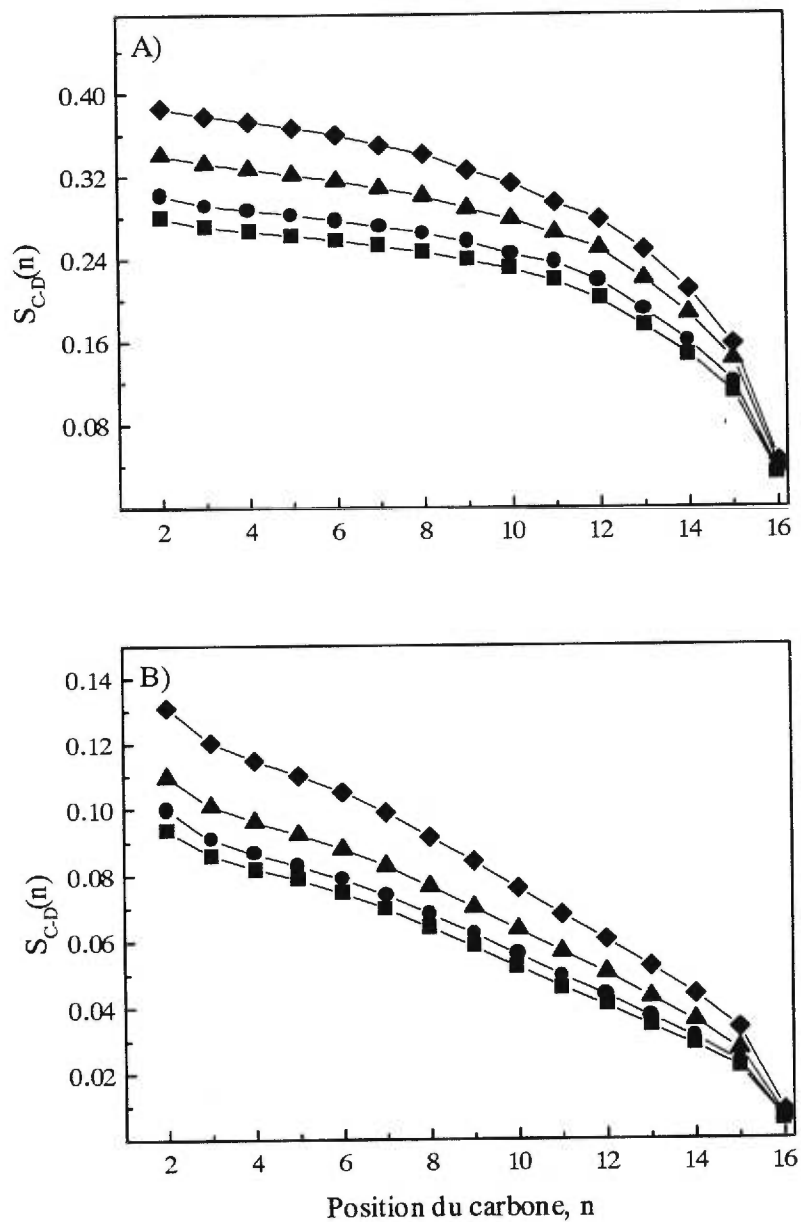


Figure 4.7 Profil d'ordre orientationnel lissé obtenu à 32° C (A) et 70° C (B) pour la POPE- $d_{31}$  pure (■) et les mélanges POPE- $d_{31}$ /10 mol% chol (●), POPE- $d_{31}$ /25 mol% chol (▲) et POPE- $d_{31}$ /45 mol% chol (◆).

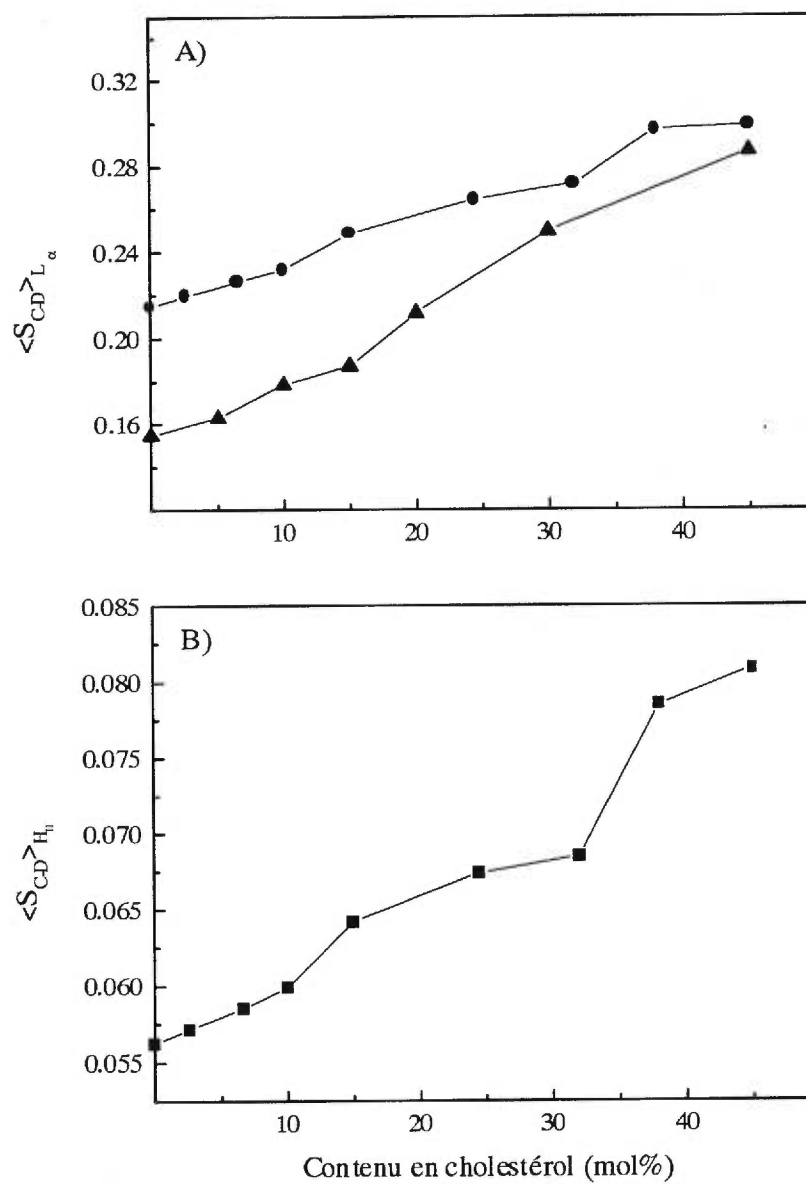


Figure 4.8 Variation du  $\langle S_{CD} \rangle$  en fonction du contenu en cholestérol en phase lamellaire (A) pour la POPE-d<sub>31</sub> (32° C; ●) et la POPC-d<sub>31</sub> (▲) (obtenu de Lafleur et al., 1990a, à 30° C) et en phase H<sub>II</sub> (B) pour la POPE-d<sub>31</sub> (70° C; ■).

Comme on peut voir à la figure 4.7 B, la variation d'ordre le long de la chaîne acyle du phospholipide est plus linéaire en phase  $H_{II}$ , en accord avec des observations antérieures (Lafleur et al., 1990b; Thurmond et al., 1990). Nos résultats montrent que le cholestérol maintient son effet de rigidification sur les chaînes acyles du lipide en phase  $H_{II}$ . L'augmentation de  $S_{C-D}(n)$  est observée tout le long de la chaîne. L'augmentation de  $\langle S_{C-D} \rangle$  en fonction du contenu en cholestérol dans la phase  $H_{II}$  est résumée à la figure 4.8 B. L'ajout de 45 mol% de cholestérol à la POPE- $d_{31}$ , à 70° C, conduit à une augmentation de  $\langle S_{C-D} \rangle$  de 47%, de 0,056 à 0,081.

#### 4.1.1.3 Discussion

##### *Phases lamellaires*

À des températures sous la  $T_m$  de la POPE pure, les résultats obtenus par IR et par RMN indiquent que le cholestérol perturbe les lipides en phase gel. Par spectroscopie infrarouge, l'augmentation de la fréquence de  $\nu_{C-H}$  suggère une augmentation de désordre conformationnel, alors que la région  $\nu_{C=O}$  indique une hydratation plus importante au niveau des groupements carbonyles du lipide. Les résultats obtenus en RMN du  $^2H$  indiquent que le cholestérol augmente les mouvements des lipides en phase gel, donnant lieu à des spectres associés à des mouvements à symétrie axiale, tel que déjà remarqué pour des systèmes PC/cholestérol (Vist et Davis, 1990; Thewalt et Bloom, 1992). À des températures supérieures à la  $T_m$  de la POPE pure, nos résultats indiquent que le cholestérol augmente l'ordre des chaînes des lipides en phase fluide. Ceci est vérifié par la diminution de la fréquence de  $\nu_{C-H}$  en présence de cholestérol et l'augmentation de l'ordre orientationnel des chaînes du lipide. Cette rigidification des chaînes cause aussi une réduction de l'hydratation des groupements carbonyles, en accord avec une étude antérieure sur des échantillons de POPE peu hydratés (Marinov et Dufourc, 1996). Nos résultats pour le système POPE/chol conduisent aux mêmes conclusions que ce qui a déjà été proposé dans des études pionnières sur l'effet du cholestérol sur des bicouches de PC (Umemura et al., 1980; Cortijq et Chapman, 1981): le stérol désordonne la phase gel et ordonne la phase fluide.

Ces effets opposés conduisent à l'abolition de la transition de phase gel à liquide-cristalline. Pour un mélange de POPE/45 mol% chol, les données obtenues par IR ne montrent aucun déplacement de  $\nu_{C-H}$  et les données RMN montrent, sur un large intervalle de température, des spectres typiques de systèmes à symétrie axiale. La diminution de l'amplitude de la transition et son éventuelle disparition en présence de cholestérol ont déjà été reportées pour différentes PE insaturées, au moyen de l'AED (Erand et Bottega, 1987; Cheetham et al., 1989; McMullen et McElhaney, 1997), de la diffraction des rayons-x (Takahashi et al., 1996) et de la RMN (Blume et Griffin, 1982; Ghosh et Seelig, 1982). À haut pourcentage de cholestérol, les spectres de RMN du  $^2H$  indiquent que les molécules de PE dans le mélange ont un mouvement à symétrie axiale par rapport à la normale à la bicouche, comme en phase fluide, mais les valeurs des paramètres d'ordre sont élevées, indiquant des chaînes ordonnées. Ces caractéristiques sont très similaires à celles proposées pour la phase liquide-ordonnée, déjà décrites pour les PC (Vist et Davis, 1990; Thewalt et Bloom, 1992; Linseisen et al., 1993).

Toutes les données obtenues par IR et RMN du  $^2H$  sont combinées dans le diagramme température-composition de la figure 4.9. En dessous de  $T_m$ , trois régions sont définies: une phase gel, une phase fluide ordonnée et une région de coexistence. Ce diagramme diffère de celui dérivé de données obtenues par AED (Erand et Bottega, 1987). Comme la transition est abolie à hauts contenus en cholestérol, l'utilisation de la calorimétrie donne peu d'information dans ces conditions et on s'attend alors à des différences. La région inférieure du diagramme température-composition proposé montre des tendances similaires à celui proposé pour le système DPPE/chol (Blume et Griffin, 1982). Nous avons inclus dans le diagramme température-composition les points limite obtenus des soustractions de spectres (comme démontré à la figure 4.6), mais aussi des symboles rapportant les phases obtenues, tel que déterminé par une inspection visuelle des spectres de RMN du  $^2H$ . En général, les deux approches sont cohérentes. Cette concordance est montrée par le fait que le spectre de différence représentatif d'une phase et le spectre expérimental d'un échantillon avec le contenu en cholestérol correspondant étaient toujours très similaires. Pour la ligne délimitant la région fluide, il y a une bonne concordance entre les limites obtenues des spectres de

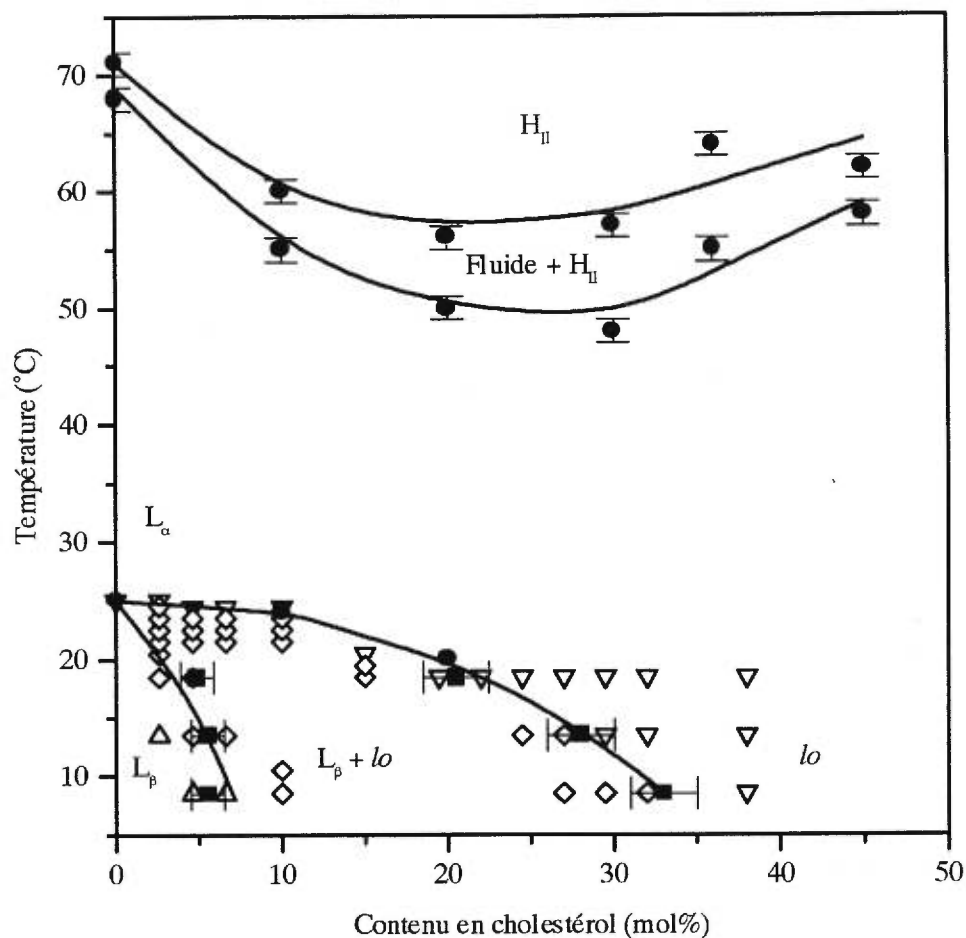


Figure 4.9 Diagramme température-composition proposé pour le système POPE/chol. Symboles utilisés: ●, limite de la transition détectée par spectroscopie IR; ■, obtenus par soustractions spectrales, tel qu'illustré à la figure 4.6; conditions pour lesquelles un spectre typique de la phase gel ( $\Delta$ ), fluide ( $\nabla$ ), ou d'une coexistence des phase gel et fluide ( $\diamond$ ) sont enregistrés, tel que déterminé par inspection visuelle. Les températures associées aux données RMN ont été systématiquement augmentées de  $3,5^{\circ}\text{C}$ , la différence entre la  $T_m$  de la POPE et celle de la POPE- $d_{31}$ , pour inclure sur la même figure les données RMN et IR. Les barres d'erreur représentent l'incertitude sur la composition reliée à la détermination du facteur de soustraction. Les lignes sur le diagramme définissent les régions dans lesquelles la(les) même(s) phase(s) est(sont) identifiée(s).

différence et les limites qui peuvent être déduites de l'inspection visuelle des spectres. Pour la ligne délimitant la région  $L_{\beta}$ , la soustraction du spectre de la composante gel obtenu par différence du spectre obtenu avec un échantillon pour un contenu en cholestérol correspondant a donné lieu à un peu de signal résiduel. Une inspection minutieuse des spectres avec les contenus en cholestérol voisins de ceux définis par soustraction spectrale indique une position légèrement différente pour les limites entre la région  $L_{\beta}$  et la région de coexistence. Le cas pour lequel la divergence est la plus prononcée est celui du point limite de la phase gel à 15° C; le contenu en cholestérol pour ce point est estimé à 5 mol% par la soustraction de spectres, mais le spectre expérimental de l'échantillon contenant 5 mol% chol affiche une contribution de lipides en phase fluide évaluée à environ 9%, basé sur l'aire relative. Cette légère différence peut être due au fait que, à cette température, l'échantillon contenant 15 mol% chol est près de la ligne délimitant la phase fluide; dans une telle situation, l'échange rapide des lipides entre les deux phases peut affecter la forme du signal et les spectres près des frontières entre les régions doivent être considérés avec circonspection (Blume et Griffin, 1982). Cet effet peut conduire à certaines déviations, tel que déjà décrit (Morrow et al., 1991; Linseisen et al., 1993).

Nos résultats obtenus en phase lamellaire pour le système POPE/chol révèlent plusieurs caractéristiques. Premièrement, à un contenu en cholestérol supérieur à ~ 35 mol%, les molécules de POPE forment une phase fluide où les chaînes acyles sont très ordonnées. Du point de vue de la RMN et de l'IR, l'organisation des bicouches de POPE contenant plus de 35 mol% de cholestérol est très semblable à celle observée pour les PC. Tel que décrit dans des articles récents sur des systèmes PC/chol (Vist et Davis, 1990; Thewalt et Bloom, 1992; Linseisen et al., 1993), cette région du diagramme température-composition est désignée comme la phase liquide-ordonnée. Par conséquent, la formation d'une telle phase ne semble pas exclusive aux PC et ce travail étend ce comportement à la POPE. Deuxièmement, nos résultats suggèrent que la région de coexistence des phases gel et liquide-ordonnée est différente de celle observée pour les PC. Nos données ne suggèrent pas la présence d'un eutectique, tel que proposé par Vist et Davis (1990) pour le système DPPC/chol. La transition de la phase gel à la phase

fluide pour la POPE-d<sub>31</sub>, tel qu'observé par la forme des spectres de RMN du <sup>2</sup>H, est élargie progressivement avec l'addition de cholestérol. La transition se déroule sur 6° C quand l'échantillon contient aussi peu que 3 mol% chol et sur plus de 10° C quand la proportion de cholestérol est de 5 mol%. Les diagrammes de phase proposés pour plusieurs systèmes PC/chol (Ipsen et al., 1987; Vist et Davis, 1990; Thewalt et Bloom, 1992; Linseisen et al., 1993) incluent aussi une ligne horizontale représentant trois phases: la coexistence des phases L<sub>β</sub>, L<sub>α</sub> et liquide-ordonnée. Cette ligne s'étend de 5 à 20 mol% de cholestérol. Une ligne similaire est proposée dans le diagramme température-composition du système DPPC/chol proposé par McMullen et McElhaney (1995), excepté que, dans leur cas, cette ligne commence à 0 mol% chol. En chauffant l'échantillon, le passage de cette ligne est associé à un pic étroit en AED. Nos résultats ne suggèrent pas la présence d'une telle ligne horizontale pour le système POPE/chol. La fin de la transition de phase gel à fluide est observée à plus basse température quand la POPE contient plus de 10 mol% chol. Par conséquent, la ligne où il y a coexistence des trois phases est beaucoup plus courte ou absente dans le diagramme température-composition du système POPE/chol. Cette conclusion est appuyée par des résultats d'AED obtenus avec des systèmes PE insaturées/chol (Erand et Bottega, 1987; Takahashi et al., 1996; McMullen et McElhaney, 1997). L'addition de cholestérol à la PE déplace l'endotherme associé à la transition de phase gel à fluide vers les plus basses températures et aucun pic étroit n'est observé à la T<sub>m</sub> du phospholipide pur quand le contenu en cholestérol est supérieur à 10 mol%. La frontière entre la coexistence des phases *lo* et L<sub>β</sub> et la phase *lo* montre aussi une forme différente pour des proportions en cholestérol supérieures à 10 mol%, si on la compare avec les diagrammes de phase proposés pour des systèmes PC/chol (Vist et Davis, 1990; Thewalt et Bloom, 1992; Linseisen et al., 1993). Pour le système POPE/chol, la proportion de cholestérol nécessaire pour éliminer la composante de phase gel du spectre dépend considérablement de la température. Sous la T<sub>m</sub> du lipide pur, de plus bas contenus en cholestérol sont nécessaires pour obtenir exclusivement un spectre typique de la phase fluide à mesure qu'on s'approche de la T<sub>m</sub> du lipide, comme observé précédemment pour le système DPPE/chol (Blume et Griffin, 1982). Ceci est quelque peu différent des comportements notés pour des PC contenant du cholestérol (Vist et Davis, 1990;

Linseisen et al., 1993) pour lesquelles un contenu en cholestérol relativement constant est nécessaire pour obtenir un échantillon complètement fluide (liquide-ordonnée). Ceci peut être clairement observé sur le diagramme de phase partiel du système 1-stéaroyl-2-élaïdoyl-*sn*-phosphatidylcholine/chol (Linseisen et al., 1993), où les données sont enregistrées 15° C sous la  $T_m$  du lipide pur.

Deux commentaires doivent être ajoutés. Premièrement, la partie du diagramme température-composition proposé, à bas pourcentage de cholestérol et autour de la  $T_m$  du phospholipide pur, est plus simple que celui des PC parce que la POPE ne forme pas la phase  $P_\beta$  (ondulée). Deuxièmement, nous n'avons pas inclus dans le diagramme température-composition les régions où les phases fluides coexistent, même si de telles régions doivent être présentes, pour être en accord avec la règle des phases. De telles régions ont été proposées pour des systèmes PC/chol (Ipsen et al., 1987; Vist et Davis, 1990; McMullen et McElhaney, 1995). Parce qu'il est difficile expérimentalement de déduire l'existence de telles régions, nous ne faisons aucune tentative pour définir cette région dans le diagramme température-composition du système POPE/chol. L'échange de lipides entre deux phases fluides est probablement rapide sur l'échelle de temps RMN, nous empêchant ainsi de détecter leur coexistence par cette méthode.

D'un point de vue moléculaire, nos résultats indiquent que l'effet de rigidification du cholestérol est moins prononcé pour la POPE- $d_{31}$  que pour la POPC- $d_{31}$ . L'effet plus faible du cholestérol sur la matrice de POPE relativement à celle de la POPC peut être à l'origine des différences observées dans chacun de leur diagramme température-composition. Il est intéressant de noter que les deux phospholipides convergent vers un ordre orientationnel similaire à haut contenu en cholestérol; à 45 mol% chol,  $\langle S_{C-D} \rangle$  est de 0,29 et l'ordre orientationnel au plateau est d'environ 0,4, indiquant des chaînes très rigides. Une bicouche fluide de 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-phospholipide doit avoir, à une température donnée, un paramètre d'ordre limite correspondant à un arrangement des chaînes très compact. Les valeurs de  $\langle S_{C-D} \rangle$  calculées pour la POPE- $d_{31}$  et pour la POPC- $d_{31}$  contenant tous les deux 45 mol% de cholestérol approchent cette situation. Ceci implique qu'on approche aussi une épaisseur limite pour une bicouche fluide.



En utilisant l'approche proposée par Douliez et al. (1995), nous avons estimé l'effet du cholestérol sur la longueur de chaîne pour la POPE-d<sub>31</sub> et la POPC-d<sub>31</sub>, à 30° C. La longueur de chaîne de la POPE-d<sub>31</sub> est de 14,4 et 16,1 Å pour le lipide pur et pour le lipide contenant 45 mol% chol, respectivement; ceci correspond à une augmentation de 12%. Dans le cas de la POPC-d<sub>31</sub>, la longueur de chaîne calculée est de 13,3 et 15,9 Å pour le lipide pur et le lipide contenant 45 mol% chol, respectivement, une augmentation de 20%. Ces résultats montrent bien l'effet plus prononcé du cholestérol sur la POPC-d<sub>31</sub> que sur la POPE-d<sub>31</sub>, et la convergence vers une bicouche épaisse.

### *Transition de phase lamellaire à hexagonale*

Le cholestérol a aussi une influence marquée sur la tendance du lipide à former des phases non-lamellaires. Entre 0 et 30 mol% chol, la Th de la POPE, tel que détectée par spectroscopie IR, est déplacée vers les basses températures, alors qu'une plus grande proportion de cholestérol conduit à une augmentation de Th. Ces résultats sont inclus dans le diagramme température-composition: les symboles représentent le début et la fin de la variation abrupte de  $\nu_{C-H}$  en fonction de la température, cette variation étant associée avec la transition de phase lamellaire à hexagonale. (Figure 4.9). Ce comportement a déjà été observé pour plusieurs PE par AED (Erand et Bottega, 1987; Cheetham et al., 1989) et diffraction des rayons-x (Takahashi et al., 1996). Les données RMN confirment que, à 70° C, la phase hexagonale est formée pour la POPE-d<sub>31</sub> avec des contenus en cholestérol variant de 0 à 45 mol%. Les lignes sur le diagramme température-composition doivent être considérées comme des guides reliant les points et ne correspondent pas nécessairement aux frontières des phases. La situation est quelque peu complexe dans cette région du diagramme, puisque la région de coexistence ne respecte pas la règle des phases. Nos résultats révèlent l'influence du cholestérol sur la transition de phase lamellaire à H<sub>II</sub> de la POPE et nous donnent de l'information sur les détails moléculaires de cette transition. D'abord, les résultats révèlent que le cholestérol maintient son effet de rigidification sur les chaînes acyles du phospholipide; ceci est déduit de l'augmentation des éclatements quadrupolaires observée par RMN du <sup>2</sup>H et du déplacement de  $\nu_{C-H}$  vers les basses fréquences obtenu par les spectres IR. La variation

de la longueur de chaîne du lipide induite par la présence de cholestérol peut être estimée des paramètres d'ordre, utilisant une approche similaire à celle proposée pour la phase  $L_{\alpha}$  (Douliez et al., 1995), vu que les mouvements conduisant au moyennage de l'interaction quadrupolaire sont similaires pour les deux phases. Cependant, les paramètres d'ordre mesurés dans la phase hexagonale doivent être multipliés par un facteur de 2 pour tenir compte du moyennage additionnel introduit par la diffusion rapide des molécules de lipide autour des cylindres d'eau de la phase  $H_{II}$  (Thurmond et al., 1990; Lafleur et al., 1996). À 70° C, la longueur de chaîne est estimée à 12,5 et 13,4 Å pour la POPE-d<sub>31</sub> pure et pour le mélange POPE-d<sub>31</sub>/45 mol% chol, respectivement. L'effet de rigidification du cholestérol sur les chaînes acyles du lipide est donc maintenu dans la phase  $H_{II}$ , mais il n'est pas aussi prononcé qu'en phase  $L_{\alpha}$ . Aussi, l'arrangement plus serré des lipides autour du cylindre de la phase  $H_{II}$  est accompagné d'une déshydratation limitée de la région carbonyle, tel qu'observé par spectroscopie IR. Une déshydratation de la tête polaire de la POPE en présence de cholestérol dans la phase  $H_{II}$  a aussi été suggérée par des expériences de RMN du D<sub>2</sub>O sur des échantillons peu hydratés (Marinov et Dufourc, 1996). Cette région du spectre IR montre que, pour la POPE pure, il y a moins de groupements carbonyles participant à des liaisons hydrogène dans la phase  $H_{II}$  que dans la phase  $L_{\alpha}$ , tel que remarqué par la faible intensité relative de la composante de basse fréquence. Cette interprétation est renforcée par l'analyse de la région des phosphates (fréquence de la bande d'élongation antisymétrique des PO<sub>2</sub>) qui indique une déshydratation. On s'attend donc à ce que le cholestérol ne conduise pas à une déshydratation prononcée de la phase  $H_{II}$ , puisque cette dernière a déjà une hydratation limitée.

La variation de  $T_h$  en fonction du contenu en cholestérol n'est pas monotone. Deux paramètres peuvent affecter cette transition. D'abord, la présence de cholestérol déplace la balance amphiphile puisque cette molécule a une petite tête polaire et une portion hydrophobe importante. Également, le paramètre d'empilement élevé du cholestérol favorise la formation de la phase  $H_{II}$  et semble être le paramètre le plus significatif pour expliquer la diminution de  $T_h$  observée en présence de cholestérol. Nous montrons également que le cholestérol a un effet de rigidification des chaînes

acyles de la POPE dans la phase  $H_{II}$ , en dépit de la géométrie différente de cette phase. Il est généralement accepté que le désordre des chaînes acyles (lors d'une augmentation de température, introduit par la présence d'insaturations) favorise la formation de la phase  $H_{II}$ , en réduisant  $R_o$  (Rilfors et al., 1984; Lafleur et al., 1996). Si une interprétation analogue est faite, l'effet de rigidification du cholestérol en phase  $H_{II}$  ne devrait pas être favorable à sa formation. Ce facteur ne semble pas contribuer de façon significative à des contenus en cholestérol inférieurs à 30 mol%, puisqu'on observe une diminution de  $Th$ . Il peut, cependant, être impliqué dans l'augmentation de  $Th$  observée pour des proportions plus importantes de cholestérol. Il est intéressant de noter ici que l'amplitude de la variation de l'ordre dans les chaînes observée pendant la transition de phase lamellaire à  $H_{II}$ , tel qu'obtenue à partir de la bande  $\nu_{C-H}$ , varie d'une manière concertée avec  $Th$  (Figure 4.2). Pour de faibles contenus en cholestérol, l'amplitude augmente; ceci peut être expliqué par le fait que la phase lamellaire devient plus ordonnée et que les changements structuraux vers une phase dont la géométrie permet un espace considérable pour les mouvements des chaînes conduit à une augmentation du désordre des chaînes. Pour des contenus en cholestérol entre 30 et 45 mol%, l'amplitude du déplacement de  $\nu_{C-H}$  pendant la transition de phase lamellaire à  $H_{II}$  diminue. Les spectres RMN montrent que, dans de telles conditions, la rigidification relative des chaînes acyles du phospholipide en phase  $H_{II}$  devient plus importante qu'en phase lamellaire. Ceci peut être relié au fait qu'on atteint une limite à l'empilement compact des chaînes en phase lamellaire, alors que la géométrie cylindrique de la phase  $H_{II}$  laisse de l'espace pour une rigidification additionnelle. La variation de l'enthalpie associée à la transition de phase lamellaire à hexagonale de la POPE en présence de cholestérol ne varie pas de façon linéaire entre 0 et 45 mol% chol (Erand et Bottega, 1987) et elle peut être influencée par l'ampleur de l'introduction de désordre dans les chaînes pendant la transition. D'autres facteurs tel l'influence du cholestérol sur le module de courbure,  $K_c$ , ainsi que la séparation de phase du cholestérol devraient être examinés.

## 4.1.2 Systèmes DMPE-d<sub>54</sub>/cholestérol et DSPE/cholestérol

### 4.1.2.1 Introduction

Comme il a été mentionné dans l'introduction, les phosphatidyléthanolamines, lorsqu'incubées à basse température pendant un certain temps, forment une phase gel anhydre, une phase moins hydratée et pour laquelle les chaînes sont plus ordonnées que la phase gel hydratée. La température de transition de phase gel anhydre à liquide-cristalline se situe à une température supérieure à la  $T_m$  du lipide, la transition impliquant la fusion des chaînes, mais aussi l'hydratation de la tête polaire. Comme indiqué également dans l'introduction, une simulation numérique a suggéré qu'en présence de 5 mol% de cholestérol, il y avait découplage de la transition de phase gel anhydre à liquide-cristalline pour la DMPE (Lagüe, 1996). Il y aurait une transition à 20° C, résultat de l'hydratation des têtes, et une transition à 49° C, correspondant à la fusion des chaînes. Une étude par AED a également montré la présence de deux transitions pour des phosphatidyléthanolamines à chaînes longues (18, 19 et 20 carbones) saturées (Lewis et McElhaney, 1993). Ces deux transitions ont été attribuées à l'hydratation de la tête polaire et à la fusion des chaînes qui sont à des températures différentes pour ces trois phosphatidyléthanolamines (Lewis et McElhaney, 1993). Le but de notre étude est donc de vérifier, par spectroscopie IR, s'il y a effectivement un découplage de la transition de phase gel anhydre à liquide-cristalline pour la DMPE-d<sub>54</sub> en présence de 5 mol% de cholestérol et pour une PE à chaînes longues, la DSPE. L'effet du cholestérol sur les transitions de la DSPE sera aussi examiné.

Nous avons essayé deux méthodes différentes, décrites par Silvius et al. (1986), pour la préparation des échantillons et leur incubation de manière à favoriser la formation de la phase gel anhydre. Dans un premier cas, le lipide est hydraté de façon à ce qu'il ne se retrouve jamais en phase liquide-cristalline. L'échantillon est alors incubé pendant 5 jours à 4° C (Méthode d'incubation no 1). C'est cette méthode qui a été utilisée dans la plupart des expériences que nous avons réalisées. Dans un deuxième cas, le lipide a été hydraté normalement (cycles gel-dégel sous et au-dessus de la  $T_m$ ) et il est incubé pendant un mois à 4° C (Méthode d'incubation no 2). Nous avons constaté que les deux méthodes

permettent la formation efficace de la phase gel anhydre, tel que rapporté dans la littérature (Silvius et al. (1986)).

Les phases gel hydratée et gel anhydre sont très semblables. La différence principale entre ces deux phases est que la phase gel anhydre est moins hydratée que la phase gel hydratée (d'où son nom). Nous avons donc étudié deux bandes des spectres IR dont la fréquence et la largeur sont influencées par l'hydratation du lipide: la bande d'élongation antisymétrique des  $\text{PO}_2^-$  de la tête polaire du lipide ( $\nu_{\text{PO}_2^-}$ ) et la bande d'élongation des groupements carbonyles ( $\nu_{\text{C=O}}$ ). Une variation de la fréquence et de la largeur des bandes  $\nu_{\text{C=O}}$  et  $\nu_{\text{PO}_2^-}$  est remarquée selon le degré d'hydratation (Wong et Mantsch, 1988; Salgado et al., 1995), puisque la nature et la force des liens hydrogène changent. Nous avons donc suivi l'évolution de ces deux bandes (fréquence et largeur) en fonction de la température et de l'ajout de cholestérol pour déterminer l'hydratation ou la déshydratation de la tête polaire du lipide. Nous avons également étudié la variation de la bande d'élongation symétrique des  $\text{CD}_2$  (DMPE- $d_{54}$ ) ou  $\text{CH}_2$  (DSPE) des chaînes acyles du lipide avec la température, de façon à déterminer les variations d'ordre des chaînes acyles des lipides. À partir de l'analyse de ces bandes, nous avons finalement vérifié s'il y a découplage de la transition de phase gel anhydre à liquide-cristalline dans certains cas.

#### 4.1.2.2 Résultats

##### *Système DMPE- $d_{54}$ /5 mol% chol*

Dans un premier temps, nous avons désiré établir si les régions carbonyles et phosphates permettaient la distinction des phases gel anhydre, gel hydratée et fluide. Le thermotropisme de la DMPE- $d_{54}$  pure incubée selon la méthode d'incubation no 1 est obtenu par la variation de la fréquence de la bande d'élongation symétrique des  $\text{CD}_2$  des chaînes acyles du lipide (Figure 4.10). La  $T_m$  du lipide, dans ce cas-ci, se situe à  $56^\circ\text{C}$ . Lorsqu'il n'est pas deutéré, la température de transition de phase gel hydraté à fluide de la DMPE est de  $49^\circ\text{C}$  (Blume, 1980), tandis que la température de transition de phase gel

anhydre à fluide rapportée dans la littérature se situe entre 53 et 58° C (Mantsch et al., 1983; Silvius et al., 1986; Lewis et McElhaney, 1993; Salgado et al., 1995; Takahashi et al., 1997; Takahashi et al., 1997b). Ceci vient donc confirmer que la méthode d'incubation no 1 conduit bel et bien à la formation de la phase gel anhydre. La figure 4.11 présente des profils de bandes  $\nu_{C=O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$  pour les trois phases pertinentes à cette étude. On peut voir sur cette figure les bandes caractéristiques d'un lipide en phase gel hydratée à 10° C (le lipide a été hydraté par des cycles de températures au-dessus et en-dessous de la  $T_m$  du lipide), en phase gel anhydre à 30° C (après incubation selon la méthode no 1) et en phase liquide-cristalline à 60° C. Les différentes fréquences et largeurs pour ces trois phases sont détaillées dans le tableau III.

|             | Bande $\nu_{C=O}$                  |                           | Bande $\nu_{PO_2^-}$               |                           |
|-------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|
|             | L (cm <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> | $\nu$ (cm <sup>-1</sup> ) | L (cm <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup> | $\nu$ (cm <sup>-1</sup> ) |
| $L_\beta$   | 25,9                               | 1737,6                    | 33,7                               | 1219,0                    |
| Gel anhydre | 7,0                                | 1740,4                    | 6,7                                | 1223,9                    |
| $L_\alpha$  | 33,4                               | 1732,2                    | 37,6                               | 1216,0                    |

Tableau III Largeurs de bande (L) et fréquence ( $\nu$ ) des bandes  $\nu_{C=O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$  pour la DMPE-d<sub>54</sub> pure dans différentes phases.

