

Université de Montréal

Cinétique d'association de la mélittine aux membranes lipidiques

Par

Iren Constantinescu

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

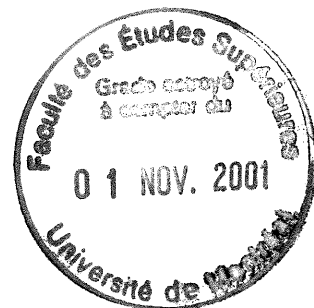
Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M. Sc.)

en chimie

Août 2001



©Iren Constantinescu, 2001

QD

3

154

2001

N. 037

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Cinétique d'association de la mélittine aux membranes lipidiques

présenté par:

Iren Constantinescu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Gilles Durocher	président-rapporteur
Michel Lafleur	directeur de recherche
Thomas Ellis	membre du jury

Mémoire accepté le: _____

Sommaire

Ce travail examine l'aspect cinétique de l'interaction d'un peptide amphiphile, la mélittine, avec des membranes modèles neutres. L'effet de la présence de lipides chargés négativement et de cholestérol dans la bicouche a aussi été étudié. Deux méthodes en spectroscopie de fluorescence nous ont permis d'examiner de façon indépendante les mécanismes d'association et d'insertion tandis que la structuration du peptide a été analysée à l'aide du dichroïsme circulaire.

Pour le système peptide/phosphatidylcholine, les trois types de cinétiques indiquent des mécanismes d'interaction en deux phases. Les temps associées à ces phases sont en général rapides : de l'ordre de la milliseconde pour la première étape et de l'ordre de la seconde pour la deuxième. En effectuant la synthèse de ces données expérimentales, il est possible d'établir la séquence dans laquelle les événements se déroulent: association, insertion et structuration en hélice α .

La présence de faibles quantités de lipides chargés négativement dans les bicouches zwitterioniques ne modifie pas la séquences des événements ni l'aspect biphasiques des cinétiques. Cependant, on peut observer une réduction des temps correspondant aux premières étapes des trois cinétiques. Cette réduction est d'autant plus importante que la proportion molaire des lipides anioniques dans la membrane est augmentée. Ceci est principalement associé aux interactions électrostatiques attractives entre le peptide et l'interface chargée négativement de la membrane.

En présence de cholestérol dans les bicouches de PC, la même séquence de phénomènes est conservée. Les trois types de cinétiques d'interaction sont différents,

les mécanismes étant dans ce cas monophasiques. Leurs temps sont comparables à ceux associés aux premières phases des systèmes sans le stérol bien que légèrement plus rapides. Il est proposé que l'empilement plus compact des chaînes des lipides empêche la pénétration profonde de la mélittine dans la membrane.

Mots clés: mélittine, phospholipides, cholestérol, cinétique d'interaction, fluorescence, extinction, dichroïsme circulaire

Table des matières

Sommaire.....	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations	xiii
Chapitre 1: Introduction	1
1.1 La mélistine	1
1.2 Lipides et membranes lipidiques.....	4
1.3 Interaction mélistine/membrane	10
1.4 Fluorescence du tryptophane.....	15
1.5 Extinction de la fluorescence par les lipides bromés	17
1.6 Dichroïsme circulaire	18
Chapitre 2: Matériel et méthodes.....	20
2.1 Provenance des produits.....	20
2.2 Purification de la mélistine	20
2.3 Influence de la polarité du milieu sur la fluorescence du tryptophane de la mélistine	23

2.4	Extinction de la fluorescence du tryptophane de la mélittine par les lipides bromés	26
2.5	Interaction peptide/membrane par dichroïsme circulaire	28
2.6	Détermination de la concentration de phosphore	31
Chapitre 3:	Résultats	33
3.1	Correction pour la fluorescence du tryptophane en présence de vésicules	33
3.2	Variation de la fluorescence du tryptophane de la mélittine en fonction de la polarité du milieu	39
3.3	Extinction de la fluorescence du tryptophane de la mélittine par le brome.....	54
3.4	Changements conformationnels lors d'interaction mélittine/membranes analysés par DC	66
Chapitre 4:	Discussion.....	78
4.1	Système mélittine/POPC.....	78
4.2	Système Mélittine/POPC-POPG.....	89
4.3	Système mélittine/POPC-Cholestérol	96
Chapitre 5:	Conclusion.....	103
Références	105
Remerciements	111

Liste des tableaux

Tableau 2.1:	Gradient d'élution pour la mélittine	22
Tableau 3.1:	Facteur f_{df} pour diverses préparations lipidiques	35
Tableau 3.2:	Les paramètres cinétiques d'association de la mélittine avec la POPC en présence ou en absence de POPG, en fonction du changement de la polarité environnementale du tryptophane	46
Tableau 3.3:	Les paramètres cinétiques d'association de la mélittine avec la POPC en présence de cholestérol	51
Tableau 3.4:	Paramètres cinétiques d'insertion de la mélittine dans des membranes de POPC/Br ₂ PC, (85/15) en présence ou en absence de 3% (mol) de POPG.....	62
Tableau 3.5:	Paramètres cinétiques d'insertion de la mélittine dans des membranes de POPC/Br ₂ PC, (85/15) en présence de 30% (mol) de cholestérol	65
Tableau 3.6:	Les valeurs d'ellipticité molaire et d'hélice α pour le peptide seul ou associé aux membranes	69
Tableau 3.7:	Paramètres cinétiques d'enroulement en hélices α de la mélittine en présence de membranes zwitterioniques avec ou sans charges négatives.....	74
Tableau 3.8:	Paramètres cinétiques d'enroulement en hélices α de la mélittine en présence de membranes zwitterioniques avec cholestérol	75
Tableau 4.1:	Paramètres cinétiques d'interaction mélittine/POPC, Ri 90	84

Tableau 4.2:	Paramètres cinétiques d'association mélattine/(POPC avec 3% (mol) POPG), (RI 90).....	93
Tableau 4.3:	Comparaison des résultats des expériences à l'équilibre avec et sans cholestérol.	98
Tableau 4.4:	Paramètres cinétiques d'interaction mélattine/POPC/Cholestérol, (70/30).....	100

Liste des figures

Figure 1.1:	Structure primaire de la mélittine.....	3
Figure 1.2:	Arrangement des monomères de mélittine dans le tétramère cristallin.....	3
Figure 1.3:	Structures des glycérophospholipides et du cholestérol.....	5
Figure 1.4:	Modèle d'une membrane biologique.....	8
Figure 1.5:	Profil de la barrière hydrophobe d'une bicouche hydratée de DSPC.....	9
Figure 1.6:	Orientation de la mélittine dans une bicouche de phosphatidylcholine.	12
Figure 1.7:	a) Structure convexe d'une bicouche zwitterionique en présence de mélittine. b) Structure concave (type II) d'une bicouche chargée négativement en présence de mélittine.....	14
Figure 2.1:	Le chromatogramme pour l'analyse HPLC de la mélittine purifiée	22
Figure 2.2:	Courbe d'étalonnage typique pour le test de phosphore	32
Figure 3.1:	Spectres de fluorescence du tryptophane libre et en présence de la POPC avec le blanc approprié soustrait	34
Figure 3.2:	Spectres de fluorescence du tryptophane de la mélittine libre, en présence de la POPC, non-corrigé et corrigé.....	37

Figure 3.3:	Traces cinétiques de fluorescence du tryptophane libre et en présence de la POPC corrigés avec le blanc approprié.	38
Figure 3.4:	Spectres de fluorescence de la mélittine libre et en présence de la POPC.....	40
Figure 3.5:	Spectres de fluorescence de la mélittine libre et en présence de POPC avec 30% (mol) cholestérol.....	42
Figure 3.6:	Spectres de fluorescence de la mélittine libre, en présence de POPC avec 3% (mol) POPG et avec 15% (mol) POPG	43
Figure 3.7:	La variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour la mélittine libre et en présence de la POPC.....	45
Figure 3.8:	L'influence de la charge négative dans la bichouche pour la cinétique d'association mélittine/lipide zwitterionique	48
Figure 3.9:	La variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour la mélittine libre et en présence de POPC/cholestérol (70/30)	51
Figure 3.10:	L'effet du RI et du cholestérol dans la bichouche pour la cinétique d'association mélittine/lipide zwitterionique.....	53
Figure 3.11:	Spectres de fluorescence pour la mélittine en présence de POPC avec et sans 15% (mol) lipides bromés	56
Figure 3.12:	Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de POPC avec et sans le 6,7Br ₂ PC.....	57

Figure 3.13:	Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de POPC avec et sans le 9,10Br ₂ PC.....	59
Figure 3.14:	Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de LUV de POPC/POPG, (97/3) avec et sans 6,7Br ₂ PC.....	60
Figure 3.15:	Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de LUV de POPC/POPG, (97/3) avec et sans 9,10Br ₂ PC.....	61
Figure 3.16:	Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de LUV de POPC/Cholestérol, (70/30) avec et sans 6,7Br ₂ PC.....	63
Figure 3.17:	Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de LUV de POPC/Cholestérol, (70/30) avec et sans 9,10Br ₂ PC.....	64
Figure 3.18:	Spectres DC pour la mélittine libre et en présence de membranes lipidiques	68
Figure 3.19:	Cinétique d'enroulement en hélice α de la mélittine libre et en présence de la POPC	71
Figure 3.20:	Cinétique d'enroulement en hélice α de la mélittine libre et en présence de POPC/POPG, (97/3).....	72
Figure 3.21:	Effet du tampon salin sur la cinétique d'enroulement en hélice α de la mélittine en présence de POPC/POPG, (97/3).....	73

Figure 3.22:	Cinétique d'enroulement en hélice α de la méltine libre et en présence de POPC/Cholestérol, (70/30).....	76
--------------	---	----

Liste des abréviations

RI	ratio molaire lipide/peptide durant l'incubation
DC	dichroïsme circulaire
Trp ¹⁹	tryptophane en position 19 de la mélittine
C _t	carbone terminal
N _t	azote terminal
PC	phosphatidylcholine
PG	phosphatidylglycérol
PS	phosphatidylsérine
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphoglycérol
DMPC	1,2-dimyristoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
DOPC	1,2-dioléoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
DSPC	1,2-distéaroyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
6,7Br ₂ PC	1-palmitoyl-2-(6,7-dibromo)stéaroyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
9,10Br ₂ PC	1-palmitoyl-2-(9,10-dibromo)stéaroyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
MLV	vésicule multilamellaire (multilamellar vesicle)
LUV	grande vésicule unilamellaire (large unilamellar vesicle)
SUV	petite vésicule unilamellaire (small unilamellar vesicle)
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
HEPES	acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique]
TFA	acide trifluoroacétique

Chapitre 1: Introduction

Les interactions lipide-protéine contrôlent plusieurs fonctions des membranes biologiques. Son étude est essentielle pour une meilleure compréhension du lien entre la structure et la fonction de ces systèmes (1).

La présente étude porte sur la cinétique d'interaction à court temps (de l'ordre de la milliseconde à la seconde) d'un peptide modèle, la mélittine, avec les membranes. Trois techniques complémentaires ont permis d'observer les mécanismes d'association, d'insertion et d'enroulement en hélice α du peptide. La somme des informations obtenues permet d'établir la séquence dans laquelle les événements se déroulent. Par la même occasion, nous avons étudié les modulations de ces interactions induites par la présence des lipides chargés négativement et par le cholestérol dans la membrane lipidique.

1.1 La mélittine

La mélittine, la composante protéique majeure du venin d'abeille, est un court peptide basique. Elle contient 26 acides aminés dont 6 sont chargés positivement à pH physiologique (Lys^{7,21,23}, Arg^{22,24} et Gly¹), la plupart d'entre eux sont situés au bout C_t (2). La majorité des autres acides aminés ont un caractère hydrophobe prédominant et ils se retrouvent en grande partie sur le bout N_t. La structure primaire, montrée à la figure 1.1, confère au peptide un caractère amphiphile. Ceci permet à la

mélistine d'être très soluble dans l'eau et de s'associer spontanément aux membranes lipidiques naturelles ou artificielles (3). En solution aqueuse, dépendamment des conditions expérimentales (concentration, pH, force ionique, la nature du contre-ion, etc.) la mélistine peut se retrouver sous forme de monomère ou de tétramère (4). Le monomère a une structure secondaire désordonnée (5) tandis que le tétramère adopte une structure secondaire essentiellement en hélice α (6). Trois facteurs déterminent la capacité d'agrégation de la mélistine dans l'eau: les interactions entre les parties hydrophobes, la répulsion électrostatique des charges positives et l'entropie de formation d'une structure secondaire bien ordonnée. L'interaction des parties hydrophobes, isolées à l'intérieur du tétramère, favorise l'agrégation tandis que la répulsion électrostatique entre les monomères de mélistine et le facteur entropique favorisent plutôt le monomère désordonné (2). La structure cristalline de la mélistine montre que le tétramère (à l'état solide) est formé de quatre peptides en hélice α . Chacune de ces hélices est coudée à un angle obtus d'environ 120° tel que présenté à la figure 1.2. (7). L'acide aminé Pro¹⁴ induit la formation d'un coude à cause de son noyau pyrrolydone rigide et brise l'hélice α en deux parties (8). Cette structure montre une séparation spatiale des acides aminés hydrophobes et hydrophiles de l'hélice α . La majorité des résidus hydrophobes est placée du côté intérieur du coude, contribuant ainsi à l'agrégation du tétramère, tandis que la majorité des résidus hydrophiles est orientée vers l'extérieur (7). Dans les systèmes biologiques, les protéines ont souvent une structure secondaire en hélice α lors d'interaction avec les membranes (9-11). Le peptide signal qui amène les protéines aux mitochondries est composé d'acides aminés basiques et hydrophobes, ce qui lui confère un

Gly¹-Ile-Gly-Ala-Val⁵-Leu-Lys-Val-Leu-Thr¹⁰-Thr-Gly-Leu-Pro-Ala¹⁵-Leu-Ile-Ser-
 Trp-Ile²⁰-Lys-Arg-Lys-Arg-Gln²⁵-Gln-NH₂

Figure 1.1: Structure primaire de la mélittine

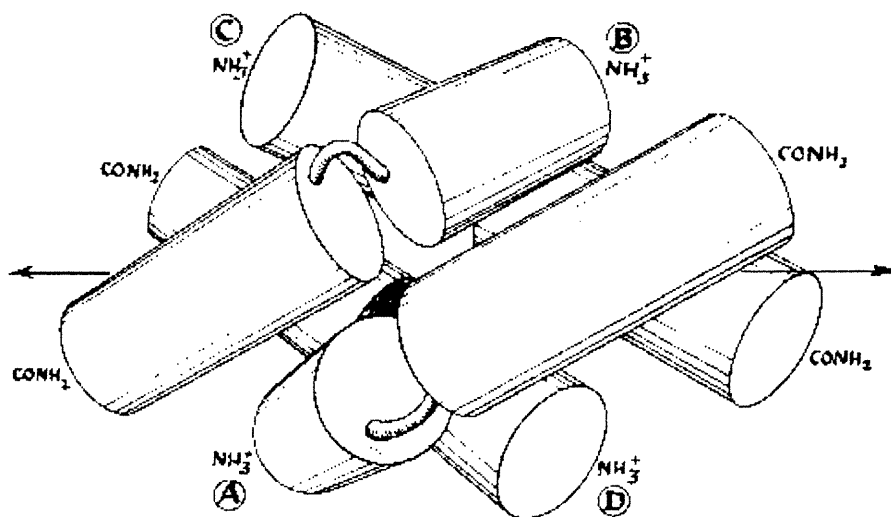


Figure 1.2: Arrangement des monomères de mélittine dans le tétramère cristallin (7).

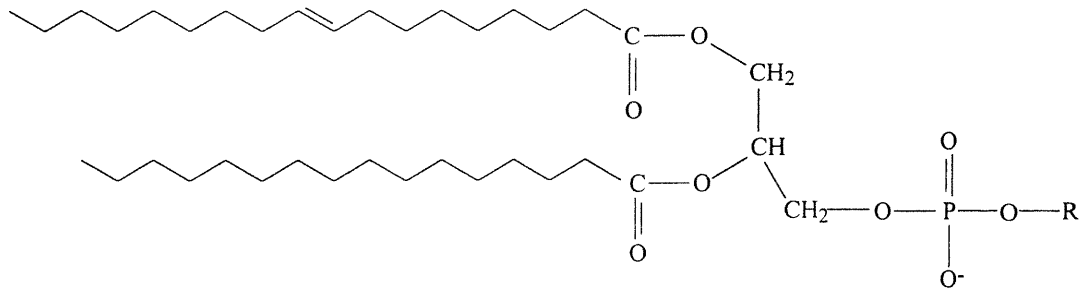
caractère amphiphile secondaire similaire à celui de la mélittine (12). Sa structure secondaire en hélice α est aussi analogue à celle de certaines protéines, telle que les apolipoprotéines, ce qui fait de la mélittine un peptide modèle intéressant.

1.2 Lipides et membranes lipidiques

Les lipides sont principalement des molécules amphipathiques, c'est-à-dire qu'ils contiennent à la fois des groupes polaires et hydrophobes. Parmi les lipides les plus abondants dans les membranes cellulaires, on trouve les phospholipides. La figure 1.3a montre leur structure. La tête polaire est constituée par le groupe phosphate et la queue hydrophobe par la partie glycérol estérifiée par deux acides gras à longue chaîne. En fonction du groupement fonctionnel greffé à la tête polaire on retrouve la phosphatidylcholine (PC), le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylsérine (PS), etc. (13). Les acides gras possèdent en général de 14 à 24 atomes de carbone et ils ont différents degrés d'insaturation. Généralement, la double liaison possède une configuration *cis*, ce qui introduit une angulation dans la queue hydrocarbonée (8).

Une autre famille de lipides qui participe aux fonctions cellulaires est celle des stéroïdes. Le cholestérol, un stéroïde, est le constituant lipidique majeur de la membrane plasmique de la cellule animale. Dans la figure 1.3b on peut observer la tête polaire (le groupe OH) et la queue hydrophobe (le noyau stéroïde rigide) du cholestérol. Cette forme spéciale a d'importantes conséquences sur la fluidité des membranes plasmiques (14).

a)



$R = \text{---CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, Phosphatidylcholine

$R = \text{---CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$, Phosphatidylglycérol

$R = \text{---CH}_2\text{CH}(\text{COO}^-)(\text{NH}_3^+)$, Phosphatidylsérine

b)

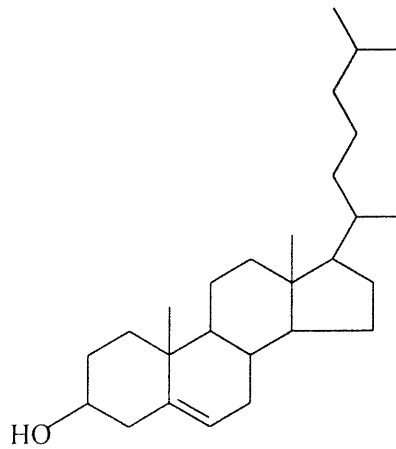


Figure 1.3: Structures des glycérophospholipides (a) et du cholestérol (b).

Les lipides amphiphiles forment spontanément différents types de structures quand ils sont dispersés dans un milieu aqueux. En fonction de la composition et la concentration des lipides et du solvant, on peut avoir une organisation en micelles, phase hexagonale (H_{II}), phase lamellaire, etc. (15). Tous ces arrangements tendent à minimiser les contacts entre les chaînes non polaires des lipides et le milieu polaire aqueux. Dans cette étude, on analyse les bicouches (structures lamellaires) car cette organisation est à la base de la membrane cellulaire.

La bicouche lipidique est une association de deux monocouches par leurs faces non-polaire, les têtes polaires étant orientées vers l'eau. Généralement, les phospholipides forment spontanément des vésicules multilamellaires (MLV) quand ils sont dispersés dans l'eau. Cet assemblage rappelle les couches superposées d'un oignon (13). À l'aide de différentes méthodes, il est possible d'obtenir des vésicules unilamellaires. Ces dernières sont souvent utilisées comme membranes modèles compte tenu de leur ressemblance avec les membranes naturelles.