<sup>a</sup> Les largeurs de bande ont été mesurées à 75% de la hauteur de la bande.

On remarque une différence importante entre les largeurs et fréquences de ces deux bandes pour les phases gel anhydre et hydratée. En effet, la largeur de bande augmente environ d'un facteur 3,5 dans le cas de  $\nu_{C=O}$  et de 5 dans le cas de  $\nu_{PO_2^-}$ . On remarque une légère augmentation supplémentaire de la largeur de bande lors du passage de la phase gel hydratée à la phase liquide-cristalline. La fréquence des deux bandes étudiées diminue lors du passage de la phase gel anhydre à gel hydratée: on peut remarquer une diminution de 2,8 cm<sup>-1</sup> pour la bande  $\nu_{C=O}$  et de 5 cm<sup>-1</sup> pour  $\nu_{PO_2^-}$ . Ces différences de largeur et de fréquence de bande pour les deux bandes étudiées en phase gel anhydre et gel hydratée sont

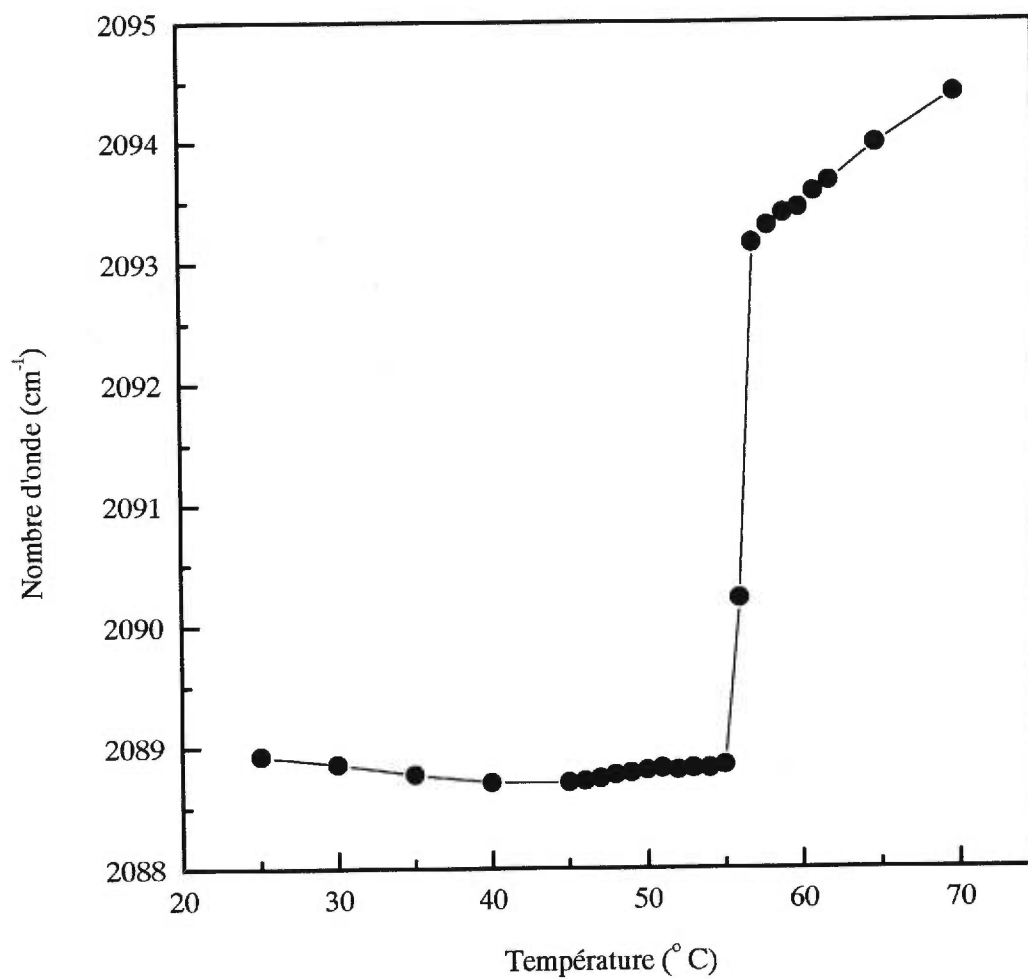


Figure 4.10 Variation de  $\nu_{C-D}$  avec la température pour la DMPE-d<sub>54</sub> pure incubée selon la méthode d'incubation no 1.

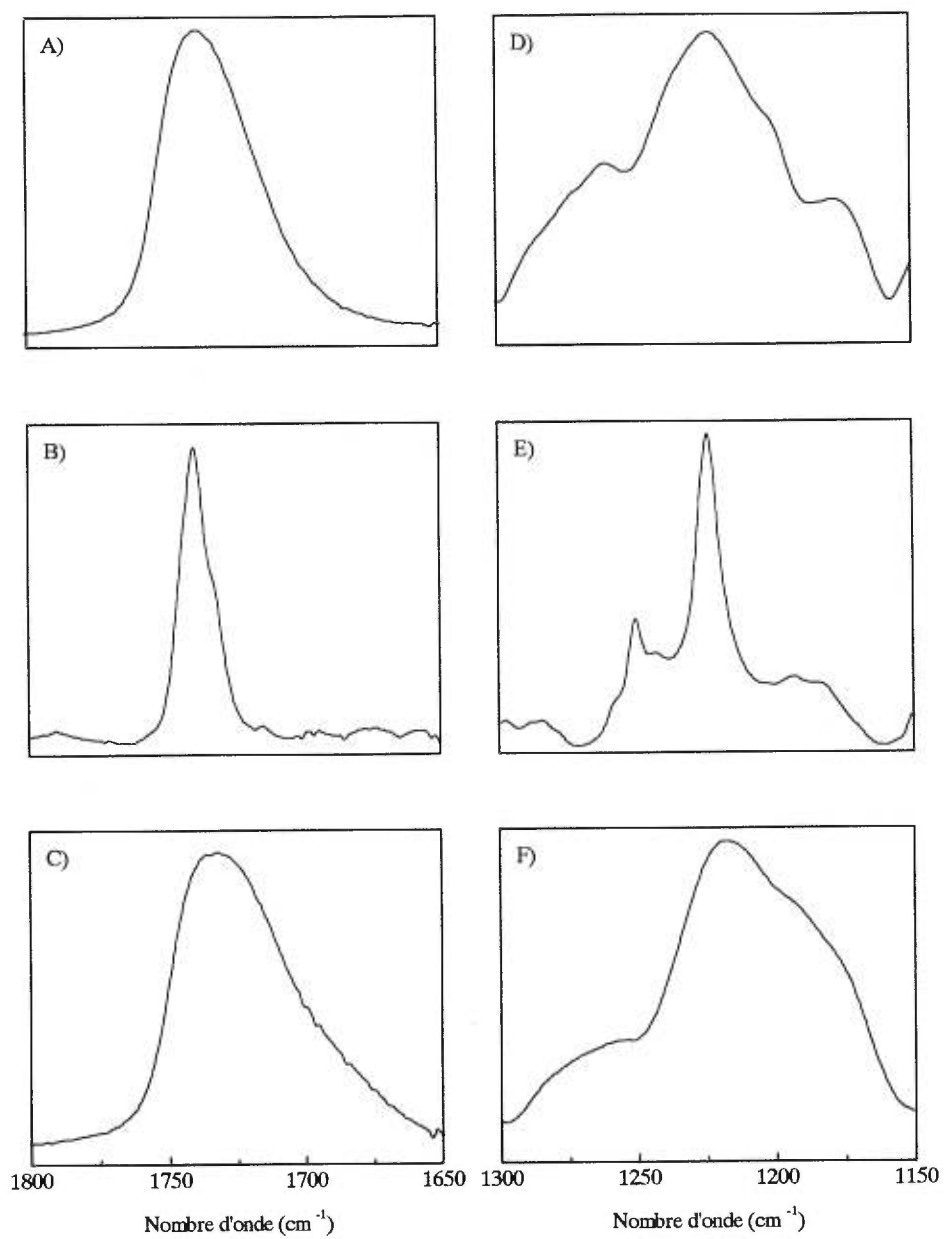


Figure 4.11 Bandes  $\nu_{C=O}$  (colonne de gauche) et  $\nu_{PO_2^-}$  (colonne de droite) pour la DMPE-d<sub>54</sub> pure pour la phase gel hydratée (A et D), gel anhydre (B et E) et liquide-cristalline (C et F).



en accord avec une étude précédente (Salgado et al., 1995). En effet, il a été rapporté que le passage de la phase gel anhydre à gel hydratée diminuait la fréquence de  $\nu_{C-O}$  de  $3 \text{ cm}^{-1}$ , alors que la largeur augmentait d'un facteur 2,3. La fréquence de la bande  $\nu_{PO_2^-}$  est diminuée de  $5 \text{ cm}^{-1}$  lors de la même transition et la largeur de la bande augmente. Les largeurs de bande étant plus sensibles à l'hydratation que les fréquences, les prochaines analyses traiteront seulement des largeurs de bande.

Pour le mélange DMPE-d<sub>54</sub>/5 mol% chol, les deux méthodes d'incubation ont été essayées et les résultats sont similaires; les résultats présentés sont ceux obtenus avec la méthode d'incubation no 1. À la figure 4.12, le thermotropisme du mélange DMPE-d<sub>54</sub>/5 mol% chol, suivi à l'aide de trois paramètres spectraux, est présenté: le déplacement abrupt de la  $\nu_{C-D}$  indique que la fusion des chaînes se produit à  $52^\circ \text{ C}$  (Figure 4.12A). Ceci représente une diminution de  $4^\circ \text{ C}$  par rapport au thermotropisme du lipide pur. On a représenté les largeurs de bande (mesurées à 75% de la hauteur de la bande) en fonction de la température pour les deux bandes  $\nu_{C-O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$  aux figures 4.12B et C. Les bandes  $\nu_{C-O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$  enregistrées à  $30$  et  $60^\circ \text{ C}$  sont présentées à la figure 4.13. Les largeurs obtenues à basse température sont typiques de la phase gel anhydre ( $7,4 \text{ cm}^{-1}$  pour  $\nu_{C-O}$  et  $9,5 \text{ cm}^{-1}$  pour  $\nu_{PO_2^-}$  à  $30^\circ \text{ C}$ ). On constate que la largeur de ces deux bandes varie abruptement à  $52^\circ \text{ C}$ , de façon concertée avec les  $\nu_{C-D}$ . Nous n'observons aucune transition à  $20^\circ \text{ C}$ , contrairement à ce qui était suggéré par la simulation numérique (Lagüe, 1996). Les largeurs, à haute température, sont comparables à la phase fluide ( $26,8 \text{ cm}^{-1}$  pour  $\nu_{C-O}$  et  $27,1 \text{ cm}^{-1}$  pour  $\nu_{PO_2^-}$  à  $60^\circ \text{ C}$ ).

### *Système DSPE/chol*

Le thermotropisme de la DSPE pure et des mélanges DSPE/5 et 15 mol% chol a été obtenu par IR (Figure 4.14A). Les échantillons ont été incubés selon la méthode d'incubation no 1. Nous notons, pour le phospholipide pur, deux transitions de phase, l'une faible centrée à  $66^\circ \text{ C}$  et l'autre à  $76^\circ \text{ C}$ . Lewis et McElhaney (1993) ont obtenu, par AED,

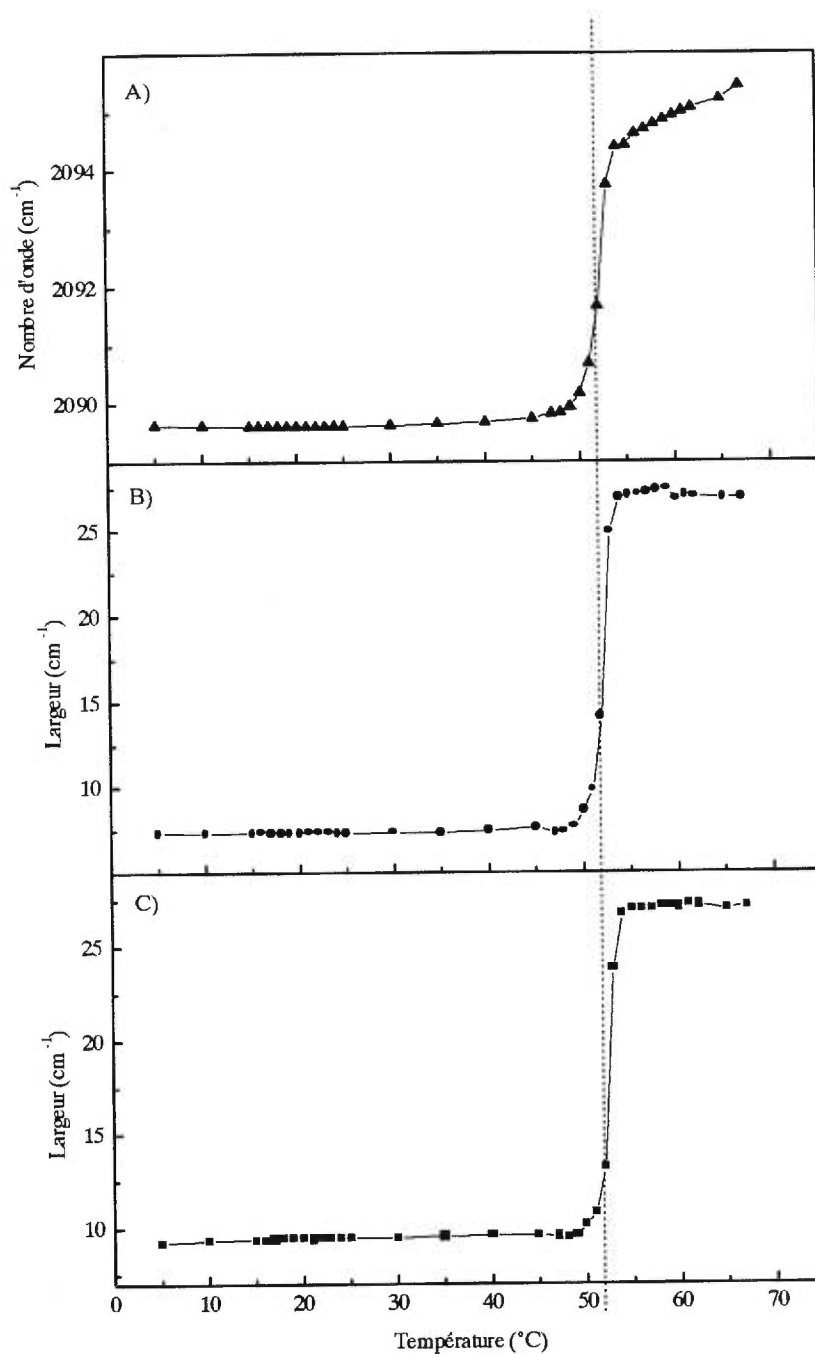


Figure 4.12 Variation de A) la fréquence de  $\nu_{C-D}$  B) la largeur (mesurée à 75% de la hauteur) de la bande  $\nu_{C-O}$  et C) la largeur (mesurée à 75% de la hauteur) de la bande  $\nu_{PO_2^-}$  en fonction de la température pour le mélange DMPE-d<sub>54</sub>/5 mol% chol incubé selon la méthode d'incubation no 1.

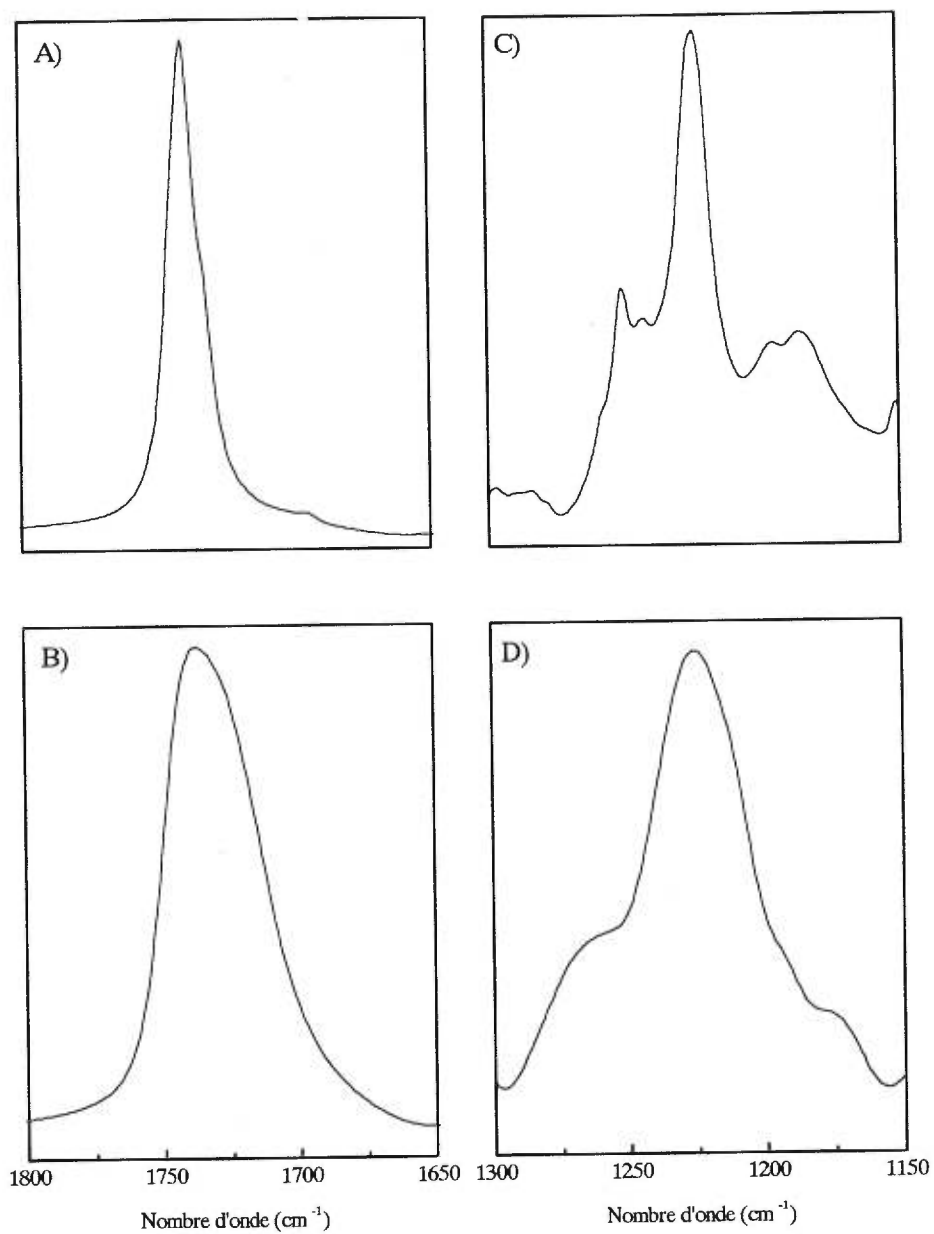


Figure 4.13 Bande  $\nu_{C=O}$  (colonne de gauche) et bande  $\nu_{PO_2^-}$  (colonne de droite) pour le mélange DMPE- $d_{54}/5$  mol% chol incubé selon la méthode d'incubation no 1 à 30° C (A et C) et 60° C (B et D).

deux transitions très rapprochées de 73,3 et 74,2° C, la première d'amplitude moins importante, comme dans notre cas. L'ajout de 5 mol% de cholestérol à la DSPE diminue la température de transition à 74° C. On note également une augmentation de  $\nu_{\text{C-H}}$  à basse température et une diminution à haute température, de même qu'une diminution de l'amplitude des deux transitions. Cependant, la diminution pour la première transition est plus importante. Finalement, avec l'ajout de 15 mol% chol, la première transition semble à toutes fins pratiques abolie, mais la transition principale est semblable à celle observée en présence de 5 mol% chol.

Nous avons, pour ces trois mélanges, représenté les variations de la largeur des bandes  $\nu_{\text{C=O}}$  et  $\nu_{\text{PO}_2^-}$  en fonction de la température en parallèle avec la variation de  $\nu_{\text{C-H}}$  (Figure 4.14). Pour le lipide pur, on note une augmentation abrupte de la largeur des deux bandes à 76° C. À basse température, les largeurs sont typiques de la phase gel anhydre, alors qu'à haute température, elles sont typiques de la phase liquide-cristalline. Pour le mélange DSPE/5 mol% chol, on note une légère diminution de la largeur des deux bandes entre 40 et 60° C. Après cette diminution de largeur, nous observons des valeurs typiques de la phase gel anhydre, tandis qu'aux températures supérieures à 74° C, les largeurs de bandes sont typiques de la phase fluide hydratée. Le mélange DSPE/15 mol% chol présente une évolution plus complexe. Après une augmentation de la largeur entre 40 et 50° C, on note une diminution importante de la largeur et à nouveau une augmentation abrupte à 74° C. Les valeurs de largeur à 40° C se rapprochent de celles de la phase gel hydratée, alors qu'à 70° C, elles se rapprochent de la phase gel anhydre. Finalement, à 80° C, la largeur est près des valeurs obtenues pour la phase liquide-cristalline.

#### 4.1.2.3 Discussion

##### *Système DMPE-d<sub>54</sub>/5 mol% chol*

La température de fusion des chaînes de la DMPE-d<sub>54</sub> pure, lorsqu'elle est incubée selon la méthode no 1, est de 56° C, indiquant un passage de la phase gel anhydre à liquide-

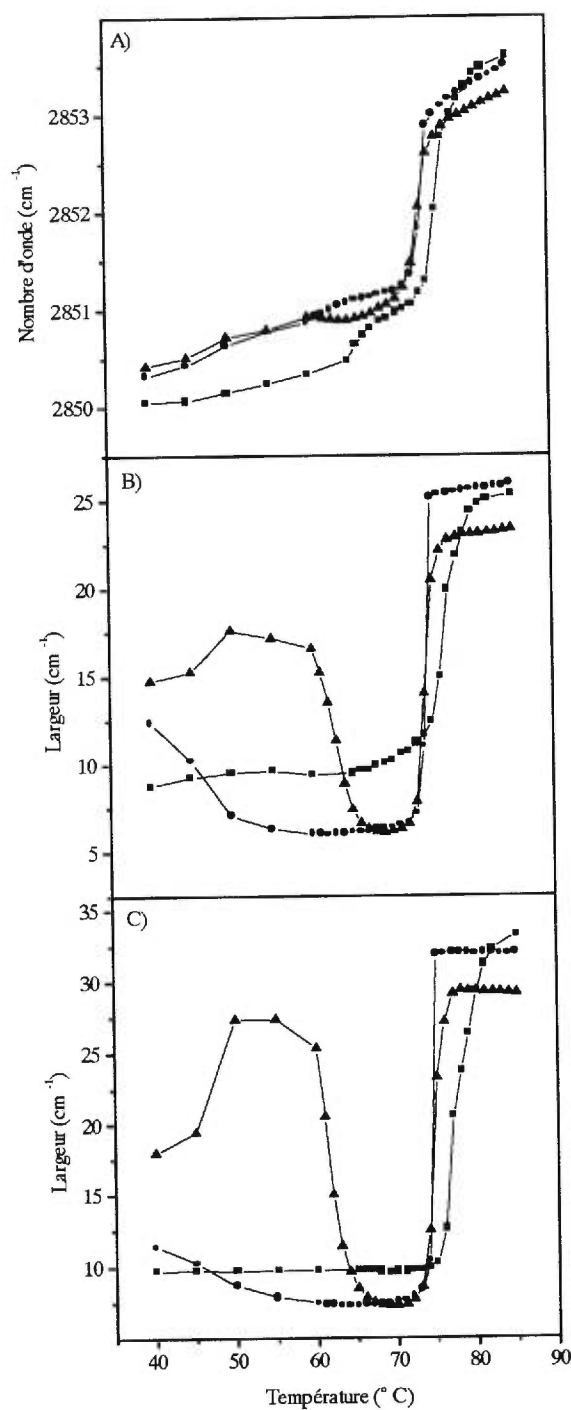


Figure 4.14 Variation de A) la fréquence de  $\nu_{C-H}$  B) la largeur (à 75% de la hauteur) de la bande  $\nu_{C=O}$  et C) la largeur de la bande  $\nu_{PO_2^-}$  en fonction de la température pour la DSPE pure (■), le mélange DSPE/5 mol% chol (●) et le mélange DSPE/15 mol% chol (▲) incubés selon la méthode d'incubation no 1.

cristalline. En effet, la transition de la phase gel hydratée à liquide-cristalline se situe à 49° C (Blume, 1980), alors que la transition de la phase gel anhydre à liquide-cristalline se situe entre 53 et 58° C (Mantsch et al., 1983; Silvius et al., 1986; Lewis et McElhaney, 1993; Salgado et al., 1995; Takahashi et al., 1997; Takahashi et al., 1997b). Nous avons alors comparé les fréquences et largeurs de bande de  $\nu_{C-O}$  et de  $\nu_{PO_2^-}$  d'un échantillon de DMPE-d<sub>54</sub> pure sans incubation à basse température et avec incubation selon la méthode no 1. On constate une diminution importante de la largeur de bande en phase gel anhydre, accompagnée d'une augmentation de la fréquence pour les deux bandes étudiées. Une diminution de fréquence de ces deux bandes a été associée à une hydratation plus importante pour d'autres types de systèmes (Blume et al., 1988; Mantsch et McElhaney, 1991; Lewis et al., 1994). L'examen de la fréquence et de la largeur de ces deux bandes nous donne donc un moyen d'identification de la phase dans laquelle se trouve le lipide à basse température. Des bandes plus étroites, de même que des fréquences plus élevées ont déjà été observées pour ces deux bandes pour la phase gel anhydre lorsque comparé avec la phase gel hydratée (Salgado et al., 1995). L'augmentation additionnelle de la largeur de bande et la diminution de fréquence entre la phase gel hydratée et la phase liquide-cristalline s'expliquent aussi en terme d'hydratation, la phase liquide-cristalline étant plus hydratée que la phase gel hydratée (pour un résumé, voir Bach et Miller, 1998).

La fusion des chaînes du mélange DMPE-d<sub>54</sub>/5 mol% chol s'effectue à une température de 52° C (Figure 4.12A), soit 4° C sous la T<sub>m</sub> du lipide pur. Cet écart de 4° C par rapport à la transition de phase du lipide pur est associé à la présence de cholestérol. Par AED, un déplacement de 2° C par rapport au lipide pur a été observé pour le mélange DMPE/5 mol% chol (Blume, 1980). Une variation des largeurs de  $\nu_{C-O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$  (Figure 4.12B et C) est remarquée à la même température. La transition implique donc à la fois la fusion des chaînes (à partir de  $\nu_{C-D}$ ) et l'hydratation de la tête polaire ( $\nu_{C-O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$ ). Nous n'observons d'ailleurs aucune transition à 20° C. Les valeurs de largeur de bande obtenues pour le mélange DMPE-d<sub>54</sub>/5 mol% chol nous permettent de conclure que la transition de phase centrée à 52° C est un passage de la phase gel anhydre à liquide-cristalline. Le modèle suggérant que l'hydratation de la tête polaire et la fusion des chaînes

soient découplées (qu'il y a donc deux transition de phase: gel anhydre à gel hydratée et gel hydratée à liquide-cristalline) doit donc être révisé.

### *Système DSPE/chol*

La variation de la position de  $\nu_{C-H}$  de la DSPE pure a montré qu'il y a, comme mentionné par Lewis et McElhaney (1993), deux transitions de phase (Figure 4.14). Ils ont associé la première transition à l'hydratation de la tête polaire et la seconde à la fusion des chaînes. Cependant, nos résultats montrent que leur interprétation est incorrecte. Nos variations des largeurs de bande de  $\nu_{C=O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$  montrent une seule transition qui correspond en fait à la seconde transition observée par Lewis et McElhaney (1993), tel qu'observé à partir de la variation de  $\nu_{C-H}$  à 76° C. À partir de la variation des fréquences de  $\nu_{C-H}$ ,  $\nu_{C=O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$  (Figure 4.14), on peut conclure que la transition principale provoque à la fois la fusion des chaînes et l'hydratation de la tête polaire. Les largeurs de bande ( $\nu_{C=O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$ ) pour la DSPE pure nous permettent de conclure au passage de la phase gel anhydre à la phase liquide-cristalline. La première transition serait associée à une prétransition, tel qu'observée pour certains lipides. Ici, le déplacement de fréquence de  $\nu_{C-H}$  observé lors de cette transition se compare à celui observé pour la prétransition de la phase gel hydratée à la phase ondulée ( $P_\beta$ ) de la DPPC (Lewis et al., 1996) et l'ordre des chaînes est donc peu affecté pendant la transition. De même, un changement d'hydratation n'est observé que lors de la transition principale. Lewis et McElhaney (1993), dans leur étude par AED de phosphatidyléthanolamines ayant des chaînes saturées, ont noté une enthalpie de la transition principale de la DSPE d'environ 11 kcal/mol, ce qui se compare à l'énergie impliquée dans une transition de phase gel à liquide-cristalline (Marsh, 1990) pour un phospholipide. L'enthalpie de 9 kcal/mol notée pour la première transition est plus élevée que pour une prétransition. Cependant, les deux transitions étant très rapprochées (73,3 et 74,2° C), la détermination des enthalpies de chacune des transition est probablement difficile.

On remarque qu'avec l'ajout de 5 et 15 mol% chol à la DSPE, on assiste toujours à une transition de phase gel anhydre à fluide vers 74° C (Figure 4.14A). Cependant, la transition principale est déplacée de 2° C vers les basses températures et sa coopérativité est diminuée. On note également une augmentation de  $\nu_{C-H}$  à basse température et une diminution à haute température. Ces changements sont typiques de l'influence du cholestérol sur la transition de phase gel à fluide d'un phospholipide (Chapitre 1). La température de la prétransition diminue de 5° C avec l'ajout de 5 mol% chol et est abolie en présence de 15 mol% chol. Ceci vient renforcer notre hypothèse que cette transition est une prétransition car il est connu que la présence de cholestérol abolit la formation de la phase ondulée ou "ripple" pour la DPPC et la DMPC (Copeland et McConnel, 1980). Cependant, la transition principale est associée à la fusion des chaînes et l'hydratation de la tête polaire sans découplage. Par contre, il y a des variations particulières des largeurs des deux bandes pour le mélange DSPE/15 mol% chol. À 40° C, les largeurs de  $\nu_{C-O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$  sont intermédiaires à celles observées pour la phase gel anhydre et la phase gel hydratée. Lors de la chauffe, vers 65° C, on observe des signes de recuit puisque la  $\nu_{C-H}$  diminue légèrement et que les bandes  $\nu_{C-O}$  et  $\nu_{PO_2^-}$  deviennent plus étroites pour atteindre des valeurs typiques de la phase gel anhydre. Il semblerait que l'incubation de 3 semaines, pour l'échantillon contenant 15 mol% chol, ne soit pas suffisante pour transformer complètement l'échantillon en phase gel anhydre à basse température.

Les deux études que nous avons réalisées sur des phosphatidyléthanolamines ayant des chaînes saturées (DMPE-d<sub>54</sub> et DSPE) ont donc montré qu'il n'y avait pas, contrairement à ce que certaines études suggéraient, de découplage de la transition de phase gel anhydre à liquide-cristalline pour laquelle l'hydratation de la tête polaire et la fusion des chaînes acyles se produisent à des températures différentes. L'ajout de cholestérol ne provoque pas plus ce découplage. L'ajout de cholestérol diminue la T<sub>m</sub> et la coopérativité de la transition de phase gel anhydre à fluide du phospholipide. On note également l'abolition de la première transition pour la DSPE en présence de 15 mol% chol, transition pouvant être en fait une prétransition.



## 4.2 Système DPPS/chol

### 4.2.1 Introduction

Plusieurs auteurs ont démontré que la présence de cholestérol n'abolit pas, comme pour les PC et les PE, la transition de phase  $L_{\beta}$  à  $L_{\alpha}$  des PS et ont montré une solubilité limitée du cholestérol dans ces membranes (Bach, 1984; Wachtel et Bach, 1987; Bach et Wachtel, 1989; Bach et al., 1992; Bach et al., 1998). Certains auteurs suggèrent que cette solubilité limitée est due à la présence de charges négatives sur la tête polaire du lipide (Bach et Wachtel, 1989). Nous avons voulu, par spectroscopie IR et RMN du  $^2\text{H}$ , examiner l'effet du cholestérol sur la DPPS et le comparer à celui sur les lipides zwitterioniques. Récemment, des auteurs ont proposé que la préparation de mélanges de lipides était critique et pouvait mener à des artefacts (Huang et al., 1999). Parallèlement à ces travaux, nous avons étudié l'influence du solvant utilisé dans la préparation des échantillons DPPS/chol sur leur polymorphisme de manière à identifier les artefacts potentiels reliés à la méthode de préparation.

La présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans des échantillons de PS provoque la formation de cochléates, des structures très ordonnées (Papahadjopoulos et al., 1975) pour lesquelles il y a abolition de la transition de phase  $L_{\beta}$  à  $L_{\alpha}$  du lipide (Dluhy et al., 1983; Bach et Wachtel, 1989; Flach et Mendelsohn, 1993). Nous avons voulu caractériser par RMN du  $^2\text{H}$  l'ordre orientationnel des chaînes acyles dans ce type d'arrangement. Dans ce cadre, nous avons cherché à établir l'origine des épaulements très larges que nous avons observés sur les spectres RMN du  $^2\text{H}$  de la DPPS.

### 4.2.2 Résultats

#### 4.2.2.1 Spectroscopie IR

La préparation des échantillons de PS/chol semble problématique et pourrait en partie expliquer les résultats discordants quant à la solubilité du cholestérol dans des

membranes de PS. Comme la DPPS est très peu soluble dans un mélange benzène:méthanol, il est impossible d'effectuer une lyophilisation à partir d'une telle solution. Nous avons donc préparé les échantillons par évaporation, une technique courante dans le cas des PS (Bach, 1984; Wachtel et Bach, 1987; Bach et Wachtel, 1989; Bach et Wachtel, 1992; Bach et al., 1998). Un des problèmes avec l'approche par évaporation du solvant est qu'il est possible d'avoir une cristallisation d'une des composantes lors de l'évaporation du solvant organique et donc un échantillon très inhomogène au départ. La nature du solvant influence bien sûr ce phénomène. Nous avons donc effectué une comparaison entre des mélanges de DPPS et de 30 mol% cholestérol préparés à partir d'un mélange chloroforme:méthanol (80:20) et à partir de chloroforme pur. Le thermotropisme de ces échantillons est étudié à partir de la variation de  $\nu_{C-H}$  en IR (Figure 4.15). En accord avec les études précédentes effectuées sur des mélanges PS/chol préparés à partir de mélanges chloroforme:méthanol (Bach, 1984; Wachtel et Bach, 1987; Bach et Wachtel, 1989; Bach et al., 1992; Bach et al., 1998), nous observons une variation relativement abrupte de  $\nu_{C-H}$  à 51° C, qui serait associée à une transition de phase  $L_{\beta}$  à  $L_{\alpha}$  résiduelle (Figure 4.15). Ce déplacement de la  $T_m$  du phospholipide en présence de cholestérol est en accord avec Bach et Wachtel (1989), qui ont observé une  $T_m$  de 52° C pour un mélange DPPS/31 mol% chol par AED. Lorsque le mélange de DPPS et de 30 mol% chol est préparé à partir de chloroforme uniquement, on observe un changement plus progressif de  $\nu_{C-H}$ . Même si ces échantillons sont incubés pendant 1 à 3 semaines à la température de la pièce, aucune modification du thermotropisme n'a été observée. Nous avons fait un contrôle en incubant un échantillon de vésicules unilamellaires de DPPS en présence de cholestérol solide pendant 3 semaines à la température de la pièce afin de vérifier si le cholestérol arrivait à s'incorporer dans les vésicules de PS. Même après cette longue incubation, une transition très coopérative était observée, indiquant que l'insertion du cholestérol et l'atteinte de l'état thermodynamiquement stable devaient être lents. On en conclut que si la préparation de l'échantillon amène initialement à des inhomogénéités, il faut une longue incubation pour atteindre la phase stable.

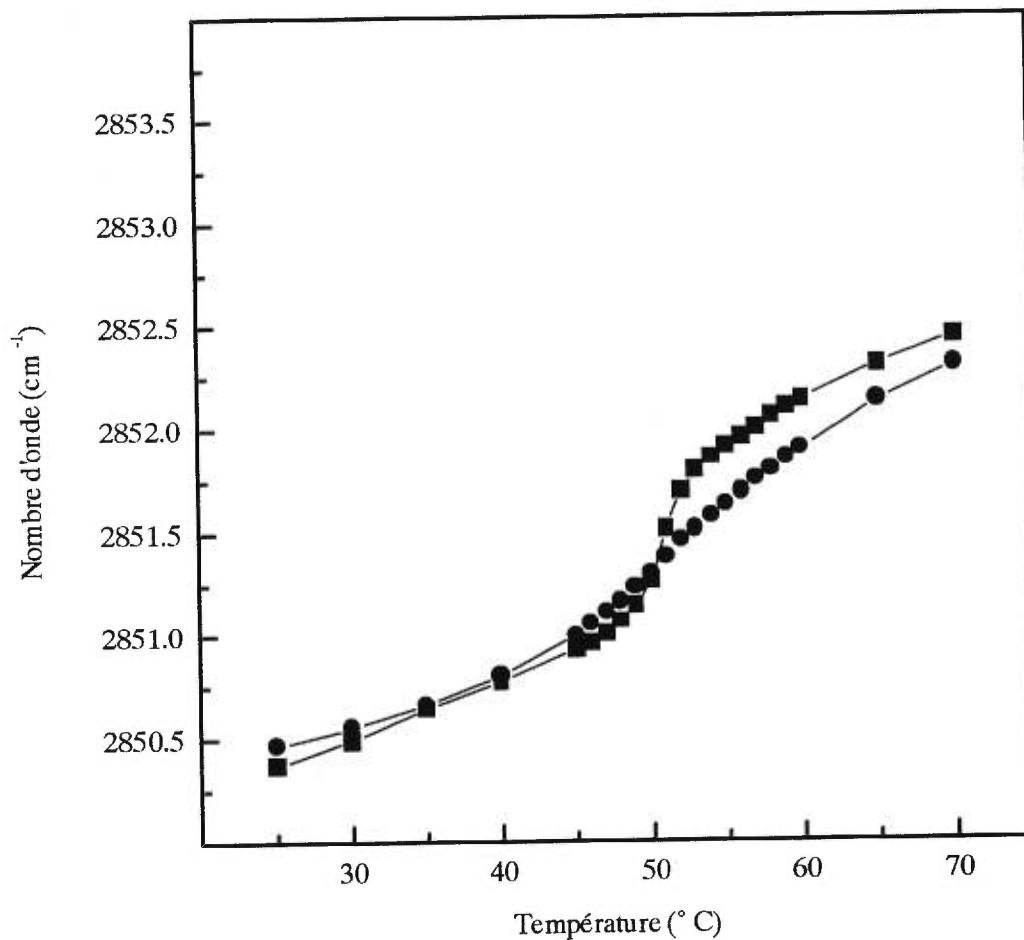


Figure 4.15 Variation de la fréquence de  $\nu_{C-H}$  en fonction de la température pour le mélange DPPS/30 mol% chol préparé à partir du chloroforme seulement (●) et d'un mélange chloroforme:méthanol (80:20) (■). L'échelle de cette figure est la même que celle de la figure 4.16.

Étant donné qu'on note une diminution importante de l'amplitude de la transition de phase lorsque l'échantillon est préparé à partir du chloroforme, nous pensons que ce solvant conduit à un échantillon plus homogène et que la présence de méthanol peut entraîner une séparation de phase. Pour les études suivantes, les échantillons ont donc été préparés à partir du chloroforme seulement.

Nous avons enregistré la variation de  $\nu_{C-H}$  en fonction de la température pour la DPPS pure et la DPPS en présence de 30 mol% chol (Figure 4.16). Pour le lipide pur, nous avons obtenu une  $T_m$  de 53,5° C avec une amplitude de 2,2  $cm^{-1}$ . La DPPS pure a une transition de phase  $L_\beta$  à  $L_\alpha$  entre 53 et 55° C, selon les études (Browning et Seelig, 1980; Cevc et al., 1981; Bach et Wachtel, 1989; Hübner et al., 1994). La présence de 30 mol% chol diminue de façon importante l'amplitude de la transition de phase  $L_\beta$  à  $L_\alpha$  de la DPPS, comme nous venons de le voir. Cet effet est principalement remarqué à haute température, où on note une diminution importante de la fréquence avec l'ajout de cholestérol. Les études précédentes sur ce mélange ont plutôt montré, par AED, une diminution de la  $T_m$  et de l'enthalpie de la transition sans abolition de la transition pour le même système (Bach et Wachtel, 1989), mais aussi pour le système 1,2-dimyristoyl-*sn*-phosphatidylsérine/chol (Bach et al., 1998), 1-stéaroyl 2-oléoyl-*sn*-phosphatidylsérine/chol (Bach et al., 1992), 1-palmitoyl 2-oléoyl-*sn*-phosphatidylsérine/chol (Bach et al., 1992) et pour la PS extraite du cerveau de boeuf en présence de cholestérol (Bach, 1984; Wachtel et Bach, 1987).

#### 4.2.2.2 Spectroscopie RMN du $^2H$

La figure 4.17 présente les spectres RMN du  $^2H$  de la DPPS- $d_{62}$  pure et de mélanges de DPPS- $d_{62}$  avec 20 et 30 mol% chol à différentes températures. Le spectre de la DPPS- $d_{62}$  pure, à 40° C, est représentatif d'un lipide en phase gel, alors qu'à 50° C, le spectre est typique de la coexistence entre les phases gel et liquide-cristalline. Finalement, à 60° C, le spectre est caractéristique d'un lipide en phase liquide-cristalline (largeur à mi-hauteur de l'ordre de 29 kHz). L'ajout de 20 mol% chol modifie le thermotropisme du lipide. En effet, déjà à 40° C, il y a coexistence entre la phase gel et

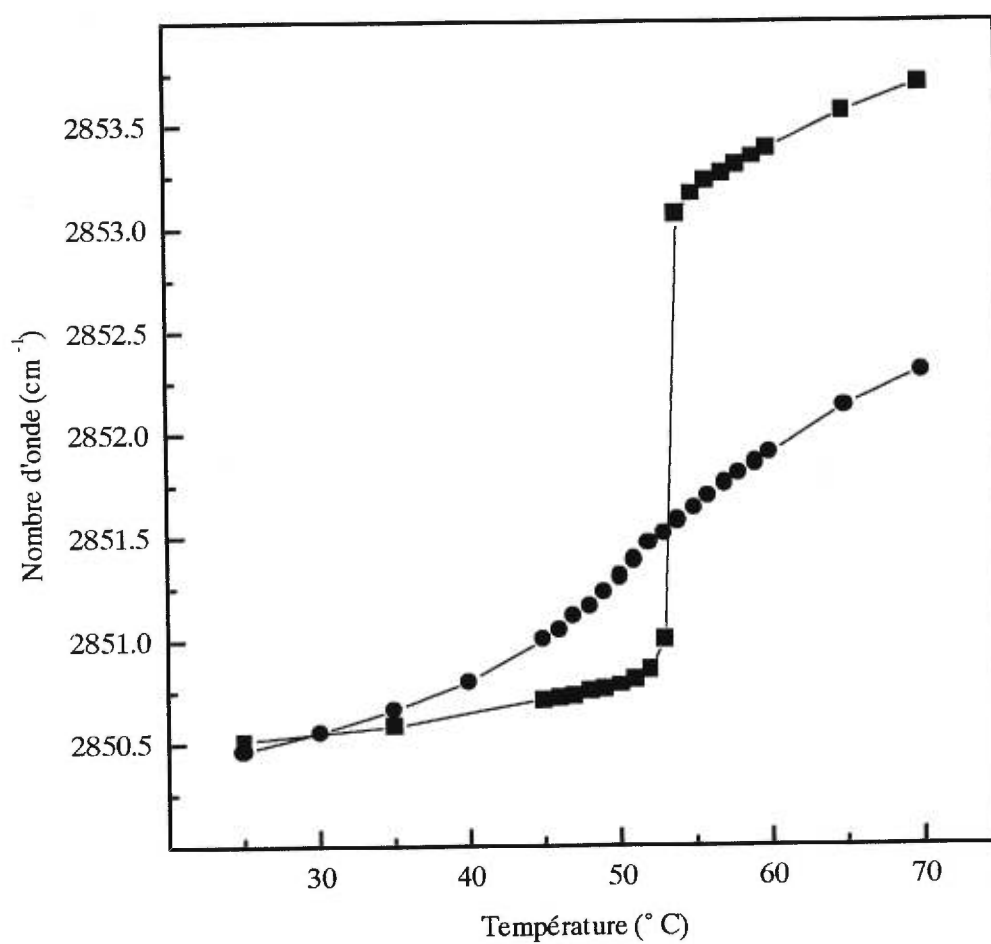


Figure 4.16 Variation de la fréquence de  $\nu_{\text{C-H}}$  en fonction de la température pour la DPPS pure (■) et pour le mélange DPPS/30 mol% chol préparé à partir du chloroforme (●).

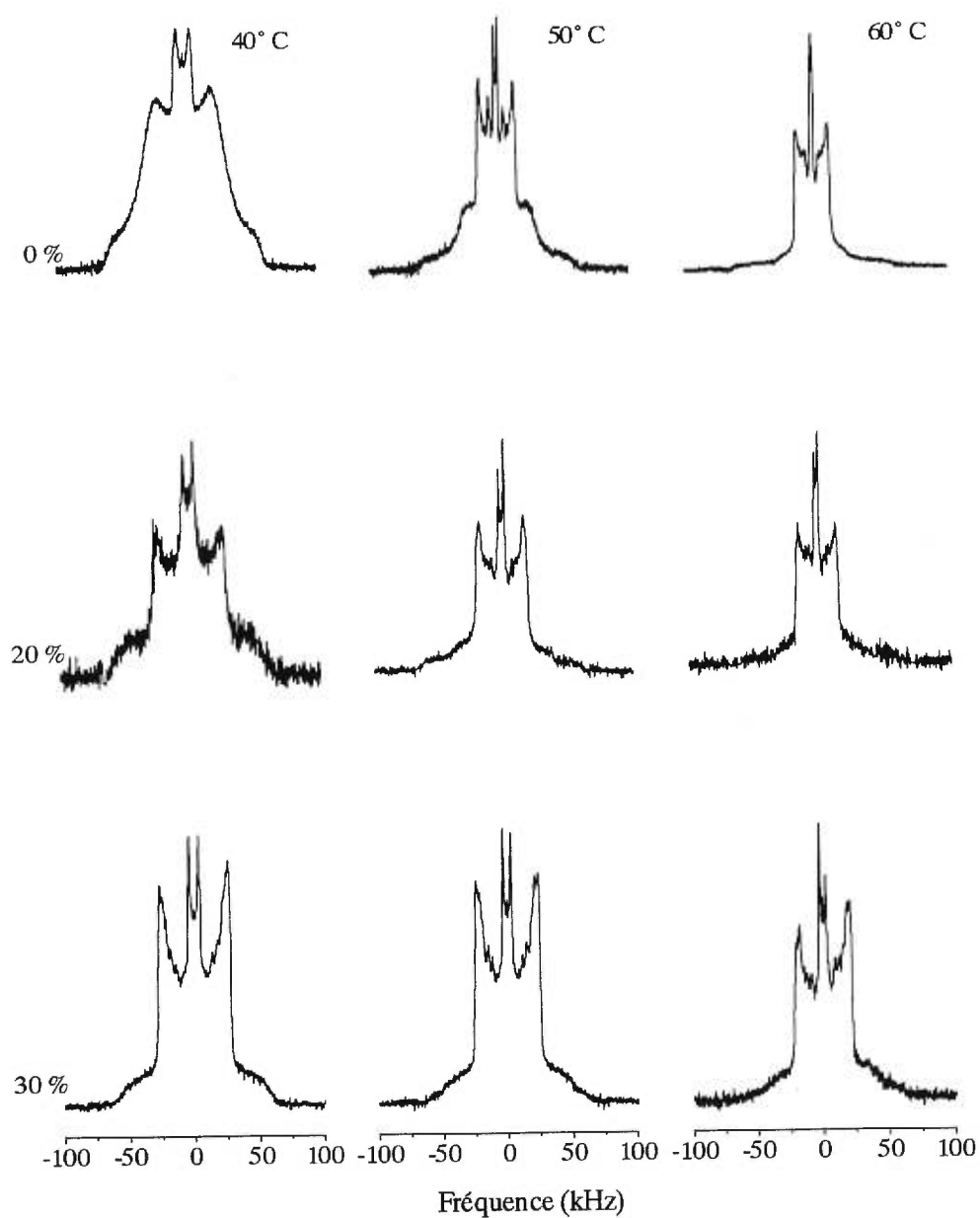


Figure 4.17 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  de la DPPS- $\text{d}_{62}$  contenant différentes proportions de cholestérol (tel qu'indiqué pour chaque ligne), enregistrés à différentes températures (tel qu'indiqué dans le haut de chaque colonne).

une phase fluide (dont la largeur à mi-hauteur est de 41 kHz), alors qu'à partir de 50° C, le lipide est presque exclusivement en phase fluide. La DPPS-d<sub>62</sub> en présence de 30 mol% chol présente des spectres à symétrie axiale (de l'ordre de 53 kHz) représentatifs d'un lipide exclusivement en phase fluide sur toute la gamme de température présentée.

Nous avons mesuré un profil d'ordre pour la DPPS-d<sub>62</sub> pure et pour le mélange DPPS-d<sub>62</sub>/30 mol% chol à 60° C (Figure 4.18). On remarque que les paramètres d'ordre du mélange DPPS-d<sub>62</sub>/30 mol% chol sont plus élevés que ceux de la DPPS-d<sub>62</sub> pure, ce qui indique un effet de rigidification des chaînes acyles de la DPPS-d<sub>62</sub> par la présence de cholestérol.

Pour les spectres de la DPPS-d<sub>62</sub> pure (par exemple celui à 60° C), on constate un signal très large (129 kHz de large) presque fondu avec la ligne de base. Ce signal représente tout de même 18% de la surface totale du spectre et son observation systématique a suscité notre intérêt. Les cochléates sont des enroulements de bicouches très ordonnées de phospholipides chargés négativement provoqués par la présence de cations, surtout le Ca<sup>2+</sup> (Papahadjopoulos et al., 1975). Bien que notre milieu ne contenait pas d'ions Ca<sup>2+</sup> ajoutés (en fait, 2 mM d'EDTA étaient présents pour complexer ces ions), il nous semblait plausible que des traces de Ca<sup>2+</sup> contaminent nos échantillons et puissent mener à la formation de cochléates avec une petite fraction des lipides. Nous avons alors ajouté à des membranes de DPPS-d<sub>62</sub> des ions Ca<sup>2+</sup> (10 mM CaCl<sub>2</sub> dans le tampon sans EDTA) dont nous avons enregistré les spectres RMN à différentes températures pour en étudier le polymorphisme. Nous représentons les spectres à trois températures (40, 50 et 60° C) à la figure 4.19. À 40° C, on note un spectre large (64 kHz) avec un épaulement de 127 kHz (correspondant à l'orientation à 0°). Le spectre ressemble à ce que nous avons remarqué pour un échantillon solide (Figure 2.3b) et est distinct de celui de la phase gel. Le doublet du groupement méthyle est résolu et un seul éclatement quadrupolaire représente les groupements CD<sub>2</sub> de la chaîne acyle. Ce type de spectre est en accord avec l'apparition d'un éclatement quadrupolaire d'environ 120 kHz observée pour la 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn* phosphatidylsérine deutérée à trois

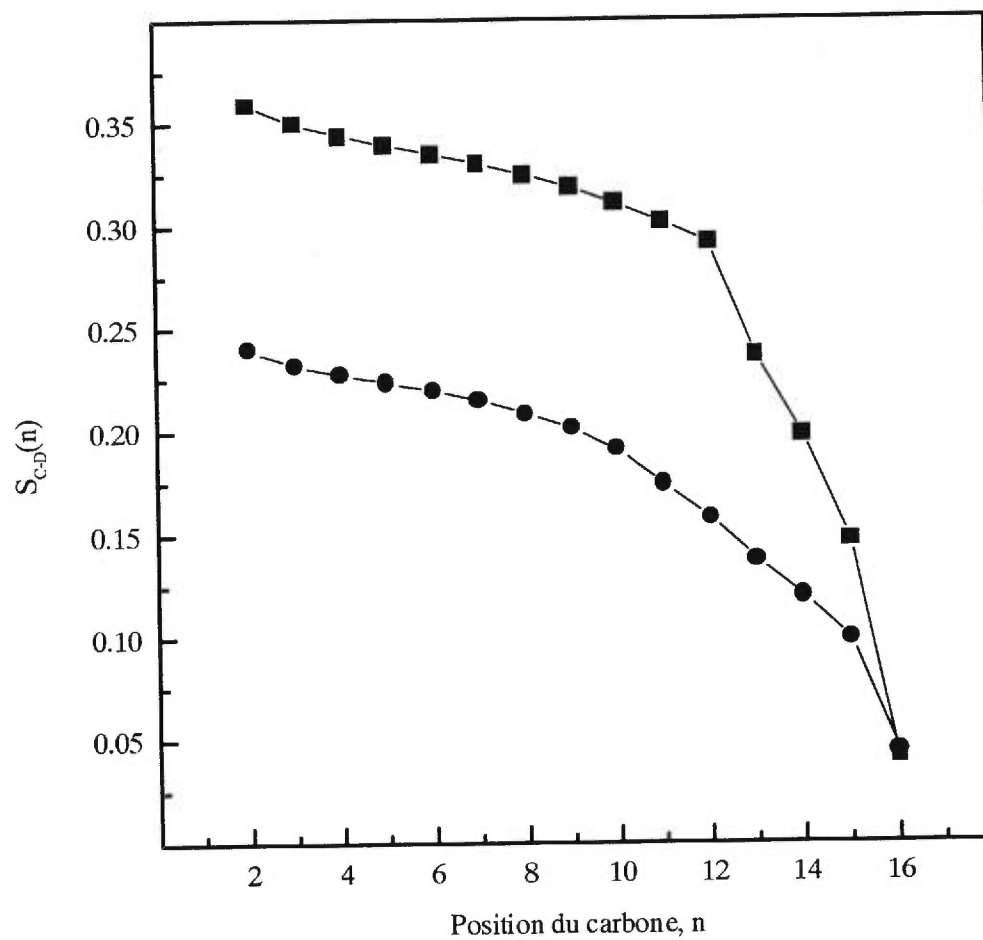


Figure 4.18 Profil d'ordre de la DPPS- $d_{62}$  pure (■) et du mélange DPPS- $d_{62}$ /30 mol% chol (●) à 60° C.



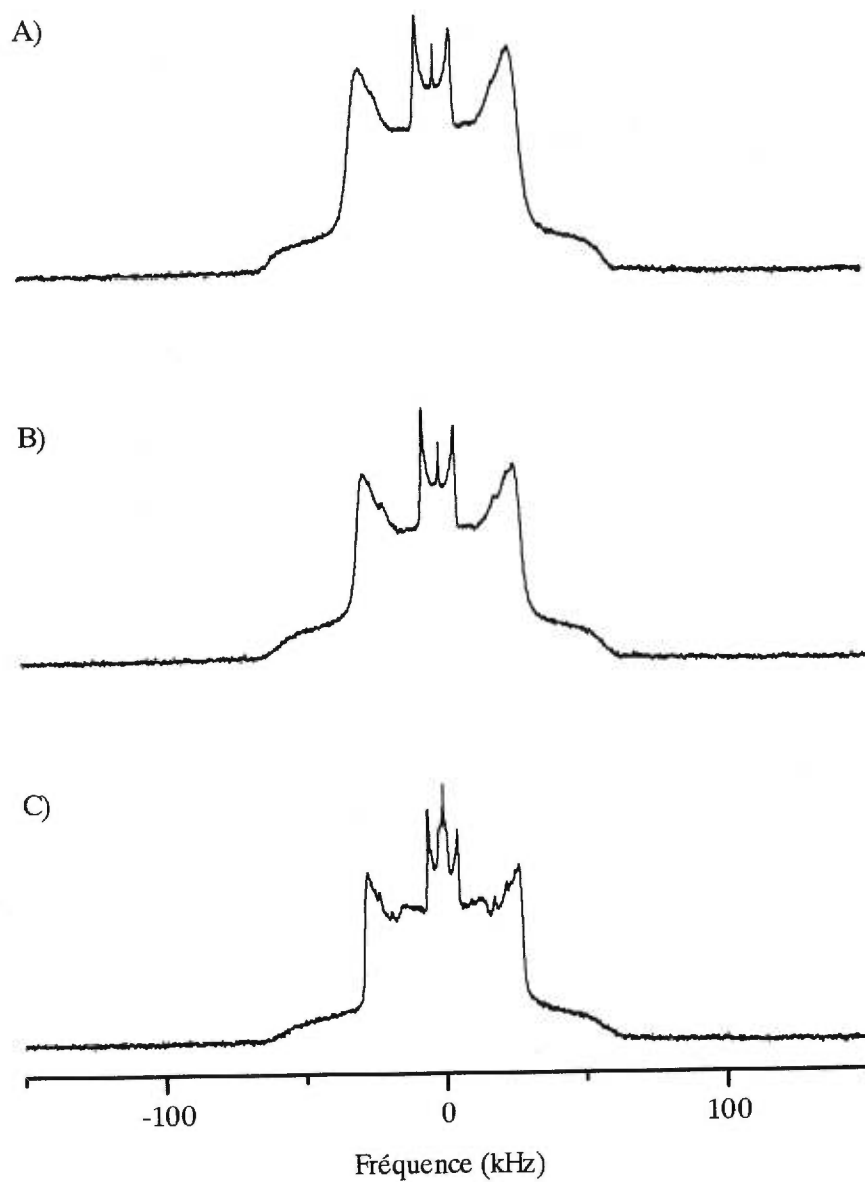


Figure 4.19 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  de la DPPS- $\text{d}_{62}$  en présence de 10 mM d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  (sans EDTA dans le tampon) enregistrés à A) 40° C, B) 50° C et C) 60° C avec un temps de recyclage de 500 ms.

positions sur la tête polaire (POPS-d<sub>3</sub>) en présence de concentrations croissantes d'ions Ca<sup>2+</sup> (Roux et Bloom, 1991). L'augmentation de la température augmente légèrement la résolution des groupements CD<sub>2</sub> et diminue légèrement la largeur du spectre (de 64 kHz à 55 kHz à mi-hauteur). À 60° C, on note l'apparition de signaux d'environ 28 kHz, ce qui représente la moitié du signal au plateau. Ce signal serait caractéristique de la phase H<sub>II</sub> (Lafleur et al., 1990b).

#### 4.2.3 Discussion

Nos résultats montrent que le choix du solvant utilisé dans la préparation des échantillons est critique. La préparation des échantillons dans un mélange de chloroforme et de méthanol conduit à une transition résiduelle vers 51° C, tandis que la préparation des mélanges de DPPS et de cholestérol dans le chloroforme conduit à une diminution beaucoup plus importante de la transition de phase gel à liquide-cristalline de la DPPS (Figure 4.15). La transition résiduelle observée pour les échantillons préparés à partir du mélange chloroforme:méthanol (80:20) pourrait être associée à la précipitation partielle du cholestérol lors de l'évaporation du mélange de solvants. Une étude récente a montré que la préparation des échantillons était critique et que l'évaporation du solvant pouvait conduire à des artefacts (Huang et al., 1999). Ceci implique que la solubilité limitée du cholestérol dans des membranes de PS, par rapport à des membranes zwitterioniques, pourrait n'être qu'une conséquence de la préparation des échantillons.

Préparés dans le chloroforme, les échantillons de DPPS-d<sub>62</sub> et de cholestérol montrent le spectre à symétrie axiale résolu et large typique de la phase *lo* (Figure 4.17). On note également une augmentation des paramètres d'ordre du mélange DPPS-d<sub>62</sub>/30 mol% chol par rapport au phospholipide pur (Figure 4.18). Cette phase *lo* se compare à celle que nous avons examinée pour le système POPE-d<sub>31</sub>/cholestérol avec une longueur de chaîne de 16,5 Å pour le mélange DPPS-d<sub>62</sub>/30 mol% chol à 60° C. Cette phase est stable au moins 10° C sous la T<sub>m</sub>.

Les spectres de la DPPS-d<sub>62</sub> montrent l'existence d'un signal large qui pourrait être associé à la formation de cochléates (Figure 4.19). Nous avons donc préparé des échantillons dans des conditions où l'on sait que la PS forme des cochléates (Papahadjopoulos et al., 1975) pour voir l'allure des spectres RMN du <sup>2</sup>H de ces arrangements. Notre étude par RMN du <sup>2</sup>H de vésicules de DPPS-d<sub>62</sub> mises en présence d'ions Ca<sup>2+</sup> nous permet d'obtenir les premiers spectres caractéristiques de la présence de cochléates (Figure 4.19). La forme large du spectre à 40° C (64 kHz) indique un arrangement très ordonné des chaînes du phospholipide, presque comme l'arrangement caractéristique d'un solide. De plus, cet arrangement est formé sur tout l'intervalle de température étudié. Ces résultats sont en accord avec plusieurs études. En effet, on a montré que la présence d'ions Ca<sup>2+</sup> dans des vésicules de phosphatidylsérine abolit la transition de phase gel à liquide-cristalline du lipide (Dluhy et al., 1983; Bach et Wachtel, 1989; Flach et Mendelsohn, 1993). La diminution importante de la fréquence de  $\nu_{C-H}$  de 2850,5 (typique de la phase gel) à 2849,4 cm<sup>-1</sup> suggère que les chaînes acyles du lipide sont très ordonnées, cette valeur étant typique de l'état cristallin (MacPhail et al., 1984). L'augmentation de température augmente légèrement la résolution du spectre et on note aussi une diminution de la largeur du spectre, ce qui peut être une indication de mouvements un peu plus importants des chaînes acyles de la DPPS-d<sub>62</sub> dans les cochléates. On observe en effet une augmentation de résolution des doublets des méthylènes de bout de chaîne (où les mouvements sont toujours plus importants). Le spectre à 60° C possède une autre caractéristique particulière. On note la présence d'un signal d'environ 28 kHz. Cette contribution est probablement associée à la présence, en plus des cochléates, de la phase hexagonale. Il pourrait donc y avoir, dans ce type d'échantillon, une transition de phase des cochléates vers une phase hexagonale. Une telle transition n'a jamais été rapportée jusqu'à présent et elle mérite d'être examinée plus en détails dans le futur. Le signal large observé dans les spectres de la DPPS-d<sub>62</sub> et de ses mélange avec du cholestérol est donc compatible avec la formation d'une structure très ordonnée comme les cochléates. Ces faits doivent être soulignés puisque, malgré les précautions prises (présence d'EDTA dans le tampon), l'existence d'une fraction de PS sous forme de cochléates ou de phase hexagonale semble possible et cette présence peut influencer les résultats et conclusions des expériences impliquant des vésicules de PS.

Comme les conditions de préparation des échantillons sont critiques, nous devons examiner ce point avant de procéder à une étude plus approfondie du système DPPS/cholestérol. La littérature récente (Huang et al., 1999) propose une méthode qui semble conduire à l'état thermodynamiquement stable et à des résultats reproductibles. Cette méthode devrait être évaluée dans la préparation des échantillons RMN. Il n'en demeure pas moins que l'analyse du système DPPS/cholestérol doit être faite car elle déterminerait l'influence du cholestérol sur un lipide chargé négativement et éclaircirait beaucoup de points contradictoires dans la littérature.

### 4.3 Système acide palmitique/cholestérol

#### 4.3.1 Introduction

Nous avons constaté, dans les sections précédentes, que la phase *lo* est formée à hauts pourcentages de cholestérol pour plusieurs types de phospholipides. Nous avons voulu déterminer si ce phénomène existait aussi pour un lipide simple comme un acide gras. Nous étudions, dans cette section du chapitre, l'influence du cholestérol sur l'acide palmitique. En plus d'un intérêt fondamental sur l'origine de la formation de la phase *lo*, il est intéressant d'étudier le polymorphisme de ce système car cet acide gras et le cholestérol sont des principaux constituants du stratum corneum de la peau (Elias, 1990; Lieckfeldt et al., 1994).

Nous avons étudié des mélanges binaires d'acide palmitique et de cholestérol à des proportions variables. Nous avons d'abord travaillé à un pH de 5,5 pour s'assurer que l'acide gras était protoné (Cistola et al., 1988). De plus, ce pH correspond à celui de la surface du stratum corneum (Öhman et Vahlquist, 1994). La température de fusion de l'acide palmitique est de 64° C (Rehfeld et al., 1986): il est donc cristallin à la température de la pièce. À ce pH, le cholestérol est solide et insoluble dans l'eau. Notre mélange a donc la particularité d'être formé de deux espèces moléculaires qui, individuellement, s'hydratent mal. Le comportement d'un mélange de cholestérol et d'acide palmitique équimolaire a déjà été étudié par AED (Rehfeld et al., 1986). Les

auteurs ont conclu à la présence d'un mélange eutectique. À cette composition, le passage des deux solides à une phase "liquide" s'effectue donc à une température donnée, comme pour un produit pur. Nous avons aussi travaillé à un pH de 8,8 pour vérifier l'effet de l'ionisation de l'acide gras sur le polymorphisme du mélange.

#### 4.3.2 Résultats

##### 4.3.2.1 Étude de mélanges PA-d<sub>31</sub>/cholestérol

###### *Spectroscopie IR*

Dans un premier temps, nous avons étudié, par IR, le thermotropisme du PA-d<sub>31</sub> pur hydraté et du PA-d<sub>31</sub> en présence de différents contenus en cholestérol (Figure 4.20). Nous avons utilisé la forme deutérée du lipide pour s'affranchir de la contribution du cholestérol dans la région d'élongation des méthylènes du lipide. Le lipide deutéré pur fond à une température de 58,5° C, ce qui est environ cinq degrés au-dessous de la température de fusion du PA (Rehfeld et al., 1986), probablement à cause du marquage isotopique. Il est aussi à noter que la mesure de la température de fusion de l'acide gras dans cet article a été effectuée en absence d'eau, mais nous constatons que la faible hydratation de l'acide palmitique a peu d'influence sur la température de fusion. On note, à cette température, un passage d'une fréquence de 2089 cm<sup>-1</sup> à 2097 cm<sup>-1</sup>, signe d'une augmentation importante du désordre conformationnel de la chaîne (Mantsch et McElhaney, 1991). Ce déplacement abrupt correspond à la fonte de l'acide gras. La présence de cholestérol influence le thermotropisme du lipide. D'abord, on peut noter une diminution progressive de la température de transition avec l'ajout de cholestérol. L'addition de 5 à 25 mol% de cholestérol déplace la transition autour de 56-57° C. Les mélanges PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol et PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol ont des températures de transitions de 54 et 52° C, respectivement. Le déplacement observé pour le mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol est en accord avec la littérature où Rehfeld et al. (1986) ont observé par AED une diminution de la température de transition de 3° C (de 64° C pour le lipide pur non deutéré à 61° C pour le mélange PA/50 mol% chol).

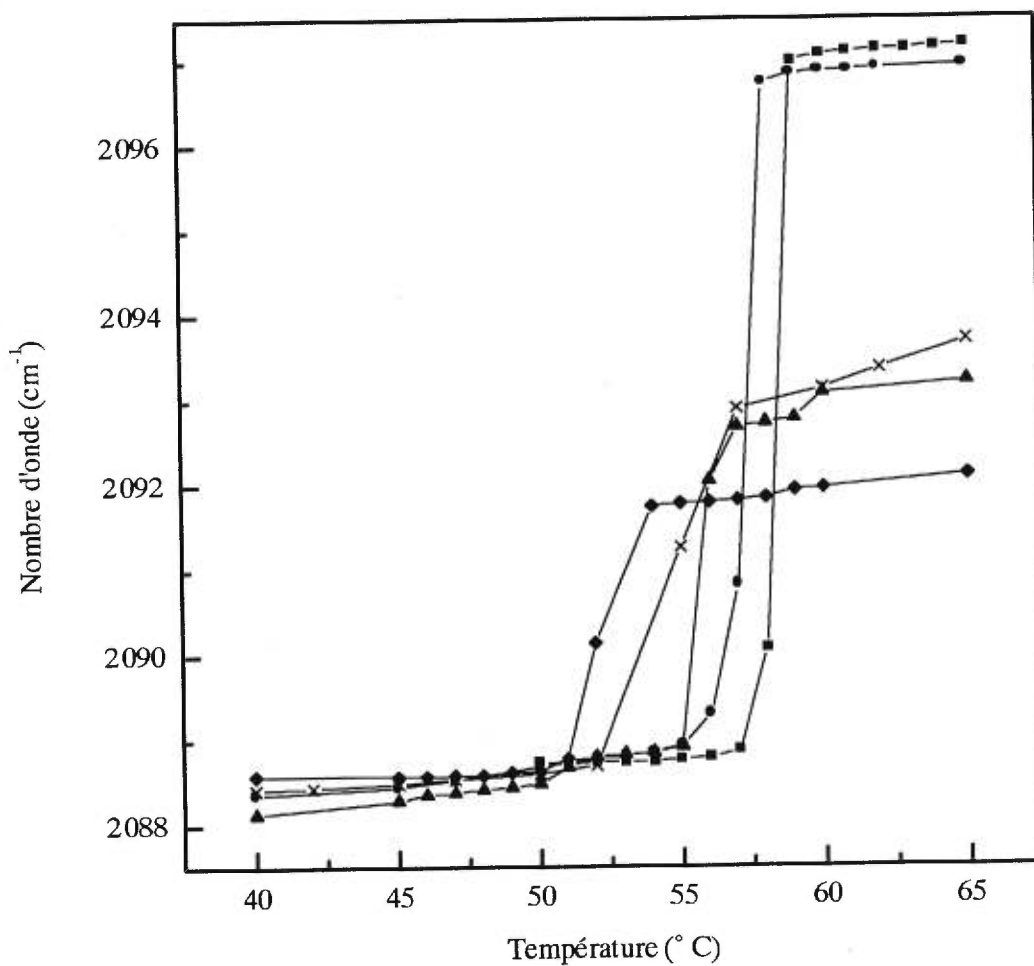


Figure 4.20 Thermotropisme de l'acide palmitique obtenu à partir de la fréquence de  $\nu_{C-D}$  pour le PA-d<sub>31</sub> pur (■) et pour les mélanges PA-d<sub>31</sub>/5 mol% chol (●), PA-d<sub>31</sub>/25 mol% chol (▲), PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol (×) et PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol (◆).

Nous observons également une diminution de la fréquence de la bande aux températures supérieures à la température de transition pour les mélanges de PA-d<sub>31</sub> contenant 25 mol% de cholestérol ou plus. Cette diminution semble être, comme dans le cas de la température de transition, reliée à la proportion de cholestérol. En effet, elle passe de 2097 cm<sup>-1</sup> pour le PA-d<sub>31</sub> pur à 2093 cm<sup>-1</sup> pour les mélanges PA-d<sub>31</sub>/25 et 50 mol% chol et à 2092 cm<sup>-1</sup> pour le mélange formé de 75 mol% de cholestérol.

Nous avons aussi étudié les bandes de déformation des groupements CD<sub>2</sub> de l'acide palmitique pur et en présence de concentrations variables de cholestérol (Figure 4.21). Pour le PA-d<sub>31</sub> pur, nous notons un éclatement de la bande en deux composantes jusqu'à 58,5° C et une seule bande après cette température, associée à la fusion du lipide (Figure 4.20). L'éclatement entre les deux composantes de la bande correspond à l'écart maximal (identique à celui de l'acide palmitique pur), ce qui signifie que les domaines d'acide gras sont à toutes fins pratique exempts de cholestérol et qu'ils sont composés de plus de 100 molécules (Snyder et al., 1992; Snyder et al., 1995). Pour tous les contenus en cholestérol étudiés, on peut remarquer un éclatement de la bande avant la température de transition (telle que détectée par  $\nu_{C-D}$ ) et une seule bande après cette température.