On retrouve des vésicules lamellaires sous forme de petites vésicules unilamellaires (SUV) et de grandes vésicules unilamellaires (LUV). Les SUV ont un diamètre entre 25 et 40 nm et sont obtenues par sonication. Ayant une courbure prononcée, il existe une tension dans cette membrane, ce qui perturbe leurs propriétés physico-chimiques. De plus, il est difficile d'obtenir des SUV de taille homogène (15). Les LUV ont un diamètre entre 50 et 500 nm et sont obtenues par extrusion (15). Les LUV étant plus grandes ont une tension moins importante au niveau de la membrane, ce qui en fait un meilleur modèle membranaire que les

SUV. Les LUV ont aussi l'avantage d'avoir une taille plus homogène, contrôlée et reproductible.

La composition d'une membrane cellulaire naturelle est un mélange de différents types de lipides et de protéines. Leurs pourcentages peuvent varier significativement d'un type à l'autre de membrane. À titre d'exemple, les mitochondries contiennent 80% de protéines tandis que, dans les membranes plasmiques, on en retrouve environ 50%. (13,16). Le modèle proposé par Singer et Nicolson pour la structure d'une membrane biologique est montré dans la figure 1.4. Dans ce modèle, les lipides forment une matrice bidimensionnelle, la bicouche phospholipidique, dans laquelle on trouve les protéines membranaires (13). La nature complexes des membranes naturelles rend difficile l'étude de l'interaction des protéines avec celles-ci. Pour cette raison, on utilise fréquemment des membranes modèles qui ont une composition lipidique simple bien définie. On peut utiliser des membranes composés d'un seul lipide ou bien d'un mélange de deux ou de plusieurs lipides. Les phosphatidylcholines et les phosphatidylglycérols sont parmi ceux que l'on retrouve le plus souvent dans la composition des membranes biologiques (13). Avec des chaînes similaires, les deux lipides sont miscibles et peuvent être utiliser pour préparer des membranes modèle (17).

L'insertion d'une molécule à l'intérieur d'une vésicule ou de cellule est en principe dictée par les propriétés physico-chimiques de la membrane lipidique, et spécialement par sa polarité. Tel qu'on peut le voir sur la figure 1.5, la constante diélectrique (ϵ) de la bicouche de phosphatidylcholine à un profil trapézoïdal (18). Le centre de la bicouche est la région où ϵ est minimale, ceci constitue le maximum

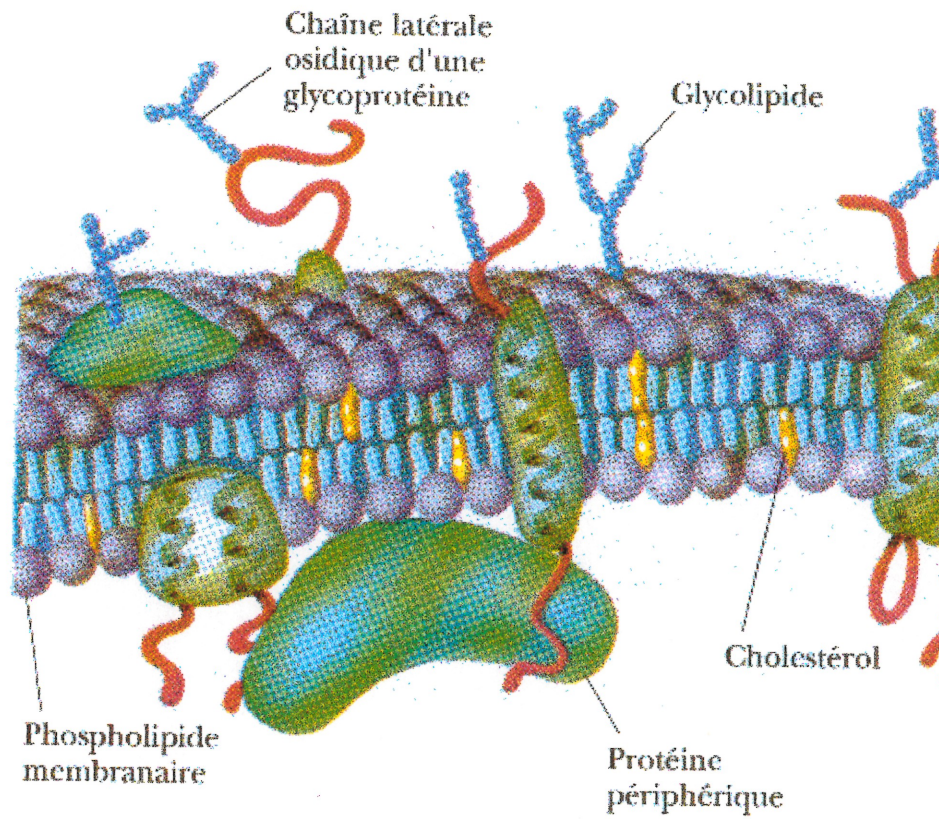


Figure 1.4: Modèle d'une membrane biologique (13).

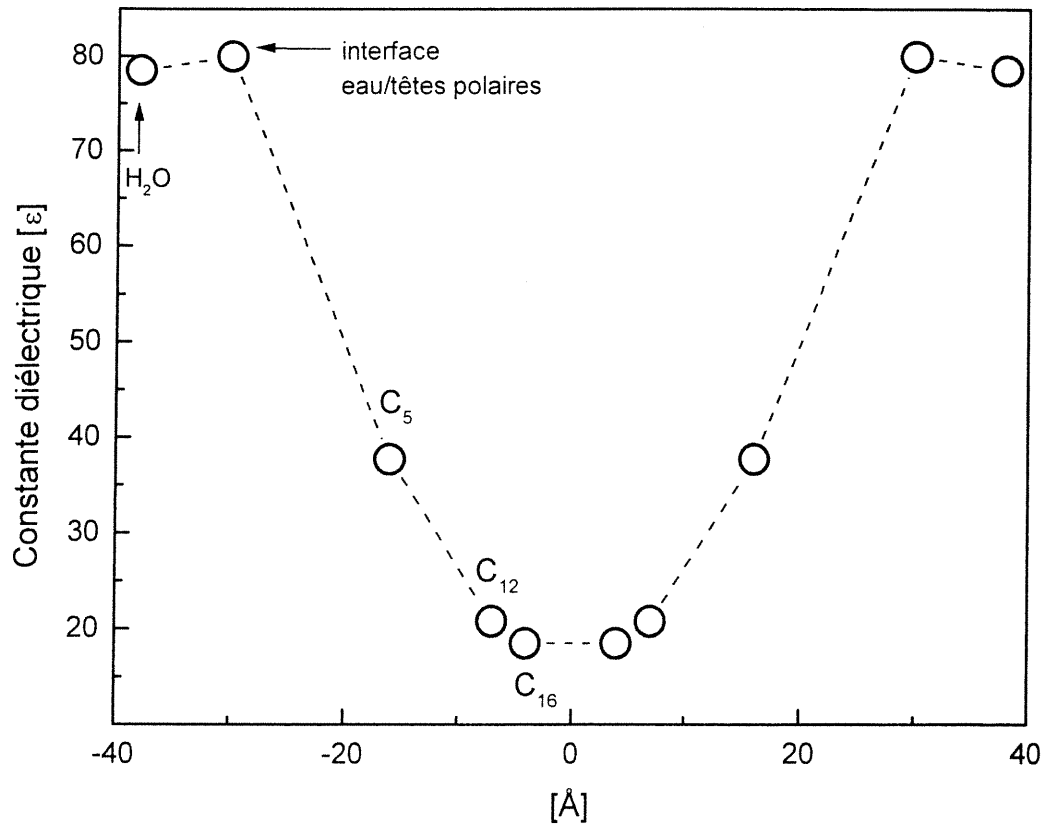


Figure 1.5: Profil de la barrière hydrophobe d'une bicouche hydratée de DSPC. Le centre géométrique de la bicouche est situé à 0 Å. Ces valeurs sont obtenues expérimentalement à partir de mesures de résonance paramagnétique électronique (RPE) sur une sonde nitroxyde greffé sur les chaînes acyles des lipides (18,19).

de la 'barrière hydrophobe'. À ce point, ϵ correspond à des valeurs voisines de celles observées pour des alcanes liquides. La largeur de la barrière hydrophobe est d'environ 40 Å pour une bicouche de distéaroyl-PC (DSPC). Près de l'interface, il y a l'insertion de molécules d'eau dans la bicouche. La courbe de polarité est utile pour comprendre la relation entre la profondeur du tryptophane de la mélittine dans les bicouches et ses propriétés de fluorescence. La section 1.4 explique en détail la relation qui existe entre le maximum d'émission du tryptophane et la polarité du milieu.

1.3 Interaction mélittine/membrane

L'interaction entre les peptides et les lipides est un domaine fondamental étant donné son importance physiologique. La mélittine est un peptide largement utilisé pour l'étude de ses interactions, son affinité pour les membranes zwitterioniques étant bien connue (1,20,21). En présence de membranes lipidiques ou de micelles, la mélittine adopte aussi une conformation majoritairement en hélice α semblable à celle du tétramère (2,6,7,22). La structure secondaire en hélice α qu'elle adopte lors de cette interaction semble ne pas inclure les résidus 22-26 du bout C_t (23).

L'orientation du peptide dans la bicouche est encore sujet à controverse. Elle pourrait varier en fonction de la composition lipidique, du degré d'hydratation et du pH. Cependant, la majorité des études indique une orientation parallèle à l'interface eau/membrane (7,24,25) bien qu'une étude suggère une orientation perpendiculaire

(6). La figure 1.6 montre un modèle utilisé pour simuler la dynamique moléculaire de la mélittine associée à une membrane de phosphatidylcholine en considérant l'axe de l'hélice α approximativement parallèle à l'interface (24). Une telle position permet aux résidus polaires du peptide de s'orienter vers l'eau et aux résidus hydrophobes de se diriger vers l'intérieur de la bicouche (7,24).

La présence du peptide affecte fortement la perméabilité des membranes. Parmi les effets les plus représentatifs, on retrouve son potentiel hémolytique (26). La mélittine peut également provoquer la lyse d'autres cellules eucaryotes et procaryotes (27). Elle forme aussi des pores dans les bicouches lipidiques dont la dimension augmente avec la diminution du rapport molaire lipide/mélittine d'incubation (RI) (2,27). La mélittine cause aussi le relargage de sondes fluorescentes encapsulées dans des vésicules de POPC (28). Pour de fortes concentrations, elle induit la micellisation des vésicules de phosphatidylcholine (29). L'action de la mélittine sur la membrane dépend aussi de la composition lipidique de celle-ci. Il a été observé que la présence de lipides chargés négativement dans les bicouches de phosphatidylcholine stabilise les membranes, inhibe la lyse (28,30) et la micellisation (30,31) causés par la mélittine. L'affinité de la mélittine pour la bicouche est augmentée par la présence des lipides chargés négativement (2,12,32). La liaison du peptide aux lipides chargés négativement est environ 100 fois plus forte que pour les lipides zwitterioniques (33). Des études indiquent aussi que la mélittine induit la formation de phases non-lamellaires en présence de bicouches de cardiolipine (34) et d'autres phospholipides chargés négativement (35). Un modèle

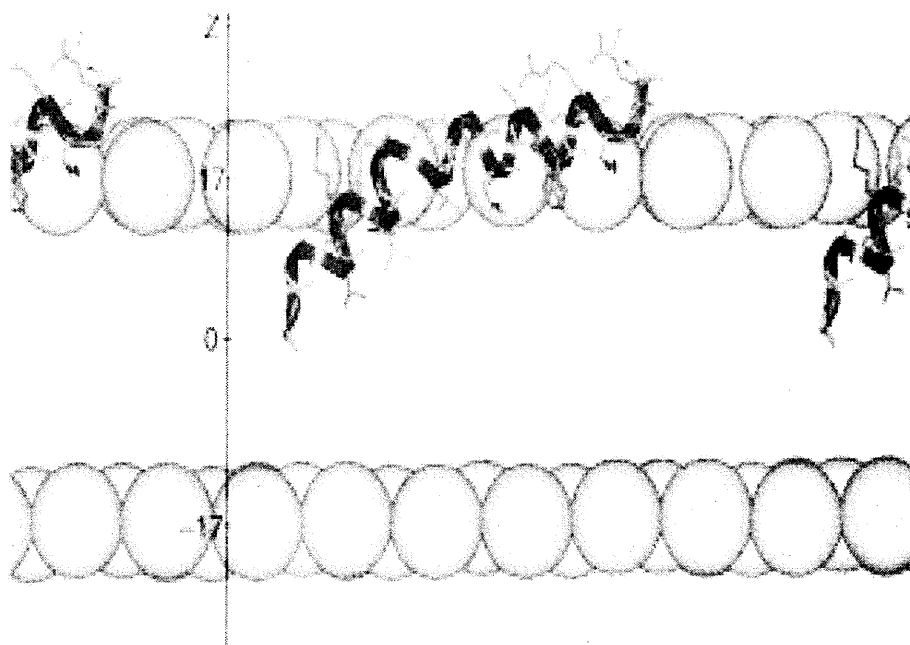


Figure 1.6: Orientation de la mélistine (hélice) dans une bicouche de phosphatidylcholine. Les sphères représentent les têtes polaires des lipides. Les valeurs indiquées sur l'axe Z représentent la distance, en Å, du centre de la bicouche (24).

proposé par Batenburg et coll. (33) permet d'expliquer le polymorphisme lipidique observé en présence du peptide. Il a été suggéré (33) que les fortes interactions électrostatiques entre les charges positives du peptide et les charges négatives de la surface de la membrane causent l'insertion plus profonde de la mélittine dans la région hydrophobe de la bicouche de cardiolipine comparée à une bicouche de PC. L'enfoncement plus profond induit un changement dans le rayon de courbure de la membrane anionique (figure 1.7) (33).

L'interaction mélittine/membrane est influencée aussi par la présence dans la bicouche d'autres lipides comme le cholestérol. L'affinité du peptide pour les bicouche de POPC contenant du cholestérol est diminuée de façon importante (36). En même temps, la micellisation et la lyse des bicouches de phosphatidylcholine induites par la mélittine sont inhibées en présence du stérol (14,36-38). L'origine de ces effets semble être l'empilement compact des lipides dans les bicouches contenant du cholestérol (36).

Malgré le nombre important des études réalisées pour expliquer l'interaction de la mélittine avec les membranes, l'aspect cinétique de ces événements reste encore peu caractérisé. Jusqu'à ce jour, il a été montré que la lyse des érythrocytes procède par un mécanisme biphasique dont la durée est de l'ordre des minutes (26). D'autres interactions comme la formation de pores procèdent par un mécanisme monophasique dont la durée est aussi de l'ordre des minutes (39,40). À une échelle de temps plus courts, on observe des cinétiques d'un intérêt particulier car elle précèdent la formation de structures plus complexes. Par exemple, il a été montré que l'association et l'insertion de la mélittine aux membranes est de l'ordre de la

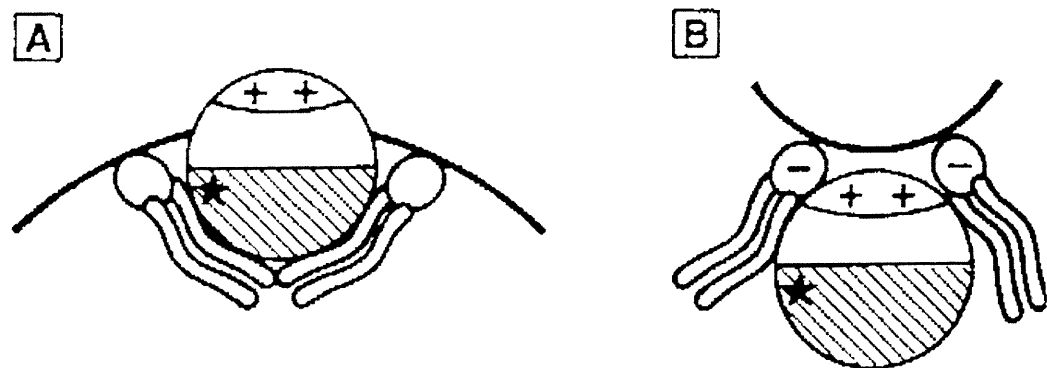


Figure 1.7: a) Structure convexe d'une bicouche zwitterionique en présence de mélittine. b) Structure concave (type II) d'une bicouche chargée négativement en présence de mélittine. La mélittine est représentée par un cercle. L'étoile représente le tryptophane, la zone hachurée le côté hydrophobe de l'hélice α (33).

milliseconde (21,41-43). En fonction du type de vésicules utilisés (SUV ou LUV) et de la composition lipidique de la bicouche, ces processus peuvent être monophasiques (21,41,42) ou biphasiques (43). D'autres cinétiques, telle la structuration du peptide dans la membrane, restent encore à étudier. Ces interactions seront discutées pour certains systèmes peptide-lipides dans le chapitre IV.

Le présent travail est une des premières études qui analyse l'aspect cinétique de l'interaction mélittine/membranes de manière complexe, traitant l'association, l'insertion et la structuration du peptide. Des méthodes spectroscopiques telles que: la fluorescence du tryptophane, son extinction par des lipides bromés et le dichroïsme circulaire nous ont permis d'établir la séquence temporelle des événements et de mieux comprendre ce qui influence chacune de ces cinétiques.

C'est la première étude qui caractérise la cinétique d'enroulement en hélice α de la mélittine en présence de membranes lipidiques. Des conditions presque identiques dans les trois cas permettent aussi d'établir avec confiance la séquence des événements qui se produisent. En même temps, nous avons rapporté dans ce travail les premières études effectuées sur l'effet du POPG et du cholestérol sur la cinétique d'interaction mélittine / membranes zwitterionique.

1.4 Fluorescence du tryptophane

La fluorescence des protéines dans l'ultraviolet provient le plus souvent de l'acide aminé tryptophane. La mélittine possède un seul résidu Trp¹⁹ dans la région hydrophobe, ce qui simplifie beaucoup l'étude de ce peptide par la technique de

fluorescence. La fluorescence est très sensible à l'environnement dans lequel se trouve le fluorophore. Selon les propriétés physico-chimiques du milieu, la longueur d'onde (λ_{\max}) et le rendement quantique (ϕ) de la fluorescence varient (44).

La fluorescence est un processus qui débute toujours par l'absorption d'un photon par la molécule. L'absorption doit se faire entre deux états électroniques dont la différence d'énergie est supérieure ou égale à celle des photons de fluorescence. Dans le cas du tryptophane, la transition électronique impliquée est une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ (44). Le photon de fluorescence est émis lors de la relaxation $\pi^* \rightarrow \pi$.

Il est possible de suivre le déplacement du maximum de la longueur d'onde de fluorescence du tryptophane (λ_{\max}) qui dépend surtout de la polarité du milieu. Dans le cas d'une transition $\pi^* \rightarrow \pi$, l'état excité a un moment dipolaire plus grand que l'état fondamental, il est donc plus stabilisé par un solvant polaire que l'état fondamental. Cette stabilisation de l'état excité provoque un déplacement de la bande de fluorescence vers les faibles énergies dans l'eau ($\lambda_{\max} = 354$ nm) qui est un solvant polaire. À l'intérieur de membrane, un milieu moins polaire, l'état excité du tryptophane est moins stabilisé et on observe une transition à plus grande énergie ($\lambda_{\max} = 339$ nm). Lorsqu'on mesure la fluorescence du tryptophane de la mélittine dans l'eau et en présence de vésicules, on observe un déplacement hypsochrome (vers les courtes longueurs d'onde) de la bande. Ce changement est une première indication qu'il y a une interaction entre la mélittine et les membranes (45).

1.5 Extinction de la fluorescence par les lipides bromés

L'extinction de la fluorescence du tryptophane de la mélyttine par les lipides bromés est une méthode permettant de mesurer la profondeur de l'insertion de la mélyttine dans les membranes (45,46). Le principe consiste à éteindre l'émission du tryptophane de la mélyttine par des atomes de brome qui se trouvent attachés à des positions différentes sur les chaînes acyles des phospholipides. Le taux d'extinction varie en fonction de l'accessibilité du brome (45). Donc, plus le tryptophane du peptide se place près des atomes de brome, dans le milieu hydrophobe de la bicouche, plus le rendement quantique de fluorescence (ϕ) diminue. Afin de bien mesurer l'extinction de l'émission du tryptophane, lors des acquisitions cinétiques, il est important de sélectionner adéquatement la longueur d'onde d'observation. Il est préférable d'utiliser la longueur d'onde correspondant au point isoémissif du système étudié. Le point de croisement des deux spectres de fluorescence, mélyttine libre et mélyttine en présence de vésicules sans brome, détermine ce point isoémissif. À ce point, le rendement quantique de fluorescence est le même pour les deux systèmes. De cette manière, on peut éliminer des traces cinétiques les variations de l'intensité de fluorescence de la mélyttine qui ne sont pas reliées à l'extinction par le brome.