### *Spectroscopie RMN du <sup>2</sup>H*

Les spectres RMN du <sup>2</sup>H du PA-d<sub>31</sub> pur et des mélanges PA-d<sub>31</sub>/50, 75 et 83 mol% chol sont présentés à la figure 4.22. On peut remarquer, dans le cas du PA-d<sub>31</sub> pur à 40° C, un spectre très large (de l'ordre de 109 kHz au maximum) représentatif de l'acide palmitique solide. Ce signal est associé aux groupements CD<sub>2</sub> très ordonnés le long de la chaîne et le spectre de poudre plus étroit ( $\Delta\nu_Q=34,3$  kHz) correspond au groupement CD<sub>3</sub> de l'acide gras, réduit d'environ un facteur 3 à cause de la rotation de ce groupement. À 65° C, une seule raie étroite est présente, le signal attendu pour l'acide gras fondu. Dans les mélanges PA-d<sub>31</sub>/chol, on remarque qu'à 40° C, l'acide gras montre le même profil de spectre large et nous concluons qu'il est solide. Quand on augmente la température, le comportement de l'acide palmitique est influencé par la présence de

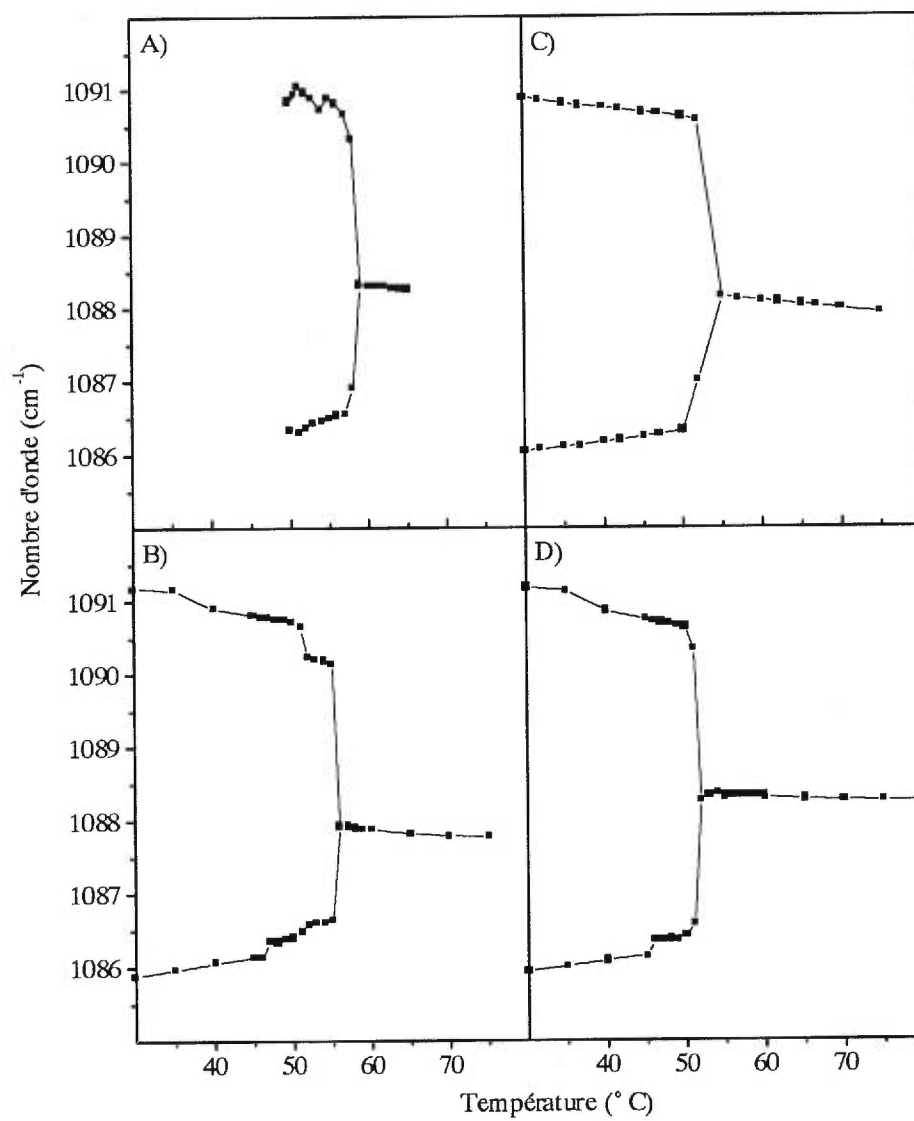


Figure 4.21 Variation des fréquences de  $\delta_{CD_2}$  avec la température pour A) le PA- $d_{31}$  pur et les mélanges B) PA- $d_{31}$ /25 mol% chol, C) PA- $d_{31}$ /50 mol% chol et D) PA- $d_{31}$ /75 mol% chol.



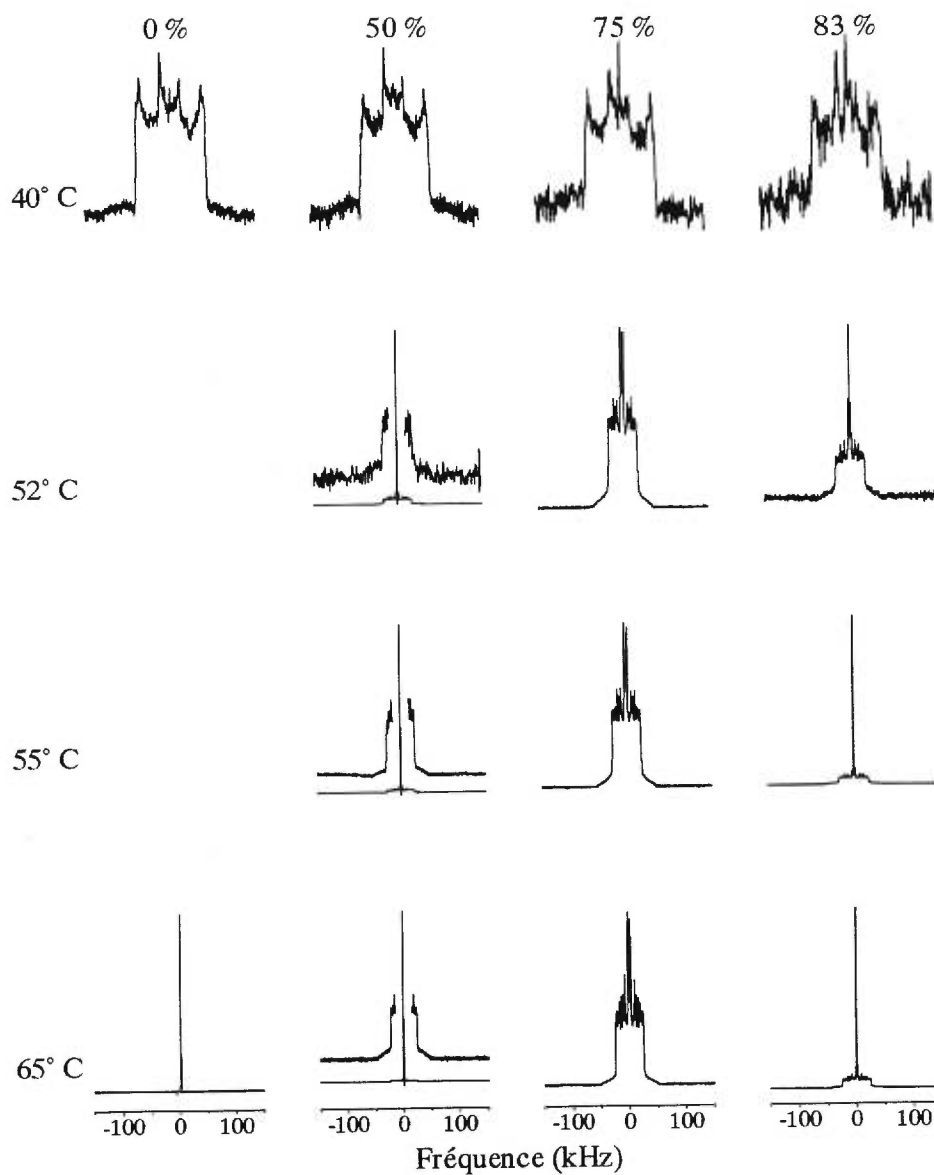


Figure 4.22 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  du PA- $\text{d}_{31}$  contenant différentes proportions de cholestérol (tel qu'indiqué dans le haut de chaque colonne), enregistrés à différentes températures (tel qu'indiqué pour chaque ligne).

cholestérol. Le cas le plus intéressant est celui du mélange PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol pour lequel, à 52° C, on observe exclusivement une série de spectres de poudre dont certains sont résolus. Les composantes les plus larges le sont moins que pour l'acide gras solide. Ce type de signal est typique d'une phase lamellaire. Cette phase lamellaire est stable au moins jusqu'à 80° C. Le mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol forme aussi cette phase lamellaire. À 52° C, le spectre est représentatif d'un mélange de trois phases: l'acide palmitique sous forme solide, une phase lamellaire et une raie étroite (cette raie peut être représentative de plusieurs arrangements moléculaires: acide gras fondu, micelles, petites vésicules). À 55 et 65° C, il n'y a plus d'acide palmitique solide et il y a seulement coexistence du spectre à symétrie axiale et de la raie étroite. Dans le cas du mélange PA-d<sub>31</sub>/83 mol% chol, les spectres de la figure 4.22 nous montrent que ce mélange forme aussi la phase lamellaire jusqu'à 80° C, comme pour le mélange contenant 75 mol% de cholestérol. À 52° C, il y a coexistence entre les trois phases: principalement le signal caractéristique de la phase lamellaire, avec une faible raie étroite et un peu de signal caractéristique de la PA-d<sub>31</sub> solide. À 55 et 65° C, il y a coexistence entre le signal de la phase lamellaire et une raie étroite.

Nous avons déterminé le pourcentage de chacune des phases qu'adopte le PA-d<sub>31</sub> en fonction de la température pour tous les mélanges étudiés. On peut constater que la proportion de phase lamellaire du mélange PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol (Figure 4.23C) augmente rapidement jusqu'à un plateau qui s'étend jusqu'à 80° C. Il y a toujours une très faible proportion de raie étroite (moins de 5%). Pour le mélange PA-d<sub>31</sub>/83 mol% chol (Figure 4.23D), le comportement est très semblable à celui du mélange PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol, sauf que la raie étroite représente environ 15% du spectre total. La phase lamellaire du mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol n'est pas aussi stable (Figure 4.23B). Lorsqu'elle est observée, elle coexiste toujours avec le signal de l'acide palmitique solide ou la raie étroite. À 54° C, il n'y a plus d'acide gras sous forme solide. La proportion de phase lamellaire diminue avec la température, au profit de la raie étroite, pour atteindre environ 40% pour des températures supérieures à 65° C. Le mélange PA-d<sub>31</sub>/25 mol% chol (Figure 4.23A) forme aussi la phase lamellaire, mais environ 15% des lipides adoptent cette structure à des températures supérieures à 60° C.

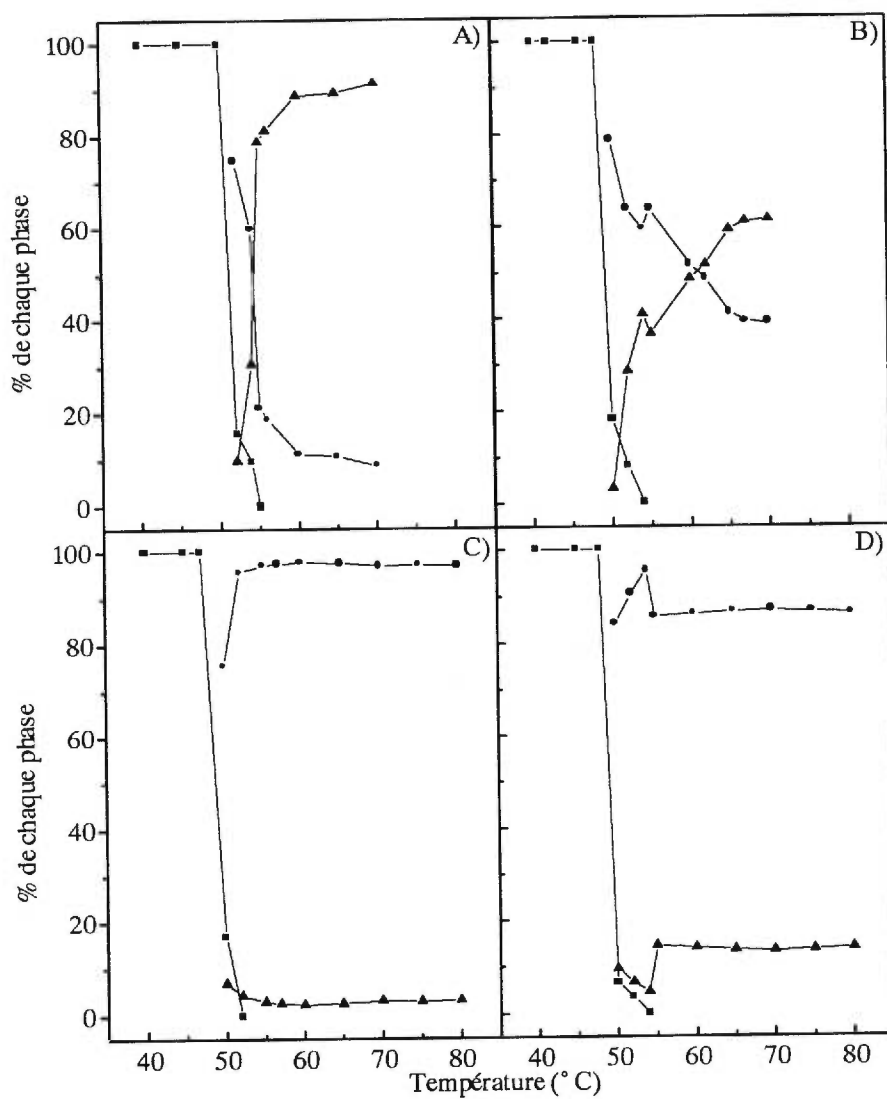


Figure 4.23 Pourcentage de phase solide (■), de phase lamellaire (●) et de raie étroite (▲) en fonction de la température pour le PA-d<sub>31</sub> dans des mélanges A) PA-d<sub>31</sub>/25 mol% chol, B) PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol, C) PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol et D) PA-d<sub>31</sub>/83 mol% chol.

Une autre phase coexiste toujours avec la phase lamellaire. Il y a d'abord une contribution de l'acide gras solide jusqu'à 54° C et une contribution de la raie étroite, contribution qui augmente avec la température, pour atteindre 91% à 70° C.

Nous avons mesuré, à 55° C, le profil d'ordre de la portion lamellaire des échantillons avec différents contenus en cholestérol (Figure 4.24). Le profil d'ordre est très semblable pour tous les mélanges étudiés, indiquant que la fraction lamellaire a une structure, et très probablement une composition, très semblable. À partir des paramètres d'ordre, il est possible d'estimer la longueur d'une chaîne de PA-d<sub>31</sub> en présence de cholestérol (et par le fait même l'épaisseur hydrophobe de la bicouche) et le coefficient d'expansion thermique (section 2.2.1.2; Bloom et al., 1991). Nous avons obtenu une longueur de chaîne de 16,0-16,5 Å et un coefficient d'expansion thermique de  $2,2 \times 10^{-3} / ^\circ \text{C}$ .

#### 4.3.2.2 Étude de mélanges PA/[2,2,4,4,6-d<sub>5</sub>]cholestérol (chol-d<sub>5</sub>)

Le mélange PA/75 mol% chol-d<sub>5</sub>, celui dont la phase lamellaire de l'acide gras est la plus stable, a été aussi étudié par RMN du <sup>2</sup>H pour obtenir cette fois-ci de l'information sur le cholestérol. Les spectres obtenus sont présentés à la figure 4.25. Nous avons aussi reproduit sur cette figure les spectres aux mêmes températures pour le mélange équivalent, mais où l'acide gras était deutéré. À 45° C, le cholestérol est solide. Nous obtenons en effet un seul spectre de poudre dont l'éclatement quadrupolaire est maximal (127 kHz). À 55 et 65° C, nous observons au moins trois spectres de poudre résolus (la largeur du plus important est de 52 kHz), mais il y a toujours une certaine proportion de cholestérol sous forme cristalline (éclatement de 127 kHz) (Figure 4.25, colonne de droite). Cette proportion diminue avec la température, mais est toujours présente à 65° C. En effet, il y a, à 55° C, 40% de phase solide, alors qu'à 65° C, cette proportion diminue à 15%. Pour obtenir un meilleur rapport signal/bruit de la portion lamellaire des spectres à 55 et 65° C, nous avons enregistré les spectres avec un temps de recyclage plus court (Figure 4.25, colonne du centre). Nous observons trois éclatements

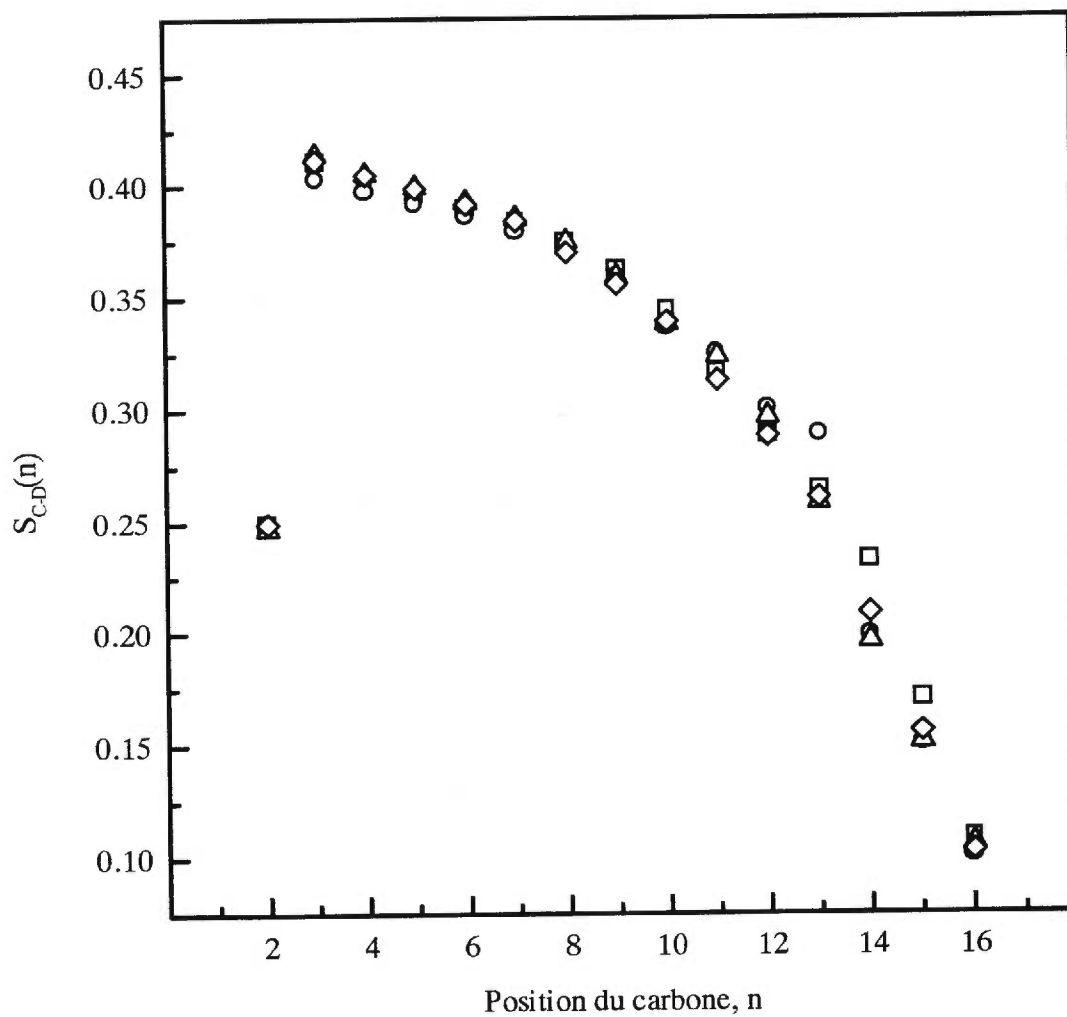


Figure 4.24 Profil d'ordre des mélanges PA-d<sub>31</sub>/25 mol% chol (Δ), PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol (○), PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol (□) et PA-d<sub>31</sub>/83 mol% chol (◇) à 55° C.

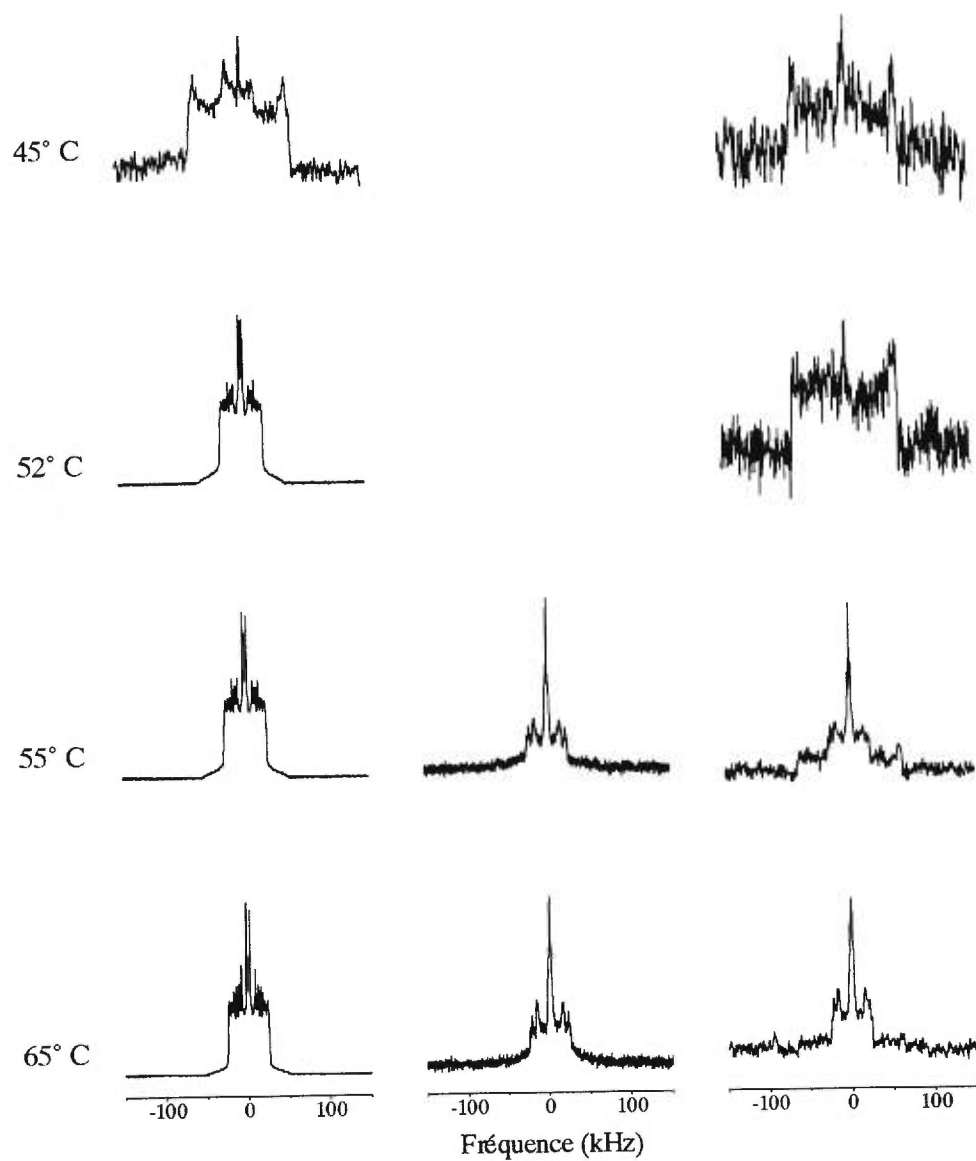


Figure 4.25 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  du cholestérol deutéré dans le mélange PA/75 mol% chol- $\text{d}_5$  avec un temps de recyclage de 300 ms (colonne du centre) ou de 30 s (colonne de droite) et du PA- $\text{d}_{31}$  dans le mélange PA- $\text{d}_{31}$ /75 mol% chol (colonne de gauche).

quadrupolaires distincts, dont un très étroit, qui se confond avec la faible raie étroite présente. Nous avons mesuré les éclatements quadrupolaires de ces différentes bandes et fait leur attribution, selon les études effectuées par Dufourc et al. (1984) et Marsan et al. (1999) sur un mélange DMPC/30 mol% chol-d<sub>6</sub>. Les éclatements quadrupolaires obtenus par ces auteurs, ainsi que les nôtres et leur attribution sont résumés dans le tableau suivant:

|                                     | $\Delta\nu_Q$ (kHz) <sup>a</sup> |       | $\Delta\nu_Q$ (kHz) <sup>b</sup> |       | $\Delta\nu_Q$ (kHz) <sup>c</sup> |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|----------------------------------|
|                                     | 55° C                            | 65° C | 55° C                            | 65° C | 30° C                            |
| 2,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ax | 45,8                             | 45,3  | 44,6                             | 43,4  | 47,5                             |
| 2,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> éq | 34,3                             | 32,3  | 31,3                             | 30,3  | 31,3                             |
| 6- <sup>2</sup> H                   | 4,4                              | 3,6   | 2,4                              | 2,2   | 3,2                              |

Tableau IV Attribution des bandes et éclatements quadrupolaires obtenus pour le cholestérol deutéré dans le mélange <sup>a</sup>PA/75 mol% chol-d<sub>5</sub> à 55 et 65° C (nos résultats), <sup>b</sup>DMPC/30 mol% chol-d<sub>6</sub> à 55 et 65° C (Dufourc et al., 1984) et <sup>c</sup>DMPC/30 mol% chol-d<sub>6</sub> à 30° C (Marsan et al., 1999).

On constate que l'ordre de grandeur des éclatements quadrupolaires que nous avons obtenus et ceux de la littérature est le même et que l'attribution par comparaison entre ce système et le nôtre est probablement correcte.

#### 4.3.2.3 Étude de l'effet du pH

Finalement, nous avons voulu savoir si le fait que le PA soit ionisé avait une influence importante sur le polymorphisme du mélange PA-d<sub>31</sub>/chol. Nous avons d'abord étudié par IR le mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à un pH de 8,8. Il est possible, par l'observation des bandes associées aux groupements carboxyliques, de savoir si on est en présence de l'acide palmitique ou du palmitate. En effet, une bande centrée à environ 1725 cm<sup>-1</sup> a été associée au groupement protoné, alors que la bande centrée à 1530 cm<sup>-1</sup> est associée au groupement ionisé (Gómez-Fernández et Villalaín, 1998). Tout d'abord, nous voyons qu'à un pH de

5,5, l'acide gras du mélange n'est pratiquement que sous la forme protonée. Ceci est vrai pour tous les mélanges avec du cholestérol discutés précédemment. Au pH de 8,8, l'acide gras est entièrement ionisé: la bande  $\nu_{\text{COOH}}$  (située à  $1697 \text{ cm}^{-1}$ ) est absente, alors qu'une bande située à  $1542 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_{\text{COO}^-}$ ) est présente (Figure 4.26). L'observation visuelle de l'échantillon nous suggère d'ailleurs déjà un changement de polymorphisme. En effet, cet échantillon est une dispersion aqueuse homogène, alors que le même mélange à un pH de 5,5 montrait un précipité qui semblait peu hydraté.

Les variations des bandes  $\nu_{\text{C-H}}$  et  $\delta_{\text{CD}_2}$  du mélange à pH=8,8 sont présentées à la figure 4.27. On peut noter l'absence de transition de phase à partir de la variation de  $\nu_{\text{C-D}}$ . La fréquence observée pour ce mélange est typique de la présence de la phase *lo* (Lafleur, 1998). L'absence d'éclatement de la bande  $\delta_{\text{CD}_2}$  nous indique que le PA-d<sub>31</sub>, à basse température, n'est pas sous forme cristalline orthorhombique (voir section 2.1).

Nous avons enregistré les spectres RMN du  $^2\text{H}$  du même mélange à 30 et 60° C (Figure 4.28). Nous remarquons, à ces deux températures, le spectre large et résolu de la phase liquide-ordonnée. À ce pH, les spectres RMN du  $^2\text{H}$  du PA-d<sub>31</sub> pur en-dessous de 50° C indique que l'acide gras est sous forme cristalline. Le profil d'ordre du mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à ce pH est présenté à la figure 4.29. Nous remarquons que les paramètres d'ordre sont plus élevés pour le mélange à un pH de 8,8 qu'à 5,5. Ce mélange a un paramètre d'ordre moyen de 0,36 à 60° C.

### 4.3.3 Discussion

À basse température, les spectres RMN de l'acide palmitique et du cholestérol deutérés nous indiquent que les deux constituants sont solides (à pH=5,5), peu importe le contenu en cholestérol (Figure 4.22 et 4.25). De plus, l'éclatement de la bande  $\delta_{\text{CD}_2}$  avant la transition de phase (Figure 4.21) est une indication que le PA-d<sub>31</sub> est cristallin avec un empilement orthorhombique et que le cholestérol est exclus des domaines d'acide palmitique.



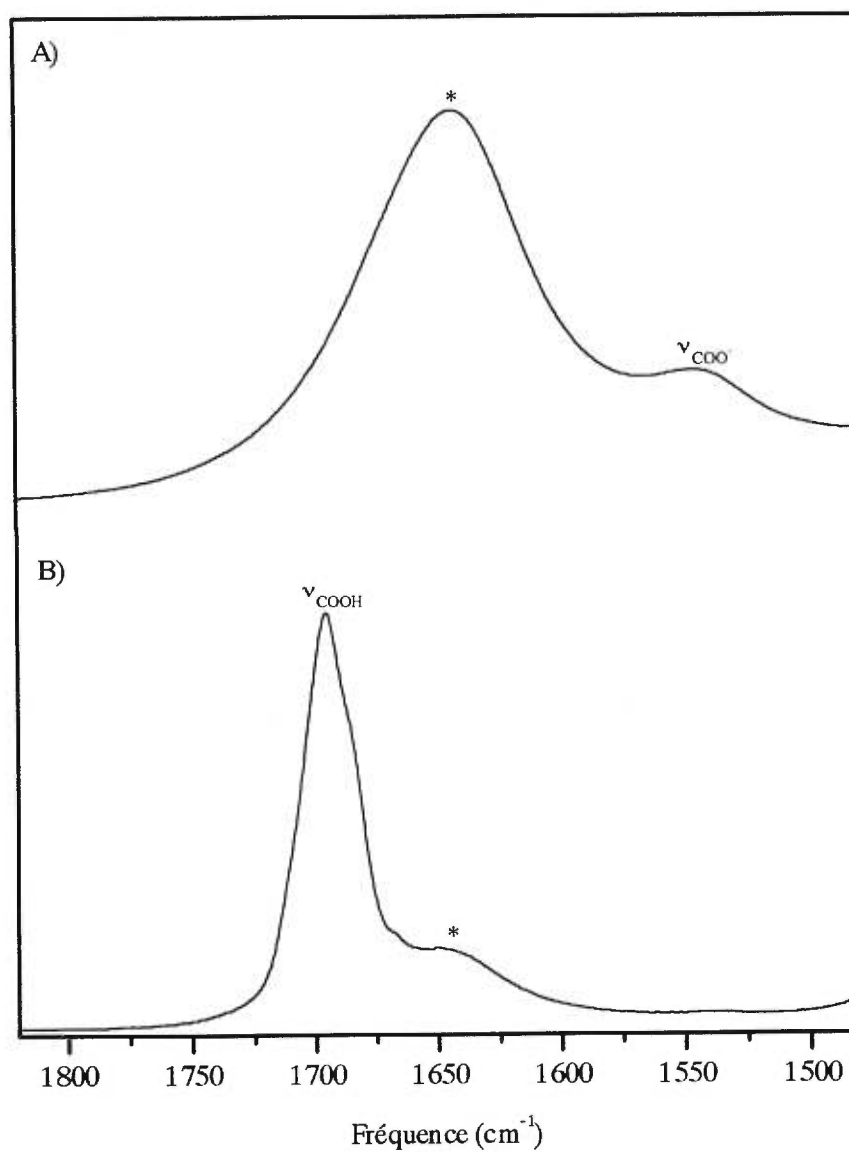


Figure 4.26 Région du spectre IR présentant les bandes caractéristiques des groupements COOH et COO<sup>-</sup> pour le mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à 50° C A) à pH=8,8 et B) à pH=5,5. \*correspondent aux bandes d'eau.

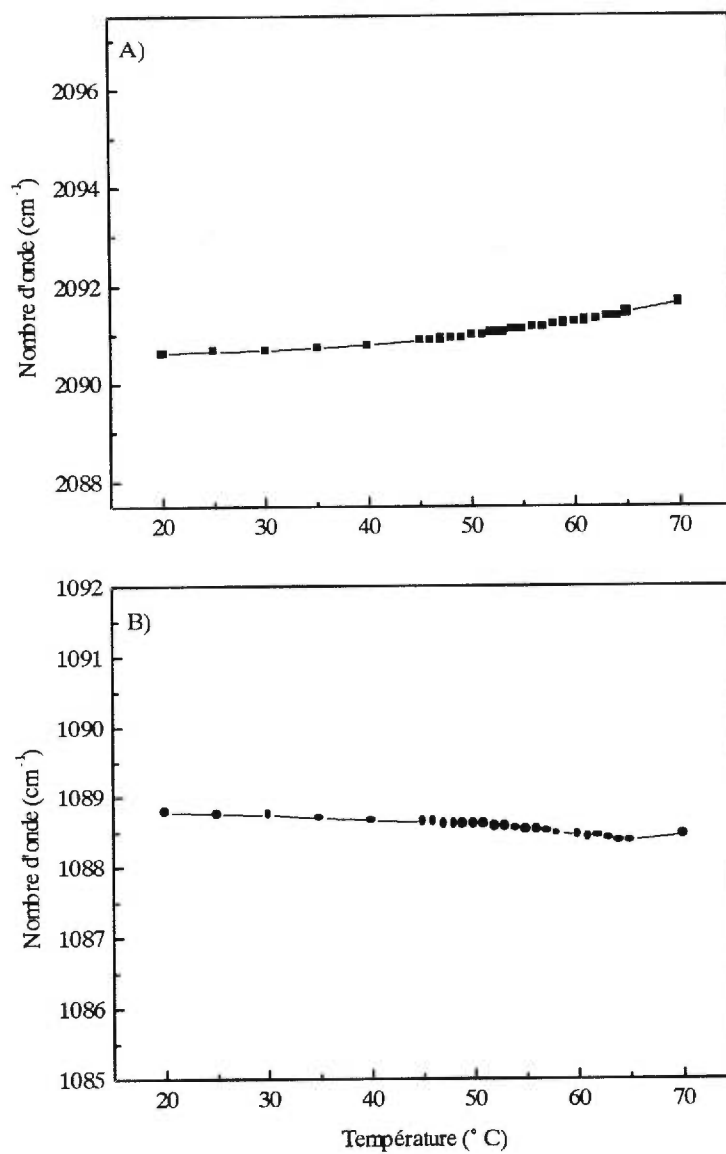


Figure 4.27 Variation de la fréquence de A)  $\nu_{C-D}$  et B)  $\delta_{CD_2}$  en fonction de la température pour le mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à un pH de 8,8. L'échelle utilisée pour l'ordonnée en A) est la même que celle de la figure 4.20 et celle en B) est la même que celle de la figure 4.21.