1.6 *Dichroïsme circulaire*

Le dichroïsme circulaire (DC) est une méthode sensible aux variations de structure secondaire des macromolécules telles que l'ADN, l'ARN, les protéines et les peptides. Plusieurs structures secondaires existent dans ces peptides/ protéines à l'état natif. L'arrangement en hélices α (gauche ou droite) et en feuillets β dépend des conditions expérimentales: solvant, force ionique, pH, etc (13). Le dichroïsme circulaire permet de différencier chacune de ces conformations .

Cette technique consiste à faire la différence d'absorbance entre la lumière polarisé circulairement vers la gauche et vers la droite, pour des échantillons qui présentent une asymétrie moléculaire. Si on définit A_G comme étant l'absorbance de la lumière circulairement polarisée gauche et A_D celle de la lumière circulairement polarisée droite alors on peut simplement écrire:

$$\Delta A = A_G - A_D \quad (1.1)$$

Comme l'absorbance dépend de la concentration, on peut écrire $\Delta \epsilon = \Delta A/lM$, où l est le parcours optique, M la concentration en moles par litre. Le dichroïsme circulaire (DC) est défini par $\Delta \epsilon$ qui est une propriété moléculaire indépendante de la concentration. Le DC peut être soit négatif ($A_D > A_G$), soit positif ($A_G > A_D$). Contrairement aux mesures de biréfringence, la substance doit absolument absorber dans la région voulue pour observer un signal (44). Lorsque de la lumière polarisée dans un plan traverse un échantillon actif en DC, le faisceau émergent est polarisé de

façon elliptique. Par conséquent, on peut aussi définir le DC par l'ellipticité (θ_{obs}), ou par l'ellipticité molaire (θ_{M}) (44):

$$\theta_{\text{obs}} \text{ (mdeg)} = 32980 \cdot \Delta A \quad (1.2)$$

$$\theta_{\text{M}} \text{ (deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) = 3298 \cdot \Delta \epsilon \quad (1.3)$$

En ce qui concerne les protéines et peptides, la structure en hélice α est bien caractérisée par un minimum d'ellipticité à 222 nm causé par la transition électronique $n \rightarrow \pi^*$ du carbonyle de l'amide (47). Le DC permet donc de déterminer la proportion d'hélice α présente dans un peptide donné. Cette méthode ne permet cependant pas de connaître quels acides aminés à l'intérieur d'une chaîne peptidique participent à l'hélice (48).

Chapitre 2: Matériel et méthodes

2.1 *Provenance des produits*

Le cholestérol et le tryptophane sont obtenus de la compagnie Sigma (St. Louis, EU). La 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-3-phosphocholine (POPC) et 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-3-phosphoglycérol (POPG) sont achetés de la compagnie Northern Lipids Inc. (Vancouver, B.C. Canada). Les phosphatidylcholines (6,7-dibromo) et (9,10-dibromo) proviennent de la compagnie Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, Al., EU). Tous ces produits ont été utilisés sans purification ultérieure.

2.2 *Purification de la mélittine*

La chromatographie du type échange d'ions a été utilisée pour isoler la mélittine présente dans le venin d'abeille (Sigma). On solubilise 1 g de venin dans 5 mL de tampon acétate 0.1 M à pH 4.7. On centrifuge ensuite la suspension obtenue pendant 30 minutes à 3000 g et on récolte le surnageant. Le culot contient les dards d'abeille et d'autres matières insolubles. On injecte le surnageant en tête d'une colonne de 30 x 5 cm, remplie avec du gel SP-Sephadex C-25, préalablement gonflé dans le tampon acétate. Par la suite, on élue avec 1 L de tampon acétate contenant 0.6 M NaCl, avec un débit constant de 50 mL/min. Ensuite on procède à un gradient de concentration en NaCl de 0.6 M à 1.2 M toujours dans le tampon acétate. Finalement, on élue avec le tampon acétate contenant 1.2 M de NaCl jusqu'à ce que

toute la mélistine soit sortie de la colonne. La détection du peptide à la sortie de la colonne se fait à l'aide d'un spectromètre UV (100-60 Hitachi) dont la longueur d'onde est fixée à 280 nm. Les fractions contenant la mélistine (environ 250 mL) sont lyophilisées.

La mélistine est ensuite déssalée par chromatographie liquide à haute performance avec un système Waters 600 E, muni d'une pompe Waters U6K et un détecteur Waters 486 dont la longueur d'onde est ajustée à 280 nm, sur une colonne Bondpack C-18, semi-préparative (49). Le solide obtenu par lyophilisation, composé essentiellement de mélistine et NaCl, est solubilisé dans un minimum d'eau distillée. La solution obtenue est passée à travers un filtre de porosité de 0.45 μm et injectée (maximum 15 mL par séparation) sur la colonne préconditionnée à l'eau distillée. À un débit constant de 3 mL/min, maintenu pendant toute la séparation, on élue environ 15 mL d'eau déionisée pour enlever l'excès de NaCl. Ensuite pour favoriser l'échange de contre-ions de la mélistine par des Cl^- , l'élution se poursuit avec 10 mL d'une solution 100 mM NaCl. La colonne est éluee de nouveau avec 15 mL d'eau déionisée permettant ainsi d'éliminer le surplus de sels et finalement avec du méthanol pour décrocher toute la mélistine et ainsi la récupérer. Un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide est utilisé pour évaporer le méthanol. À la fin, la mélistine est dissoute dans l'eau distillée et ensuite lyophilisée. Cette méthode de purification nous permette d'obtenir environ 350 mg de mélistine avec un contenu en sel d'environ 12%.

L'évaluation de la pureté de peptide se fait par chromatographie avec un système Hitachi D-7000 muni d'une pompe Hitachi L-7100 et un détecteur à barrette de

diodes – Hitachi L-7450 (λ : 300 - 190 nm), sur une colonne analytique C-18, 4.6 x 250 mm (Higgins Analytical Inc.). La mélittine est injectée sous forme de solution aqueuse (~ 0.5 mg/mL) et le volume d'injection est de 100 μ L. L'élution se fait à un débit de 1.5 mL/min avec un gradient qui est présenté au tableau 2.1. La pureté de la mélittine est d'environ 96%, estimée à partir du profil chromatographique de la mélittine purifiée, enregistré à 214 nm (figure 2.1).

Tableau 2.1: Gradient d'élution pour la mélittine

Temps (min)	[H ₂ O + 0.03%(v/v) TFA ^a] [% (v/v)]	[CH ₃ CN + 0.003%(v/v) TFA ^a] [% (v/v)]
0	100	0
10	100	0
40	10	90
50	10	90

^aacide trifluoroacétique

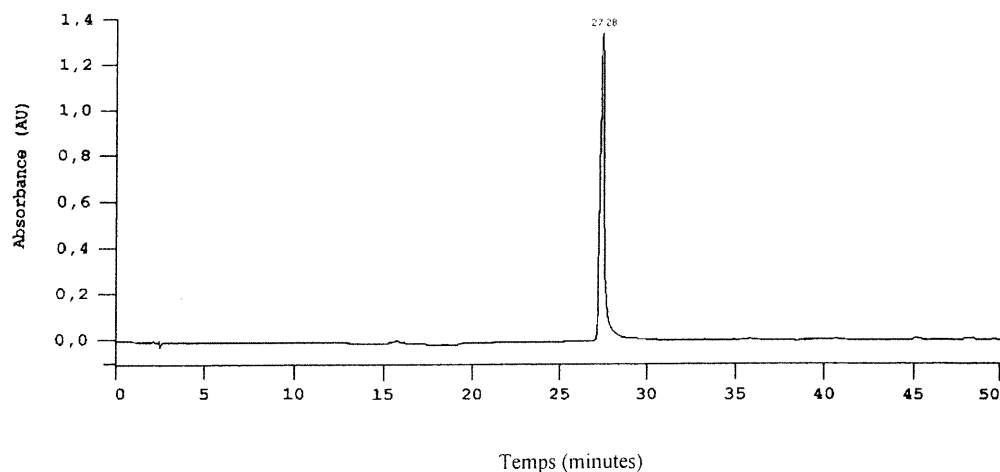


Figure 2.1: Le chromatogramme pour l'analyse HPLC de la mélittine purifiée

2.3 *Influence de la polarité du milieu sur la fluorescence du tryptophane de la mélittine*

Deux types d'expériences de fluorescence ont été effectués: cinétique d'association de la mélittine aux membranes lipidiques et spectre à l'équilibre (après 5 minutes d'incubation dans la cellule). Un tampon 20 mM HEPES (acide N-[2-hydroxyéthyl]-piperazine-N'-[2-éthanesulfonique]), 5 mM NaCl, 2mM EDTA (acide étylènediaminetétraacétique), à pH 7.4, est utilisé pour ces expériences. L'EDTA inclus dans le tampon sert à inactiver les dernières traces de phospholipase A2, qui pourraient être présentes dans les échantillons de mélittine après la purification.

Les liposomes employés pour étudier l'interaction mélittine/membrane sont constitués de POPC ou d'un mélange homogène de POPC et de POPG ou de cholestérol. Dans le cas d'un mélange lipidique, la fraction molaire et le pourcentage molaire de chaque composé sont donnés par rapport aux lipides totaux. Pour préparer le mélange de lipides, on dissout séparément des quantités connues des phospholipides et de cholestérol dans un mélange benzène:méthanol (95/5) (v/v). Des volumes appropriés de ces solutions sont mélangés pour obtenir la proportion molaire désirée. L'élimination du solvant organique se fait par lyophilisation pendant environ 18 heures. Ensuite, les lipides sont hydratés avec le tampon. Les suspensions ont une concentration qui varie entre 10 et 20 mM. L'échantillon vortexé subit ensuite une série de 5 cycles de gel dans l'azote liquide puis dégel à la température de la pièce. Les vésicules multilamellaires (MLV) obtenues sont extrudées 10 fois sur des filtres de polycarbonate possédant des pores de 50 nm de diamètre

(Nuclepore Whatman) en utilisant un extrudeur avec une capacité de 10 mL (Lipex). Cette technique permet la formation des larges vésicules unilamellaires (LUV) de taille homogène (la dimension des liposomes est imposée par le diamètre des pores). La concentration exacte en phospholipides est déterminée pour chaque échantillon par un test de phosphore décrit à la section 2.6. Les suspensions des vésicules sont diluées pour obtenir une concentration finale en lipides de 3.15 mM. Dans un seul cas, pour les LUV de POPC/cholestérol, une concentration finale de 4.5 mM a aussi été utilisée.

Les solutions de mélattine et de tryptophane sont préparées en solubilisant une quantité connue de produit dans quelques mL du tampon. Les concentrations sont déterminées par spectroscopie UV, en mesurant l'absorbance à 280 nm. Le coefficient d'extinction molaire pour le tryptophane et pour la mélattine à cette longueur d'onde est de $5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (29). Des dilutions sont ensuite effectuées pour avoir une concentration finale en peptide ou en tryptophane de $35 \mu\text{M}$. Il est connu que, à cette concentration, la mélattine est sous forme monomère (5). Toutes les mesures expérimentales sont faites à 25°C sur un spectrofluorimètre (Applied Photophysics SX.18MV Stopped-Flow, U.K.) muni d'un contrôleur de température Isotemp 1016P Fisher Scientific (U.S.A). L'appareil est aussi équipé d'un accessoire de flot-arrêté (stop flow). La solution de mélattine et la suspension de LUV à mélanger sont d'abord mises dans deux seringues. Un piston contrôlé par de l'azote comprimé injecte des volumes égaux de chaque solution dans la cellule réactionnelle ayant un volume de $100 \mu\text{L}$. Les suspensions de LUV et les solutions de peptide sont mélangées à un RI (ratio molaire lipides totaux/mélattine à l'incubation) de 90. Pour

l'étude des interactions mélattine/(POPC/cholestérol, 70/30), des RI de 90 et 129 ont été utilisés. Après une période d'incubation d'au moins 5 minutes, l'acquisition des spectres d'émission à l'équilibre est lancée. Tous les résultats obtenus lors des expériences de fluorescence de la mélattine en présence de membranes lipidiques sont corrigés afin de minimiser l'effet de la diffusion de la lumière par les vésicules. Dans des conditions expérimentales identiques, des mesures sur des solutions de tampon, de tryptophane 17.5 μM , de mélattine 17.5 μM ainsi que sur des systèmes tampon/vésicules et tryptophane/vésicules ont été utilisées pour corriger les acquisitions originales (voir la section 3.1).

Toutes les expériences sont faites en utilisant comme source d'excitation la lumière d'une lampe au xénon filtrée par un monochromateur réglé à 280 nm. L'intensité de l'émission est déterminée par le nombre de photons émis, qui sur l'appareil utilisé, est converti en volts. Cette unité de mesure permet une comparaison entre les résultats obtenus en mode cinétique et ceux en équilibre. La bande passante pour l'excitation et pour l'émission est de 4.6 nm. Le voltage appliqué au photomultiplicateur est de 930 V. Les spectres d'émission du tryptophane sont enregistrés entre 420 et 310 nm avec un incrément de 2 nm. Comme il est difficile de déterminer de façon précise la longueur d'onde au maximum de la bande d'émission, on mesure la longueur d'onde médiane à 2/3 de la hauteur de celle-ci. Pour améliorer le rapport signal sur bruit, une moyenne de 3 acquisitions est calculée pour chaque spectre. Dans le cas du mélange mélattine/(POPC/cholestérol, 70/30) avec un RI de 90, le spectre d'émission est enregistré entre 450 et 300 nm avec un incrément de 1 nm, pour mieux visualiser le

déplacement de la bande de fluorescence à l'équilibre. Les mesures cinétiques sont faites en observant la variation de l'intensité de la fluorescence en fonction du temps à une longueur d'onde de 380 nm. Le temps mort de l'appareil, c'est-à-dire le temps entre le mélange des réactifs et l'arrivée de l'échantillon dans la cellule de mesure, pour le montage que nous avons utilisé est situé entre 1.34 et 1.37 ms (50). Celui-ci a été déterminé par le fabricant (50) en utilisant la méthodologie publiée par Tonomura et al. (51) en utilisant la réaction de réduction du 2,6-Dichlorophénol-indophénol par l'acide L-ascorbique.

L'acquisition du premier point est effectuée 2 ms après l'injection, ce qui est plus grand que le temps mort de l'appareil. Donc tous les processus reliés au temps mort n'apparaissent pas sur la trace cinétique. Ceci est confirmé par les résultats expérimentaux que nous avons obtenus pour les cinétiques très rapides (voir page 48-49). La durée d'une acquisition en mode cinétique est de 2 secondes avec un intervalle de temps de 2 millisecondes entre 2 points consécutifs. Chaque trace cinétique est constituée d'une moyenne de plusieurs acquisitions, de 25 à 75, dans le but d'augmenter le ratio signal sur bruit. Le logiciel de l'instrument a été utilisé pour simuler ces traces avec des fonctions exponentielles.

2.4 Extinction de la fluorescence du tryptophane de la mélittine par les lipides bromés

Toutes les solutions ont été préparées dans le même tampon que celui utilisé pour les autres expériences de fluorescence. Les lipides bromés utilisés: 1-palmitoyl-2-(6,7-

dibromo)stéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (6,7Br₂-PC) et 1-palmitoyl-2-(9,10-dibromo)stéaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (9,10Br₂-PC) ainsi que la POPC sont d'abord mis en solution séparément dans un mélange benzène/méthanol (95/5) (v/v). Un test de phosphore est effectué pour chacune des solutions pour obtenir la concentration exacte en lipide. Des volumes appropriés de ces solutions sont mélangés de manière à obtenir des mélanges de POPC avec 15% (mol) 6,7Br₂-PC ou 15% (mol) 9,10Br₂-PC. Des aliquotes de ces mélanges lipidiques sont ensuite ajoutés à des solutions organiques de concentrations connues de POPG et de cholestérol pour obtenir les mélanges désirés. Des mélanges lipidiques contrôle, sans lipides bromés, sont aussi préparés en gardant les mêmes pourcentages molaires en POPG et en cholestérol. L'élimination du solvant organique se fait par lyophilisation. Il faut mentionner ici que tous les pourcentages molaires en lipides bromés sont exprimés par rapport au nombre total de phosphatidylcholines (Br₂PC/[POPC + Br₂PC]). Par contre, les pourcentages de POPG et de cholestérol sont déterminés par rapport au nombre total des lipides dans le mélange. Les lipides sont hydratés dans le tampon et ensuite les suspensions lipidiques formées sont utilisées pour obtenir des LUV de diamètre de 50 nm. La méthode de préparation des liposomes, des solutions de mélittine et des solutions de tryptophane de concentration 35 μM a été décrite précédemment à la section 2.3. Les expériences faites pour les systèmes mélittine/lipides sans brome, ont servi de références. Les mesures sont effectuées avec le spectrofluorimètre décrit à la section précédente en utilisant les mêmes paramètres instrumentaux, à l'exception de la bande passante à l'excitation qui est de 2.3 nm. Tout comme pour les autres expériences de

fluorescence, chaque acquisition est corrigée pour la diffusion de lumière par les vésicules. Les spectres d'émission sont enregistrés entre 450 et 300 nm avec un incrément de 1 nm et chacun représente une moyenne de 3 acquisitions. Les mesures cinétiques sont prises dans un intervalle de temps de 2 secondes, à différentes longueurs d'onde: 351 nm pour les systèmes avec phosphatidylcholine, 350 nm pour les systèmes avec phosphatidylcholine/POPG et à 346 nm pour les systèmes avec phosphatidylcholine/cholestérol. Ces longueurs d'onde correspondent aux points isoémissifs pour chacun des systèmes mélittine-libre/mélittine-LUV. Chaque trace cinétique est le résultat d'une moyenne de 75 à 100 acquisitions, dans le but d'augmenter le ratio signal sur bruit.

2.5 Interaction peptide/membrane par dichroïsme circulaire

L'interaction entre la mélittine et les différents mélanges lipidiques a été étudiée par dichroïsme circulaire (DC). Les spectres, sont enregistrés entre 250 et 215 nm. La longueur d'onde la plus courte est en fait la limite de l'instrument utilisé. Pour avoir un rapport signal bruit raisonnable en DC, il est important d'utiliser des tampons qui ont une absorbance faible dans cette région. Pour cette raison, nous avons réduit la concentration de HEPES dans le tampon utilisé pour les expériences en DC, par rapport aux expériences de fluorescence, car cet acide absorbe fortement en UV. La force ionique du tampon a été maintenue en augmentant la concentration en NaCl.

D'abord un tampon 5mM HEPES, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, à pH 7.4 est utilisé pour préparer la solution de 35 μ M de mélattine et les suspensions lipidiques. Les expériences faites pour le système mélattine avec POPC/POPG (97/3) sont aussi répétées en utilisant un tampon plus riche en sel : tampon 5mM HEPES, 2 mM EDTA, 20 mM NaCl, à pH 7.4. Toutes les solutions de peptide, les mélanges de lipides ainsi que les dispersions de LUV de diamètre de 50 nm sont préparées de la manière déjà décrite à la section 2.3. Les mesures expérimentales sont prises à 25°C avec l'appareil décrit précédemment, sauf que le parcours optique inclut un polariseur circulaire. Une cellule de quartz avec un parcours optique de 0.2 cm est utilisé et le volume réactionnel est ajusté à 200 μ L (50). Le calibrage de l'instrument se fait avec une solution étalon d'acide d-10-camphorsulfonique à une concentration de 1 mg/mL dont l'ellipticité à 290.5 nm est de 67 mdeg (50,52) pour un parcours optique de 2 mm. Les résultats que nous avons obtenus doivent être convertis en mdeg. On fait le rapport entre la valeur connue de 67 mdeg et le signal obtenu (0.0591) pour la solution étalon. Le facteur déterminé pour cette conversion, $f = 1133$, est automatiquement considéré par le logiciel de l'appareil à toutes les analyses DC. Les spectres DC sont enregistrés à une vitesse de 10 nm/min, entre 250 et 215 nm avec un incrément de 0.5 nm. Chaque spectre est une moyenne de 28 acquisitions, dans le but d'augmenter le ratio signal sur bruit. Lors des expériences de cinétique, l'ellipticité à 222 nm est mesurée pour une durée de 2 s. Une moyenne de plusieurs acquisitions (de 300 à 500) est prise pour chaque trace pour améliorer le rapport signal sur bruit. Tous les spectres ou traces cinétiques enregistrés sont corrigés pour les contributions mineures du tampon, des vésicules ou de la diffusion

de la lumière par les vésicules, en soustrayant le signal d'un blanc contenant tout sauf le peptide. Les données expérimentales sont exprimées sous forme d'ellipticité molaire moyenne par résidu $[\theta]$, en $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ en utilisant la formule :

$$[\theta] = \theta_M/N = \theta_{\text{obs}}/(10 \cdot C \cdot l \cdot N) \quad (2.1)$$

où : θ_{obs} représente l'ellipticité observée expérimentalement en mdeg, θ_M est l'ellipticité molaire en $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$, C est la concentration de mélistine en mol/L, l est le parcours optique en cm et N représente le nombre des résidus d'acides aminés de la mélistine, c'est-à-dire 26 (9,53). La fraction du peptide dans la conformation d'hélice, αf_h , a été calculée à l'aide d'équation :

$$f_h = ([\theta]_{222} - [\theta]_l) / ([\theta]_H - [\theta]_l) \quad (2.2)$$

où: $[\theta]_{222}$ est l'ellipticité molaire moyenne par résidu observée expérimentalement à 222 nm, $[\theta]_H$ et $[\theta]_l$ représentent les valeurs limites pour la conformation hélice α à 100% et la forme désordonnée à 100% respectivement à 222 nm. Ces deux valeurs sont dépendantes de température et leurs valeurs sont déterminées à l'aide des formules :

$$[\theta]_H = [-44000 + 250T][1 - (3/N)] \quad (2.3)$$

$$[\theta]_l = (2220 - 53T) \quad (2.4)$$

où T est la température en °C et N représente le nombre des résidus d'acides aminés de la mélattine (48,54).

2.6 Détermination de la concentration de phosphore

Le dosage du phosphore dans les échantillons de phospholipides se fait avec la méthode de Fiske et SubbaRow (55)

Les solutions suivantes sont requises:

Acide perchlorique 70% (HClO₄)

0.22% (poids/volume) molybdate d'ammonium (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O

22 g molybdate d'ammonium sont dissous dans 20 mL H₂SO₄ concentré et dilués pour un volume final de 1L

Réactif de Fiske et SubbaRow

1 g de sulfite de sodium (Na₂SO₃), 30 g de hydrogénosulfite de sodium (NaHSO₃) et 0.5 g d'acide 1-amino-2-naphtolsulfonique sont dissous dans 200 mL d'eau déionisée en chauffant le mélange pendant 5-10 minutes à 40°C. On laisse refroidir la solution obtenue et on filtre pour éliminer les éventuels cristaux formés.

Solution aqueuse de dihydrogénophosphate de sodium (NaH₂PO₄) 3.35 μM, utilisée comme standard.

Des volumes contenant entre 30 et 270 nmol de phosphore (présents dans la solution standard ou dans les suspensions de phospholipides) sont prélevés et déposés dans des éprouvettes de 20 mL. La dégradation des lipides est assurée par une digestion à l'acide perchlorique (0.6 mL dans chaque échantillon) à 190° C, pendant 2 heures.

Pour minimiser l'évaporation de l'acide, chaque tube est couvert d'une bille de verre. À la fin de cette étape, on laisse les solutions refroidir. À chaque échantillon, on ajoute 7 mL de solution de molybdate d'ammonium et on agite ces mélanges. Ensuite, on ajoute 0.6 mL de réactif Fiske et SubbaRow et on agite de nouveau toutes les solutions. Pour aider la formation du complexe, on chauffe les éprouvettes à 100° C pendant 20 minutes. Une fois les solutions refroidies, on mesure l'absorbance à 830 nm par rapport au blanc en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible (Cary-1Bio, Varian). Les valeurs d'absorbance obtenues pour les échantillons de la solution standard sont utilisées pour tracer une courbe d'étalonnage. La figure 2.2 illustre un exemple de courbe d'étalonnage.

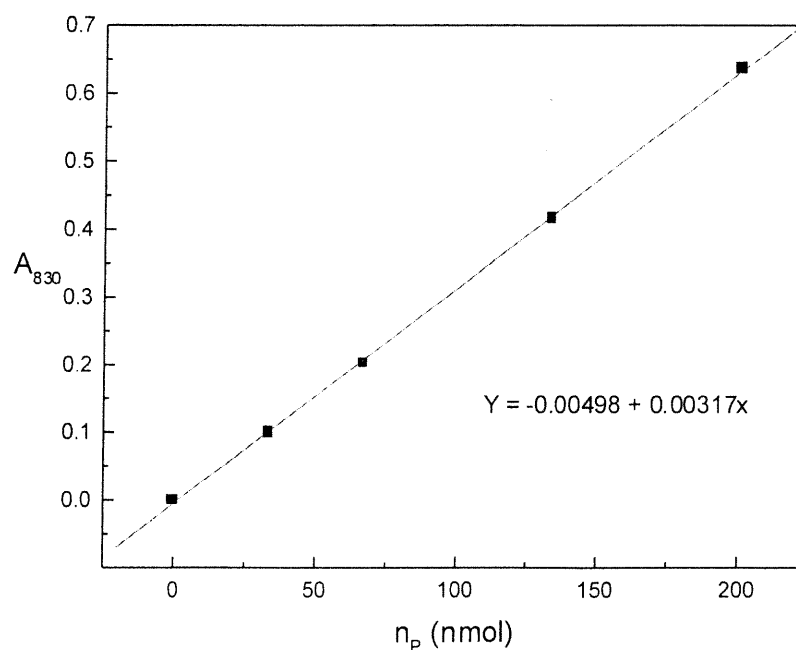


Figure 2.2: Courbe d'étalonnage typique pour le test de phosphore

Chapitre 3: Résultats

3.1 Correction pour la fluorescence du tryptophane en présence de vésicules

La fluorescence du résidu tryptophane de la mélattine est employée pour étudier l'interaction peptide-membrane modèle. Afin de mieux corriger l'influence des phénomènes autres que ceux associés à l'interaction mélattine-vésicules, on utilise une solution de tryptophane comme fluorophore de référence car il ne s'associe pas aux membranes (56). Les spectres d'émission enregistrés pour les mélanges de liposomes-tryptophane présentent certaines distorsions par rapport aux spectres de tryptophane seul à cause de la diffusion de la lumière par les vésicules. L'effet est dépendant de la composition lipidique des membranes et il croît avec la concentration et la taille des liposomes.

D'abord, pour éliminer les déformations des spectres d'émission causées par la diffusion de la lumière et par la bande Raman associée à l'élongation OH de l'eau, on a procédé à une première correction en soustrayant, dans un rapport d'un pour un, un spectre obtenu pour un blanc. Le blanc avait la même composition que les solutions analysées, exception faite du chromophore. La figure 3.1 montre les spectres de fluorescence corrigés, pour une solution de 17.5 μM de tryptophane, libre et en présence d'une suspension de 1.58 mM de LUV de POPC. Les soustractions ont été réalisées avec deux spectres de blanc pris pour une solution de tampon et pour une suspension de LUV de POPC de la même concentration. La figure 3.1 présente aussi ces deux spectres. Le même traitement a été appliqué à tous les

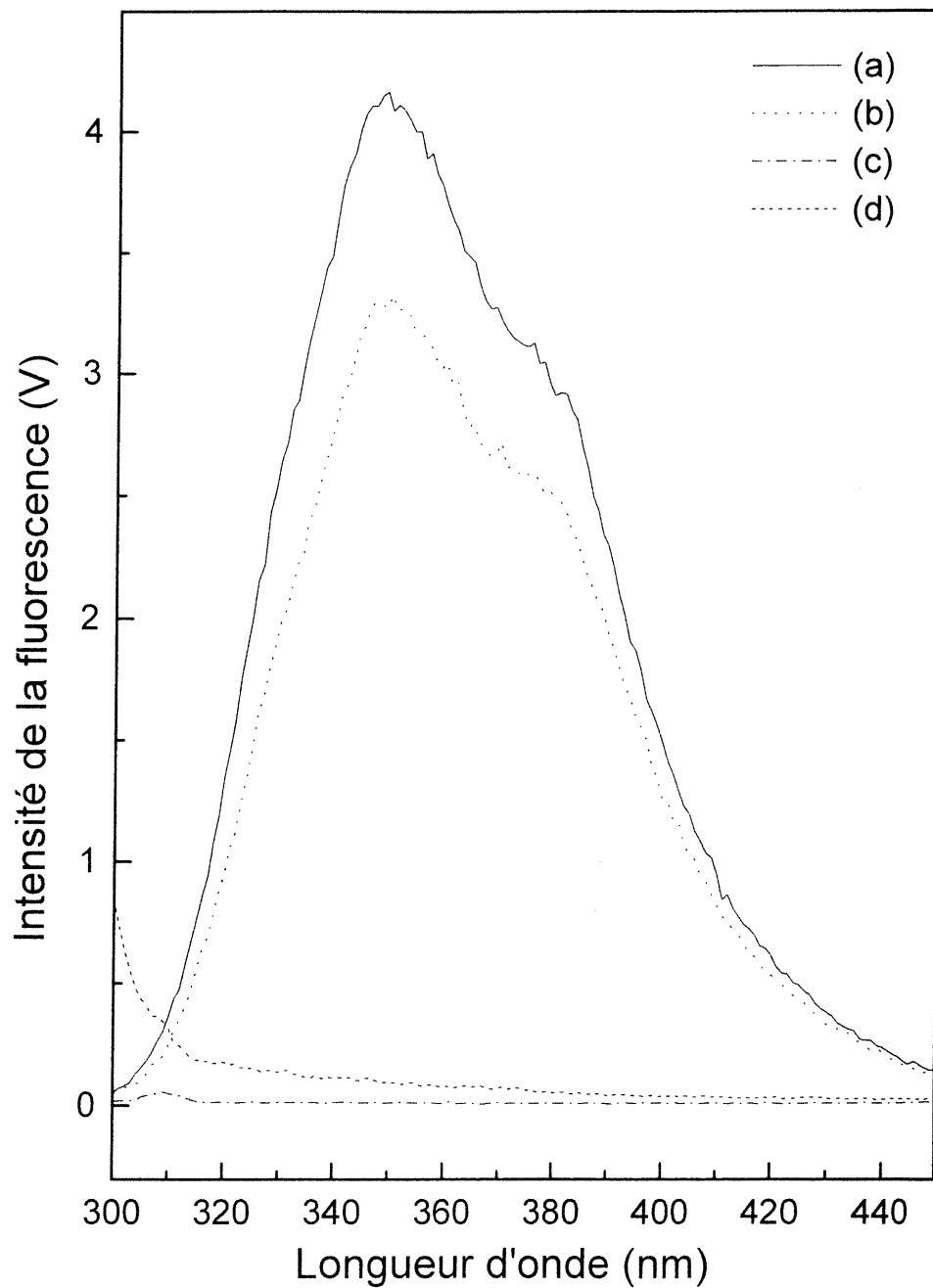


Figure 3.1: Spectres de fluorescence du tryptophane avec le blanc approprié soustrait: a) libre, b) en présence de la POPC, c) tampon, d) LUV de POPC dans le tampon.

spectres de fluorescence enregistrés de mélattine ou de tryptophane. La diminution d'intensité de fluorescence observée pour le spectre du tryptophane en présence de vésicules est essentiellement due à l'atténuation de la lumière d'excitation et de la lumière émise à cause de la diffusion associée aux vésicules. Ce phénomène se produit donc aussi dans les spectres de mélattine-LUV de POPC. Il est à noter que la forme du spectre n'est pas affectée par la présence des lipides. En faisant le rapport entre l'aire du spectre du tryptophane (S_{Trp}) et celle du spectre du tryptophane en présence des LUV de POPC ($S_{(\text{Trp} + \text{LUV})}$), il est possible d'estimer un facteur de correction pour corriger les différences de fluorescence causées par la présence des vésicules dans la solution du chromophore: $f_{df} = S_{\text{Trp}}/S_{(\text{Trp} + \text{LUV})}$. Ce facteur est dépendant des conditions expérimentales employées, de la concentration et la nature des vésicules utilisées. Il est donc indiqué de le déterminer pour chaque nouvelle série d'expériences. Dans le tableau 3.1, on présente des valeurs de f_{df} calculées pour les spectres d'émission d'une solution de 17.5 μM de tryptophane en présence des liposomes de principales compositions étudiées (RI 90). Pour tous les systèmes étudiés dans ce travail, ces valeurs varient entre 1.13 et 1.32.

Tableau 3.1: Facteur f_{df} pour diverses préparations lipidiques

Type de membrane	$f_{df} = S_{\text{Trp}}/S_{(\text{Trp} + \text{LUV})}$
POPC	1.24
POPC/POPG (97/3)	1.20
POPC/Cholestérol (70/30)	1.30

Les spectres sont enregistrés à 25 °C avec les mêmes paramètres instrumentaux pour toutes les expériences, en utilisant des LUV de diamètre de 50 nm et une concentration totale en lipide, de 1.58 mM.

Afin d'obtenir les spectres de fluorescence mélattine-vésicules normalisés ($S_{(m-v)N}$) par rapport aux spectres de mélattine, on procède à une deuxième correction. Cette fois, on multiplie l'aire du spectre mélattine-LUV de POPC ($S_{(m-v)}$) avec le facteur f_{df} , calculé pour le système correspondant tryptophane-vésicules : $S_{(m-v)N} = f_{df} \times S_{(m-v)}$. La figure 3.2 montre le spectre de fluorescence corrigé pour une solution de 17.5 μ M de mélattine en présence de 1.58 mM de LUV de POPC. On y voit aussi le spectre avant correction et le spectre de la mélattine libre pour une concentration identique. Cette méthode de correction a été appliquée sur tous les spectres de fluorescence enregistrés pour le système mélattine-vésicules.

Tout comme pour les spectres d'émission, les acquisitions cinétiques doivent aussi être corrigées pour la diffusion de lumière par les vésicules. D'abord, on a soustrait à chacune des traces celle d'un blanc contenant tout sauf le fluorophore. En regardant de nouveau les spectres de la figure 3.1, on observe que la diminution d'intensité de fluorescence du tryptophane en présence de vésicules dépend de la longueur d'onde. Les traces cinétiques doivent donc être corrigées avec le facteur de réduction approprié pour la longueur d'onde utilisée. Le facteur de correction pour cette longueur d'onde est calculé de la même façon que pour les spectres de fluorescence. Au lieu d'utiliser la surface sous la courbe pour calculer le facteur on utilise l'intensité en un seul point $f_{dc} = I_{Trp}/I_{(Trp + LUV)}$. Comme l'intensité de fluorescence ne varie pas en fonction du temps pour les expériences avec le

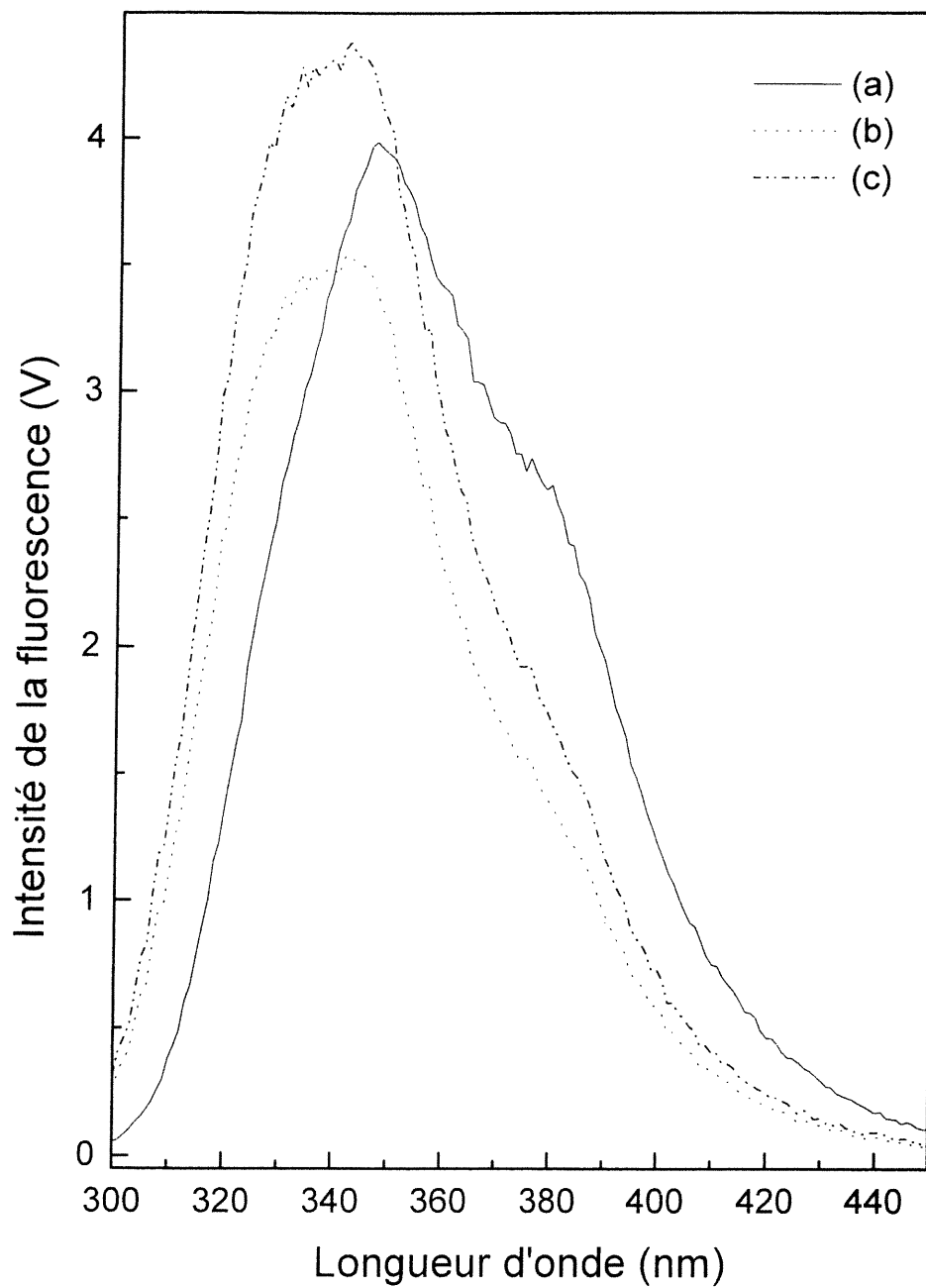


Figure 3.2: Spectres de fluorescence du tryptophane de la méloitine libre (a) en présence de la POPC, non-corrige (b) et corrige (c).

tryptophane, la valeur moyenne sur le temps d'acquisition est utilisée. La trace cinétique corrigée pour le système mélattine-vésicules se calcule comme suit : $I_{(m-v)N} = f_{dc} \times I_{(m-v)}$. La figure 3.3 montre des traces cinétiques pour le tryptophane, le tryptophane avec des LUV de POPC, une suspension de LUV de POPC et le tampon seul. Les courbes de cinétique avec tryptophane sont corrigées en soustrayant le blanc correspondant. Les acquisitions cinétiques corrigées pour les systèmes mélattine-vésicules et mélattine libre sont présentées dans la section suivante.