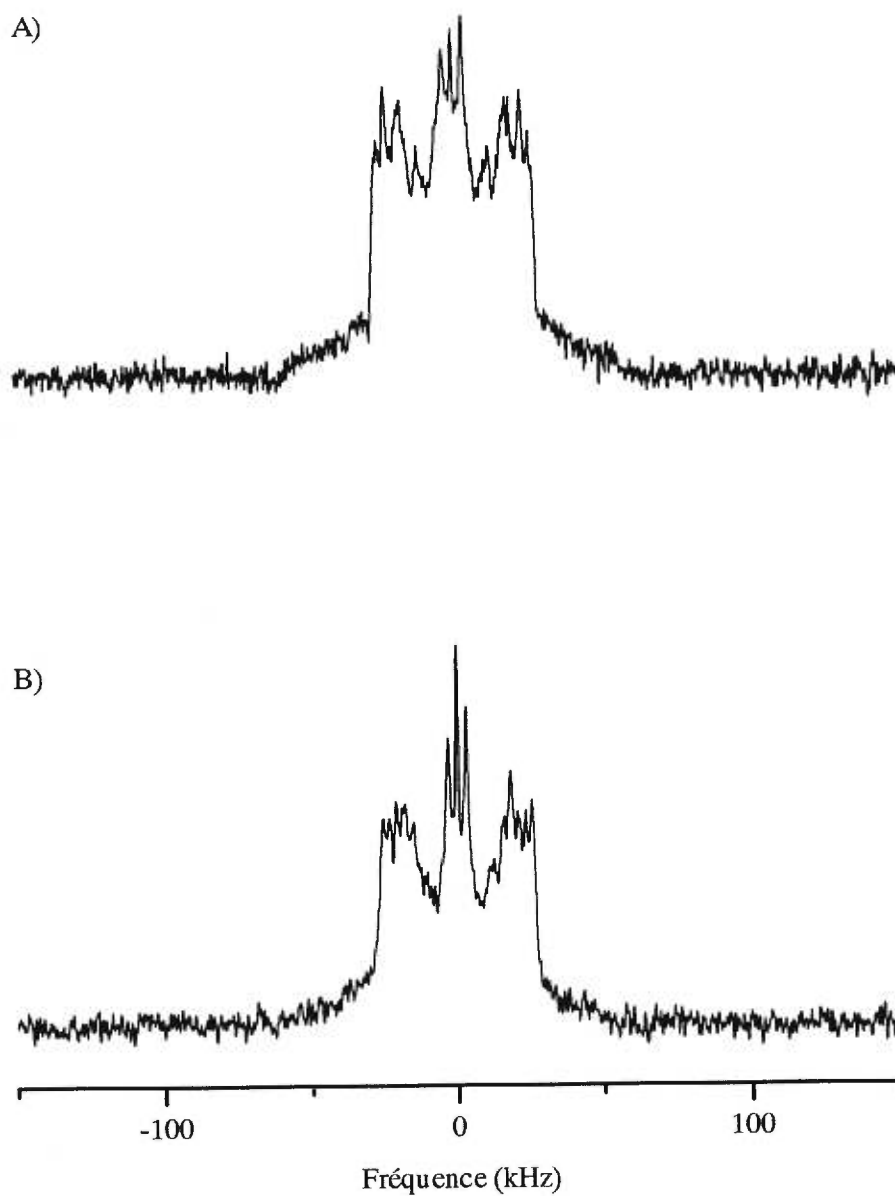


Figure 4.28 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  du mélange PA- $\text{d}_{31}$ /50 mol% chol à un pH de 8,8 à A) 30° C et B) 60° C. Le temps de recyclage est de 500 ms.

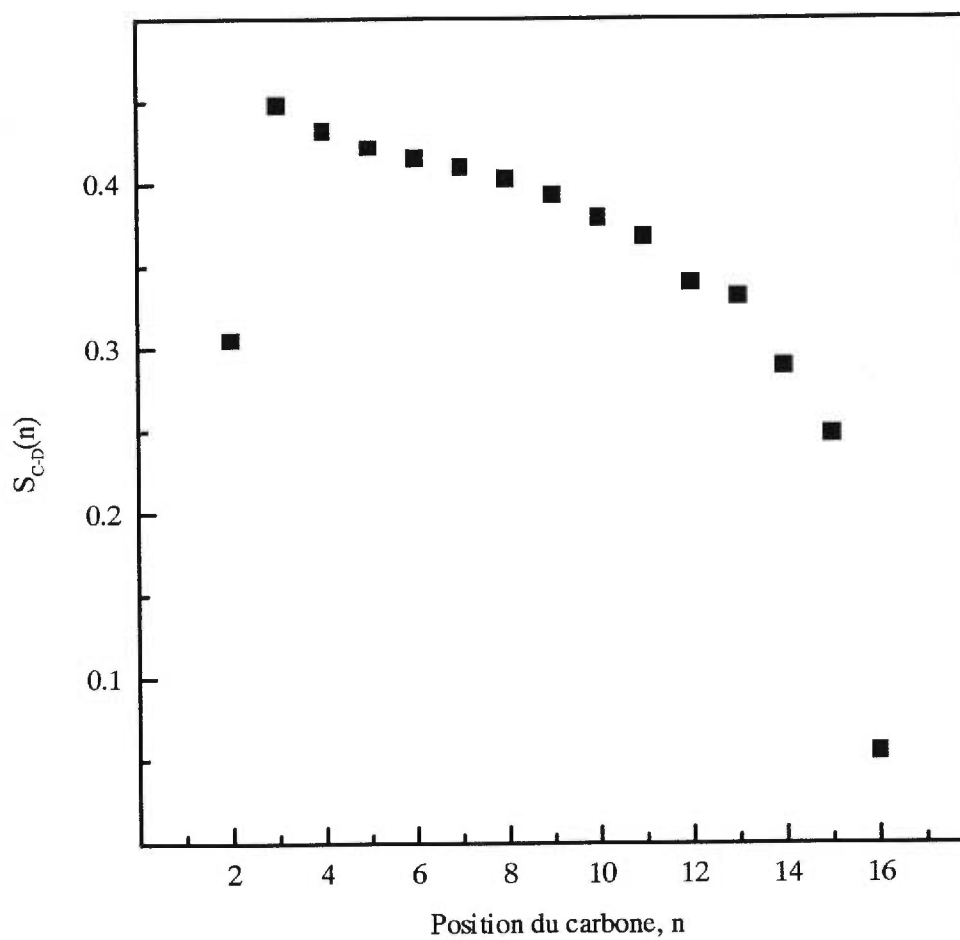


Figure 4.29 Profil d'ordre du mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à un pH de 8,8 à 60° C.

Lorsque l'échantillon de PA-d<sub>31</sub> pur est chauffé, on assiste à la fonte de l'acide gras. La présence d'une raie étroite dans le spectre RMN (Figure 4.22), l'augmentation abrupte de la fréquence de  $\nu_{C-D}$  à 58,5° C jusqu'à 2097 cm<sup>-1</sup> (Figure 4.20), ainsi que la présence d'une seule bande de déformation  $\delta_{CD_2}$  (Figure 4.21), le montrent. La présence de cholestérol modifie ce comportement et entraîne la formation d'une phase lamellaire. Les spectres RMN des différents contenus en cholestérol étudiés (Figure 4.22) nous montrent un spectre caractéristique de la phase liquide-ordonnée. Ces résultats sont aussi appuyés par la diminution progressive de la fréquence de  $\nu_{C-D}$  à des températures supérieures à la T<sub>m</sub> avec l'ajout de cholestérol, qui suggère que les chaînes demeurent plus ordonnées qu'en phase liquide et renforce la conclusion que l'on n'assiste plus à la fonte de l'acide palmitique en présence de cholestérol.

Cette phase, formée à une température différente selon la composition, possède des caractéristiques typiques de la phase *lo* formée dans des membranes de phospholipides. Les spectres montrent la symétrie axiale du système et les valeurs des paramètres d'ordre obtenus pour les différents mélanges (Figure 4.24) sont typiques de la phase *lo*. À partir de ces profils d'ordre, nous avons calculé une longueur de chaîne du PA-d<sub>31</sub> dans le mélange de 16,0-16,5 Å. Cette valeur est typique pour un phospholipide formant la phase *lo*. Par exemple, nous avons mesuré pour le mélange POPE-d<sub>31</sub>/45 mol% chol à 32° C une longueur de chaîne de 16,1 Å. Malgré la nature inhabituelle du lipide, un acide gras, le coefficient d'expansion thermique de la membrane du mélange PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol, calculé à partir des  $\langle S_{C-D} \rangle$  en fonction de la température (équation 17a), est de  $2,2 \times 10^{-3} / ^\circ C$ , une valeur qui se rapproche de l'expansion d'une membrane de DEPE contenant 20 mol% chol ( $2,3 \times 10^{-3} / ^\circ C$ ) (Takahashi et al., 1996) ou de POPC ( $2 \times 10^{-3} / ^\circ C$ ) et de 1-stéaroyl-2-oléoyl-*sn*-phosphatidylcholine ( $3 \times 10^{-3} / ^\circ C$ ) (Bloom et al., 1991).

L'orientation du cholestérol dans ce type de membrane semble également être semblable à celle d'un mélange DMPC/30 mol% chol-d<sub>6</sub> (Dufourc et al., 1984; Marsan et al., 1999). En effet, les éclatements quadrupolaires que nous avons obtenus sont semblables à ceux mesurés pour le système DMPC/30 mol% chol-d<sub>6</sub> (Dufourc et al.,

1984; Marsan et al., 1999) (Tableau IV). L'éclatement quadrupolaire obtenu dans le cas du cholestérol deutéré nous offre de l'information sur l'orientation de la molécule dans la membrane étudiée. Les angles entre le lien C-D et l'axe de rotation de la molécule ( $\beta'$ ) pour les différents sites deutérés ont été calculés (Marsan et al., 1999) pour le mélange DMPC/30 mol% chol-d<sub>6</sub> (Tableau IV). Si on suppose que ces valeurs sont transférables à notre système, nous pouvons déterminer une valeur de  $S_{\text{mol}}$  qui minimise les écarts entre les éclatements quadrupolaires calculés selon l'équation 18 et ceux mesurés. Le tableau V reproduit la valeur de  $S_{\text{mol}}$ , les valeurs des angles de la littérature ( $\beta'$ ), les valeurs d'éclatement quadrupolaire calculées et mesurées expérimentalement.

| Position   | $\beta'$<br>° | $S_{\text{mol}}$ calculé | $\Delta\nu_Q$ calculé<br>(kHz) | $\Delta\nu_Q$<br>expérimental<br>(kHz) |
|--|---------------|--------------------------|--------------------------------|--|
| 2,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ax <sup>a</sup> | 74,1          | 0,95                     | 48                             | 45,8                                   |
| 2,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> éq <sup>a</sup> | 66,2          |                          | 32                             | 34,6                                   |
| 6- <sup>2</sup> H <sup>a</sup>                   | 55,8          |                          | 3                              | 4,4                                    |
| 2,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ax <sup>b</sup> | 74,1          | 0,94                     | 47                             | 45,3                                   |
| 2,4- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> éq <sup>b</sup> | 66,2          |                          | 31                             | 32,3                                   |
| 6- <sup>2</sup> H <sup>b</sup>                   | 55,8          |                          | 3                              | 3,6                                    |

Tableau V Position des liens deutérés, angle entre le lien C-D et l'axe de rotation de la molécule ( $\beta'$ ) (Marsan et al., 1999),  $S_{\text{mol}}$  calculé, éclatement quadrupolaire expérimental et calculé ( $\Delta\nu_Q$ ) pour le cholestérol deutéré dans une membrane de PA/75 mol% chol-d<sub>5</sub> à <sup>a</sup>55° C et <sup>b</sup>65° C.

Pour effectuer ces calculs, nous avons supposé que l'orientation du cholestérol ne changeait pas avec la température. L'obtention d'un  $S_{\text{mol}}$  qui permet de reproduire, avec un écart maximal de 3 kHz, les valeurs d'éclatement quadrupolaire mesurées suggèrent fortement que l'orientation du cholestérol dans une membrane de PA/75 mol% chol-d<sub>5</sub> est très semblable à celle du cholestérol dans une membrane de DMPC/30 mol% chol-d<sub>6</sub>. Les valeurs de  $S_{\text{mol}}$  de 0,94 et 0,95 indiquent qu'il y a peu de fluctuations de la molécule de cholestérol par rapport à son axe de rotation, qui est à peu près parallèle à la

normale à la bicouche (c'est-à-dire à un angle  $\beta \approx 0^\circ$ ). La fluctuation est légèrement plus élevée lorsque la température augmente. Ces valeurs sont près du  $S_{mol}$  de 0,96 obtenu pour le système DMPC/30 mol% chol-d<sub>6</sub> (Marsan et al., 1999).

Nous avons regroupé toutes les informations que nous avons obtenues dans un diagramme température-composition (Figure 4.30). Pour les quatre échantillons étudiés en RMN, nous avons indiqué par des symboles différents la ou les phase(s) formée(s) par l'acide gras dans un mélange donné à une température spécifique. Nous avons négligé la raie étroite lorsqu'elle représentait moins de 15% de l'aire totale; sa présence peut être expliquée par la fonte de l'acide gras, mais aussi par plusieurs structures comme les micelles et les petites vésicules qui peuvent être des états métastables formés durant la transition. Les lignes pointillées délimitent des régions de coexistence d'après l'inspection visuelle. Les lignes pleines sont obtenues par l'analyse quantitative des spectres RMN. Dans un premier cas, nous avons utilisé la méthode de soustraction spectrale, déjà utilisée dans la section 4.1.1.2 de ce chapitre et décrite par Vist et Davis (1990) pour délimiter la région de coexistence entre la phase *lo* et les molécules ayant des mouvements rapides et isotropes représentées par la raie étroite (entre 20 et 70 mol% chol) pour le PA-d<sub>31</sub> à deux températures (étoiles sur le graphique). Dans un deuxième cas, nous avons les spectres RMN du <sup>2</sup>H du cholestérol et de l'acide gras pour le mélange PA/75 mol% chol à 55 et 65° C. Nous pouvons calculer le pourcentage de lipide sous forme solide et en phase *lo* pour le cholestérol et l'acide gras. Connaissant les proportions des deux composantes dans le mélange, il est simple de calculer la composition de chacune des phases à l'aide de:

$$\chi_{chol}^{fluide} = \frac{X_{chol} \cdot \%_{chol}^{fluide}}{(X_{chol} \cdot \%_{chol}^{fluide} + (1 - X_{chol}) \cdot \%_{PA}^{fluide})} \quad (22)$$

où  $X_{chol}$  représente la fraction molaire du cholestérol dans le mélange,  $\chi_{chol}^{fluide}$  la fraction molaire du cholestérol dans la phase fluide,  $\%_{chol}^{fluide}$  le pourcentage de cholestérol en phase fluide et  $\%_{PA}^{fluide}$  le pourcentage de PA en phase fluide. La limite représentée par les triangles inversés ( $\nabla$ ) a été obtenue de ce calcul et les lignes de délimitation ont

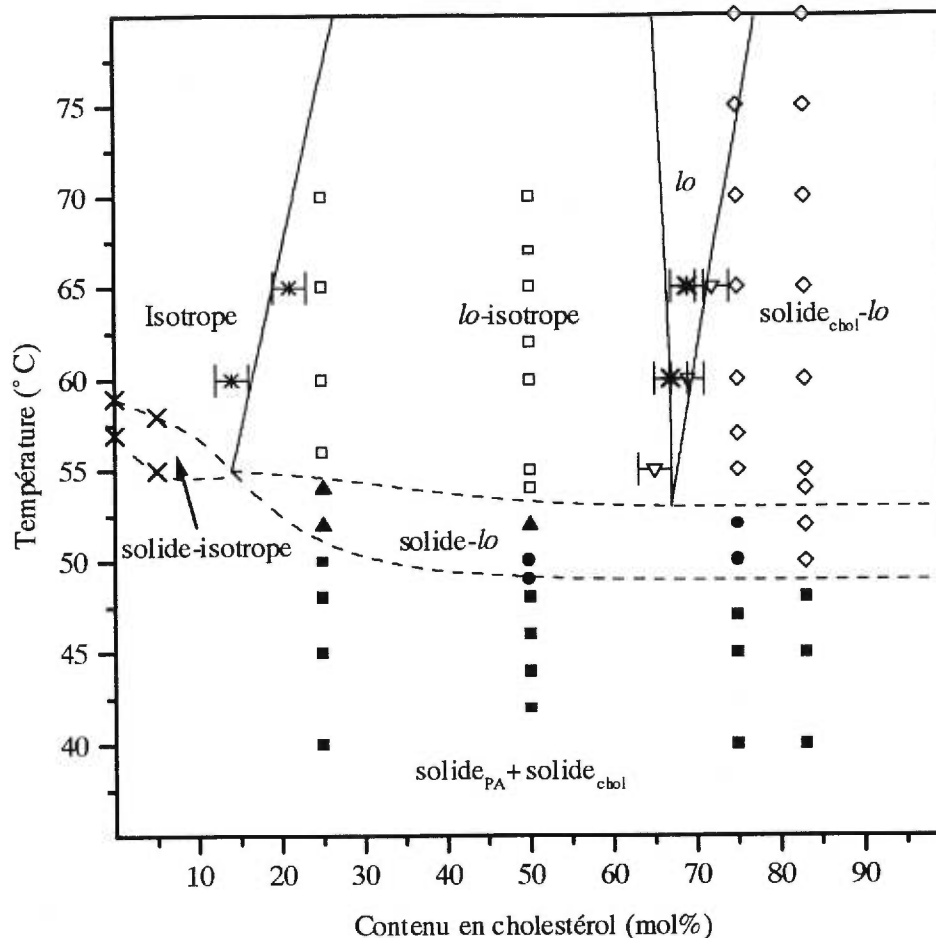


Figure 4.30 Diagramme température-composition proposé pour le système PA/chol. Symboles utilisés:  $\times$ , limite de la transition détectée par spectroscopie IR;  $*$ , obtenus par soustractions spectrales et  $\nabla$  obtenus par calcul à partir des échantillons PA-d<sub>31</sub>/75 mol% chol et PA/75 mol% chol-d<sub>5</sub>; conditions pour lesquelles un spectre typique de la phase solide (■), lamellaire (◇) et d'une coexistence des phases solide et lamellaire (●), solide, lamellaire et une raie étroite (▲) et lamellaire et raie étroite (□) sont enregistrés pour le PA-d<sub>31</sub>, tel que déterminé par inspection visuelle. Les barres d'erreur représentent l'incertitude sur la composition reliée à la détermination du facteur de soustraction ou l'intégration des aires relatives à chacune des phases. Les lignes sur le diagramme définissent les régions dans lesquelles la(les) même(s) phase(s) est(sont) identifiée(s); celles en pointillé résultent d'une inspection visuelle des spectres RMN ou des courbes de thermotropisme IR, alors que les lignes pleines ont été déterminées par calcul ou soustractions spectrales.



ensuite été tracées. On obtient une proportion de 65 à 72 mol% de cholestérol dans la phase *lo*, selon la température.

À basse température, les deux constituants des mélanges sont solides. Entre 0 et de 14 à 20 mol% chol (selon la température), nous assistons à la fonte de l'acide gras. Cette fonte s'effectue entre 57 et 59° C pour l'acide gras pur (deutéié) (Données IR, Figure 4.20). En présence de 5 mol% chol, la transition s'effectue sur un domaine de température de 55 à 58° C (Figure 4.20). L'élargissement de la transition s'explique par la présence de l'impureté qu'est le cholestérol. Nous avons délimité la région de coexistence entre l'acide gras solide et liquide par une ligne pointillée (les débuts et fins des transitions telles que détectées par IR sont représentées par les croix sur le graphique). Ces limites de région sont toutefois approximatives pour les autres mélanges. En présence de 5 mol% de cholestérol, la fréquence de la bande  $\nu_{C-D}$  à une température supérieure à la température de transition est très élevée (du même ordre que celle du PA-d<sub>31</sub> pur), ce qui nous suggère que l'acide gras existe toujours sous forme liquide.

Entre 14 et 65 mol% chol (dépendant de la température), le mélange forme la phase *lo*, mais coexiste avec une structure menant à une raie étroite. Les données obtenues suggèrent la présence d'un eutectique entre 65 et 70 mol% chol. Une étude a déjà suggéré l'existence d'un mélange eutectique, mais pour un mélange équimolaire d'acide palmitique et de cholestérol (Rehfeld et al., 1986). Cette conclusion, tirée d'une analyse d'AED, repose sur l'observation que la température de transition de ce mélange diminuait, mais que la largeur du pic demeurait étroite. Leur détermination est donc approximative, étant donné que les auteurs n'ont étudié qu'un seul mélange; leur valeur est donc passablement en accord avec la nôtre. Compte tenu que les deux approches RMN suggèrent des valeurs voisines, nous croyons que l'intervalle de 65-70 mol% obtenu pour l'eutectique se rapproche plus de la réalité. Finalement, au-delà de ces concentrations, le cholestérol est en excès dans le mélange et cristallise.

La présence de cholestérol augmente donc l'hydratation du PA en brisant des liaisons hydrogène entre les molécules de PA et permet de former la phase *lo*. D'autre part, les chaînes d'acide gras demeurent très ordonnées. La présence de spectres RMN du  $^2\text{H}$  à symétrie axiale pour le PA et le cholestérol, ainsi que les grands paramètres d'ordre orientationnel des chaînes acyles du PA ( $\langle S_{\text{C-D}} \rangle = 0,31$ ) permettent de conclure à la formation d'une phase *lo*. L'incorporation de 50 mol% chol dans une matrice de PA ionisé provoque aussi la formation de la phase *lo* car elle existe de manière exclusive et sur tout le domaine de température étudié (de 20 à 70° C). La phase lamellaire est plus stable qu'à un pH de 5,5. Les chaînes sont plus ordonnées ( $\langle S_{\text{C-D}} \rangle = 0,36$ ) que lorsque le PA est protoné. La répulsion électrostatique entre les têtes polaires du PA ionisé semble donc favoriser la formation de la phase *lo*.

Nous avons donc prouvé, par IR et RMN du  $^2\text{H}$ , que les mélanges d'acide palmitique et de cholestérol formaient la phase *lo* à différentes températures selon la concentration en cholestérol dans le mélange. Cette phase *lo* a des caractéristiques très semblables de celles des autres mélanges phospholipides/cholestérol étudiés. Nous obtenons une épaisseur hydrophobe du PA-d<sub>31</sub> qui est très près de celle de la POPE-d<sub>31</sub> en présence de 45 mol% de cholestérol que nous avons calculée précédemment. Nous avons également obtenu que l'orientation du cholestérol dans cette membrane et sa fluctuation moléculaire sont voisines de celles obtenues pour le cholestérol dans une membrane de DMPC en présence de 30 mol% chol-d<sub>6</sub> (Dufourc et al., 1984; Marsan et al., 1999). L'expansion thermique de ce type de bicouche se compare aussi à celle de phospholipides en présence de cholestérol. Les informations obtenues par IR et RMN du  $^2\text{H}$  nous ont également permis de construire le diagramme température-composition de ce mélange. Nous suggérons la présence d'un mélange eutectique entre 65 et 70 mol% de cholestérol. Ce mélange forme donc une phase *lo* très simple.

Les informations que nous avons obtenues sur ce type de mélange ont un impact au niveau de notre compréhension du stratum corneum. On a vu que le cholestérol et l'acide palmitique peuvent, ensemble, former la phase *lo*. Cette information pourrait conduire à une réinterprétation de certains résultats obtenus sur des systèmes modèles du

stratum corneum. Par exemple, la formation de la phase *lo* par l'acide palmitique dans un mélange céramide/cholestérol/PA-d<sub>31</sub> a amené les auteurs à suggérer que les céramides y participaient (Kitson et al., 1994). Cependant, à la lumière des présents résultats, il est possible que cette phase *lo* n'inclut que le cholestérol et le PA-d<sub>31</sub> et que les céramides n'y soient pas nécessairement impliqués. De plus, la formation de la phase liquide-ordonnée à la température ambiante pour un système simple ouvre la voie à de nombreuses applications. Comme les propriétés du mélange PA/chol semblent similaires à celles des mélanges phospholipides/cholestérol, on peut envisager les mêmes types d'applications que celles qui exploitent les vésicules de phospholipides, mais avec une bicouche plus simple qui, de plus, est sensible au pH.

#### 4.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié cinq lipides (POPE, DMPE-d<sub>54</sub>, DSPE, PA et DPPS) en présence de cholestérol. Nous avons prouvé pour la première fois que la phase liquide-ordonnée présente à hauts pourcentages de cholestérol n'est pas une caractéristique particulière aux PC (Vist et Davis, 1990; Thewalt et Bloom, 1992; Linseisen et al., 1993), mais peut s'étendre à d'autres lipides zwitterioniques (PE), aux lipides chargés négativement (PS) et même à un acide gras (PA). De plus, les membranes de PS, PE ou PA riches en cholestérol possèdent presque les mêmes caractéristiques quand elles sont en phase *lo*. Nous avons représenté à la figure 4.31 les profils d'ordre de trois mélanges (POPE-d<sub>31</sub>/32 mol% chol, PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol et DPPS-d<sub>62</sub>/30 mol% chol) à une température relative de 10° C au-dessus de la T<sub>m</sub> de chacun de ces lipides purs. On remarque que le profil d'ordre est très semblable pour les trois mélanges, conduisant à des bicouches *lo* d'une longueur de chaîne d'environ 16,0-16,5 Å.

Nous avons également étudié l'influence du cholestérol sur différentes transitions de phase. La présence de cholestérol abolit la transition de phase L<sub>β</sub> à L<sub>α</sub>, en rigidifiant les chaînes du phospholipide dans la phase liquide-cristalline et en augmentant le désordre dans la phase gel, et forme la phase liquide-ordonnée. Dans le cas du PA, on

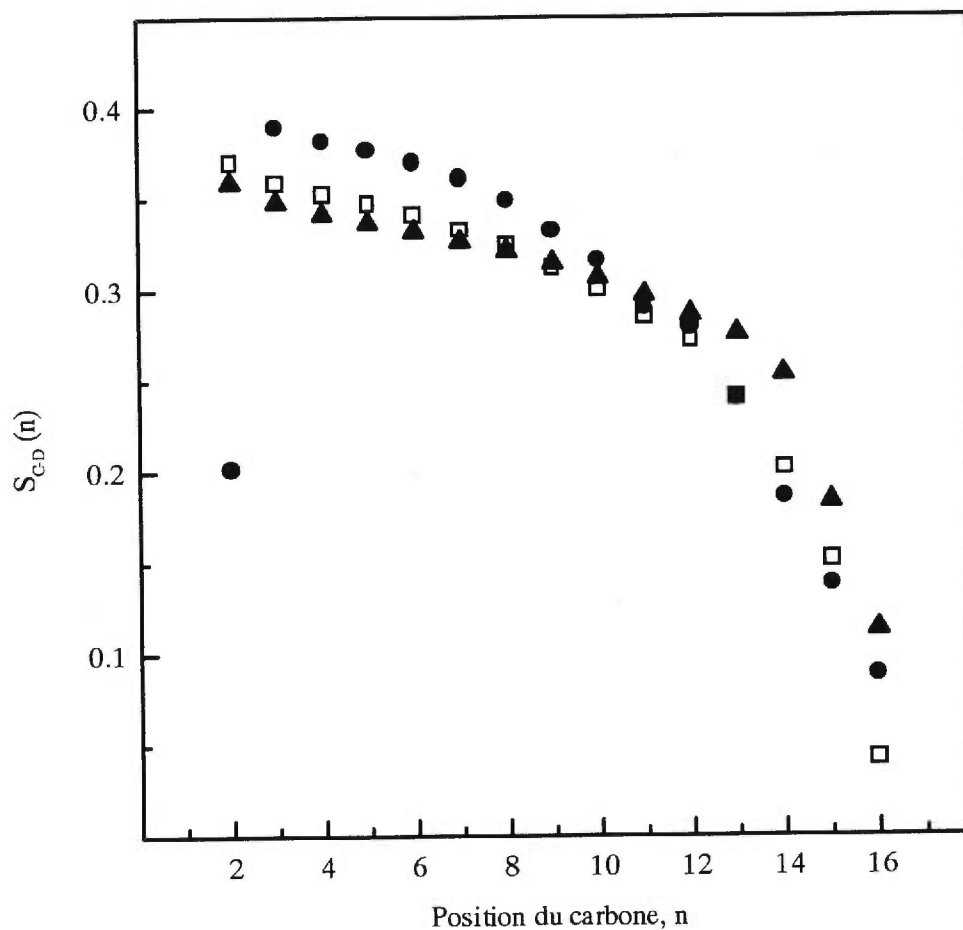


Figure 4.31 Profil d'ordre des mélanges POPE-d<sub>31</sub>/32 mol% chol à 32° C (□), PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol à 67° C (●) et DPPS-d<sub>62</sub>/30 mol% chol à 60° C (▲).

assiste à une transition de phase cristalline à liquide-ordonnée en présence de cholestérol, plutôt que cristalline à liquide pour l'acide gras pur. Une variation de pH influence de façon importante la transition de phase solide à *lo* du mélange PA-d<sub>31</sub>/chol. Lorsque l'acide gras est ionisé (pH=8,8), un mélange PA-d<sub>31</sub>/50 mol% chol existe en phase *lo* entre 20 et 70° C. En plus, le cholestérol influence la transition de phase L<sub>α</sub> à H<sub>II</sub> de la POPE. L'effet n'est cependant pas monotone. On remarque une diminution de la T<sub>m</sub> et une augmentation de l'amplitude de la transition jusqu'à 30 mol% chol suivie d'une diminution de la T<sub>m</sub> et d'une augmentation de l'amplitude. On a aussi remarqué une rigidification des chaînes acyles de la POPE-d<sub>31</sub> en phase H<sub>II</sub> avec l'ajout de cholestérol.

Une incubation de quelques jours à quelques semaines d'échantillons comme la DMPE-d<sub>54</sub> et la DSPE permet la formation de la phase gel anhydre à basse température, plutôt que la phase gel hydratée. La présence de cholestérol, comme lors de la transition de phase gel hydratée à liquide-cristalline, diminue la T<sub>m</sub> et affecte la transition, qui est moins abrupte. Sa présence ne cause cependant pas de découplage de la transition de phase (hydratation de la tête polaire, suivie de la fusion des chaînes acyles du phospholipide).

Finalement, le solvant utilisé dans la préparation d'échantillons peut être critique. Nous avons remarqué que, pour la DPPS en présence de 30 mol% chol, la préparation de l'échantillon dans un mélange de solvants organiques (chloroforme:méthanol (80:20)) n'abolissait pas la transition de phase L<sub>β</sub> à L<sub>α</sub>, ce que plusieurs auteurs attribuent au fait que le cholestérol est moins soluble dans des membranes de PS, qui sont chargées, que dans des membranes zwitterioniques. Cependant, la préparation de l'échantillon dans le chloroforme seulement abolit la transition de phase et la DPPS forme la phase *lo*.

## CHAPITRE 5

### ÉTUDE DE SYSTÈMES PHOSPHOLIPIDES/CHOLESTÉROL PAR LA TECHNIQUE RMN DE WIDELINE SEPARATION (WISE)

#### 5.1 Introduction

Nous avons voulu, par l'utilisation de la technique RMN en deux dimensions de type WISE, caractériser la solubilité du cholestérol dans des membranes modèles. Le but ultime est de développer une technique sensible à l'apparition de cristaux de cholestérol. Jusqu'à maintenant, la technique WISE a été utilisée avec des polymères (Reddy et al., 1997), des monocouches auto-assemblées (voir Reven et Dickinson, 1998 pour une revue de la littérature sur le sujet) et des bicouches lipidiques (Urbina et al., 1998). La technique a permis, entre autres, de mettre en évidence des domaines cristallins dans des mélanges de polymères (Clauss et al., 1992; Schmidt-Rohr et al., 1992; Chin et Kaplan, 1994; Silvestri et Koenig, 1995). Il a été aussi possible de différencier des portions cristallines et amorphes à l'intérieur de l'acide polyéthylène-co-méthacrylique à partir de la largeur des tranches proton (dans ce cas, les déplacements chimiques en  $^{13}\text{C}$  des deux structures sont différents d'environ 2 ppm) (Chin et Kaplan, 1994).

Nous avons voulu examiner la possibilité d'appliquer cette technique sur des modèles biologiques pour caractériser les formes cristallines ou solubilisées du cholestérol dans la membrane. Comme étape préliminaire, nous avons analysé les spectres RMN de  $^{13}\text{C}$  et de  $^1\text{H}$  en une dimension pour définir l'attribution des bandes associées au cholestérol et au phospholipide et pour déterminer la largeur des bandes en proton dans différentes conditions. Nous avons obtenu des spectres WISE pour deux systèmes extrêmes: le cholestérol cristallin et un système pour lequel le cholestérol est complètement solubilisé dans la membrane. Les résultats de ce chapitre sont préliminaires et suggèrent les expériences futures qui devraient être réalisées.

## 5.2 Résultats

Tel que spécifié dans le chapitre 2, la dimension proton du spectre WISE permet d'obtenir de l'information sur la mobilité des molécules, ce qui peut être utilisé ici pour identifier l'état cristallin ou solubilisé dans la membrane du cholestérol. La dimension  $^{13}\text{C}$  permet de séparer les bandes correspondant au cholestérol de celles correspondant au phospholipide à partir de leur déplacement chimique. Nous avons tout d'abord analysé les spectres  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS du cholestérol sous deux formes: cristalline anhydre et hydratée (Figure 5.1).

Des tableaux récapitulatifs présentent les attributions des bandes (Tableau VI et VII)- la numérotation des carbones se réfère à celle indiquée aux figures 1.2 et 1.4. Ces attributions sont basées sur celles faites par Forbes et al. (1984) pour des mélanges de phospholipides et de cholestérol. Nous avons observé des différences dans les spectres du cholestérol cristallin anhydre et hydraté, en accord avec Guo et Hamilton (1996). Deux différences entre les spectres des deux formes cristallines du cholestérol sont particulièrement évidentes. D'abord, une bande à 54,5 ppm est présente dans le cas du cholestérol anhydre, mais pas dans le spectre du cholestérol hydraté. De plus, à basse fréquence, le cholestérol anhydre possède 3 bandes (à 11,4, 12,4 et 14,1 ppm), alors que le cholestérol hydraté n'en possède que deux, centrées à 12,2 et 13,5 ppm. Guo et Hamilton (1996) ont également constaté un dédoublement de certaines bandes (C5, C6, C18 et C3) lorsque le cholestérol était anhydre. Nous n'observons pas ces différences entre les deux spectres. Les spectres nous montrent que la RMN nous permet d'identifier aisément l'état du cholestérol, qu'il soit cristallin anhydre ou monohydraté.

Nous avons ensuite mis en parallèle quatre spectres: celui de la POPC pure, des mélanges POPC/60 mol% chol et POPC/90 mol% chol, ainsi que celui du cholestérol hydraté (Figure 5.2). L'absence de bande à 54,5 ppm et la présence de seulement deux bandes à basse fréquence pour les deux mélanges POPC/cholestérol étudiés nous indiquent que le cholestérol existe sous forme hydratée. L'attribution des bandes pour le

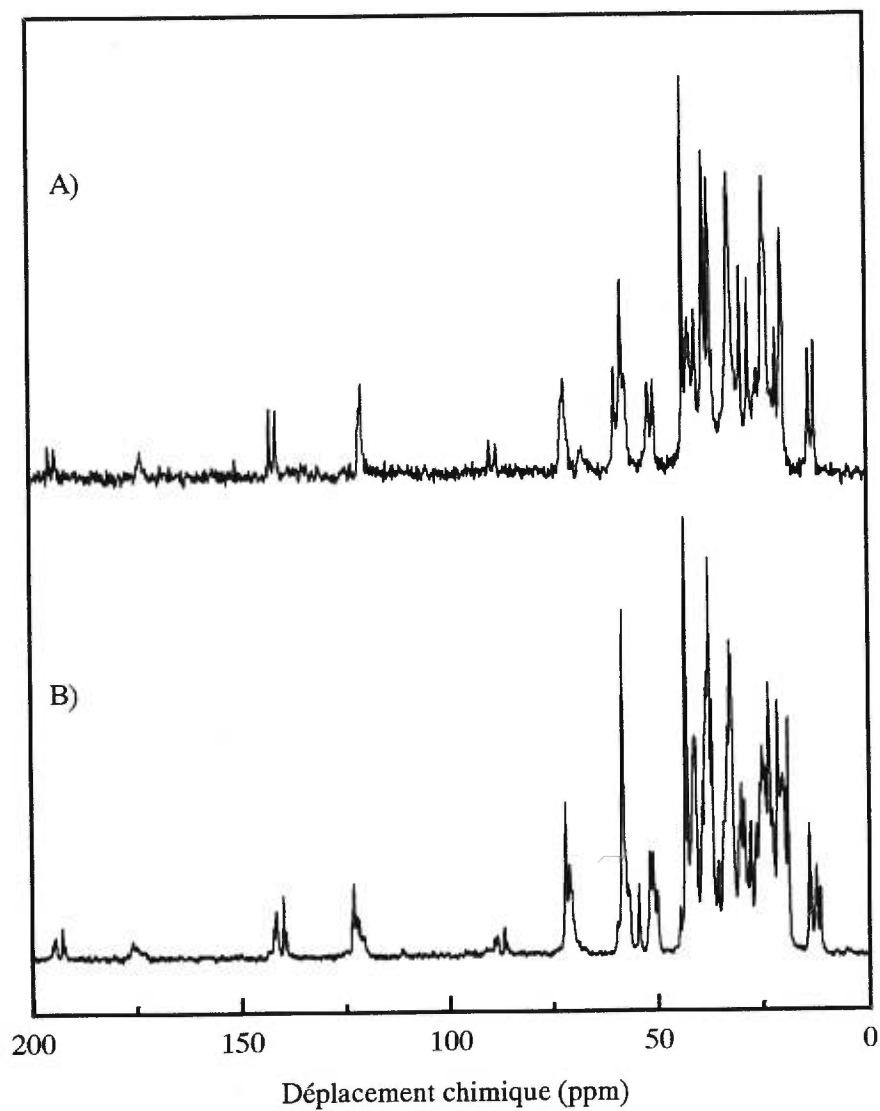


Figure 5.1 Spectres  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS du cholestérol cristallin A) hydraté et B) anhydre. Le temps de recyclage est de 7 s, la vitesse de rotation de 4 kHz et le temps de contact de 1 ms.



| Attribution des bandes | $\delta$ (ppm)<br>Chol anhydre | $\delta$ (ppm)<br>Chol hydraté |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                        | 11,4                           |                                |
| C18                    | 12,4                           | 12,2                           |
|                        | 14,1                           | 13,5                           |
| C21                    | 19,0                           | 19,8                           |
| C11                    | 21,4                           | 21,2                           |
| C26/C27                | 23,5                           | 24,0                           |
| C15/C23                | 25,5                           | 25,6                           |
| C25                    | 27,8                           | 27,7                           |
| C16                    | 29,2                           | 29,5                           |
|                        | 30,0                           |                                |
| C7/C8                  | 32,7                           | 32,4                           |
|                        | 35,5                           |                                |
| C10                    | 36,8                           | 37,1                           |
| C20/C22                | 37,5                           | 38,2                           |
| C24                    |                                | 40,3                           |
| C4                     | 41,1                           | 41,9                           |
| C13 <sup>a</sup>       | 43,2                           | 43,2                           |
|                        | 50,1                           | 50,0                           |
|                        | 51,2                           |                                |
| C9                     | 51,9                           | 51,6                           |
|                        | 54,5                           |                                |
|                        |                                | 57,1                           |
| C14/C17                | 58,3                           | 58,0                           |
|                        |                                | 59,6                           |
| C3                     | 72,0                           | 71,6                           |
|                        | 86,8                           | 88,0                           |
|                        | 88,6                           | 89,6                           |
| C6                     | 123,1                          | 120,6                          |
|                        | 139,8                          | 141,0                          |
| C5                     | 141,6                          | 142,6                          |

<sup>a</sup> Bande ayant servi de référence pour tous les spectres selon le déplacement chimique attribué par Forbes et al. (1984).