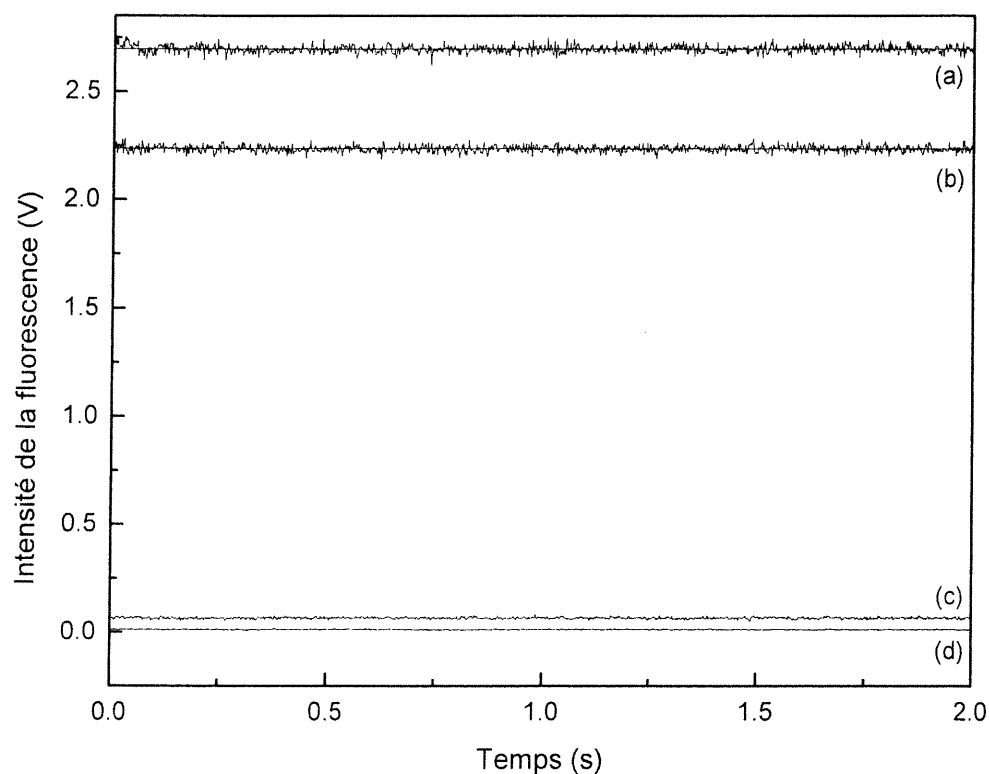


Figure 3.3: Traces cinétiques de fluorescence du tryptophane corrigées avec le blanc approprié: a) libre, b) en présence de la POPC, c) LUV de POPC dans le tampon, d) tampon.

3.2 *Variation de la fluorescence du tryptophane de la mélittine en fonction de la polarité du milieu*

Cette section porte sur la cinétique d'association de la mélittine avec différents types de bicouches phospholipidiques. La cinétique d'association est étudiée en mesurant la variation de la fluorescence du résidu tryptophane du peptide associé au changement de la polarité du milieu. Les spectres d'émission des systèmes à analyser servent à établir les paramètres expérimentaux employés pour les mesures cinétiques. Trois types de membranes de nature lipidique différentes: des bicouches zwitterioniques formés avec la POPC, des bicouches de POPC contenant 3% (mol) POPG (un phospholipide chargé négativement) et un mélange de POPC avec 30% (mol) de cholestérol ont été étudiés. L'influence de la quantité de charges négatives dans la membrane sur la cinétique d'association mélittine-vésicules a aussi été examinée en variant le pourcentage molaire de POPG dans le mélange de 0 à 15%.

Dans un premier temps, les spectres d'émission des mélanges réactionnels ont été enregistrés. Le RI de 90 utilisé permet d'avoir, à l'équilibre, la quasi totalité du peptide lié aux membranes de phosphatidylcholines (36). La figure 3.4 montre le spectre de fluorescence de la mélittine libre et en présence de LUV de POPC. Tous les spectres en présence de LUV sont corrigés pour la diffusion de la lumière d'excitation et pour la diffusion de la lumière émise par les vésicules (voir section 3.1). Sur la figure, on peut constater que le maximum de la bande d'émission de la mélittine libre est à 354 nm tandis que le maximum d'émission de la mélittine en présence de vésicules de POPC se trouve à 339 nm. L'intensité du signal est

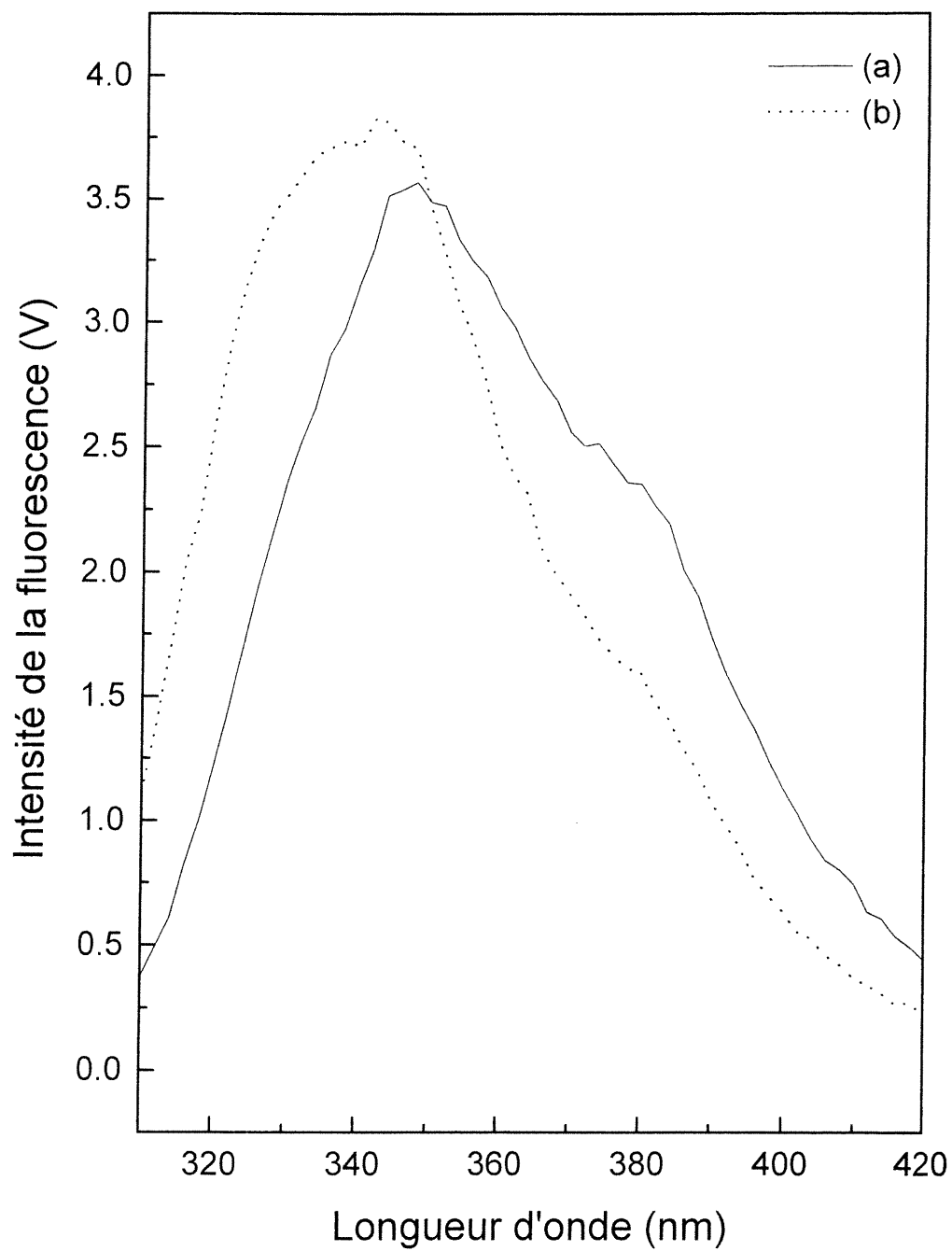


Figure 3.4: Spectres de fluorescence de la mélittine libre a) et en présence de la POPC b).

également légèrement augmentée. Le déplacement de la bande de fluorescence vers les longueurs d'onde plus courtes indique un transfert d'un milieu polaire à un milieu moins polaire du résidu tryptophane (1). Ce déplacement correspond à celui rapporté dans la littérature pour des conditions similaires (36), ce qui confirme que l'on suit bien l'adsorption de la mélittine aux vésicules. La figure 3.5 montre le spectre de fluorescence de la mélittine en présence de LUV de POPC avec 30%(mol) de cholestérol. Dans ce cas le maximum d'émission de la mélittine se trouve à 347 nm. On remarque que la présence du cholestérol dans les membranes provoque un plus faible déplacement de la bande d'émission et l'intensité du signal reste sensiblement la même qu'en absence de vésicules.

La figure 3.6 montre le spectre de fluorescence de la mélittine libre et deux spectres de la mélittine en présence de LUV de POPC/POPG dans des rapports molaires de 97/3 et 85/15. Les maxima d'émission de ces deux dernières se trouvent à 338 et 337 nm respectivement. On remarque que le déplacement vers les longueurs d'onde courtes de la fluorescence du résidu tryptophane est plus important lorsque la proportion de lipides chargés négativement augmente.

Pour les expériences en cinétique, la longueur d'onde d'émission choisie est de 380 nm. En comparant les spectres de fluorescence de la mélittine libre avec ceux de la mélittine en présence de vésicules, on observe que la variation de l'intensité de fluorescence est maximale à cette longueur d'onde (voir figures 3.4, 3.5 et 3.6). Le choix d'une longueur d'onde plus courte est à éviter en raison de la diffusion Rayleigh qui devient importante ($I_d \propto 1/\lambda^4$). Dans le cas de la mélittine en présence des vésicules avec le cholestérol, la différence d'intensité de fluorescence est faible à

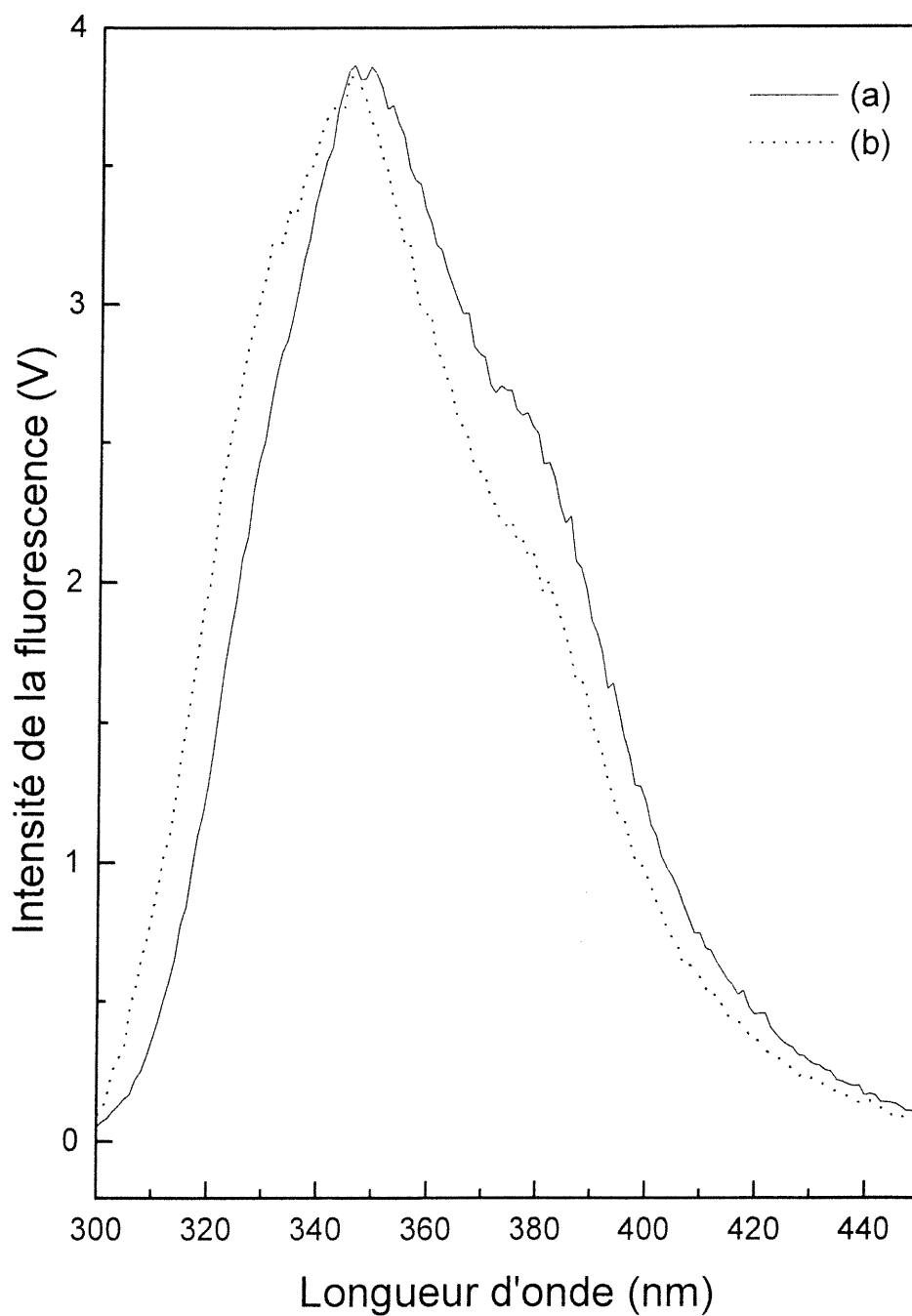


Figure 3.5: Spectres de fluorescence de la mélittine libre a) et en présence de POPC avec 30% (mol) cholestérol b).

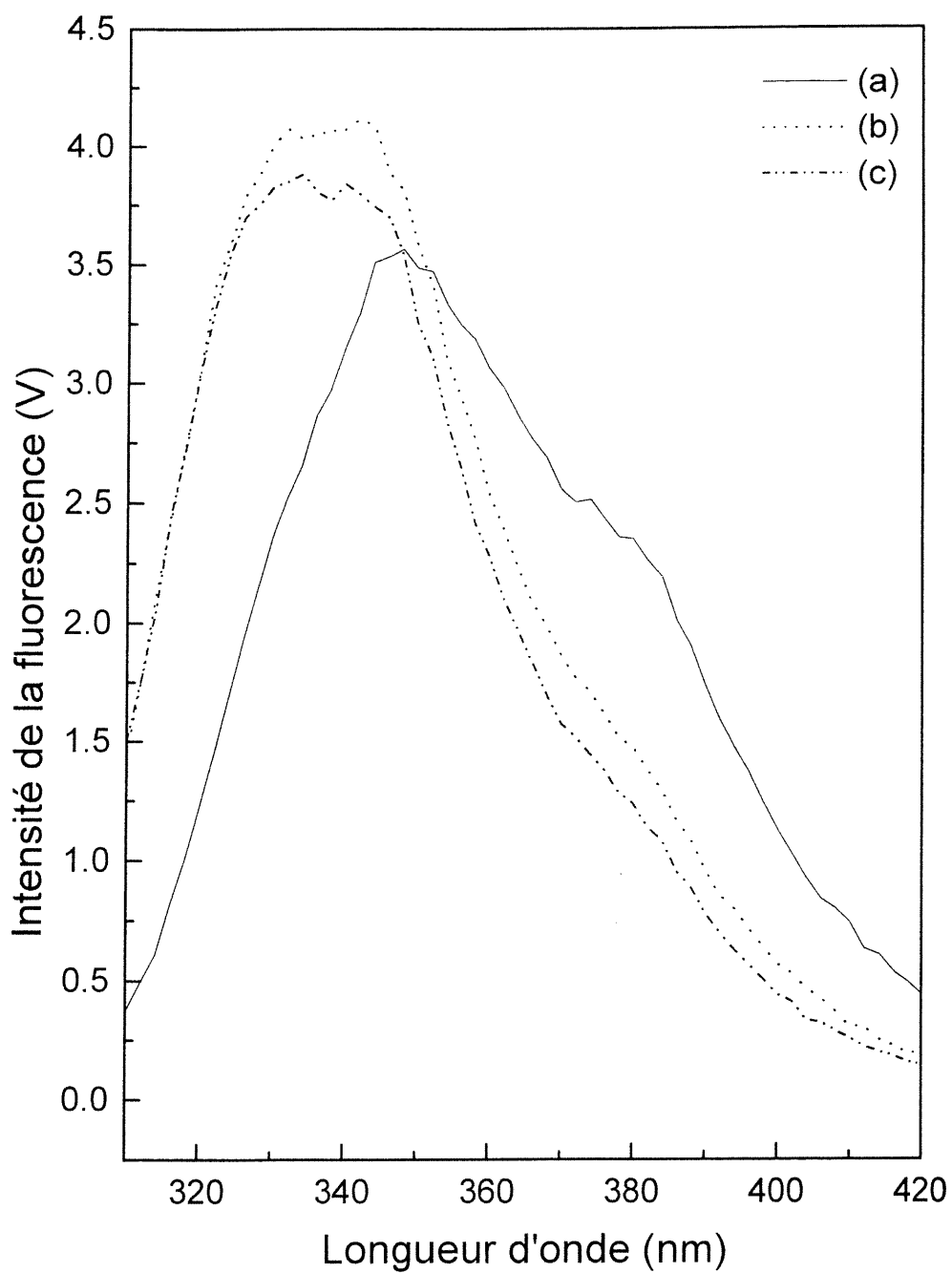


Figure 3.6: Spectres de fluorescence de la mélittine libre a), en présence de POPC avec 3% (mol) POPG b), avec 15% (mol) POPG c)

toutes les longueurs d'ondes dans ces conditions expérimentales.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la cinétique d'association peptide-membranes neutres. La variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour le système mélattine-LUV de POPC est présentée dans la figure 3.7a. La mélattine libre est utilisée comme référence (trace du haut). On remarque que pour le système mélattine-vésicules, le signal mesuré au temps 0 est légèrement inférieur à celui de la trace de référence. Ceci nous indique qu'il y a possiblement une perte du signal pendant le temps mort de l'appareil. En même temps, il faut prendre en considération le fait que les corrections sont faites à partir d'un système similaire mais non identique (tryptophane-vésicules) et que le bruit est d'environ 0.1 sur l'échelle utilisée. Ces facteurs peuvent conduire à certaines variations de l'intensité d'émission. On observe aussi qu'une diminution d'intensité se produit rapidement dans les premiers 600 ms, puis plus lentement pour le reste du temps. Cette décroissance peut être simulée par une double exponentielle associée à deux constantes de vitesse k_1 et k_2 :

$$I(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t) + F \quad (3.1)$$

Les facteurs préexponentiels A_1 , A_2 représentent l'amplitude de chaque exponentielle, F est l'intensité au point final de la trace et t représente le temps en seconde. Cette fonction a été utilisée dans la littérature aussi par d'autres chercheurs pour décrire l'association du peptide aux membranes (43).

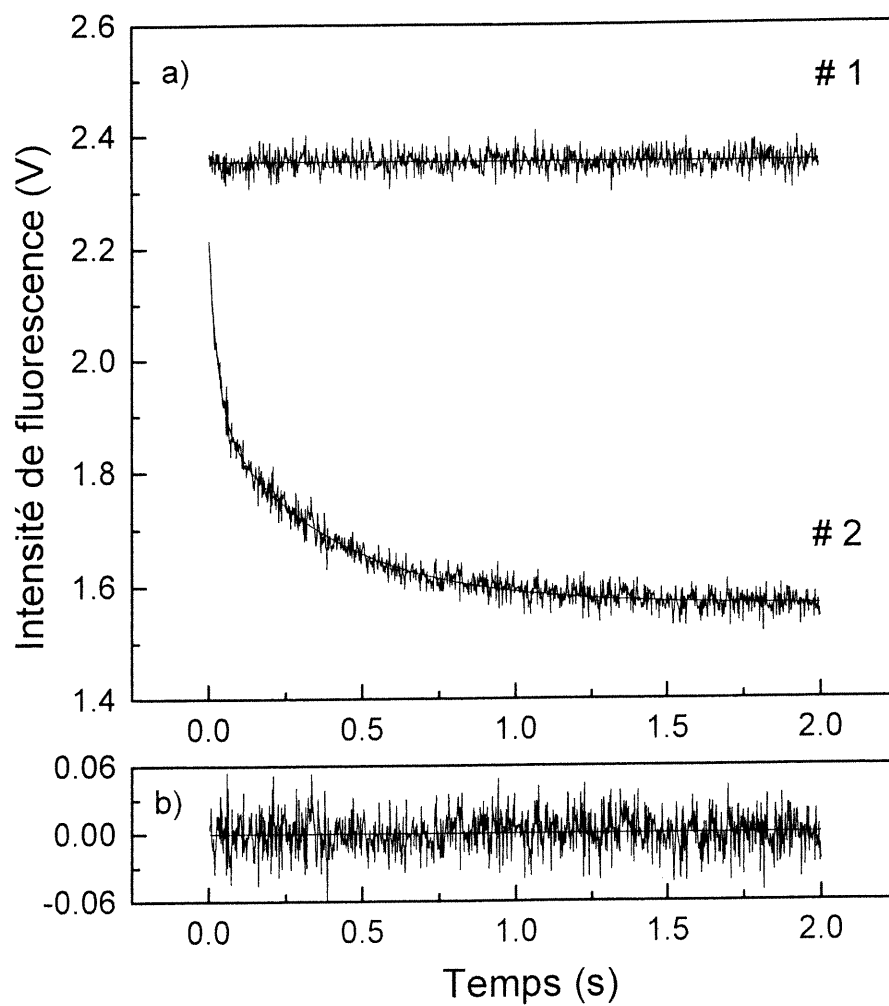


Figure 3.7: a) La variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour la mélittine libre #1 et en présence de la POPC #2, b) Le résidu pour la trace 2a

Les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau 3.2. La somme des facteurs A_1 , A_2 et F nous indique le point de départ de la trace simulé. L'ajustement des données a été fait par la méthode de Levenberg-Marquardt. Les incertitudes rapportées sont celles dérivées par cette méthode de manière standard. Il est important de noter que les paramètres sont interreliés et en conséquence, les incertitudes le sont aussi. D'un façon générale, l'incertitude est relativement plus grande pour k_1 par rapport à k_2 . Ceci s'explique probablement par le fait que moins de points définissent l'exponentielle avec un temps caractéristique court.

Tableau 3.2: Les paramètres cinétiques d'association de la mélattine avec la POPC en présence ou en absence de POPG, en fonction du changement de la polarité environnementale du tryptophane

Paramètres	POPC / mélattine	(POPC+3% POPG) / mélattine	(POPC+5% POPG) / mélattine	(POPC+15% POPG) / mélattine
^a A_1	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.11 ± 0.01
k_1 (s ⁻¹)	33 ± 2	49 ± 3	69 ± 4	77 ± 9
^a A_2	0.34 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.02 ± 0.01
k_2 (s ⁻¹)	2.60 ± 0.06	2.30 ± 0.05	3.30 ± 0.07	10 ± 7
^a F	1.57 ± 0.01	1.49 ± 0.01	1.40 ± 0.01	1.18 ± 0.01
^b Variance	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002

^aVolt

^bVariance entre la simulation et les données expérimentales (Volt)²

Pour la POPC, la valeur calculée du point de départ (A_1+A_2+F) est de 2.24 V et se rapproche du signal initial de la trace de référence. Le bruit étant approximativement de 0.1 V, le point de départ de la décroissance exponentielle est à une valeur d'intensité qui ne diffère pas significativement de la référence (2.35 V). On peut donc conclure que la trace complète est observée et que la perte de signal pour le temps mort de l'appareil est minime pour ce cas spécifique. Dans la figure 3.7b, on peut voir le résidu, la différence entre la trace expérimentale et la trace simulée avec l'équation ci-haut. L'absence de tendance dans le résidus implique que la simulation est correcte.

En gardant les paramètres expérimentaux identiques, on a remplacé les vésicules neutres par des LUV possédant des charges négatives. La figure 3.8 montre la trace cinétique d'association de la mélittine avec des LUV de POPC/POPG (97/3). Dans la même figure, il y a aussi la référence représentée par la mélittine libre pour laquelle l'intensité de fluorescence ne varie pas en fonction du temps.

Comme pour les systèmes mélittine-POPC, une double exponentielle a aussi été choisie pour simuler la cinétique d'association mélittine-POPC/POPG (97/3) (voir l'équation 3.1). Les valeurs calculées pour les deux constantes de vitesse k_1 et k_2 ainsi que pour les facteurs préexponentiels A_1 , A_2 et F sont présentées dans le tableau 3.2. Cette série des résultats ressemble beaucoup à ceux calculés précédemment pour le système peptide-membrane neutre, exception faite de la première constante de vitesse qui est plus grande en présence de charges négatives dans les vésicules. Le point de départ de la trace simulé ($A_1+ A_2 + F$) est à 2.11 V. Cette valeur d'intensité se rapproche de la trace de référence mais est légèrement

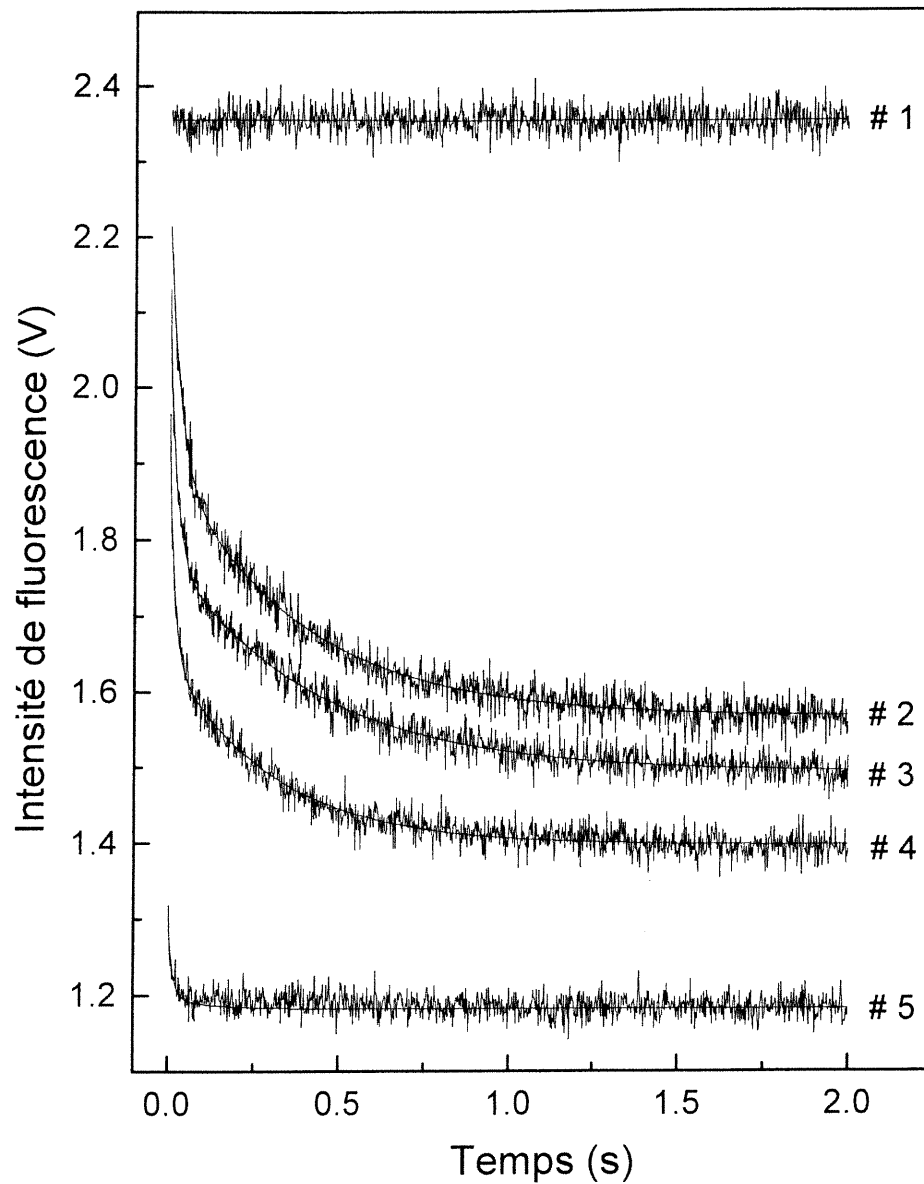


Figure 3.8: L'influence de la charge négative dans la bichouche pour la cinétique d'association peptide/lipide: #1 mélistine libre, #2 mélistine/POPC, #3 mélistine/(POPC avec 3% (mol) de POPG), #4 mélistine/(POPC avec 5% (mol) de POPG) et #5 mélistine/(POPC avec 15% (mol) de POPG)

plus basse (deux fois le bruit). Donc une quantité de la méltine injectée s'associe très vite, pendant le temps mort de l'appareil, aux membranes de POPC contenant 3% (mol) de POPG ce qui détermine la différence d'intensité observée. Afin de mieux caractériser la cinétique d'association peptide-membrane chargée négativement, on a augmenté le pourcentage de POPG dans les bicouches à base de POPC. La figure 3.8 montre les acquisitions cinétiques enregistrées pour la méltine en présence des LUV de POPC avec 5% et 15% (mol) POPG. Les paramètres résultant de la simulation de la décroissance du signal par la double exponentielle sont présentés dans le Tableau 3.2. On observe une augmentation significative des k_1 au fur et à mesure que le pourcentage en lipides chargés négativement augmente dans les vésicules. Par contre, les valeurs de k_2 sont approximativement constantes, jusqu'à un contenu en POPG de 5%. Pour les vésicules avec 15% (mol) de POPG, k_2 apparaît plus élevé mais il possède une erreur élevée et ce processus (tel que caractérisé par A_2) est peu important. L'intensité de fluorescence au départ et au point final de la trace diminue progressivement lorsque la quantité de POPG augmente. Les constantes de vitesse deviennent suffisamment grandes pour que la perte de signal durant le temps mort de l'appareil soit de moins en moins négligeable. Pour le mélange de 15% (mol) POPG, cet effet devient important. Il se répercute aussi sur l'amplitude des deux exponentielles qui sont significativement plus petites avec moins de POPG. La valeur faible de A_2 et l'erreur élevée sur k_2 pour la cinétique avec 15% de POPG peuvent aussi s'expliquer par le fait que l'association de la méltine aux membranes est pratiquement complétée à l'intérieur du temps mort de l'appareil. Des essais ont aussi été faits pour une concentration de

25% (mol) en POPG et, dans ce cas, aucune cinétique n'a été observée. A une telle concentration de POPG, l'association devient tellement rapide que la cinétique se déroule entièrement pendant le temps mort de l'appareil (environ 1 ms).

L'intensité de la fluorescence au point final décroît avec l'augmentation de charges négatives dans la membrane. La valeur de F passe de 1.57 V pour POPC à 1.18V pour une concentration de 15% (mol) de POPG. La diminution de la valeur de F suggère que le milieu entourant le tryptophane devienne moins polaire quand la proportion de charges négatives augmente dans les lipides. On peut conclure que l'interaction électrostatique semble donc jouer un rôle important en ce qui concerne la cinétique d'association de la mélittine aux membranes et ce phénomène sera discuté à la section 4.2.

L'effet de la présence de cholestérol dans la membrane sur la cinétique d'association de la mélittine a aussi été étudié. La figure 3.9a montre les traces cinétiques de la mélittine seule et de la mélittine en présence de vésicules de POPC avec 30% (mol) cholestérol pour un RI de 90. Pour le cas des cinétiques en présence de cholestérol, les simulations sont faites à l'aide d'une simple exponentielle:

$$I(t) = A \exp(-kt) + F \quad (3.2)$$

Dans cette équation, A est l'amplitude du signal au temps $t = 0$, k est la constante de vitesse, t est le temps en seconde et F est l'intensité du signal pour un temps infini.

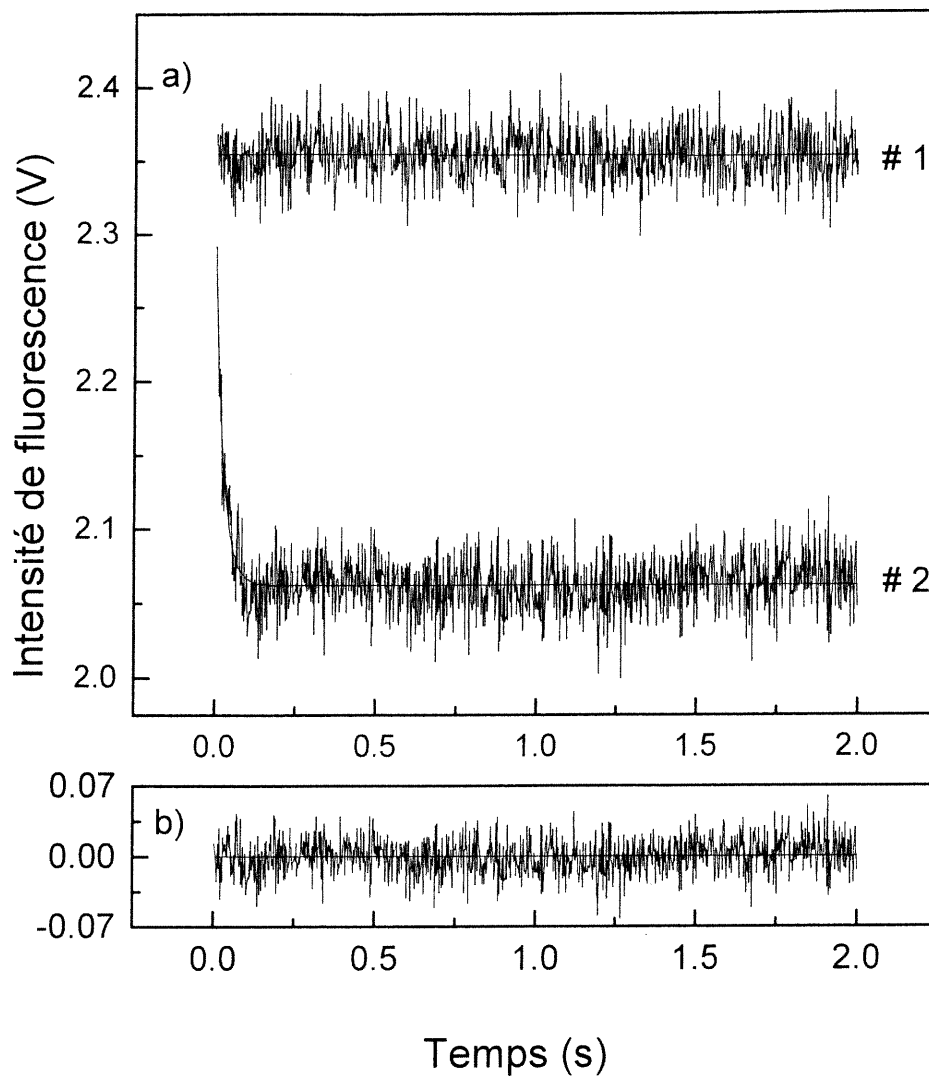


Figure 3.9: a) La variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps pour la mélattine libre #1 et en présence de POPC/cholestérol (70/30) #2, b) Le résidu pour la trace 2a

La figure 3.9b montre le résidu. Le point de départ de la trace cinétique de la figure 3.9a est de 2.3V (A+F). Ce point de départ ne diffère pas significativement du niveau moyen de la trace de référence. Les paramètres de la simulation de la

cinétique mélittine/(POPC avec 30% (mol) cholestérol) avec un RI de 90 sont présentés au tableau 3.3.

Tableau 3.3: Les paramètres cinétiques d'association de la mélittine avec la POPC en présence de cholestérol

Paramètres	(POPC+30% Chol.) / mélittine (RI 90)	(POPC+30% Chol.) / mélittine (RI 129)
^a A	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01
K (s ⁻¹)	40 ± 3	45 ± 3
F	2.060 ± 0.001	1.960 ± 0.001
^b Variance	0.0003	0.0003

^aVolt

^bVariance entre la simulation et les données expérimentales (Volt)²

L'effet du cholestérol est comparé pour deux RI différents: RI de 90, celui utilisé dans toutes les expériences et 129 car, pour ce RI, on retrouve un ratio molaire mélittine/POPC de 90. La figure 3.10 montre les traces de cinétique pour la mélittine libre (référence), la mélittine avec POPC et 30% (mol) de cholestérol pour les deux RI (90 et 129) et la mélittine avec POPC sans cholestérol (RI 90). Pour les traces

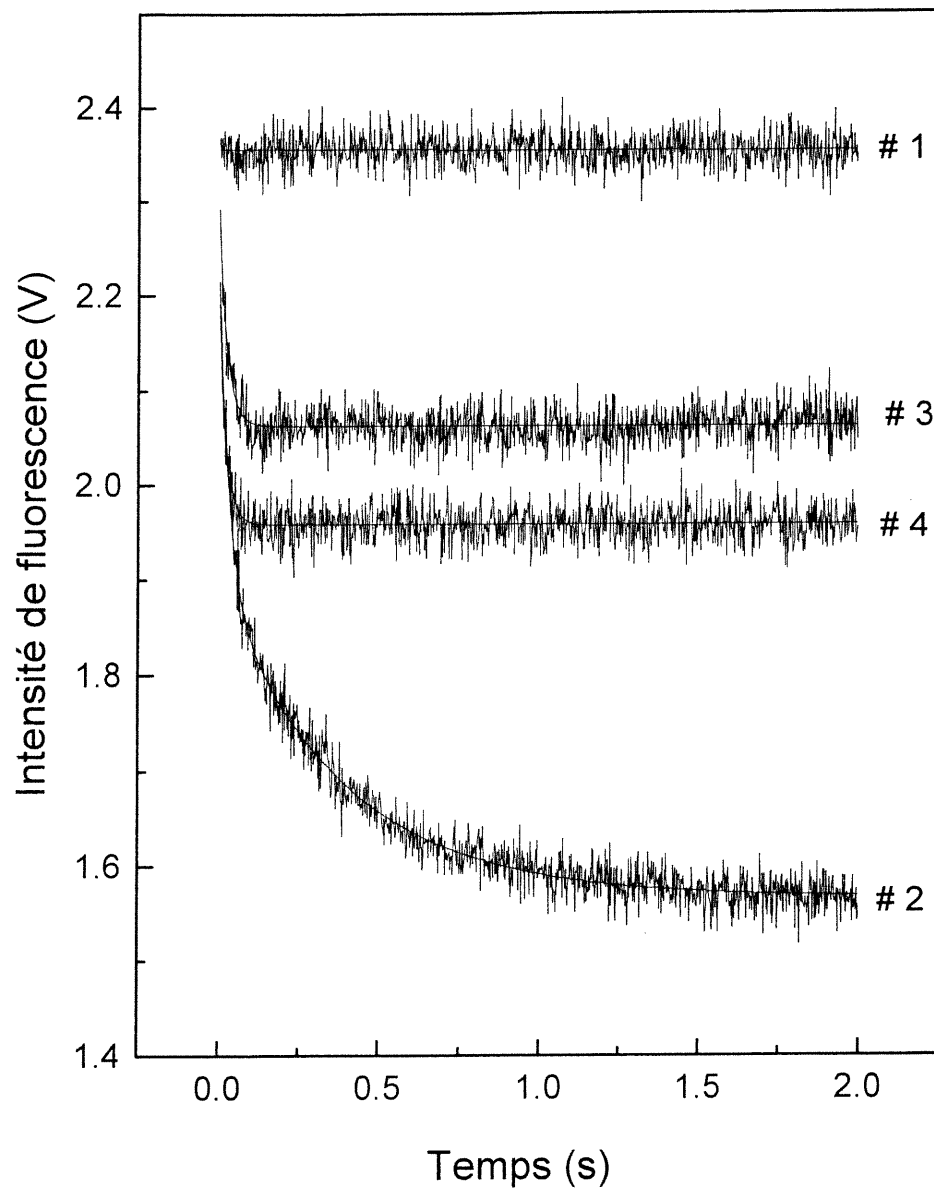


Figure 3.10: L'effet du cholestérol dans la bichouche pour la cinétique d'association peptide/lipides: #1 mélittine libre, #2 mélittine/POPC, #3 mélittine/(POPC avec 30%(mol) cholestérol), RI 90 et #4 mélittine/(POPC avec 30%(mol) cholestérol), RI 129.

cinétiques avec cholestérol, une simple exponentielle (équation 3.2) s'est avérée suffisante pour simuler les données. Le tableau 3.3 présente les paramètres résultant de la simulation de ces traces cinétiques monoexponentielles. Dans la figure 3.10, on peut observer que l'allure des traces cinétiques enregistrées pour le système mélittine-POPC/cholestérol est différente de l'allure de la trace mélittine-POPC. En comparant les constantes de vitesse, on peut voir que la cinétique d'association est légèrement plus rapide en présence de cholestérol (voir k_1 , Tableau 3.2 et k , tableau 3.3). On peut aussi remarquer que l'amplitude de la variation d'intensité en présence de cholestérol est environ trois fois plus faible que la variation totale lors des acquisitions sans cholestérol. Donc la présence de cholestérol dans les membranes entraîne des modifications au niveau de la cinétique d'interaction avec le peptide. On peut constater une légère augmentation de l'amplitudes lorsque le RI augmente bien que la vitesse n'est pas significativement affectée. Aussi, la valeur du point final (F) est légèrement diminuée, ce qui montre un faible déplacement de la bande de fluorescence de la mélittine.