Tableau VI Déplacements chimiques ( $\delta$ ) et attribution partielle des bandes des spectres <sup>13</sup>C-CP/MAS du cholestérol cristallin anhydre et hydraté.

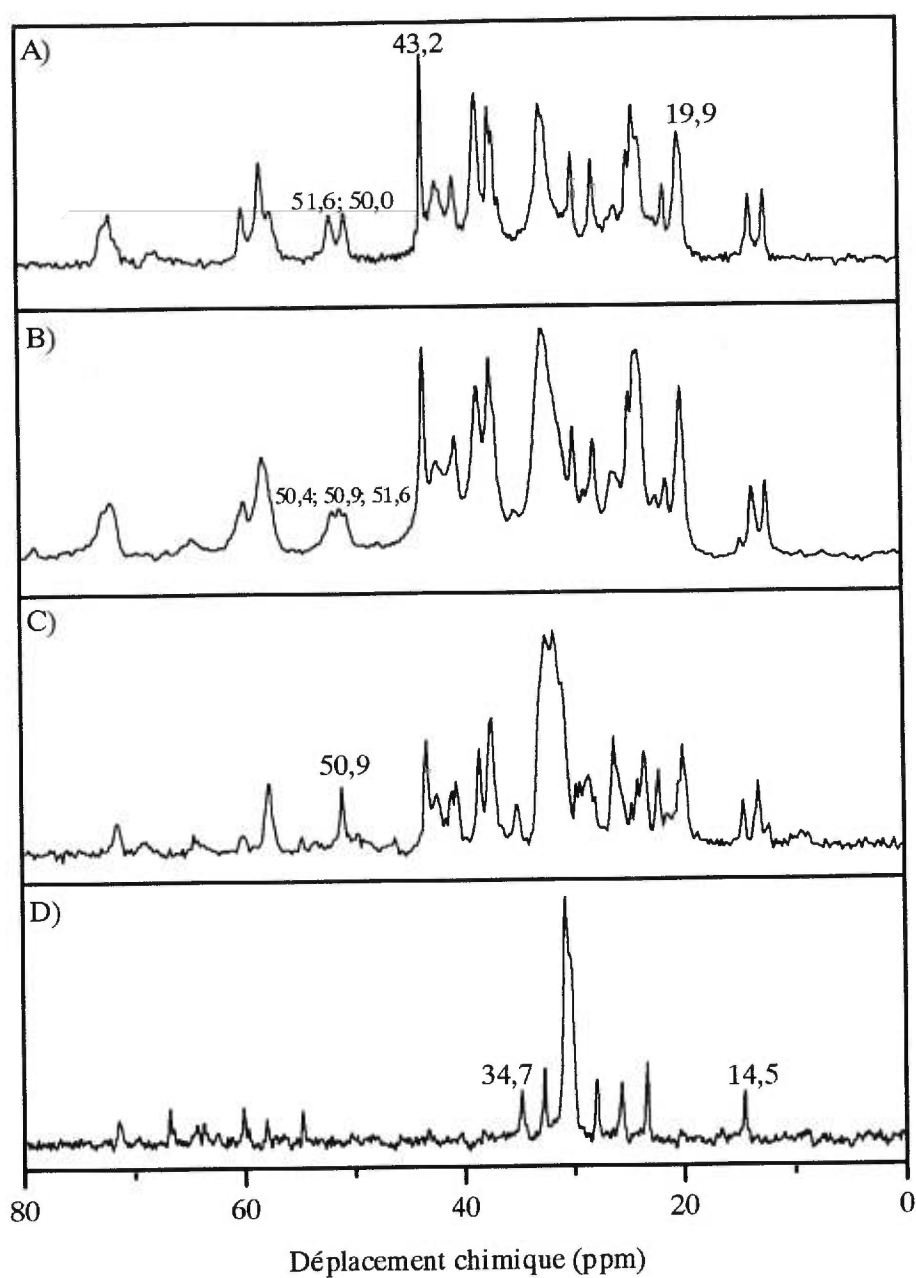


Figure 5.2 Spectres  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS A) du cholestérol hydraté, B) du mélange POPC/90 mol% chol, C) du mélange POPC/60 mol% chol et D) de la POPC pure. Le temps de recyclage est de 7 s, la vitesse de rotation de 4 kHz pour A) et de 2 kHz pour B, C et D) et le temps de contact est de 1 ms. Les déplacements chimique indiqués en A) correspondent aux bandes caractéristiques du cholestérol et celles indiquées en D) sont des bandes typiques du phospholipide.

| Attribution des bandes        | $\delta$ (ppm)<br>POPC pure | $\delta$ (ppm)<br>POPC/<br>60 mol% chol | $\delta$ (ppm)<br>POPC/<br>90 mol% chol | $\delta$ (ppm)<br>Chol hydraté |
|-------------------------------|-----------------------------|---|---|--------------------------------|
| Chol-C18                      |                             | 12,2                                    | 12,2                                    |                                |
| Chaîne-C16                    | 14,5                        | 13,2                                    | 13,5                                    | 12,2; 13,5                     |
| Chol-C21                      |                             | 14,5                                    | 14,6                                    |                                |
| Chol-C11                      |                             | 19,9                                    | 19,9                                    | 19,8                           |
| Chaîne-C15 et<br>Chol-C26/C27 | 23,3                        | 22,1                                    | 21,2                                    | 21,2                           |
| Chaîne-C3 et Chol-<br>C15/C23 | 25,6                        | 23,4                                    | 23,7                                    | 24,0                           |
| Chol-C25                      |                             | 26,1                                    | 26,1                                    | 25,6                           |
|                               | 27,9                        | 28,5                                    | 27,8                                    | 27,7                           |
| Chol-C16                      |                             |   | 29,6                                    | 29,5                           |
| Chaîne C4 à C13               | 30,7                        |   |   |                                |
| Chol-C2/C7/C8                 |                             | 31,6                                    | 32,4                                    | 32,4                           |
| Chaîne C14                    | 32,6                        |   |   |                                |
| Chaîne-C2                     | 34,7                        | 35,0                                    | 35,0                                    |                                |
| Chol-C10                      |                             | 37,2                                    | 37,2                                    | 37,1                           |
| Chol-C1/C20/C22               |                             | 38,4                                    | 38,3                                    | 38,2                           |
| Chol-C24                      |                             | 40,5                                    | 40,4                                    | 40,3                           |
| Chol-C4                       |                             | 42,2                                    | 42,1                                    | 41,9                           |
| Chol-C13 <sup>a</sup>         |                             | 43,2                                    | 43,2                                    | 43,2                           |
| Chol-C9                       |                             | 50,9                                    | 50,9                                    | 51,6                           |
| Choline-C $\gamma$            | 54,8                        |   |   |                                |
| Chol-C14/C17                  |                             | 57,7                                    | 58,0                                    | 58,0                           |
| Choline-C $\alpha$            | 60,1                        | 60,0                                    | 59,7                                    |                                |
| Glycérol-C1                   | 63,8                        |   |   |                                |
| Glycérol-C3                   | 64,4                        | 64,5                                    | 64,5                                    |                                |
| Choline-C $\beta$             | 66,8                        |   |   |                                |
| Glycérol-C2 et<br>Chol-C3     | 71,4                        | 71,3                                    | 71,8                                    | 71,6                           |
| Chol-C6                       |                             |   | 121,1                                   | 120,6                          |
| Chol-C5                       |                             |   | 141,3; 142,4                            | 141,0; 142,6                   |
| Chaîne-C1 (C=O) <sup>b</sup>  | 174,1                       |   | 174,5                                   |                                |

<sup>a</sup> Bande ayant servi de référence pour les échantillons contenant du cholestérol selon le déplacement chimique attribué par Forbes et al. (1984).

<sup>b</sup> Bande ayant servi de référence pour la POPC pure selon l'attribution de Forbes et al. (1984).

Tableau VII Déplacements chimiques ( $\delta$ ) des bandes des spectres <sup>13</sup>C-CP/MAS de la POPC pure, des mélanges POPC/60 mol% chol et 90 mol% chol et du cholestérol cristallin hydraté.

lipide pur et les deux mélanges se retrouve au tableau VII. L'attribution a été réalisée à partir des données de la littérature (Forbes et al., 1984; Le Guernevé et Auger, 1995). Ces spectres nous permettent d'identifier certaines bandes bien résolues caractéristiques d'une espèce. Les bandes à 19,9 et 43,2 ppm, dont on observe une augmentation de l'intensité avec une proportion de cholestérol plus importante, sont associées au cholestérol dans le mélange. Ces bandes ne se retrouvent pas dans le spectre  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS de la POPC pure.

Nous avons également étudié les spectres proton du cholestérol cristallin anhydre, du cholestérol cristallin hydraté et du mélange DPPC- $\text{d}_{62}$ /30 mol% chol en fonction de la vitesse de rotation du porte-échantillon (Figure 5.3). Les spectres proton du cholestérol cristallin, anhydre ou hydraté, sont très larges à la base, avec un amincissement au centre du spectre, à une vitesse de 2 kHz. La largeur de ces spectres est attribuée aux interactions dipolaires importantes dans ces échantillons solides. La seule différence mineure entre les deux spectres est la présence d'une fine raie sur le spectre proton du cholestérol cristallin hydraté, très probablement due à la présence d'une certaine fraction de  $\text{H}_2\text{O}$  dans le  $\text{D}_2\text{O}$  constituant le tampon. Par contre, le spectre proton du mélange DPPC- $\text{d}_{62}$ /30 mol% chol, un échantillon pour lequel le cholestérol est entièrement solubilisé dans la membrane (Huang et al., 1999), est plutôt constitué de bandes étroites représentant les protons du cholestérol et ceux de la tête polaire de la DPPC- $\text{d}_{62}$ . Si on augmente la vitesse de rotation, les spectres les plus affectés par la rotation sont ceux des échantillons pour lesquels il y a le moins de mouvements moléculaires, à savoir le cholestérol cristallin, anhydre ou hydraté. On remarque une augmentation de la résolution du spectre au centre, avec tout de même une base large. Étant donné que le spectre est plus étroit à une vitesse de rotation importante et afin de maximiser les différences entre les formes cristalline et solubilisée du cholestérol, nous allons utiliser une vitesse moyenne de 2 kHz dans les expériences WISE.

Le spectre WISE du cholestérol cristallin anhydre est présenté à la figure 5.4. À la figure 5.5, on montre le spectre WISE du mélange POPC/60 mol% chol. La

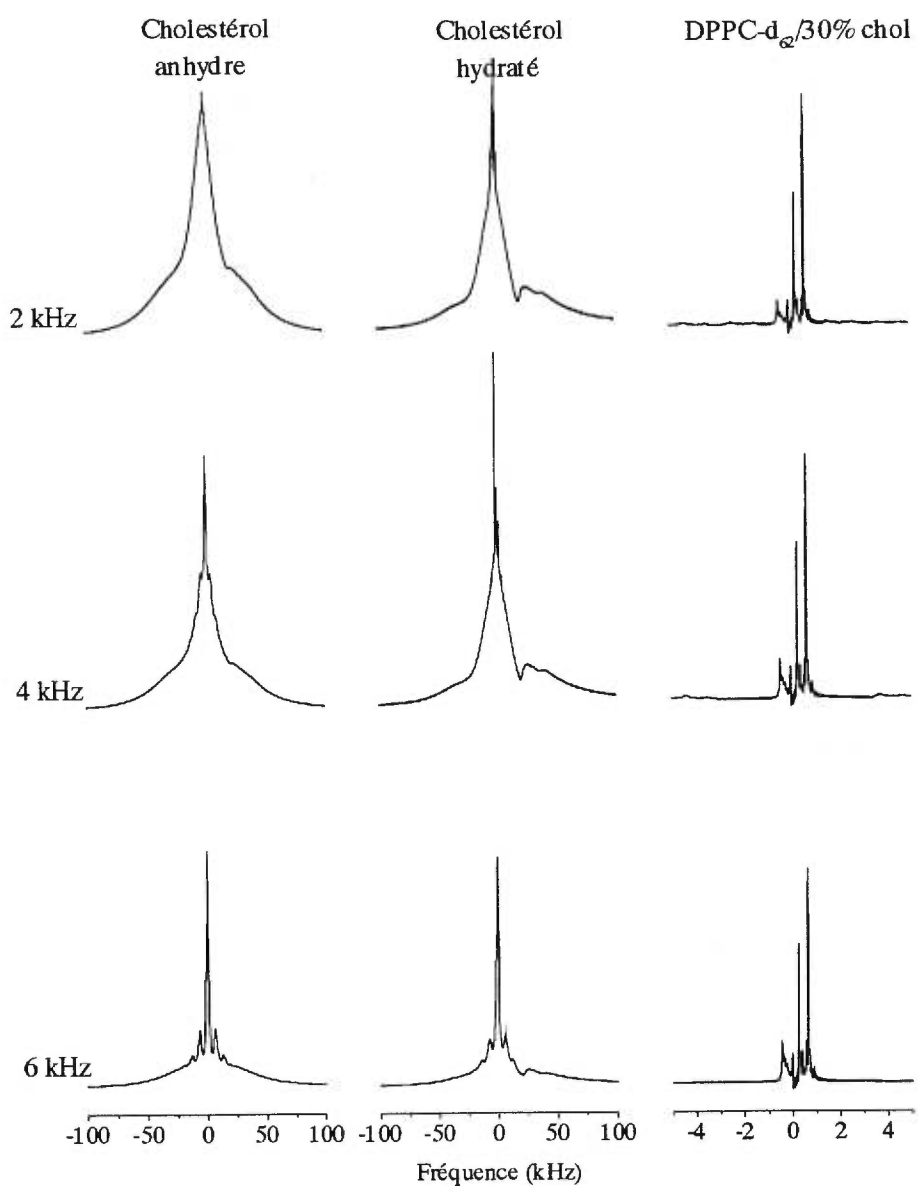


Figure 5.3 Spectres  $^1\text{H}$  du cholestérol cristallin anhydre (colonne de gauche) et hydraté (colonne du centre) et du mélange DPPC- $d_{62}$ /30 mol% chol (colonne de droite) à différentes vitesses de rotation du porte-échantillon (tel qu'indiqué pour chaque ligne).

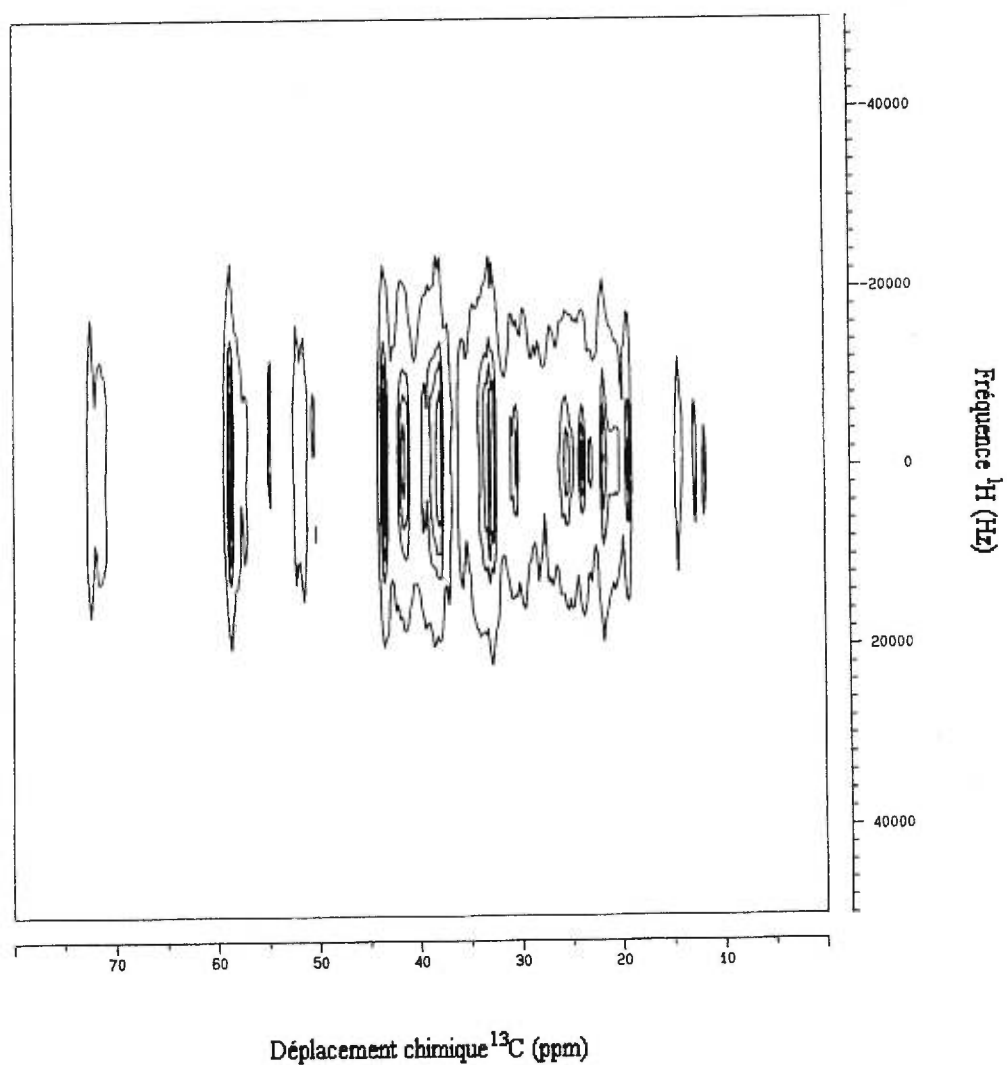


Figure 5.4 Spectre WISE du cholestérol cristallin anhydre. Le temps de recyclage est de 5 s, la vitesse de rotation du porte-échantillon de 2 kHz et le temps de contact de 0,1 ms.

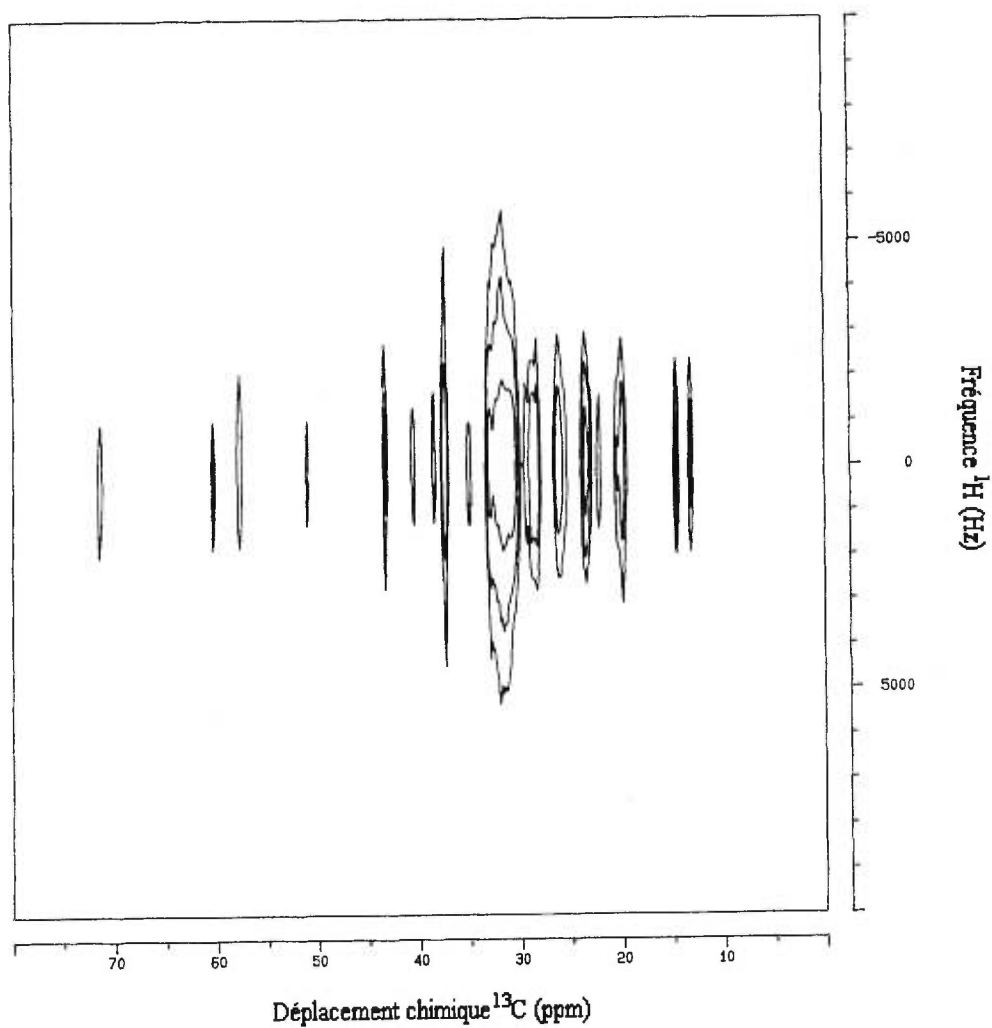


Figure 5.5 Spectre WISE du mélange POPC/60 mol% chol. Le temps de recyclage est de 5 s, la vitesse de rotation du porte-échantillon de 2 kHz et le temps de contact de 1 ms. L'échelle en  $^1\text{H}$  de ce spectre est réduite d'un facteur 5 par rapport à celle de la figure 5.4.

dimension  $^{13}\text{C}$  de ces deux spectres est présentée à la figure 5.6 pour bien montrer que ces spectres sont semblables à ceux retrouvés à la figure 5.2. Nous pouvons tout de suite remarquer par les spectres WISE que la largeur dans la dimension  $^1\text{H}$  est beaucoup plus importante pour le cholestérol cristallin que pour le mélange contenant des phospholipides. Les tranches proton des deux bandes associées au cholestérol sont présentées à la figure 5.7. Pour le cholestérol cristallin, la bande à 19,9 ppm a une largeur de 19 kHz et celle à 43,2 ppm, une largeur de 28 kHz. Pour le mélange POPC/60 mol% chol, les deux bandes ont une largeur de 5,2 kHz. Comme la solubilité du cholestérol dans une membrane de PC est de 66 mol% (Huang et al., 1999), ce signal étroit devrait représenter le cholestérol solubilisé dans la membrane. Nous voyons donc qu'à partir du profil de ces tranches proton associées à des  $^{13}\text{C}$  du cholestérol relativement bien résolus, nous pouvons caractériser l'état du stérol, à savoir s'il est cristallin ou solubilisé dans la membrane lipidique.

### 5.3 Discussion

La comparaison des spectres  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS des mélanges POPC/60 mol% chol et POPC/90 mol% chol avec le spectre du cholestérol cristallin montre quelques différences. Par exemple, il y a, sur le spectre du cholestérol cristallin, deux bandes associées au C9 du cholestérol situées à 50,0 et 51,6 ppm. Le phospholipide pur ne contribue pas dans cette région. Pour le cholestérol solubilisé (60 mol% chol dans une membrane de POPC), il n'y a qu'une seule bande située à 50,9 ppm. La bande située à ce déplacement chimique pour le mélange POPC/90 mol% chol semble être une superposition des bandes du cholestérol cristallin et de celle du mélange POPC/60 mol% chol, où tout le cholestérol est solubilisé dans la membrane. En effet, on note une bande à 50,9 ppm, épaulée par deux bandes à 50,4 et 51,6 ppm. Il est donc peut-être possible, par l'étude des spectres  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS, de distinguer des signaux caractéristiques des deux types de cholestérol lorsqu'ils coexistent. Cette approche devrait être examinée plus en détails. Nous constatons également que certaines bandes bien résolues dans la dimension  $^{13}\text{C}$  du spectre WISE du cholestérol, et les tranches proton correspondantes, permettent de distinguer le cholestérol cristallin et solubilisé à cause de leur largeur



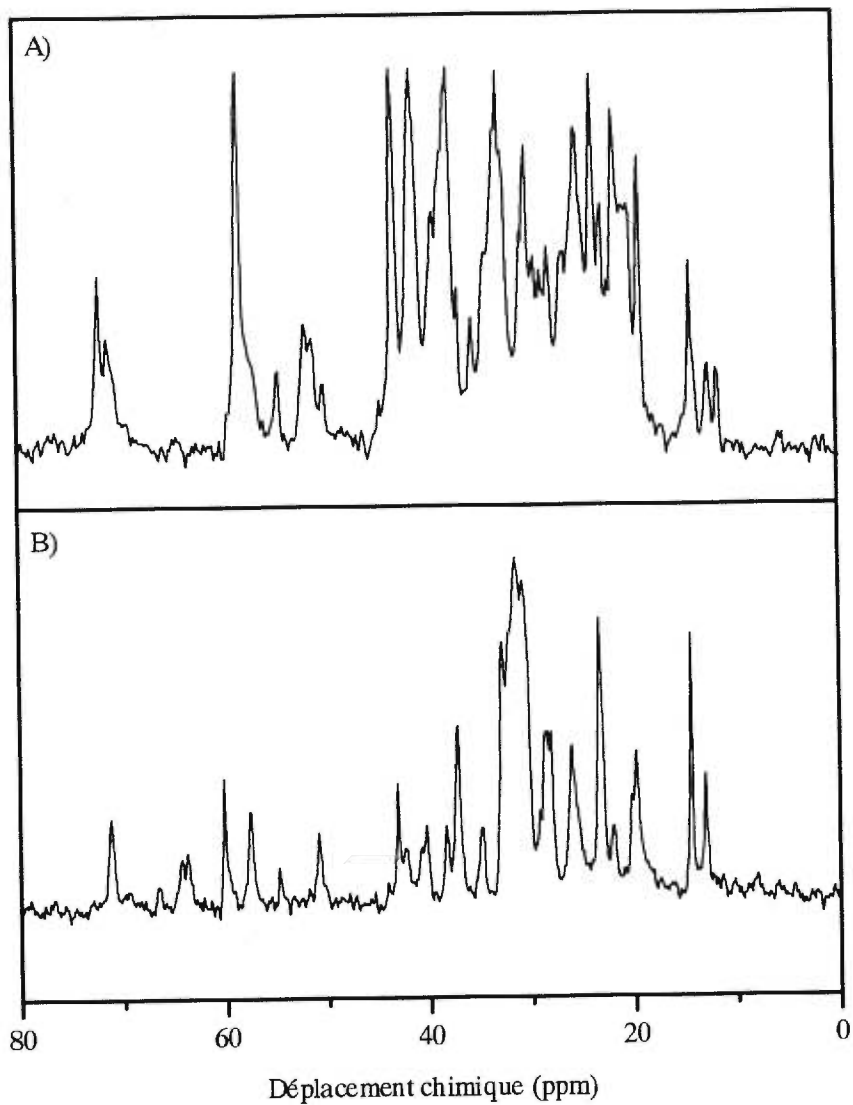


Figure 5.6 Dimension  $^{13}\text{C}$  des spectres WISE A) de la figure 5.4 (Cholestérol cristallin anhydre) et B) de la figure 5.5 (POPC/60 mol% chol).

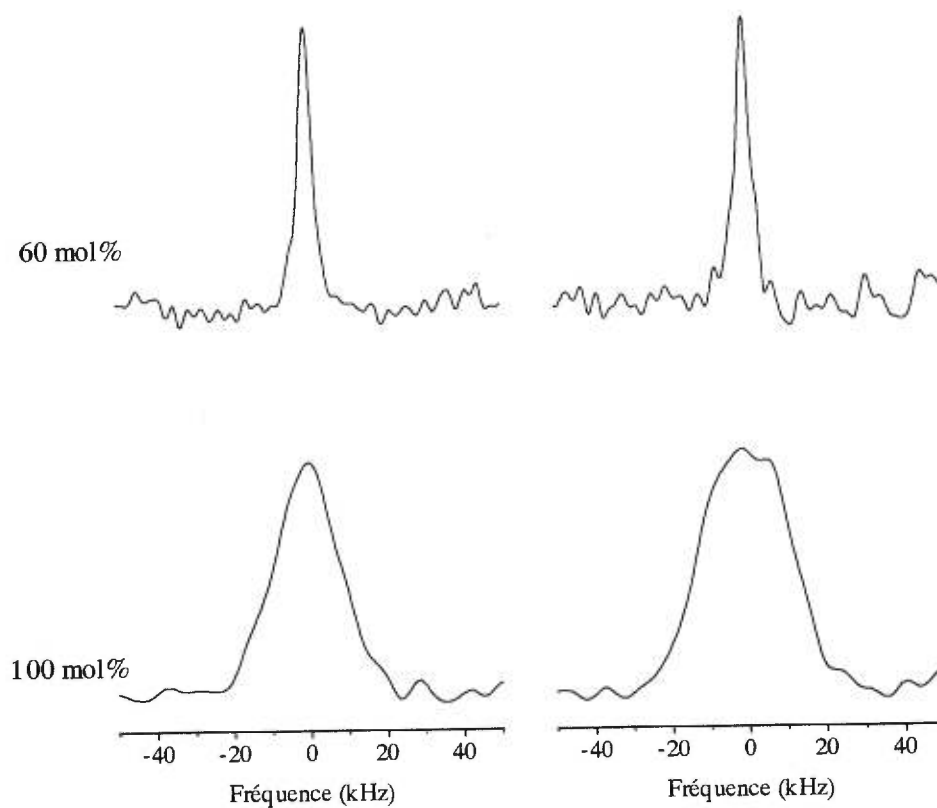


Figure 5.7 Tranches proton des spectres WISE des figures 5.4 et 5.5 pour deux bandes caractéristiques du cholestérol en  $^{13}\text{C}$  à 19,9 ppm (colonne de gauche) et 43,2 ppm (colonne de droite) pour le cholestérol cristallin anhydre et le mélange POPC/60 mol% chol.

différente. Le cholestérol cristallin, très rigide, ne subit pas un moyennage des interactions dipôle-dipôle aussi important que le cholestérol solubilisé, ce qui fait que la largeur du spectre proton est beaucoup plus importante. La vitesse de rotation cause également un moyennage des interactions dipôle-dipôle qui se répercute dans l'allure du spectre proton, qui devient plus étroit. Cependant, à une vitesse autour de 2 kHz, les deux types de signaux sont très différents. À la figure 5.7, on retrouve les tranches proton de bandes caractéristiques du cholestérol pour les deux échantillons étudiés. Les tranches proton du cholestérol dans le mélange POPC/60 mol% chol sont étroites, de l'ordre de 5,2 kHz, tandis que la tranche proton pour les mêmes bandes a une largeur de 19 à 28 kHz dans le cas du cholestérol cristallin. Il est donc possible, par l'étude de la largeur des tranches proton associées à des  $^{13}\text{C}$  du cholestérol de différencier les deux formes du cholestérol dans deux échantillons différents.

#### 5.4 Conclusion

Cette étude préliminaire montre que les signaux du proton du cholestérol cristallin et du cholestérol solubilisé dans la membrane lipidique sont très différents l'un de l'autre lorsqu'un seul type de cholestérol est présent dans l'échantillon. Les expériences suivantes devront déterminer s'il est possible de distinguer ces deux types de cholestérol lorsqu'ils sont tous les deux présents dans un même échantillon. L'étude des spectres  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS des différents échantillons nous suggère qu'il est peut-être possible de distinguer le cholestérol cristallin du cholestérol solubilisé dans la membrane par l'étude de certaines bandes, comme celle attribuée au carbone C9 du cholestérol. Cette méthode mérite une étude plus approfondie.

## CHAPITRE 6

### ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES PEPTIDES $L_{24}$ ET $(LA)_{12}$ SUR LA STRUCTURE DES BICOUCHES DE DPPC- $d_{62}$ ET POPC- $d_{31}$

#### 6.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous étudions l'effet de la topologie de la surface de peptides transmembranaires sur l'ordre des chaînes acyles du lipide. Nous savons maintenant que la présence de cholestérol dans une membrane lipidique conduit à la formation, dans tous les cas étudiés ici, de la phase liquide-ordonnée. L'influence du cholestérol sur les bicouches a été associée aux faces relativement planes du stérol (Bloch, 1983). D'ailleurs, tel que mentionné dans le chapitre 1, le lanostérol ne présente pas une forme aussi plane et son influence sur l'ordre et la dynamique des chaînes acyles de PC est moins importante que le cholestérol (Urbina et al., 1995). On peut ainsi penser que la topologie de la molécule insérée est très importante.

Nous avons étudié l'influence de deux peptides transmembranaires dont la séquence d'acides aminés différente entraîne une topologie différente. Ces deux peptides possèdent un segment hydrophobe moyen d'environ 31-32 Å (Zhang et al., 1995b) composé de 24 acides aminés chacun. Le premier, Ac-K<sub>2</sub>GL<sub>24</sub>K<sub>2</sub>A-amide ( $L_{24}$ ), possède 24 leucines dans sa section hydrophobe, alors que le second, Ac-K<sub>2</sub>G(LA)<sub>12</sub>K<sub>2</sub>A-amide ( $(LA)_{12}$ ), possède 12 groupements leucines et alanines alternés. Deux résidus lysines, de part et d'autre de la section hydrophobe, permettent l'ancrage du peptide dans une position transmembranaire. Le peptide  $L_{24}$  a une topologie plus "lisse" et cylindrique que le peptide  $(LA)_{12}$ , qui présente une surface plus "rugueuse" (Figure 6.1).