3.3 Extinction de la fluorescence du tryptophane de la mélittine par le brome

Dans notre étude, nous avons utilisé les propriétés d'extinction de fluorescence du brome pour caractériser la cinétique d'insertion de la mélittine dans la bicouche de POPC. En même temps, nous avons analysé le rôle que joue la présence de charges négatives et de cholestérol dans les membranes pour cette cinétique. La structure des lipides bromés choisis, Br₂PC, ressemble à celle du

POPC, la chaîne oléoyl est remplacé par la chaîne dibromostéaroyl (57,58). Pour fin de comparaison, on a examiné l'extinction de la fluorescence par des 6,7Br₂PC et 9,10Br₂PC. Les vésicules de POPC sans le Br₂PC sont utilisées comme contrôle dans ces expériences.

A l'aide des spectres de fluorescence enregistrés pour le peptide seul et associé aux membranes de POPC, POPC/POPG (97/3) et POPC/Chol. (70/30) (figures 3.4 à 3.6), on trouve les longueurs d'onde correspondant aux points isoémissifs. Leurs valeurs sont présentées précédemment à la section 2.4. La figure 3.11 montre des spectres d'émission de la mélittine/POPC sans brome et avec 15% (mol) de Br₂PC. On peut voir sur cette figure que l'intensité de l'émission est diminuée par le brome. La présence de brome en position 9-10 induit une extinction d'environ 22%, tandis qu'en position 6-7, l'extinction est d'environ 26%. En même temps, sur la figure, on remarque que la forme des spectres ne se modifie pas. Cette caractéristique est observée aussi pour les spectres d'extinction de la mélittine en présence de vésicules de POPC avec 15% (mol) Br₂PC contenant du POPG ou du cholestérol. L'extinction en présence de 3% (mol) POPG est de 28 et 33% pour le 9-10 et le 6-7 Br₂PC respectivement. Par contre, en présence de 30% (mol) cholestérol l'extinction induite par le brome dans les deux positions est de seulement 10%. Les différences d'extinction observées seront discutées dans le chapitre suivant. Pour des SUV de phosphatidylcholine/phosphatidylserine (1/1) contenant 25 % de lipides bromés, la littérature rapporte une extinction de la fluorescence de la mélittine plus importante pour les positions 6-7 que pour les positions 9-10 (59). Ces résultats sont cohérents avec nos observations. La figure 3.12a montre la cinétique d'insertion de

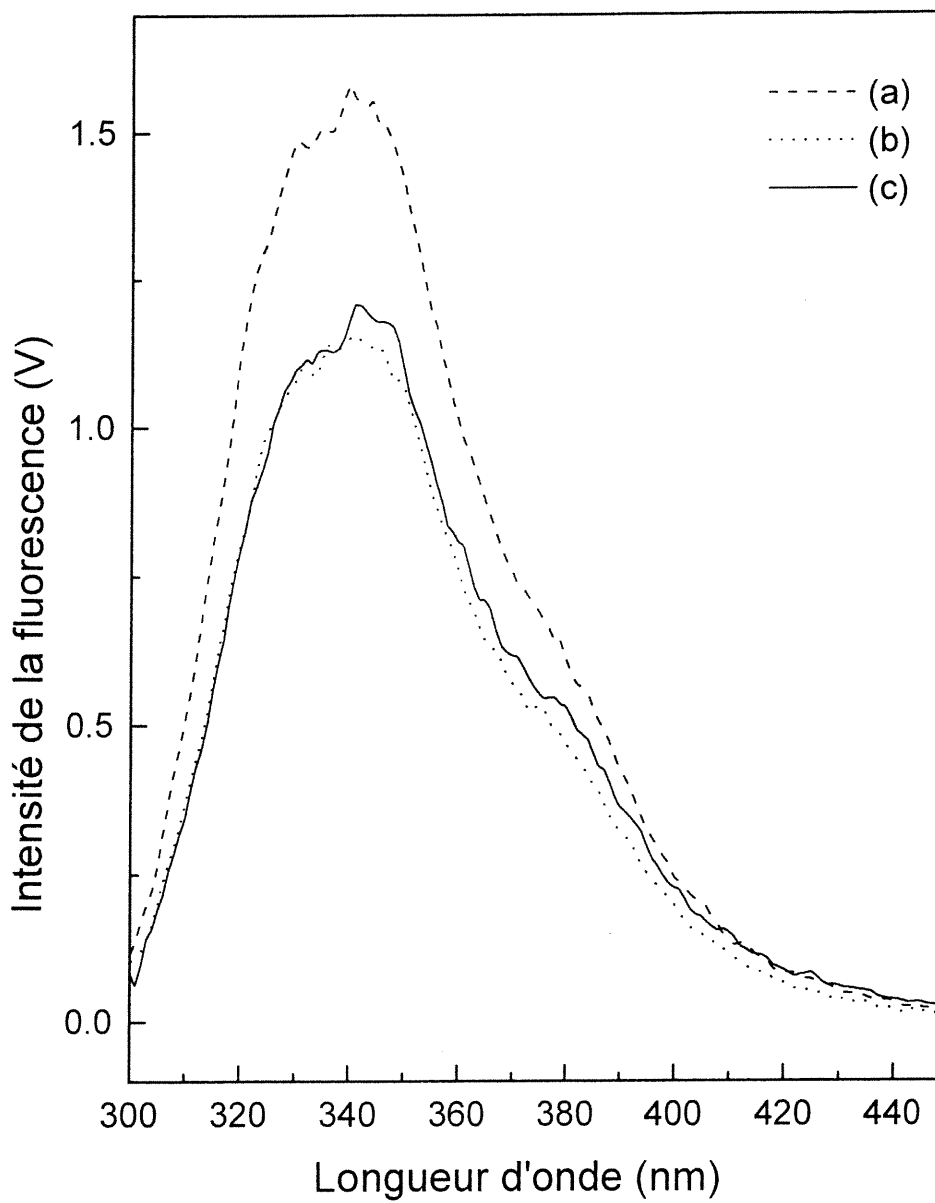


Figure 3.11: Spectres de fluorescence pour la mélittine en présence de POPC: a) sans lipides bromés (référence), b) avec 15% (mol) 6,7Br₂PC, c) avec 15% (mol) 9,10Br₂PC.

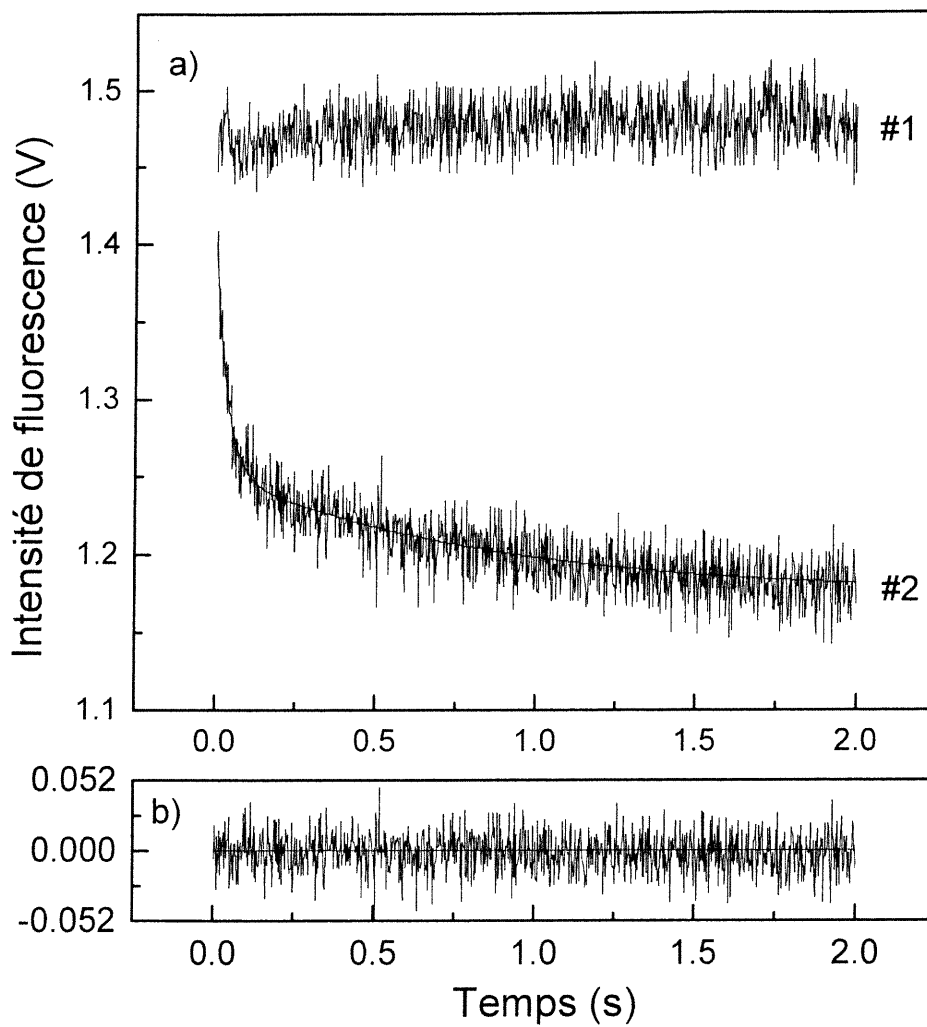


Figure 3.12: a) Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de POPC sans lipides bromés #1 (référence) et avec le 6,7Br₂PC #2, b) Le résidu pour la trace 2a

la mélittine/POPC avec 15% (mol) de 6-7 Br₂PC mesuré à 351 nm. La trace du haut montre la référence mélittine/POPC sans brome qui est horizontale et sans tendance particulière; ceci confirme le choix du point isoémissif. La cinétique est simulée avec une double exponentielle (équation 3.1) et la figure 3.12b présente le résidu. Les figures 3.13a et 3.13b montrent le résultat obtenu dans les mêmes conditions avec le lipide bromé en position 9-10.

Le rôle joué par la présence d'un faible pourcentage de charges négatives sur l'insertion du peptide dans les bicouches zwitterioniques bromées décrites précédemment a été étudié. La figure 3.14a présente la cinétique d'insertion de la mélittine dans les membranes de POPC/6-7Br₂PC/POPG, (82.5/14.5/3), enregistrée à 350 nm. La cinétique est simulée avec une double exponentielle et la figure 3.14b montre le résidu. Les figures 3.15a et 3.15b présentent les résultats obtenus dans les mêmes conditions pour des lipides bromés en position 9-10. Pour les systèmes POPC-Br₂PC/POPG (97/3), le point de départ des traces est sous le niveau de la référence, ce qui montre une perte de signal pendant le temps mort de l'appareil. Le phénomène d'insertion est donc relativement rapide par rapport à ce temps mort.

Le tableau 3.4 montre les paramètres obtenus des simulations de ces quatre cinétiques d'insertion. On peut voir que la cinétique d'insertion est plus rapide en présence de charges négatives tel qu'illustré par des valeurs de k_1 plus grandes. Par contre, les valeurs associées à la deuxième constante de vitesse (k_2) ne sont pas modifiées de façon significative pour les mêmes systèmes. Les paramètres préexponentiels A_1 et A_2 sont légèrement augmentés, excepté A_1 pour le système avec POPC/6,7Br₂PC/POPG. Dans ce cas, la diminution du paramètre A_1 semble

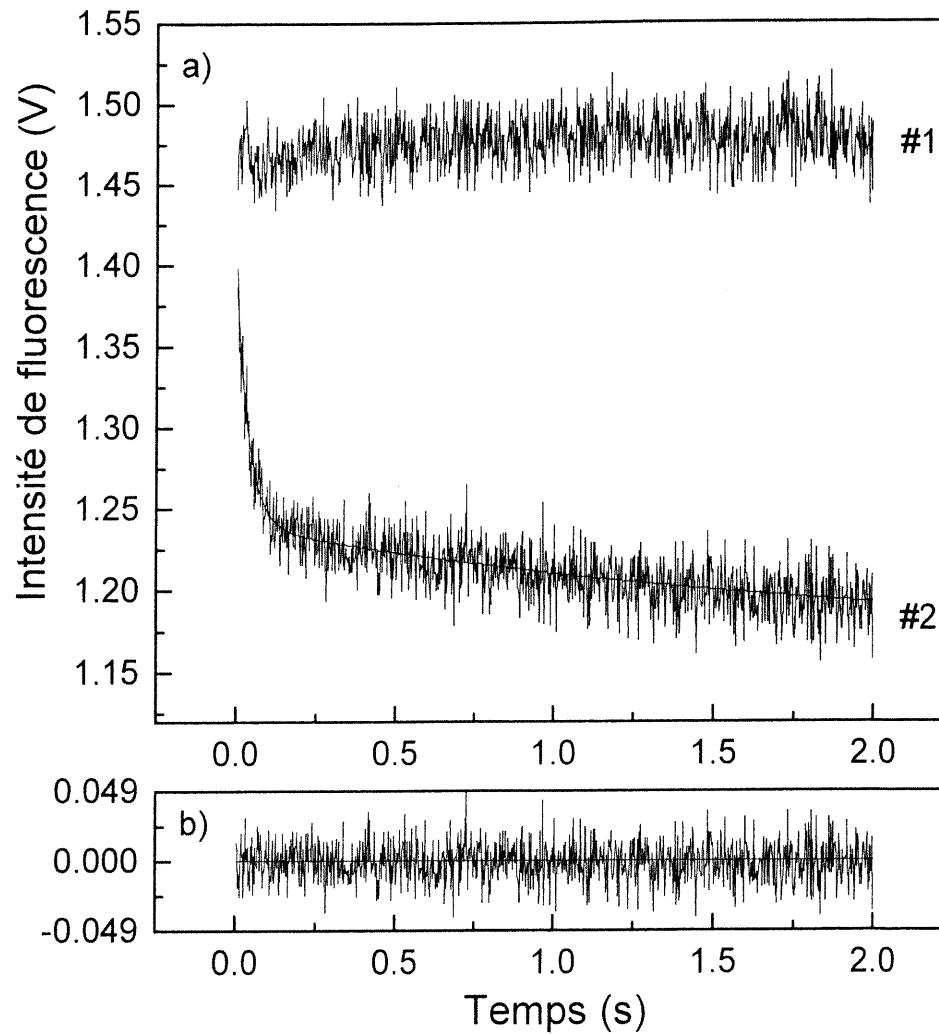


Figure 3.13: a) Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de POPC sans lipides bromés (référence) #1 et avec le 9,10Br₂PC #2, b) Le résidu pour la trace 2a

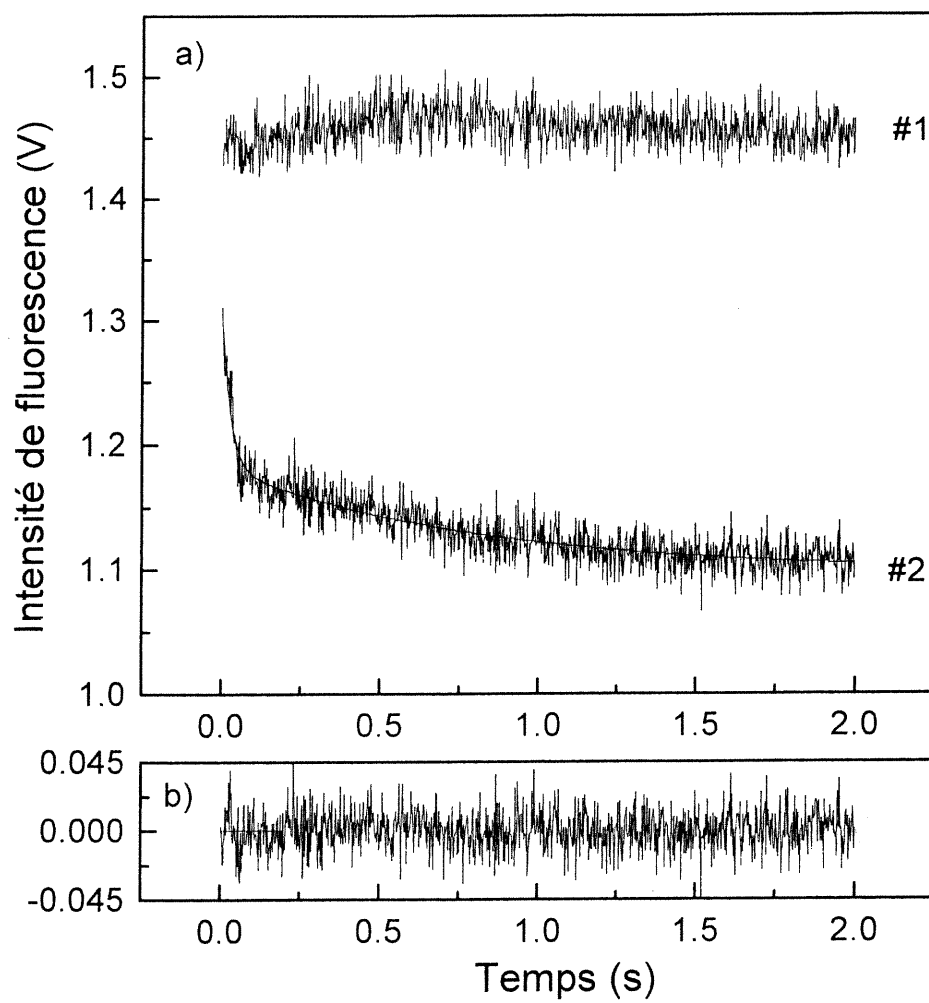


Figure 3.14: a) Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de LUV de POPC/POPG, (97/3) #1 et POPC/6,7Br₂PC/POPG, (82.5/14.5/3) #2, b) Le résidu pour la trace 2a.

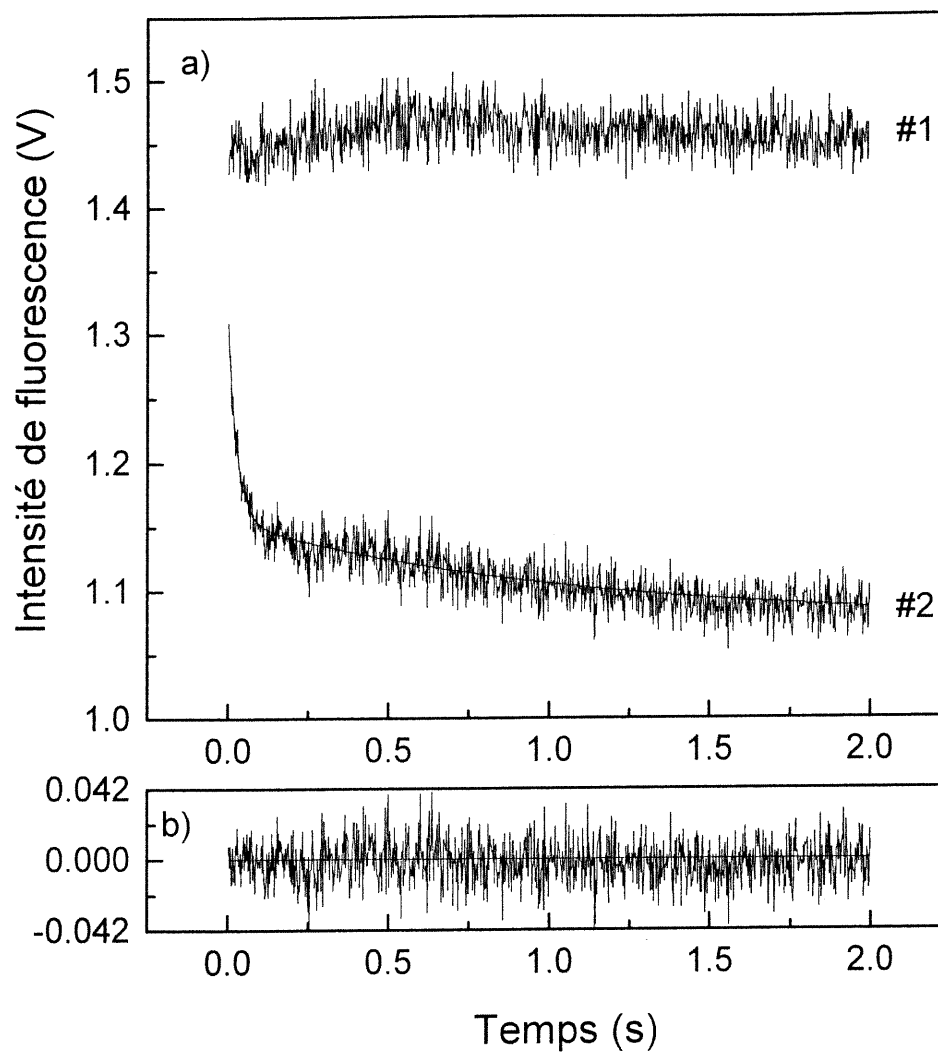


Figure 3.15: a) Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de LUV de POPC/POPG, (97/3) #1, POPC/9,10Br₂PC/POPG, (82.5/14.5/3) #2, b) Le résidu pour la trace 2a