Des études effectuées par dichroïsme circulaire et IR ont permis de constater que la section hydrophobe des peptides  $(LA)_{12}$  et  $L_{24}$  forme principalement une hélice- $\alpha$  et que l'axe de l'hélice est perpendiculaire au plan de la bicouche (Davis et al., 1983; Huschilt et al., 1989; Zhang et al., 1992a; Zhang et al., 1995a). Les deux peptides

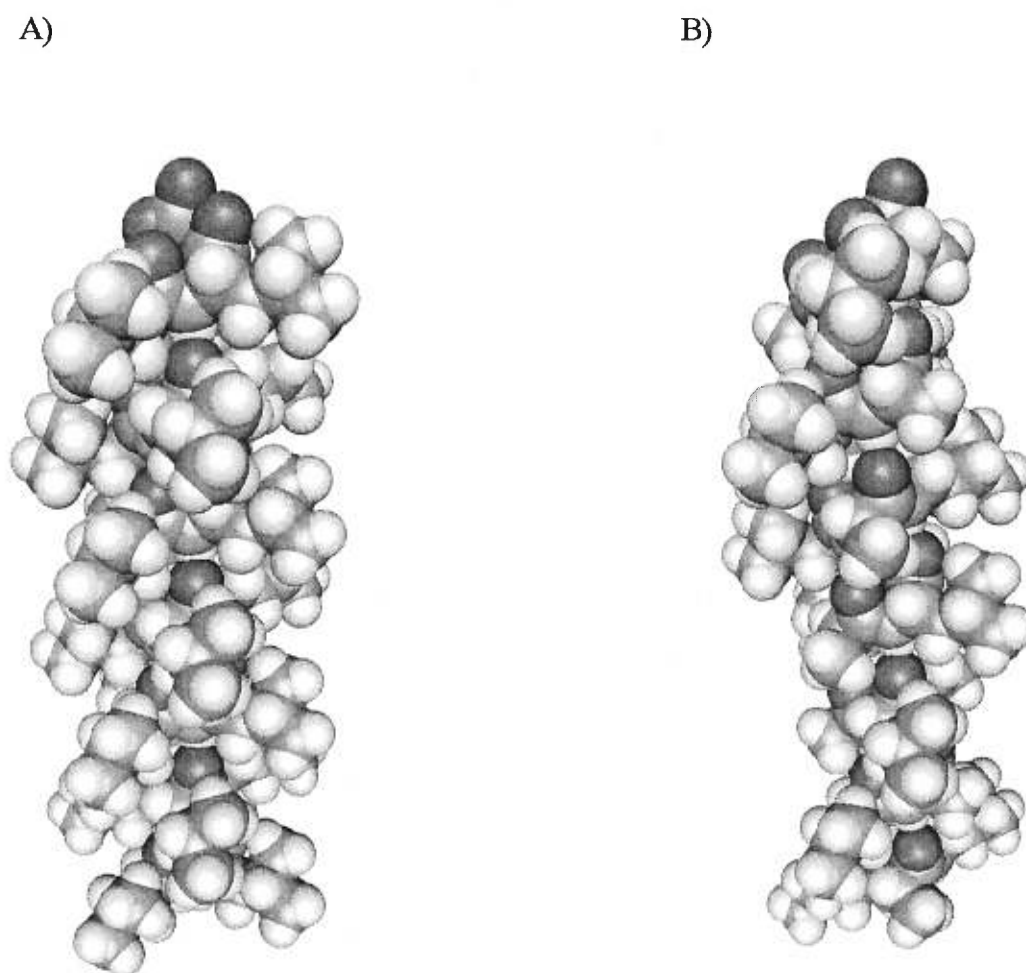


Figure 6.1 Représentation de l'hélice- $\alpha$  des peptides A)  $L_{24}$  et B)  $(LA)_{12}$  dans la même orientation.

diminuent l'enthalpie et la température de la transition de phase gel à liquide-cristalline de la DPPC (Davis et al., 1983; Huschilt et al., 1985; Morrow et al., 1985; Zhang et al., 1992b; Zhang et al., 1995b); cette diminution est cependant plus marquée pour (LA)<sub>12</sub>. L'influence du peptide L<sub>24</sub> sur l'ordre des chaînes acyles de la POPC-d<sub>31</sub> (Nezil et Bloom, 1992) et de la DPPC-d<sub>62</sub> (Huschilt et al., 1985) a été étudié par RMN du <sup>2</sup>H et une rigidification des chaînes en présence du peptide a été démontrée dans les deux cas, ce qui confirme l'effet de la non-concordance des segments hydrophobes du peptide et du lipide, théorie développée par Mouritsen et Bloom (1984). Pour le mélange DPPC-d<sub>62</sub>/peptide L<sub>24</sub>, un diagramme température-composition a d'ailleurs été construit; il montre la diminution de la T<sub>m</sub> de la transition de phase gel à liquide-cristalline avec l'ajout de concentrations croissantes de peptides et la transition est moins abrupte (Huschilt et al., 1985; Morrow et al., 1985). Il est proposé, à partir des déplacements de la bande ν<sub>C-H</sub> en IR, que la surface plus accidentée du peptide (LA)<sub>12</sub> conduit à une désorganisation plus grande des chaînes acyles des lipides, si on la compare à l'influence que possède le peptide L<sub>24</sub> (Zhang et al., 1995b).

Nous cherchons, dans cette étude, à évaluer l'influence de la topologie de la surface du segment hydrophobe de ces deux peptides modèles sur l'ordre orientationnel des chaînes acyles de deux phospholipides, la DPPC-d<sub>62</sub> et la POPC-d<sub>31</sub>, par RMN du <sup>2</sup>H pour la comparer à l'influence de la surface plane du cholestérol. Nous étudions également l'influence de ces deux peptides sur le thermotropisme de la DPPC-d<sub>62</sub>, par IR, pour évaluer s'il y a une modification de l'effet sur la T<sub>m</sub> du lipide à cause de la topologie différente des peptides.

## 6.2 Résultats

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence des peptides (LA)<sub>12</sub> et L<sub>24</sub> sur l'ordre orientationnel des chaînes acyles de la POPC-d<sub>31</sub>. La figure 6.2 montre les spectres obtenus pour la POPC-d<sub>31</sub> pure (Figure 6.2A) et pour des mélanges de POPC-d<sub>31</sub> et de (LA)<sub>12</sub> (Figure 6.2B) ou L<sub>24</sub> (Figure 6.2C) à des proportions de

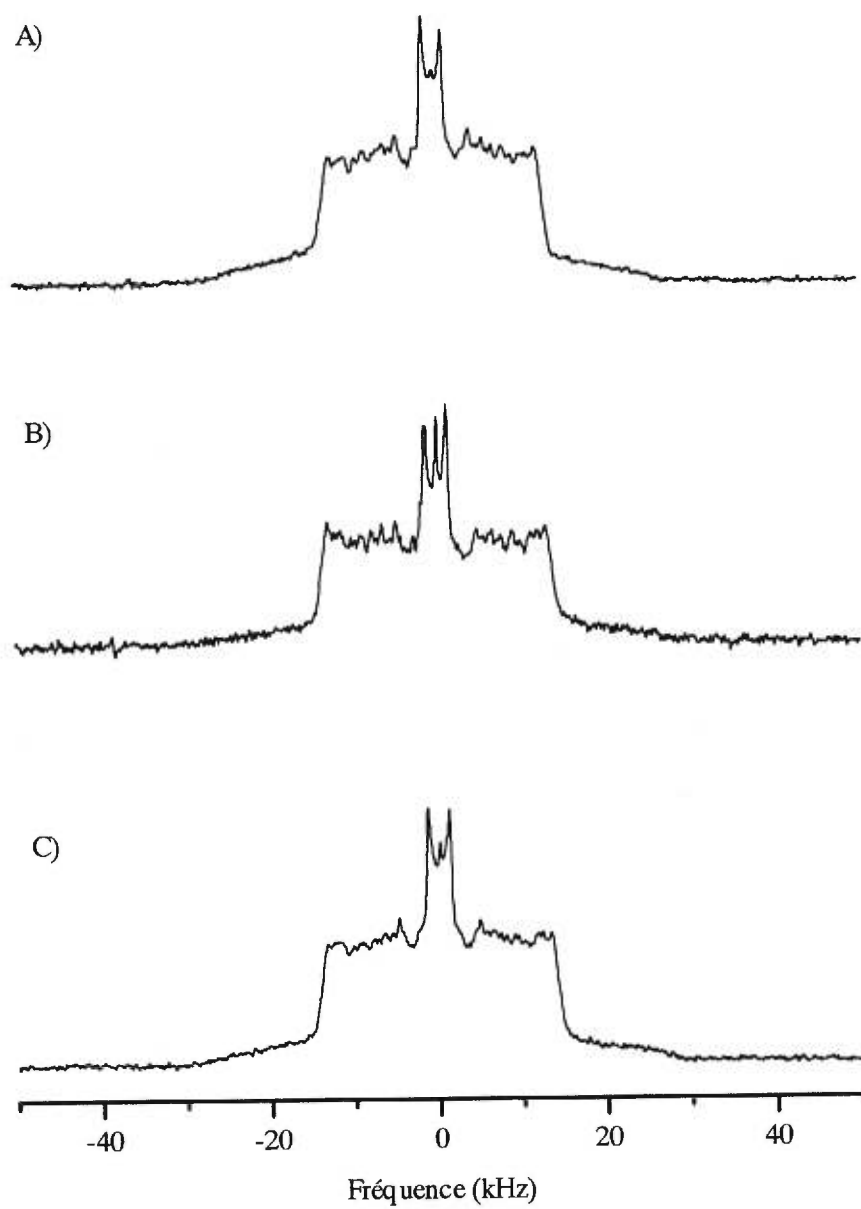


Figure 6.2 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  A) de la POPC- $\text{d}_{31}$  pure et des mélanges B) POPC- $\text{d}_{31}$ :(LA) $_{12}$  (20:1) et C) POPC- $\text{d}_{31}$ :L $_{24}$  (20:1) à 30° C.

20 lipides pour un peptide, à 30° C. Pour les trois échantillons, on observe un spectre où il y a superposition des spectres de poudre des différents groupements CD<sub>2</sub> de la chaîne acyle du phospholipide, typique de la phase liquide-cristalline. En fait, toutes les températures étudiées (de 5 à 60° C) présentent des spectres à symétrie axiale typiques de la phase liquide-cristalline (la T<sub>m</sub> de la POPC pure est de -2° C (Wiedmann et al., 1993)). En présence des deux peptides, on remarque une augmentation des éclatements quadrupolaires par rapport à ceux du lipide pur. Par exemple, l'éclatement du doublet associé au plateau du profil d'ordre passe de 24,4 kHz pour la POPC-d<sub>31</sub> pure à 25,9 et 26,6 kHz pour ce lipide en présence du peptide (LA)<sub>12</sub> et L<sub>24</sub>, respectivement.

Nous présentons, à la figure 6.3, les profils d'ordre pour la POPC-d<sub>31</sub> pure et les deux mélanges POPC-d<sub>31</sub>/peptide à 15° C (Figure 6.3A) et 30° C (Figure 6.3B). On remarque à ces deux températures une augmentation des S<sub>C-D</sub>(n) de la POPC-d<sub>31</sub> en présence des deux peptides par rapport à ceux du lipide pur. Cette augmentation est visible pour toutes les positions de la chaîne acyle, sauf pour le CD<sub>3</sub> terminal. Cette augmentation du S<sub>C-D</sub>(n) de la POPC-d<sub>31</sub> avec l'ajout du peptide L<sub>24</sub> pour ces positions est du même ordre que remarqué par Nezil et Bloom (1992), à 25° C, pour la même concentration en peptide.

Nous avons ensuite étudié l'effet de ces peptides sur la DPPC-d<sub>62</sub>. Tout d'abord, la T<sub>m</sub> de la DPPC-d<sub>62</sub> en présence des peptides a été déterminée par spectroscopie IR (Figure 6.4). La T<sub>m</sub> de la DPPC-d<sub>62</sub> pur est de 38,5° C. L'ajout du peptide (LA)<sub>12</sub> diminue la T<sub>m</sub> du lipide à 33,7° C et la transition est légèrement moins abrupte. De plus, on remarque une faible augmentation de la fréquence de ν<sub>C-D</sub> aux T>T<sub>m</sub>. Les changements de transition sont similaires à ceux obtenus par Zhang et al. (1995b). En effet, la T<sub>m</sub> est diminuée d'environ 5° C en présence du peptide (elle passe de 41° C pour le lipide pur non deutéré à 36,2° C pour le mélange DPPC:(LA)<sub>12</sub> (20:1)). L'amplitude de la transition est aussi diminuée, l'enthalpie passant de 8,3 à 4,6 kcal/mol (Zhang et al., 1995b). L'ajout du peptide L<sub>24</sub> à la DPPC-d<sub>62</sub> diminue, quant à lui, la T<sub>m</sub> du lipide à 37,0° C. La transition de phase est également moins abrupte (Figure 6.4).



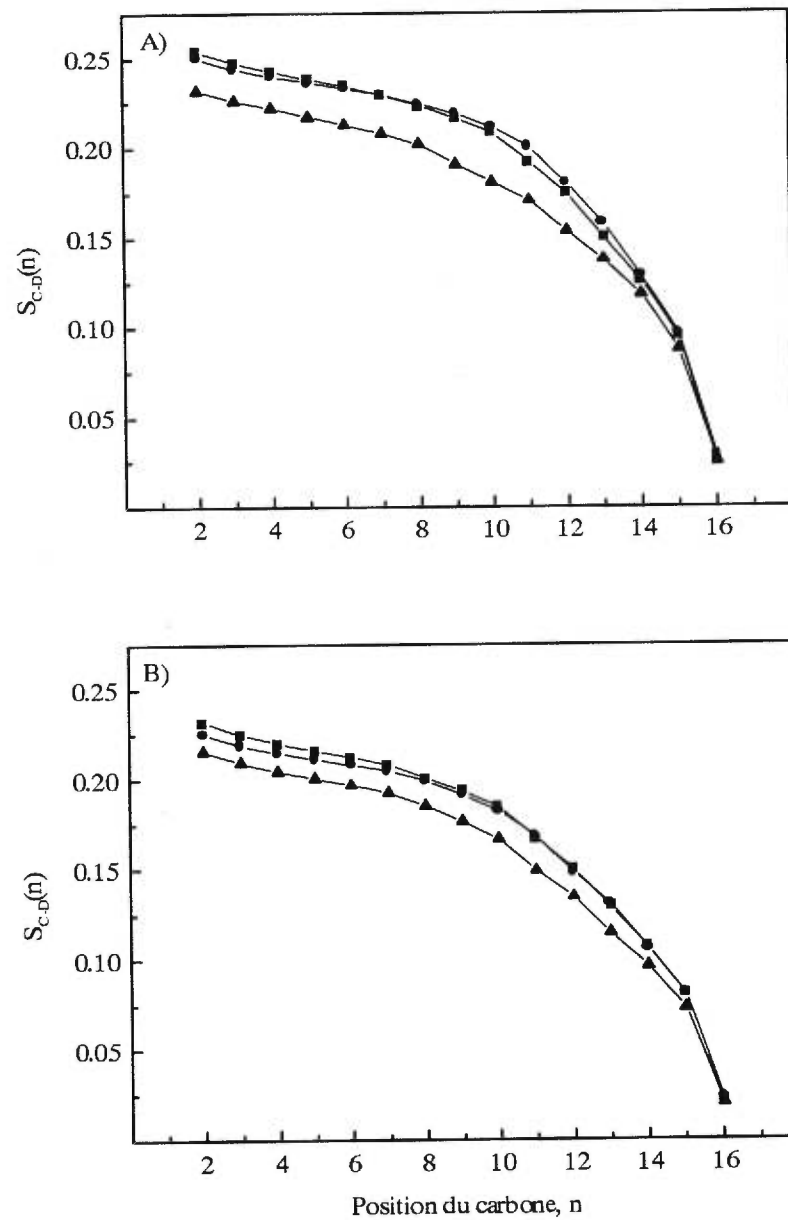


Figure 6.3 Profil d'ordre lissé obtenu pour la POPC-d<sub>31</sub> pure (▲) et pour les mélanges POPC-d<sub>31</sub>:(LA)<sub>12</sub> (20:1) (●) et POPC-d<sub>31</sub>:L<sub>24</sub> (20:1) (■) à A) 15° C et B) 30° C.

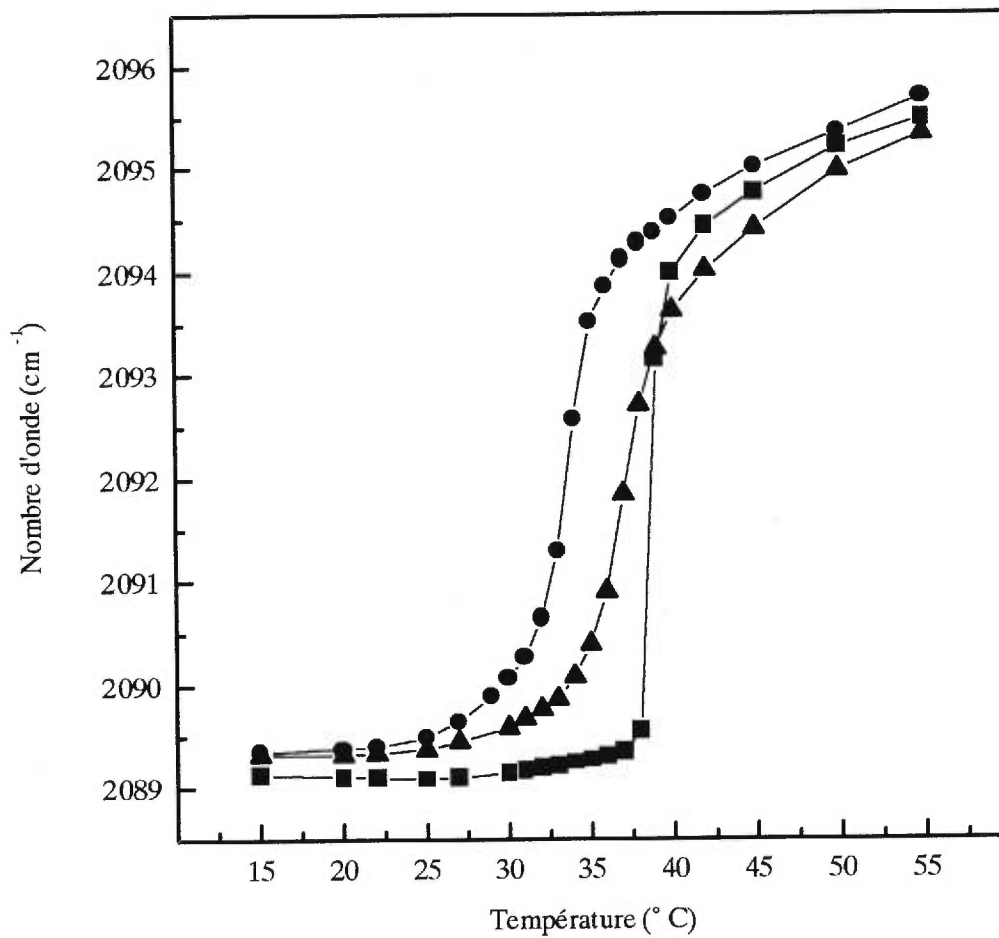


Figure 6.4 Variation de la fréquence de  $\nu_{C-D}$  avec la température pour la DPPC- $d_{62}$  pure (■) et les mélanges DPPC- $d_{62}$ :(LA) $_{12}$  (20:1) (●) et DPPC- $d_{62}$ :L $_{24}$  (20:1) (▲).

L'effet du peptide sur la fréquence de la bande aux  $T > T_m$  est très faible, avec une légère diminution par rapport à celle du lipide pur. Plusieurs études ont été réalisées sur le mélange DPPC/peptide  $L_{24}$ . Les résultats obtenus de ces différentes études diffèrent légèrement à cause de la concentration du peptide qui est différente. Pour le lipide deutéré, certains auteurs ont obtenu par DSC une  $T_m$  de  $35,8^\circ\text{C}$  pour le mélange DPPC- $d_{62}$ : $L_{24}$  (44:1) (Davis et al., 1983). Les mêmes auteurs ont obtenu, par la même technique, une  $T_m$  d'environ  $35^\circ\text{C}$  pour le mélange DPPC- $d_{62}$ : $L_{24}$  (31:1) (Morrow et al., 1985). Finalement, certaines mesures effectuées par AED et IR sur le mélange DPPC: $L_{24}$  (20:1) montrent aussi une diminution de la  $T_m$ , d'environ  $2^\circ\text{C}$  (la  $T_m$  passe de  $41^\circ\text{C}$  pour le lipide pur à  $38,7^\circ\text{C}$  pour le mélange) (Zhang et al., 1992b). La variation de  $T_m$  est légèrement plus importante que ce que nous avons observé. Pour le système DPPC: $L_{24}$  (20:1), certains auteurs ont noté une diminution de l'enthalpie de la transition, qui passe de  $8,3\text{ kcal/mol}$  pour le lipide pur à  $7,2\text{ kcal/mol}$  pour le mélange (Zhang et al., 1992b). De plus, ces auteurs ont observé une légère augmentation de fréquence de la bande  $\nu_{\text{C-H}}$  pour le mélange DPPC: $L_{24}$  à des  $T > T_m$ , mais aucune variation pour le mélange DPPC- $d_{62}$ : $L_{24}$  par l'étude de la bande  $\nu_{\text{C-D}}$ .

Les deux mélanges DPPC- $d_{62}$ /peptide ont aussi été étudiés par RMN du  $^2\text{H}$ . On présente à la figure 6.5 les spectres de la DPPC- $d_{62}$  pure et de la DPPC- $d_{62}$  en présence des deux peptides à différentes températures. En accord avec ce qui a été observé par spectroscopie IR, on note une diminution de la  $T_m$ . Ce phénomène peut être remarqué à  $35^\circ\text{C}$ , où on note que les spectres sont presque exclusivement représentatifs de la phase liquide-cristalline pour les mélanges DPPC- $d_{62}$ /peptide, alors que la DPPC- $d_{62}$  pure présente toujours un spectre exclusivement typique de la phase gel. Huschilt et al. (1985) ont observé le même genre de spectres; à  $35^\circ\text{C}$ , le mélange DPPC- $d_{62}$ : $L_{24}$  (31:1) montre l'apparition de signaux caractéristiques de la phase liquide-cristalline, alors que le lipide pur, à cette température, est en phase gel.

À  $50^\circ\text{C}$ , alors que la DPPC- $d_{62}$  pure et la DPPC- $d_{62}$  en présence des deux peptides sont en phase liquide-cristalline, on observe, comme dans le cas des mélanges avec la POPC- $d_{31}$ , une augmentation de la largeur du spectre RMN en présence des

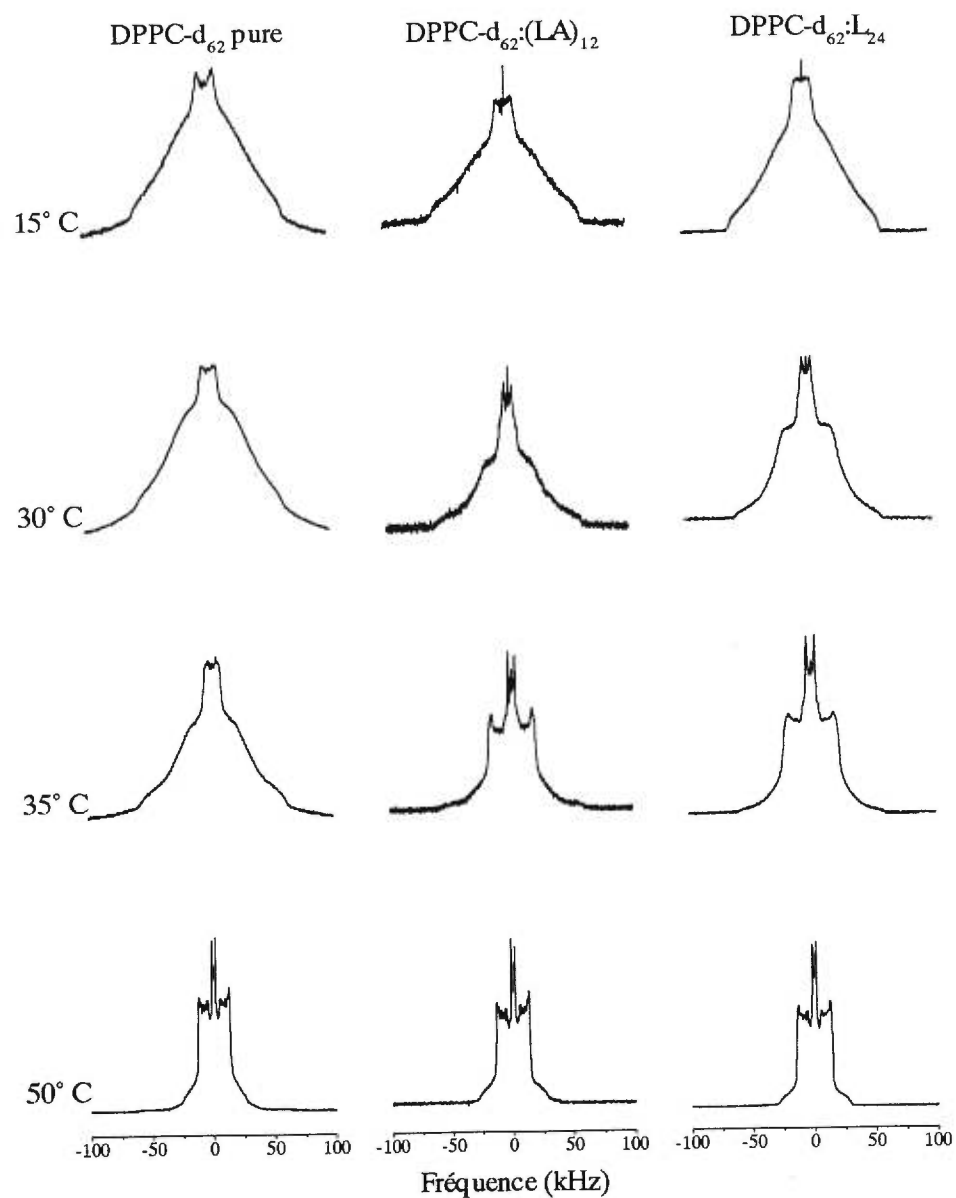


Figure 6.5 Spectres RMN du  $^2\text{H}$  de la DPPC- $\text{d}_{62}$  pure et des mélanges DPPC- $\text{d}_{62}$ :(LA) $_{12}$  (20:1) et DPPC- $\text{d}_{62}$ :L $_{24}$  (20:1), enregistrés à différentes températures (tel qu'indiqué pour chaque ligne).

peptides par rapport à la largeur du spectre du lipide pur. On remarque, en effet, un éclatement quadrupolaire au plateau de 24,6 kHz pour le lipide pur et de 26,3 et 27,2 kHz pour le lipide en présence du peptide (LA)<sub>12</sub> et L<sub>24</sub>, respectivement. Cette augmentation de l'éclatement quadrupolaire du lipide en présence du peptide L<sub>24</sub> par rapport à celui du lipide pur a déjà été remarquée pour le même mélange à des concentrations semblables par une augmentation du premier moment (Huschilt et al., 1985). Nous avons représenté à la figure 6.6 le profil d'ordre à deux températures différentes, 50° C (Figure 6.6A) et 60° C (Figure 6.6B) pour la DPPC-d<sub>62</sub> seule et en présence des deux peptides. Nous remarquons, comme dans le cas de la POPC-d<sub>31</sub> en présence des peptides, que la présence des peptides augmente l'ordre orientationnel des chaînes acyles de la DPPC-d<sub>62</sub>. Il semble cependant que le peptide L<sub>24</sub> augmente légèrement plus les paramètres d'ordre des chaînes de la DPPC-d<sub>62</sub> que le peptide (LA)<sub>12</sub> aux deux températures étudiées.

Pour résumer l'effet des deux peptides sur la POPC-d<sub>31</sub> et la DPPC-d<sub>62</sub>, nous avons représenté le paramètre d'ordre moyen,  $\langle S_{C-D} \rangle$ , en fonction de la température pour la POPC-d<sub>31</sub> pure et en présence des deux peptides (Figure 6.7A) et pour la DPPC-d<sub>62</sub> avec et sans peptide (Figure 6.7B). La présence des peptides implique une augmentation de l'ordre orientationnel des chaînes acyles et cette augmentation est environ la même pour les deux lipides. Dans le cas de la POPC-d<sub>31</sub>, les deux peptides semblent avoir le même effet sur l'ordre orientationnel des chaînes acyles. Il y a cependant une différence à 5° C, où nous avons noté une diminution du  $\langle S_{C-D} \rangle$  en présence des peptides. Nous attribuons cette différence au fait que cette température est près de la T<sub>m</sub> du lipide pur, ce qui conduit à quelques déviations. L'augmentation de l'ordre orientationnel moyen de la DPPC-d<sub>62</sub> semble un peu plus prononcée pour le mélange de la DPPC-d<sub>62</sub> avec le peptide L<sub>24</sub> que pour celui avec le peptide (LA)<sub>12</sub>.

Nous avons finalement voulu vérifier si des variations locales du paramètre d'ordre pouvaient être remarquées en présence des peptides, variations qui ne sont pas nécessairement apparentes sur le profil d'ordre lissé. Par exemple, la présence des groupements leucines dans le peptide (LA)<sub>12</sub> pourrait avoir un effet local sur certains

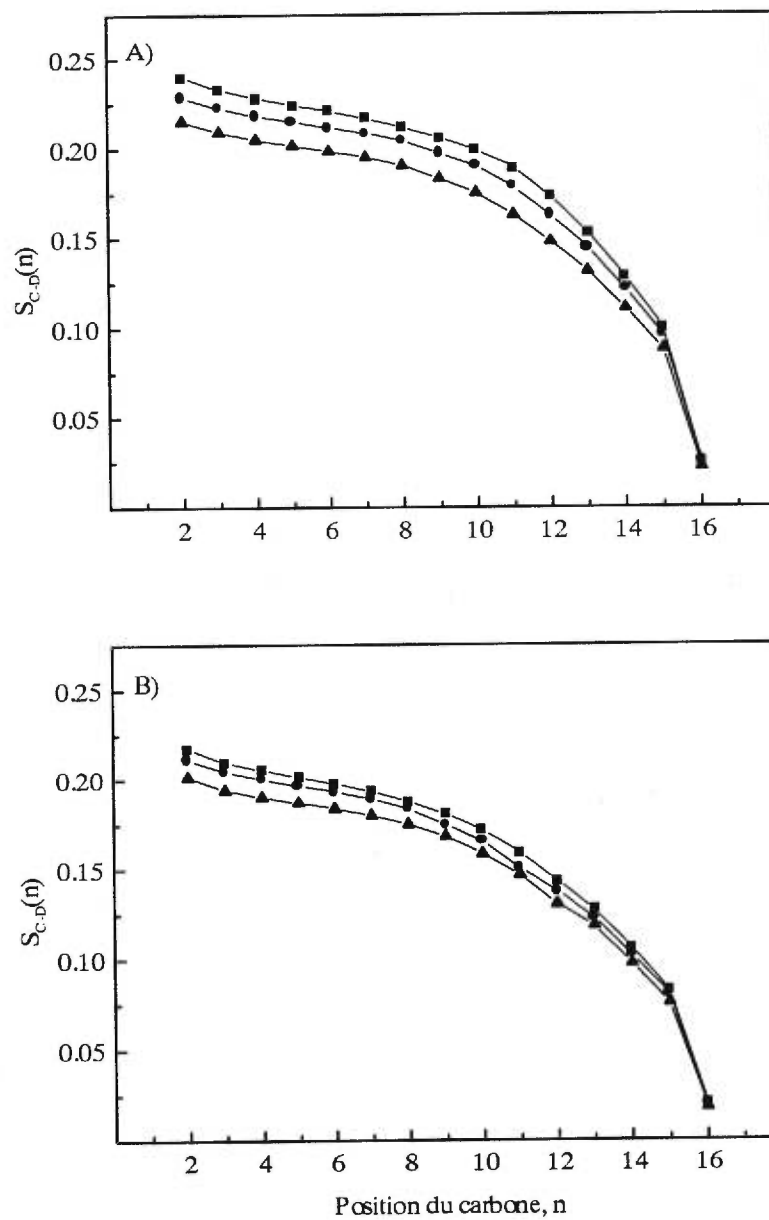


Figure 6.6 Profil d'ordre lissé pour la DPPC-d<sub>62</sub> pure (▲) et les mélanges DPPC-d<sub>62</sub>:(LA)<sub>12</sub> (20:1) (●) et DPPC-d<sub>62</sub>:L<sub>24</sub> (20:1) (■) à A) 50° C et B) 60° C.

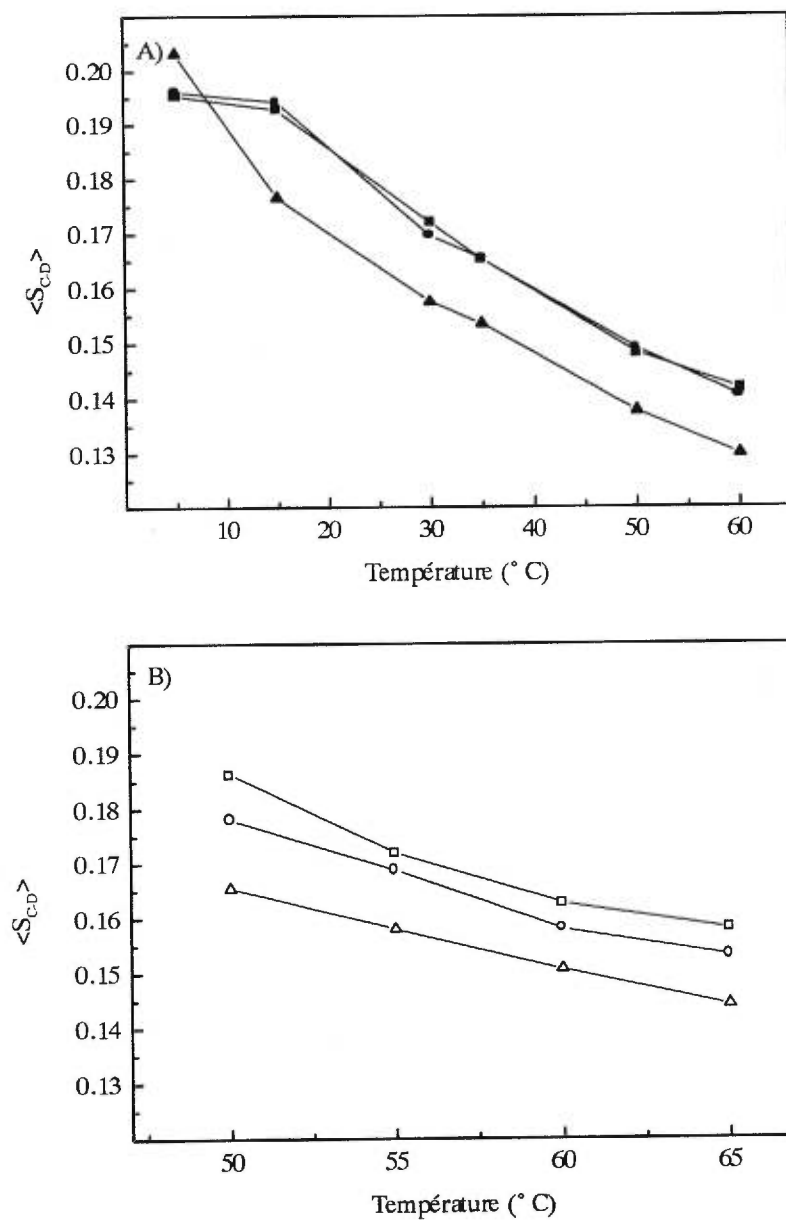


Figure 6.7 Paramètre d'ordre moyen,  $\langle S_{C-D} \rangle$ , en fonction de la température pour A) la POPC-d<sub>31</sub> pure (▲) et les mélanges POPC-d<sub>31</sub>:(LA)<sub>12</sub> (20:1) (●) et POPC-d<sub>31</sub>:L<sub>24</sub> (20:1) (■) et B) la DPPC-d<sub>62</sub> pure (Δ) et les mélanges DPPC-d<sub>62</sub>:(LA)<sub>12</sub> (20:1) (○) et DPPC-d<sub>62</sub>:L<sub>24</sub> (20:1) (□).

groupements  $CD_2$  particuliers sur la chaîne. Nous avons, pour ce faire, mesuré les éclatements quadrupolaires des pics résolus sur le spectre de Paké (en excluant le pic large correspondant au plateau). L'attribution des différents éclatements quadrupolaires est basée sur la littérature (Seelig et Seelig, 1974). À partir de ces éclatements quadrupolaires, nous avons mesuré le paramètre d'ordre de ces différentes positions pour les deux phospholipides purs ( $S_{PC}$ ) et pour les mélanges phospholipide:(LA) $_{12}$  et phospholipide:L $_{24}$  ( $S_{PEP-PC}$ ). Nous avons rapporté la différence absolue des paramètres d'ordre pour les peptides (LA) $_{12}$  (Figure 6.8) et L $_{24}$  (Figure 6.9). Nous observons une diminution de l'écart entre ces deux paramètres d'ordre à mesure qu'on s'approche du bout de la chaîne du lipide. Cette variation est observée aussi bien pour L $_{24}$  que pour (LA) $_{12}$ . Une diminution quasi-monotone est observée dans les deux cas.

### 6.3 Discussion

La présence des deux peptides ordonne les chaînes acyles des deux phospholipides et ce tout le long de la chaîne (sauf pour le groupement  $CD_3$  terminal). Cet effet a déjà été remarqué par RMN du  $^2H$  pour la POPC- $d_{31}$  (Nezil et Bloom, 1992) et pour la DPPC- $d_{62}$  (Davis et al., 1983; Huschilt et al., 1985) en présence du peptide L $_{24}$ . Cette rigidification des chaînes acyles des phospholipides en présence des peptides peut s'expliquer par une non-concordance des segments hydrophobes du peptide et du lipide. La section hydrophobe des peptides est de 31-32 Å, alors que l'épaisseur hydrophobe de la DPPC- $d_{62}$  est de 26,3 Å en phase liquide-cristalline (Zhang et al., 1992b; Zhang et al., 1995b) et celle de la POPC- $d_{31}$  est de 25,8 Å (Nezil et Bloom, 1992). Les chaînes des lipides s'adaptent donc à la section hydrophobe plus longue du peptide en se rigidifiant, ce qui va dans le sens de la théorie du matelas développée par Mouritsen et Bloom (1984). Étant donné que l'effet des deux peptides est à peu près le même sur les deux phospholipides étudiés, il ne semble donc pas y avoir d'effet des chaînes latérales plus volumineuses et donc pas d'effet important de la topologie. Ceci vient confirmer la théorie développée par Bloom (1979) selon laquelle la surface des protéines est malléable et fluide et s'adapte à la fluidité de la membrane.



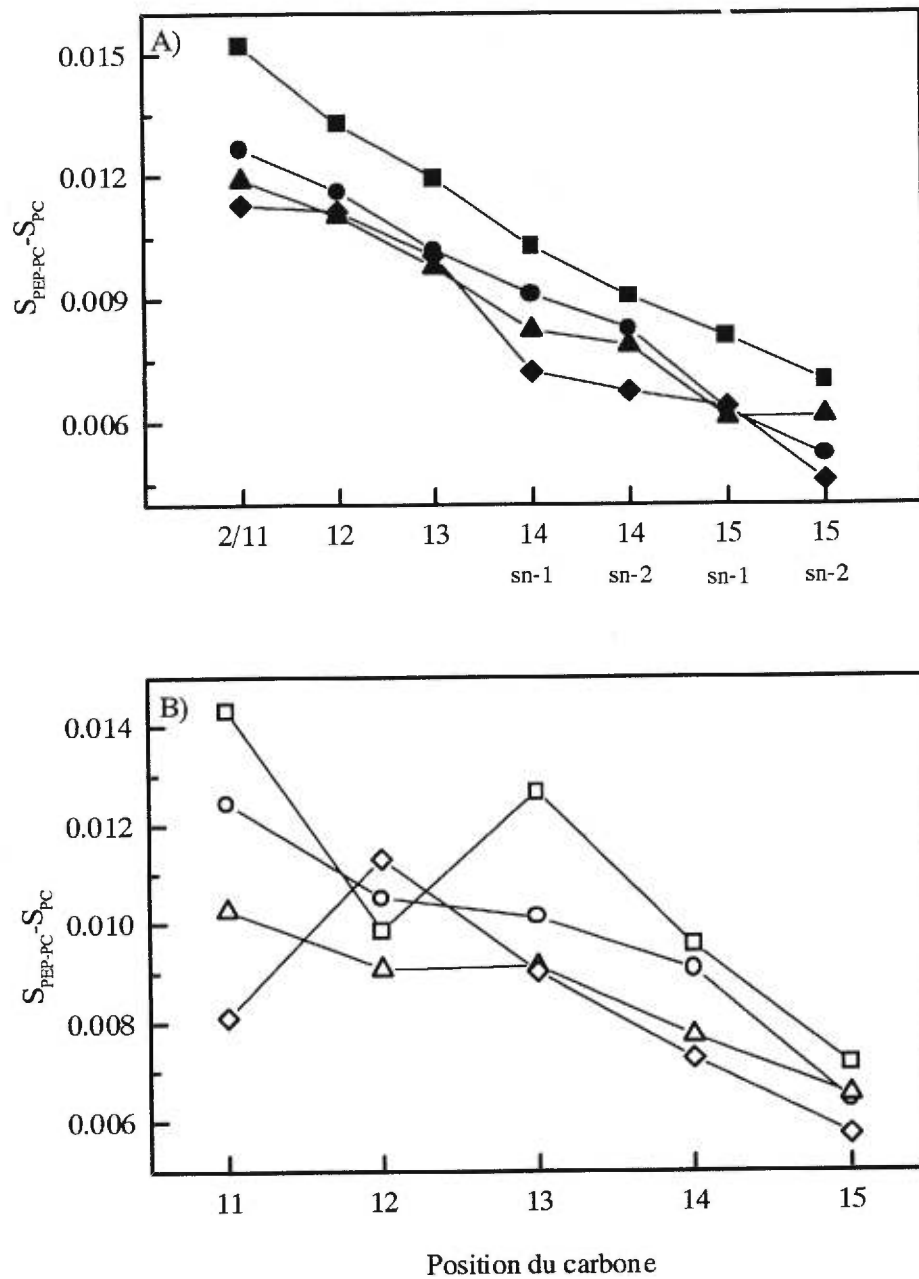


Figure 6.8 Différence absolue des paramètres d'ordre déterminés selon les pics résolus du phospholipide en présence du peptide  $(LA)_{12}$  ( $S_{PEP-PC}$ ) et du phospholipide pur ( $S_{PC}$ ) A) pour la DPPC- $d_{62}$  à 50° C (■), 55° C (●), 60° C (▲) et 65° C (◆) et B) pour la POPC- $d_{31}$  à 15° C (□), 30° C (○), 35° C (Δ) et 50° C (◇).

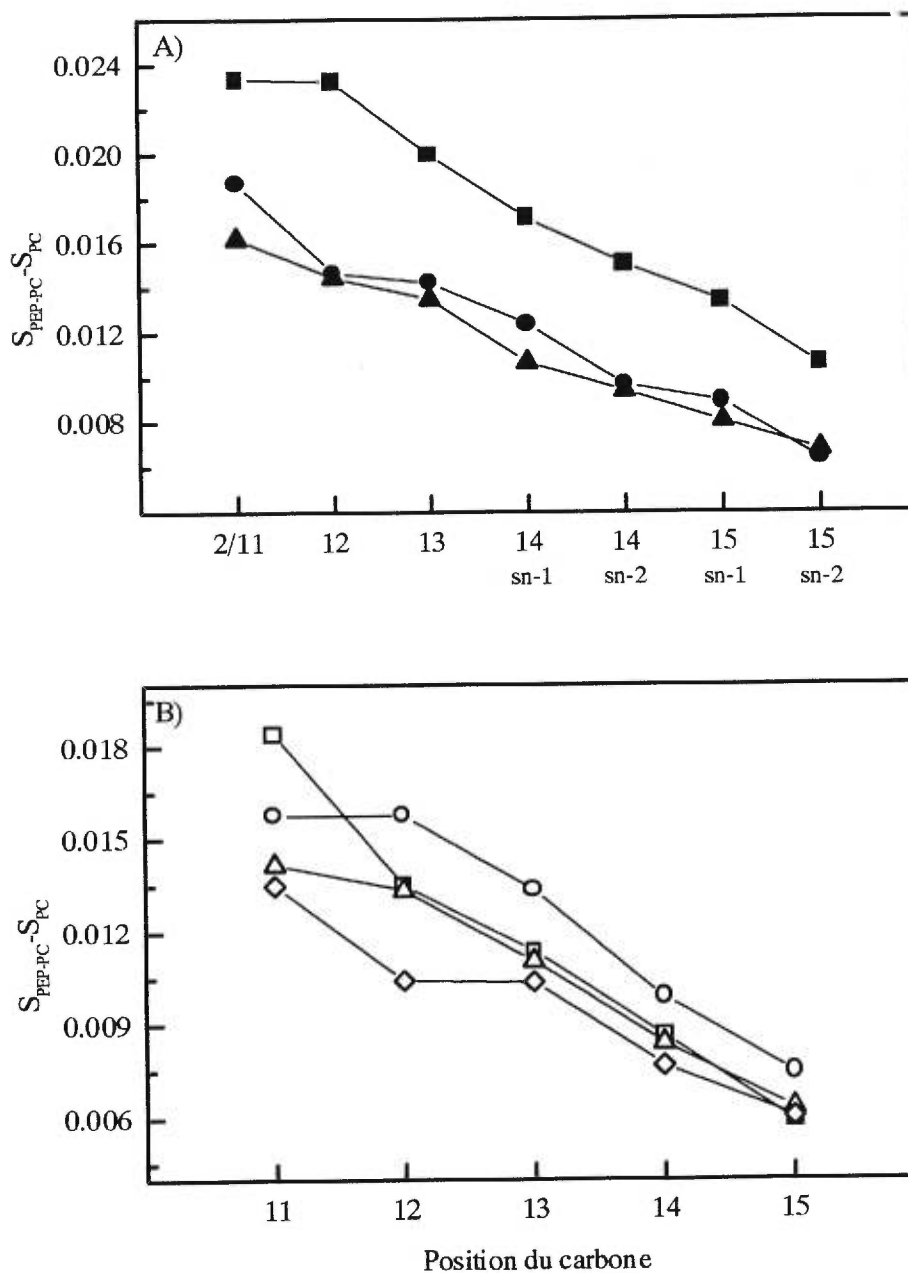


Figure 6.9 Différence absolue des paramètres d'ordre déterminés selon les pics résolus du phospholipide en présence du peptide L<sub>24</sub> ( $S_{PEP-PC}$ ) et du phospholipide pur ( $S_{PC}$ ) A) pour la DPPC-d<sub>62</sub> à 50° C (■), 55° C (●) et 60° C (▲) et B) pour la POPC-d<sub>31</sub> à 15° C (□), 30° C (○), 35° C (Δ) et 50° C (◇).

À des  $T > T_m$ , on note, par IR, de légers changements de la position de la bande  $\nu_{C-D}$  de la DPPC- $d_{62}$  en présence des peptides par rapport à celle du lipide pur (Figure 6.2). Dans le cas du peptide  $(LA)_{12}$ , la légère augmentation de la fréquence, aussi observée lors d'une autre étude IR sur un mélange DPPC: $(LA)_{12}$  (Zhang et al., 1995b), pourrait être interprétée par une augmentation du désordre conformationnel des chaînes, ce qui va à l'encontre des résultats RMN que nous avons obtenus. Pour le mélange formé de DPPC- $d_{62}$  et du peptide  $L_{24}$ , nos résultats indiquent une légère diminution de la fréquence de la bande  $\nu_{C-D}$  à des  $T > T_m$ . Une autre étude IR réalisée sur ce système a montré une légère augmentation de la fréquence  $\nu_{C-H}$  ( $\Delta\nu \approx 0,2 \text{ cm}^{-1}$ ), tandis qu'aucun changement de  $\nu_{C-D}$  n'a été observé lorsque le phospholipide était deutéré (Zhang et al., 1992b). Le changement de fréquence observé par IR n'est pas seulement attribuable à l'isomérisation *trans/gauche*, mais d'autres phénomènes comme le couplage vibrationnel intermoléculaire et les mouvements de librotorsion des chaînes peuvent aussi influencer la fréquence de  $\nu_{C-D}$  et  $\nu_{C-H}$  (Kodati et al., 1994). Ces phénomènes peuvent être influencés par l'insertion de peptides et l'interprétation moléculaire du déplacement de la bande d'élongation des groupements méthylènes doit être faite avec circonspection. Pour ces raisons, il nous semble que la variation de l'ordre orientationnel des chaînes du phospholipide tel qu'étudié par RMN du  $^2\text{H}$  est plus fiable. Les résultats RMN montrent que l'interprétation des données IR basée exclusivement en terme d'ordre conformationnel est incorrecte. La présente étude, mettant en parallèle les mesures IR et RMN sur les mêmes systèmes, constitue donc une sérieuse mise en garde quant à l'interprétation des petits changements de fréquence des modes de vibration des groupements méthylènes.

Les peptides déplacent la transition de la phase gel à liquide-cristalline de la DPPC- $d_{62}$  vers les basses températures et il y a diminution de la coopérativité de la transition. Une diminution de la  $T_m$  et une transition moins abrupte de la DPPC a déjà été remarquée en présence des deux peptides (Davis et al., 1983; Huschilt et al., 1985; Morrow et al., 1985; Zhang et al., 1992b; Zhang et al., 1995b). Le peptide  $(LA)_{12}$  déplace un peu plus la  $T_m$  de la DPPC- $d_{62}$  (de  $5^\circ \text{C}$ ) vers les basses températures que le peptide  $L_{24}$  (de  $2^\circ \text{C}$ ). Cette différence pourrait être associée à la surface plus rugueuse

du peptide alterné (LA)<sub>12</sub> qui est moins bien accommodée dans la bicouche en phase gel. Parallèlement, un examen plus minutieux des profils d'ordre des deux phospholipides en présence des deux peptides suggère un effet de rigidification légèrement différent pour les deux peptides dans la membrane composée de DPPC-d<sub>62</sub>. En effet, le profil d'ordre (Figure 6.6) et le paramètre d'ordre moyen (Figure 6.7B) suggèrent que la présence du peptide polyleucine ordonne un petit peu plus les chaînes acyles que le peptide (LA)<sub>12</sub>. Cet effet de second ordre serait encore moins significatif si la chaîne inclut une insaturation comme dans le cas de la POPC-d<sub>31</sub>. Ainsi, bien que la concordance de la section hydrophobe dicte l'effet du peptide, la topologie pourrait jouer un effet mineur sur les transition de phase gel à liquide-cristalline et sur l'ordre des chaînes acyles du phospholipide. La soustraction des paramètres d'ordre mesurés directement sur le spectre pour les lipides purs (S<sub>PC</sub>) et pour les lipides en présence des peptides (S<sub>PEP-PC</sub>) (Figures 6.8 et 6.9) n'indiquent pas d'effet local particulier.

#### 6.4 Conclusion

L'étude des deux phospholipides DPPC-d<sub>62</sub> et POPC-d<sub>31</sub> en présence des peptides (LA)<sub>12</sub> et L<sub>24</sub> a permis de montrer que les deux peptides ordonnent les chaînes acyles des deux phospholipides. Cet effet montre que la concordance entre les sections hydrophobes du lipide et du peptide est le paramètre crucial définissant l'effet du peptide sous forme d'hélice- $\alpha$  sur l'ordre des chaînes acyles du lipide. La topologie du peptide joue plutôt un rôle secondaire en influençant le déplacement de la T<sub>m</sub> du lipide et en modifiant légèrement l'ordre orientationnel des chaînes lipidiques de la DPPC-d<sub>62</sub>.

## CHAPITRE 7

### CONCLUSION ET TRAVAUX FUTURS

Nous avons montré dans cette thèse que la formation de la phase liquide-ordonnée n'est pas un trait particulier des PC, mais plutôt une caractéristique générale des lipides en présence de cholestérol. Les propriétés de la phase *l<sub>o</sub>* formée par les différents mélanges étudiés (incluant ceux avec l'acide gras) sont toutes à peu près les mêmes. Basé sur cette généralisation, on peut conclure que cette phase est vraiment représentative des membranes plasmiques de mammifères.

Il serait maintenant intéressant d'étudier comment la formation de la phase *l<sub>o</sub>* dans des matrices de PA et de cholestérol est modulée par le pH. Ce nouveau système pourrait être un vecteur intéressant pour l'encapsulation (de médicaments, par exemple) peu dispendieux et sensible au pH.

Nous montrons également que l'analyse des tranches proton associées au cholestérol des spectres WISE permet de différencier le cholestérol cristallin du cholestérol solubilisé dans la membrane dans deux échantillons différents. Cette technique devrait être examinée de façon plus intensive. Les changements, au niveau de la forme des bandes, que nous avons remarqués dans les spectres <sup>13</sup>C-CP/MAS lorsque le cholestérol était cristallin, solubilisé ou lorsqu'il y avait coexistence de ces deux formes, devront également être examinés plus longuement, puisque cette technique, plus simple, pourrait être intéressante pour, qualitativement, déterminer l'état du cholestérol dans un échantillon et, quantitativement, la proportion de chacune des formes du cholestérol.

La formation de cochléates, que nous avons induite par l'ajout d'ions Ca<sup>2+</sup> à des vésicules de DPPS-d<sub>62</sub>, a montré une rigidification des chaînes acyles de la DPPS-d<sub>62</sub> importante dans cet arrangement. De plus, les spectres RMN à haute température ont montré la présence du signal caractéristique de la phase H<sub>II</sub>. Il est donc possible qu'il y

ait une transition de phase des cochléates vers une phase hexagonale dans ce genre de système. Ce type de transition devra être examiné plus attentivement.

La préparation des échantillons est critique, nous l'avons constaté avec les mélanges de DPPS et de cholestérol. Il sera donc nécessaire, dans l'avenir, d'utiliser une méthode telle que décrite par Huang et al. (1999) qui permette l'élimination des solvants sans séparation de phase, pour éliminer les artefacts possibles.

Finalement, la présence de peptides transmembranaires ( $L_{24}$  et  $(LA)_{12}$ ) dans des membranes de PC (POPC- $d_{31}$  et DPPC- $d_{62}$ ) rigidifie les chaînes acyles du lipide (sans jamais toutefois induire la phase *lo*). Cet effet de rigidification des chaînes acyles des lipides est une conséquence directe de la non-concordance des segments hydrophobes du peptide et du lipide.

## RÉFÉRENCES

- Albert, A. D., J. E. Young, et P. L. Yeagle. 1996. *Biochim. Biophys. Acta.* 1285:47-55.
- Alivisatos, S. G. A., C. Papastavrou, E. Drouka-Liapati, A. P. Molyvdas, et G. Nikitopoulou. 1977. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 79:677-683.
- Akutsu, H., M. Ikematsu, et Y. Kyogoku. 1981. *Chem. Phys. Lipids.* 28:149-158.
- Bach, D. 1984. *Chem. Phys. Lipids.* 35:385-392.
- Bach, D., N. Borochoy, et E. Wachtel. 1998. *Chem. Phys. Lipids.* 92:71-77.
- Bach, D., et I. R. Miller. 1998. *Biochim. Biophys. Acta.* 1368:216-224.
- Bach, D., et E. Wachtel. 1989. *Biochim. Biophys. Acta.* 979:11-19.
- Bach, D., E. Wachtel, N. Borochoy, G. Senisterra, et R. M. Epand. 1992. *Chem. Phys. Lipids.* 63:105-113.
- Bloch, K. E. 1983. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 14:47-92.
- Bloom, M. 1979. *Can. J. Phys.* 57:2227-2230.
- Bloom, M., E. Evans, et O. G. Mouritsen. 1991. *Q. Rev. Biophys.* 24:293-397.
- Blume, A. 1980. *Biochemistry.* 19:4908-4913.
- Blume, A., et R. G. Griffin. 1982. *Biochemistry.* 21:6230-6242.
- Blume, A., W. Hübner, et G. Messner. 1988. *Biochemistry.* 27:8239-8249.

Bothorel, P., et C. Lussan. 1968. *C. R. Acad. Sc. Paris*. 266:2492-2494.

Brown, M. F., et J. Seelig. 1978. *Biochemistry*. 17:381-384.

Browning, J. L., et J. Seelig. 1980. *Biochemistry*. 19:1262-1270.

Bretscher, M. S., et S. Munro. 1993. *Science*. 261:1280-1281.

Cameron, D. G., H. L. Casal, E. F. Gudgin, et H. H. Mantsch. 1980. *Biochim. Biophys. Acta*. 596:463-467.

Castresana, J., J.-L. Nieva, E. Rivas, et A. Alonso. 1992. *Biochem. J.* 282:467-470.

Cheetham, J. J., E. Wachtel, D. Bach, et R. M. Epand. 1989. *Biochemistry*. 28:8928-8934.

Chen, S. C., J. M. Sturtevant, et B. J. Gaffney. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77:5060-5063.

Chin, Y.-H., et S. Kaplan. 1994. *Magn. Reson. Chem.* 32:S53-S60.

Church, S. E., D. J. Griffiths, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, et H. H. Wickman. 1986. *Biophys. J.* 49:597-605.

Cistola, D. P., J. A. Hamilton, D. Jackson, et D. M. Small. 1988. *Biochemistry*. 27:1881-1888.

Clauss, J., K. Schmidt-Rohr, A. Adam, C. Boeffel, et H. W. Spiess. 1992. *Macromolecules*. 25:5208-5214.

Copeland, B. R., et H. M. McConnel. 1980. *Biochim. Biophys. Acta*. 599:95-109.



Cortijq, M., et D. Chapman. 1981. *FEBS Lett.* 131:245-248.

Cevc, G., A. Watts, et D. Marsh. 1981. *Biochemistry.* 20:4955-4965.

Darke, A., E. G. Finer, A. G. Flook, et M. C. Phillips. 1972. *J. Mol. Biol.* 63:265-279.

Davis, J. H. 1983. *Biochim. Biophys. Acta.* 737:117-171.

Davis, J. H., D. M. Clare, R. S. Hodges, et M. Bloom. 1983. *Biochemistry.* 22:5298-5305.

Demel, R. A., et B. De Kruffyff. 1976. *Biochim. Biophys. Acta.* 457:109-132.

Dluhy, R. A., D. G. Cameron, H. H. Mantsch, et R. Mendelsohn. 1983. *Biochemistry.* 22:6318-6325.

Douliez, J.-P., A. Léonard, et E. J. Dufourc. 1995. *Biophys. J.* 68:1727-1739.

Douliez, J.-P., A. Léonard, et E. J. Dufourc. 1996. *J. Phys. Chem.* 100:18450-18457.

Dufourc, E. J., E. J. Parish, S. Chitrakorn, et I. C. P. Smith. 1984. *Biochemistry.* 23:6062-6071.

Dufourc, E. J., I. C. P. Smith, et H. C. Jarrell. 1983. *Chem. Phys. Lipids.* 33:153-177.

Elias, P. M. 1990. Dans Topical drug delivery formulations, D. W. Osborne et A. H. Amann Éditeurs, pp 13-28.

Engel, A. K., et Cowburn, D. 1981. *FEBS Lett.* 126:169-171.

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

- Fenske, D. B., J. L. Thewalt, M. Bloom, et N. Kitson. 1994. *Biophys. J.* 67:1562-1573.
- Flach, C. R., et R. Mendelsohn. 1993. *Biophys. J.* 64:1113-1121.
- Forbes, J., J. Bowers, X. Shan, L. Moran, E. Oldfield, et M. A. Moscarello. 1988. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1.* 84:3821-3849.
- Ghosh, R., et J. Seelig. 1982. *Biochim. Biophys. Acta.* 691:151-160.
- Gómez-Fernández, J. C., et J. Villalaín. 1998. *Chem. Phys. Lipids.* 96:41-52.
- Gruner, S. M. 1989. *J. Phys. Chem.* 93:7562-7570.
- Guo, W., et J. A. Hamilton. 1996. *Biophys. J.* 71:2857-2868.
- Hsiao, C. Y. Y., C. A. Ottaway, et D. B. Wetlaufer. 1974. *Lipids.* 9:913-915.
- Huang, J., J. T. Buboltz, et G. W. Feigenson. 1999. *Biochim. Biophys. Acta.* 1417:89-100.
- Huang, T.-H., C. W. B. Lee, S. K. Das Gupta, A. Blume, et R. G. Griffin. 1993. *Biochemistry.* 32:13277-13287.
- Hübner, W., H. H. Mantsch, F. Paltauf, et H. Hauser. 1994. *Biochemistry.* 33:320-326.
- Huschilt, J. C., R. S. Hodges, et J. H. Davis. 1985. *Biochemistry.* 24:1377-1386.
- Huschilt, J. C., B. M. Millman, et J. H. Davis. 1989. *Biochim. Biophys. Acta.* 979:139-141.
- Ipsen, J. H., G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, et M. J. Zuckermann. 1987. *Biochim. Biophys. Acta.* 905:162-172.

Ipsen, J. H., O. G. Mouritsen, et M. Bloom. 1990. *Biophys. J.* 57:405-412.

Israelachvili, J. N., D. J. Mitchell, et B. W. Ninham. 1976. *J. Chem. Soc. Faraday Trans II.* 72:1525-1568.

Jendrasiak, G. L., et J. H. Hasty. 1974. *Biochim. Biophys. Acta.* 337:79-91.

Killian, J. A. 1998. *Biochim. Biophys. Acta.* 1376:401-416.

Kitson, N., J. Thewalt, M. Lafleur, et M. Bloom. 1994. *Biochemistry.* 33:6707-6715.

Kodati, V. R., R. El-Jastimi, et M. Lafleur. 1994. *J. Phys. Chem.* 98:12191-12197.

Kodati, V. R., et M. Lafleur. 1993. *Biophys. J.* 64:163-170.

Koynova, R., B. G. Tenchov, S. Todinova, et P. J. Quinn. 1995. *Biophys. J.* 68:2370-2375.

Lafleur, M. 1998. *Can. J. Chem.* 76:1501-1511.

Lafleur, M., M. Bloom, E. F. Eikenberry, S. M. Gruner, Y. Han, et P. R. Cullis. 1996. *Biophys. J.* 70:2747-2757.

Lafleur, M., P. R. Cullis, et M. Bloom. 1990a. *Eur. Biophys. J.* 19:55-62.

Lafleur, M., P. R. Cullis, B. Fine, et M. Bloom. 1990b. *Biochemistry.* 29:8325-8333.

Lafleur, M., B. Fine, E. Sternin, P. R. Cullis, et M. Bloom. 1989. *Biophys. J.* 56:1037-1041.

Lagüe, P. 1996. Mémoire de maîtrise. Département de biophysique. Université du Québec à Trois-Rivières.

Le Guernevé, C., et M. Auger. 1995. *Biophys. J.* 68:1952-1959.

Lewis, R. N. A. H., N. Mak, et R. N. McElhaney. 1987. *Biochemistry.* 26:6118-6126.

Lewis, R. N. A. H., et R. N. McElhaney. 1990. *Biochemistry.* 29:7946-7953.

Lewis, R. N. A. H., et R. N. McElhaney. 1992. *Biophys. J.* 61:63-77.

Lewis, R. N. A. H., et R. N. McElhaney. 1993. *Biophys. J.* 64:1081-1096.

Lewis, R. N. A. H., R. N. McElhaney, W. Pohle, et H. H. Mantsch. 1994. *Biophys. J.* 67:2367-2375.

Lewis, R. N. A. H., W. Pohle, et R. N. McElhaney. 1996. *Biophys. J.* 70:2736-2746.

Lieckfeldt, R., J. Villalaín, J.-C. Gómez-Fernández, et G. Lee. 1994. *Colloids Surf.* 90:225-234.

Linseisen, F. M., J. L. Thewalt, M. Bloom, et T. M. Bayerl. 1993. *Chem. Phys. Lipids.* 65:141-149.

Lindblom, G., L. B.-Å. Johansson, et G. Arvidson. 1981. *Biochemistry.* 20:2204-2207.

Lundberg, B., E. Svens, et S. Ekman. 1978. *Chem. Phys. Lipids.* 22:285-292.

MacPhail, R. A., H. L. Strauss, R. G. Snyder, et C. A. Ellinger. 1984. *J. Phys. Chem.* 88:334-341.

Mantsch, H. H., S. C. Hsi, K. W. Butler, et D. G. Cameron. 1983. *Biochim. Biophys. Acta* 728:325-330.

- Mantsch, H. H., A. Martin, et D. G. Cameron. 1981. *Biochemistry*. 20:3138-3145.
- Mantsch, H. H., et R. N. McElhaney. 1991. *Chem. Phys. Lipids*. 57:213-226.
- Marinov, R., et E. J. Dufourc. 1995. *J. Chim. Phys.* 92:1727-1731.
- Marinov, R., et E. J. Dufourc. 1996. *Eur. Biophys. J.* 24:423-431.
- Marieb, E. N., et G. Laurendeau. 1993. Anatomie et Physiologie Humaines, Éditions du Renouveau Pédagogique, Québec, p. 65.
- Marsan, M. P., I. Muller, C. Ramos, F. Rodriguez, E. J. Dufourc, J. Czaplicki, et A. Milon. 1999. *Biophys. J.* 76:351-359.
- Marsh, D. 1990. Handbook of Lipid Bilayers, CRC Press, Boca Raton, Floride.
- McMullen, T. P. W., et R. N. McElhaney. 1995. *Biochim. Biophys. Acta*. 1234:90-98.
- McMullen, T. P. W., et R. N. McElhaney. 1997. *Biochemistry*. 36:4979-4986.
- Meier, P., E. Ohmes, et G. Kothe. 1986. *J. Chem. Phys.* 85:3598-3614.
- Meraldi, J. P., et J. Schlitter. 1981. *Biochim. Biophys. Acta*. 645:193-210.
- Monck, M. A., M. Bloom, M. Lafleur, R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, et P. R. Cullis. 1993. *Biochemistry*. 32:3081-3088.
- Morrow, M. R., J. C. Huschilt, et J. H. Davis. 1985. *Biochemistry*. 24:5396-5406.
- Morrow, M. R., R. Srinivasan, et N. Grandal. 1991. *Chem. Phys. Lipids*. 58:63-72.

Mouritsen, O. G., et M. Bloom. 1984. *Biophys. J.* 46:141-153.

Mulukutla, S., et G. G. Shipley. 1984. *Biochemistry.* 23:2514-2519.

Nagle, J. F., et D. A. Wilkinson. 1982. *Biochemistry.* 21:3817-3821.

Needham, D., et R. S. Nunn. 1990. *Biophys. J.* 58:997-1009.

Needham, D., T. J. McIntosh, et E. Evans. 1988. *Biochemistry.* 27:4668-4673.

Nezil, F. A., et M. Bloom. 1992. *Biophys. J.* 61:1176-1183.

Öhman, H., et A. Vahlquist. 1994. *Acta. Derm. Venereol.* 74:375-379.

Op Den Kamp, J. A. F., M. T. H. Kauerz, et L. L. M. Van Deenen. 1975. *Biochim. Biophys. Acta.* 406:169-177.

Papahadjopoulos, D., W. J. Vail, K. Jacobson, et G. Poste. 1975. *Biochim. Biophys. Acta.* 394:483-491.

Perly B., I. C. P. Smith, et H. C. Jarrell. 1985. *Biochemistry.* 24:1055-1063.

Pézolet M., B. Boulé, et D. Bourque. 1983. *Rev. Sci. Instrum.* 54:1364-1367.

Rawn, J. D. Traité de biochimie, Éditions du Renouveau Pédagogique, 1989, 1146 p.

Reddy, S., P. Desai, A. S. Abhiraman, H. W. Beckham, A. S. Kulik, et H. W. Spiess. 1997. *Macromolecules.* 30:3293-3301.

Rehfeld, S. J., M. L. Williams, et P. M. Elias. 1986. *Arch. Dermatol. Res.* 278:259-263.

Reinl, H., T. Brumm, et T. M. Bayerl. 1992. *Biophys. J.* 61:1025-1035.

Reven, L., et L. Dickinson. 1998. *Thin Films.* 24:149-178.

Rilfors, L., G. Lindblom, Å. Wieslander, et A. Christiansson. 1984. Dans Biomembranes, vol. 12., M. Kates, et L. A. Manson, Éditeurs. Plenum Press, New York et London, pp. 205-245.

Roux, M. et M. Bloom. 1991. *Biophys. J.* 60:38-44.

Rubenstein, J. L. R., B. A. Smith, et H. M. McConnell. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:15-18.

Ruocco, M. J., et G. G. Shipley. 1982. *Biochim. Biophys. Acta.* 684:59-66.

Salgado, J., J. Villalaín, et J.-C. Gómez-Fernández. 1995. *Biochim. Biophys. Acta.* 1239:213-225.

Salmon, A., S. W. Dodd, G. D. Williams, J. M. Beach, et M. F. Brown. 1987. *J. Am. Chem. Soc.* 109:2600-2609.

Schmidt-Rohr, K., J. Clauss, et H. W. Spiess. 1992. *Macromolecules.* 25:3273-3277.

Seddon, J. M., G. Cevc, R. D. Kaye, et D. Marsh. 1984. *Biochemistry.* 23:2634-2644.

Seddon, J. M., K. Harlos, et D. Marsh. 1983. *J. Biol Chem.* 258:3850-3854.

Seelig, A., et J. Seelig. 1974. *Biochemistry.* 23:4839-4845.

Seelig, A. et Seelig, J. 1975. *Biochim. Biophys. Acta.* 406:1-5.

- Sen, A., P. W. Yang, H. H. Mantsch, et S.-W. Hui. 1988. *Chem. Phys. Lipids*. 47:109-116.
- Silvestri, R. L., et J. L. Koenig. 1995. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 259:101-113.
- Silvius, J. R. 1991. *Chem. Phys. Lipids*. 57:241-252.
- Silvius, J. R., P. M. Brown, et T. J. O'Leary. 1986. *Biochemistry*. 25:4249-4258.
- Singer, S. J., et G. L. Nicholson. 1972. *Science*. 175:720-731.
- Slater, J. L., et C. Huang. 1987. *Biophys. J.* 52:667-670.
- Small, D. M. 1987. *Arteriosclerosis*. 8:103-129.
- Snyder, R. G., M. C. Goh, V. J. P. Srivatsavoy, H. L. Strauss, et D. L. Dorset. 1992. *J. Phys. Chem.* 96:10008-10019.
- Snyder, R. G., H. L. Strauss, et D. A. Cates. 1995. *J. Phys. Chem.* 99:8432-8439.
- Sternin, E., M. Bloom, et A. L. MacKay. 1983. *J. Magn. Reson.* 55:274-282.
- Takahashi, H., H. Aoki, M. Kodama, et I. Hatta. 1997. *Chem. Phys. Lipids*. 89:83-89.
- Takahashi, H., H. Aoki, H. Inoue, M. Kodama, et I. Hatta. 1997b. *Thermochim. Acta*. 303:93-99.
- Takahashi, H., K. Sinoda, et I. Hatta. 1996. *Biochim. Biophys. Acta*. 1289:209-216.
- Taylor, M. G., T. Akiyama, et I. C. P. Smith. 1981. *Chem. Phys. Lipids*. 29:327-339.
- Ter-Minassian-Saraga, L., et G. Madelmont. 1982. *FEBS Lett.* 137:137-140.



Thewalt, J. L., et M. Bloom. 1992. *Biophys. J.* 63:1176-1181.

Thurmond, R. L., G. Lindblom, et M. F. Brown. 1990. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173:1231-1238.

Thurmond, R. L., S. W. Dodd, et M. F. Brown. 1991. *Biophys. J.* 59:108-113.

Umemura, J., D. G. Cameron, et H. H. Mantsch. 1980. *Biochim. Biophys. Acta.* 602:32-44.

Urbina, J. A., B. Moreno, W. Arnold, C. H. Taron, P. Orlean, et E. Oldfield. 1998. *Biophys. J.* 75:1372-1383.

Urbina, J. A., S. Pekerar, H-b. Le, J. Patterson, B. Montez, et E. Oldfield. 1995. *Biochim. Biophys. Acta.* 1238:163-176.

Verkleij, A. J., J. Leunissen-Bijvelt, B. de Kruijff, M. Hope, et P. R. Cullis. 1984. Dans Cell function (Ciba Foundation Symposium; 103), Pitman Publishing Ltd., pp. 45-59.

Vist, M. R., et J. H. Davis. 1990. *Biochemistry.* 29:451-464.

Wachtel, E. J., et D. Bach. 1987. *Biochim. Biophys. Acta.* 922:234-238.

Wiedmann, T., A. Salmon, et V. Wong. 1993. *Biochim. Biophys. Acta.* 1167:114-120.

Wilkinson, D. A., et J. F. Nagle. 1984. *Biochemistry.* 23:1538-1541.

Wong, P. T. T., et H. H. Mantsch. 1988. *Chem. Phys. Lipids.* 46:213-224.

Zhang, Y-P., R. N. A. H. Lewis, R. S. Hodges, et R. N. McElhaney. 1992a. *Biochemistry.* 31:11572-11578.

Zhang, Y-P., R. N. A. H. Lewis, R. S. Hodges, et R. N. McElhaney. 1992b. *Biochemistry*. 31:11579-11588.

Zhang, Y-P., R. N. A. H. Lewis, G. D. Henry, B. D. Sykes, R. S. Hodges, et R. N. McElhaney. 1995a. *Biochemistry*. 34:2348-2361.

Zhang, Y-P., R. N. A. H. Lewis, R. S. Hodges, et R. N. McElhaney. 1995b. *Biochemistry*. 34:2362-2371.