Tableau 3.4: Paramètres cinétiques d'insertion de la mélittine dans des membranes de POPC/Br₂PC, (85/15) en présence ou en absence de 3% (mol) de POPG

Paramètres	(POPC/ 6,7Br ₂ PC) / mélittine	(POPC/ 9,10Br ₂ PC) / mélittine	(POPC/ 6,7Br ₂ PC/POPG) / mélittine	(POPC/ 9,10Br ₂ PC/POPG) / mélittine
^a A ₁	0.155 ± 0.008	0.154 ± 0.007	0.138 ± 0.007	0.162 ± 0.008
k ₁ (s ⁻¹)	29 ± 2	25 ± 2	38 ± 3	36 ± 3
^a A ₂	0.078 ± 0.003	0.073 ± 0.007	0.085 ± 0.002	0.080 ± 0.002
k ₂ (s ⁻¹)	1.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1
^a F	1.174 ± 0.002	1.167 ± 0.008	1.098 ± 0.002	1.075 ± 0.002
^b Variance	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002

^aVolt

^bVariance entre la simulation et les données expérimentales (Volt)²

être reliée à la perte de signal pendant le temps mort de l'appareil et pour cette raison, elle est peu significative du point de vue cinétique. Ces observations sont cohérentes avec la diminution de la valeur de F, qui est reliée à la somme de A₁ et A₂. Ces valeurs de F sont comparables aux signaux obtenus pour les spectres à l'équilibre à la longueur d'onde correspondante, ce qui démontre que les cinétiques sont complètes. La figure 3.16a montre la cinétique d'insertion de la mélittine dans des membranes de POPC/6,7Br₂PC/Chol, (60/10/30). La cinétique a été simulée par une simple exponentielle dont la figure 3.16b présente le résidu. L'extinction de la fluorescence du tryptophane de la mélittine par le 9-10Br₂PC a été aussi effectuée

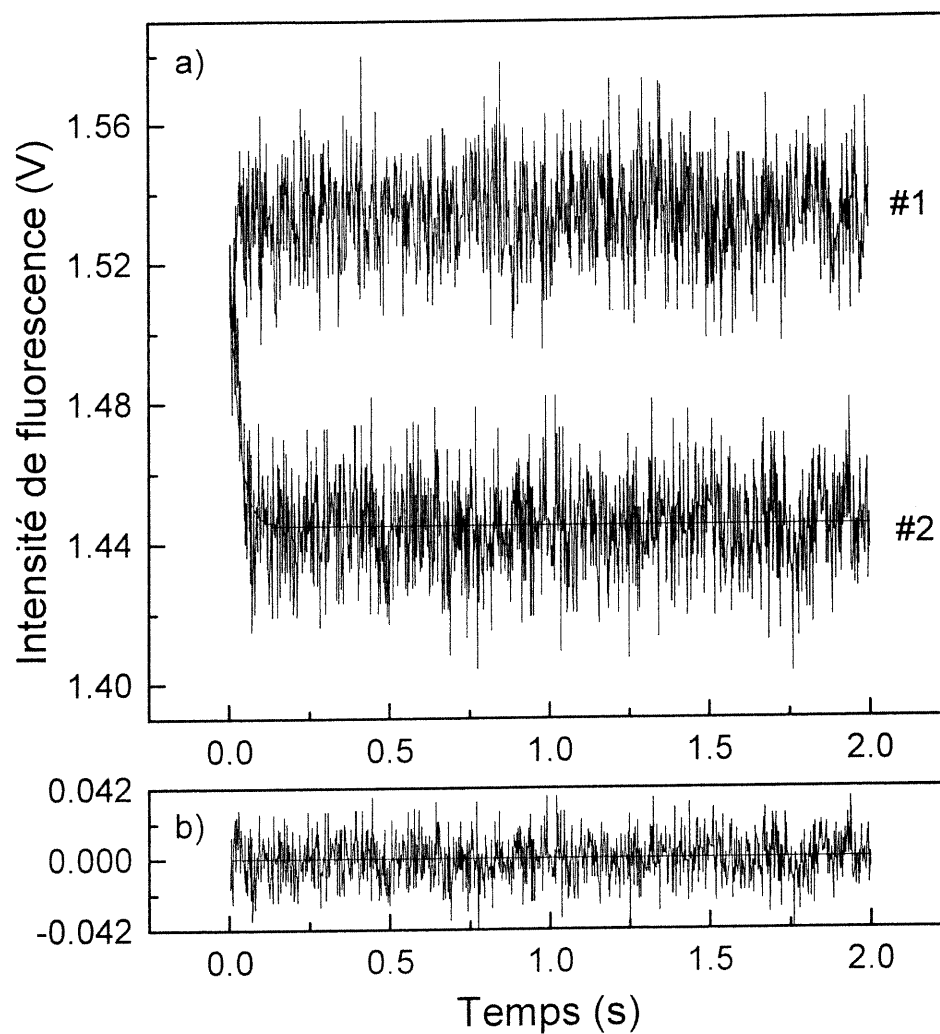


Figure 3.16: a) Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de LUV de POPC/Cholestérol, (70/30) #1, POPC/6,7Br₂PC/Cholestérol, (60/10/30) #2, b) Le résidu pour la trace 2a

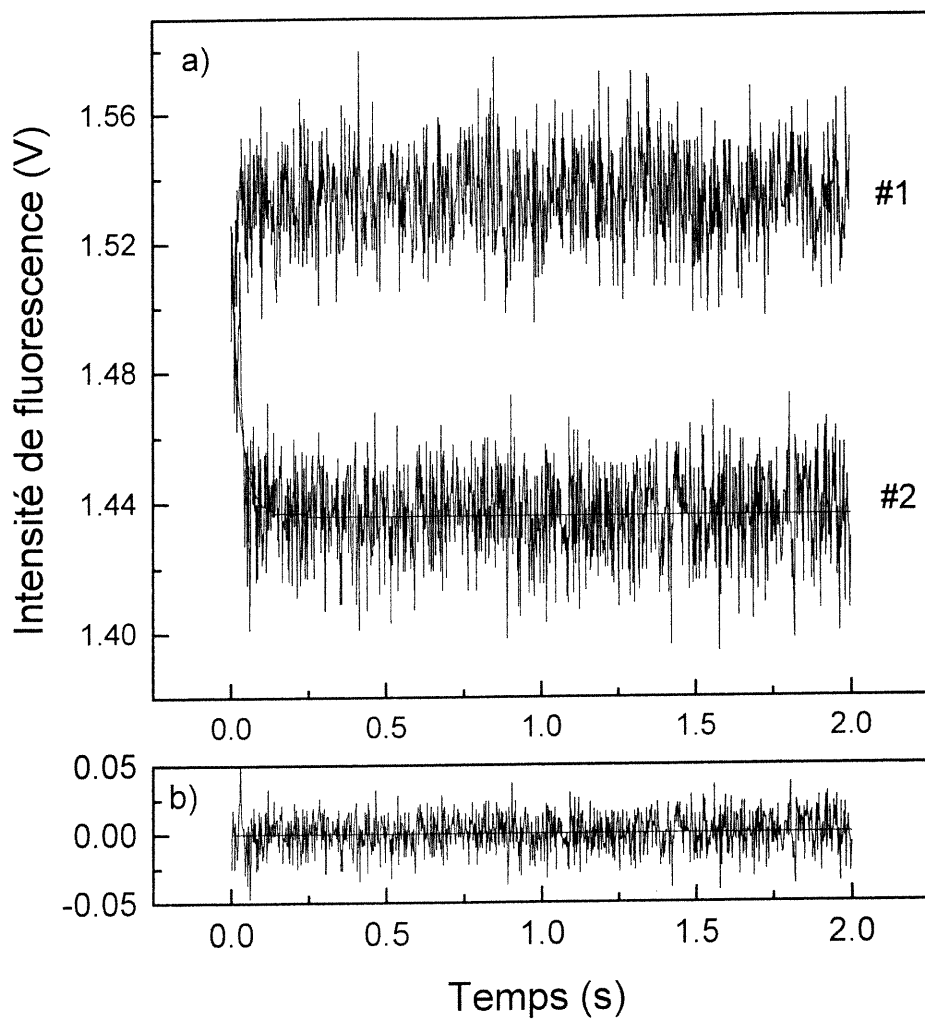


Figure 3.17: a) Extinction de la fluorescence en fonction du temps pour la mélittine en présence de LUV de POPC/Cholestérol, (70/30) #1 et POPC/9,10Br₂PC/Cholestérol, (60/10/30) #2. b) Le résidu pour la trace 2a.

Tableau 3.5: Paramètres cinétiques d'insertion de la mélattine dans des membranes de POPC/Br₂PC, (85/15) en présence de 30% (mol) de cholestérol

Paramètres	(POPC/6,7Br ₂ PC/chol.) / mélattine	(POPC/9,10Br ₂ PC/chol.) / mélattine
^a A	0.084 ± 0.007	0.084 ± 0.005
k (s ⁻¹)	35 ± 4	33 ± 3
^a F	1.445 ± 0.001	1.436 ± 0.001
^b Variance	0.0002	0.0002

^aVolt

^bVariance entre la simulation et les données expérimentales (Volt)²

pour le système dans les mêmes conditions et les figures 3.17a et 3.17b montrent les résultats cinétiques obtenus. Le tableau 3.5 montre les paramètres obtenus des simulations monoexponentielles (équation 3.2) en présence de cholestérol.

Les traces de référence des figures 3.16a et 3.17a ont été mesurées à 346 nm avec POPC/Cholestérol (70/30) en absence de brome. On remarque que ces traces sont horizontales, ce qui indique qu'elles ont été mesurées au point isoémissif pour séparer la cinétique d'insertion de la cinétique d'association. On peut voir dans les tableaux 3.4 et 3.5 que la cinétique d'insertion est plus rapide en présence de cholestérol ou de charges négatives qu'avec le POPC-Br₂PC seul. De plus, l'extinction de la fluorescence de la mélattine est toujours légèrement plus rapide avec le 6-7Br₂PC qu'avec le 9-10Br₂PC. Cette différence est à la limite de l'erreur

expérimentale mais elle est observée systématiquement pour tous les types de membrane étudiés.

3.4 Changements conformationnels lors d'interaction mélattine/membranes analysés par DC

Le dichroïsme circulaire a été utilisé pour observer les changements de structure secondaire de la mélattine induits par la présence de membranes lipidiques. Les solutions de mélattine préparées ont une concentration de 35 μM , conditions où le peptide se trouve principalement sous forme désordonnée (21). La solution de mélattine est mélangée à des vésicules, ce qui induit un changement de conformation du peptide qui passe d'un arrangement statistique à une forme d'hélice α lors de son interaction avec les membranes. Le but de cette série d'expériences est de déterminer la cinétique de formation des hélices α en présence de membranes lipidiques par DC.

Dans un premier temps, on détermine les proportions d'hélice α pour la mélattine libre et en présence de LUV en prenant des spectres de DC à l'équilibre. La figure 3.18 montre les spectres de DC pour la mélattine libre dans deux tampons de concentration saline différente et pour la mélattine en présence de 3 types différents de vésicules. L'effet de la force ionique a été aussi vérifié en présence de vésicules.

En absence de vésicules, l'ellipticité molaire moyenne par résidu $[\theta]$ varie très peu, le signal de DC est pratiquement constant. Pour des concentrations en mélattine inférieure à 0.1 mM et dans des milieu à faible force ionique, des valeurs de $[\theta]$ variant de -3500 à -5400 $\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ sont rapportées (11,60,61). Ces valeurs

concordent assez bien avec la nôtre qui est donnée au tableau 3.6 (-4000 deg·cm²/dmol). La valeur de $[\theta]$ observée à 222 nm correspond à environ 14% d'hélice α . Les deux spectres obtenus pour différentes forces ioniques sont semblables, on conclut donc que cette modification du milieu a très peu d'effet sur la conformation adoptée par la mélittine. Ceci indique que les résultats obtenus à partir des deux milieux peuvent être comparés. En présence de LUV, les spectres montrent dans tous les cas un minimum prononcé entre 215 et 225 nm ce qui est caractéristique de la présence d'hélice α . Les valeurs d'ellipticité molaire moyenne par résidu à 222 nm pour différents systèmes sont présentés dans le tableau 3.6. Avec l'équation 2.2 la proportion d'hélice α peut être calculée et les résultats sont donnés dans le même tableau.

L'ellipticité de la mélittine en présence de 3% (mol) POPG a été mesurée en utilisant des tampons avec des concentrations salines différentes: 5 mM HEPES, 2mM EDTA à pH 7.4 avec 10 et 20 mM de NaCl. On peut remarquer sur la figure 3.18, comme dans le cas de la mélittine libre, que l'effet du changement limité en concentration saline sur la conformation adoptée par le peptide est pratiquement nul.

La même figure nous montre que les spectres DC en présence de LUV de POPC contenant 3% (mol) de POPG ont une ellipticité légèrement différente du spectre en absence de lipides anioniques. Cependant, compte tenu de l'erreur sur la mesure qui est d'environ 15%, l'écart n'est pas vraiment significatif.

Cette figure montre aussi le spectre DC enregistré pour la mélittine en présence d'un mélange POPC/cholestérol, (70/30). On remarque que la formation

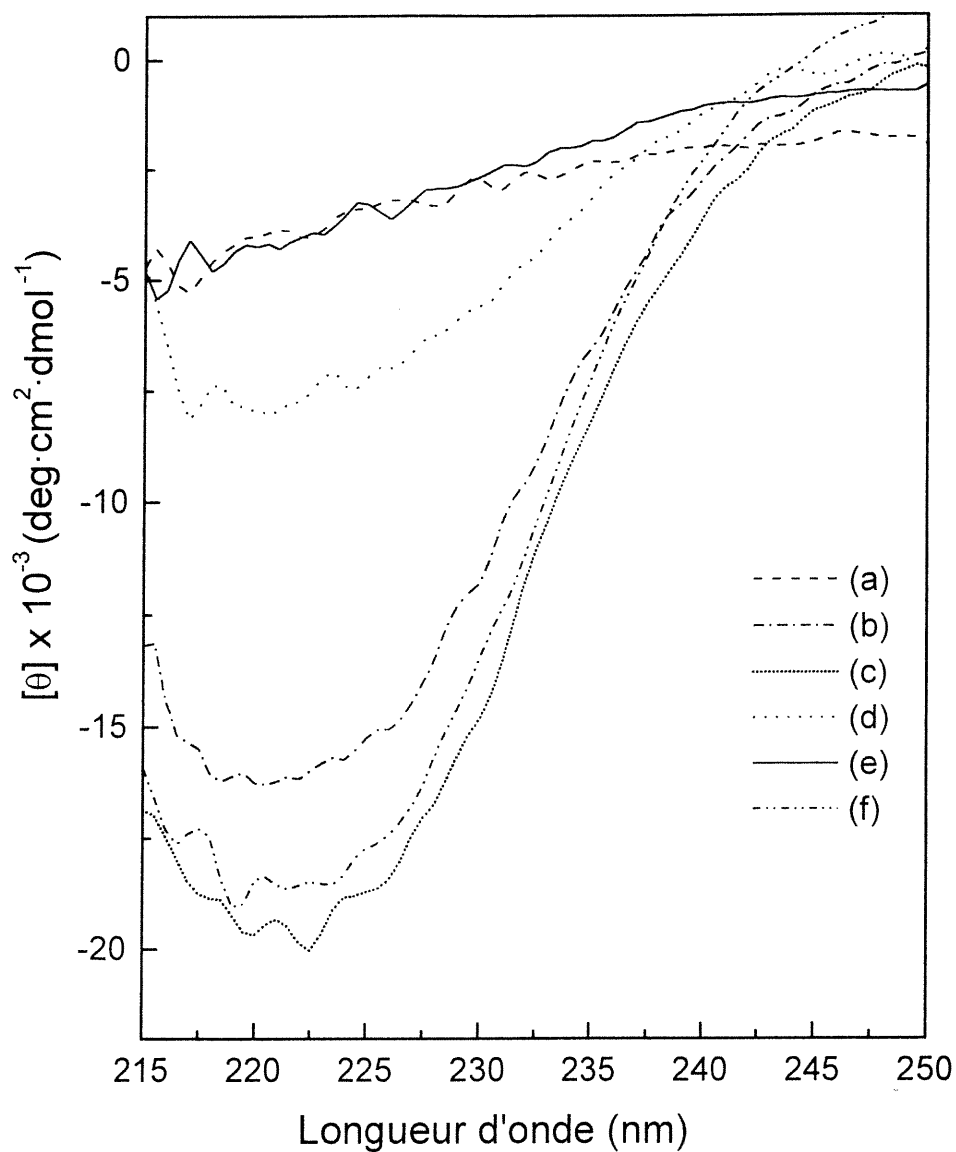


Figure 3.18: Spectres DC pour: a) la mélittine libre^{*}, b) en présence de POPC^{*}, c) en présence de POPC/POPG^{*}, d) en présence de POPC/Cholestérol^{*}, e) libre^{**}, f) en présence de POPC/POPG^{**}

^{*} tampon avec 10mM NaCl

^{**} tampon avec 20mM NaCl

Tableau 3.6: Les valeurs d'ellipticité molaire et d'hélice α pour le peptide seul ou associé aux membranes

Type du spectre	Mélistine ^{a,b}	Mélistine / POPC ^a	Mélistine / [POPC/POPG (97/3)] ^a	Mélistine / [POPC/POPG (97/3)] ^b	Mélistine / [POPC/ Chol. (70/30)] ^a
Ellipticité molaire résiduelle ^c [θ] ₂₂₂ x 10 ⁻³ (deg cm ² dmol ⁻¹)	-4	-16.2	-19.8	-18.6	-7.7
Fraction d'hélice α , f $_{\alpha}$, (%)	14	50	60	55	25

^a10 mM NaCl dans le tampon

^b20 mM NaCl dans le tampon

^cerreur calculée (15%)

d'hélice α est moins favorisée dans ce cas, le pourcentage d'hélice α chutant de moitié.

La longueur d'onde de 222 nm est sélectionnée pour l'enregistrement des acquisitions cinétiques. A cette longueur d'onde, on peut observer la plus grande différence d'ellipticité entre les conformations de la mélistine seule et de la mélistine en présence de vésicules. La figure 3.19a montre la cinétique d'enroulement en hélices α induite par la présence des LUV de POPC. Dans la même figure, on peut voir la référence obtenue avec la mélistine en absence de vésicules. Dans ce cas,

l'ellipticité ne varie pas en fonction du temps. Comme les deux acquisitions ont approximativement la même ellipticité au temps le plus court, on peut considérer que le début de la trace cinétique est mesuré. Une double exponentielle décrite par l'équation 3.1 a été de nouveau utilisée pour simuler la cinétique. Le résidu est montré à la figure 3.19b. Les paramètres cinétiques sont présentés au tableau 3.7. L'effet de la présence des charges négatives dans les membranes sur cette cinétique a été examiné. La figure 3.20a montre la variation d'ellipticité en fonction du temps en présence d'un mélange lipidique de POPC/POPG, (97/3). La mélittine libre a été à nouveau utilisée comme référence dans le même tampon avec 10 mM NaCl (trace du haut). Sur la figure, on remarque une légère perte du signal pour le début de la décroissance. Cette perte est vraisemblablement causée par le temps mort de l'appareil. La cinétique a été simulée avec une double exponentielle (équation 3.1) et la figure 3.20b présente le résidu. La première constante de vitesse k_1 est de 20 et 23 s^{-1} en absence et en présence de POPG. La deuxième constante de vitesse k_2 est aussi indiquée au tableau 3.7. On peut aisément voir que la première exponentielle est la plus importante, car dans les deux cas, A_1 est environ deux fois plus grand que A_2 . La valeur finale F est comparable aux valeurs obtenues pour les spectres à l'équilibre, ce qui confirme que les cinétiques sont complètes. Tout comme pour les spectres en équilibre, le système avec 3% (mol) POPG a été étudié en mode cinétique dans le tampon plus concentré en NaCl. Les ressemblances observées pour les deux traces de la figure 3.21 et les valeurs obtenues pour les simulations (tableau 3.7) nous permettent de considérer que les cinétiques sont pratiquement identiques, l'effet de la force ionique est donc négligeable pour ce cas. Il faut préciser que l'effet

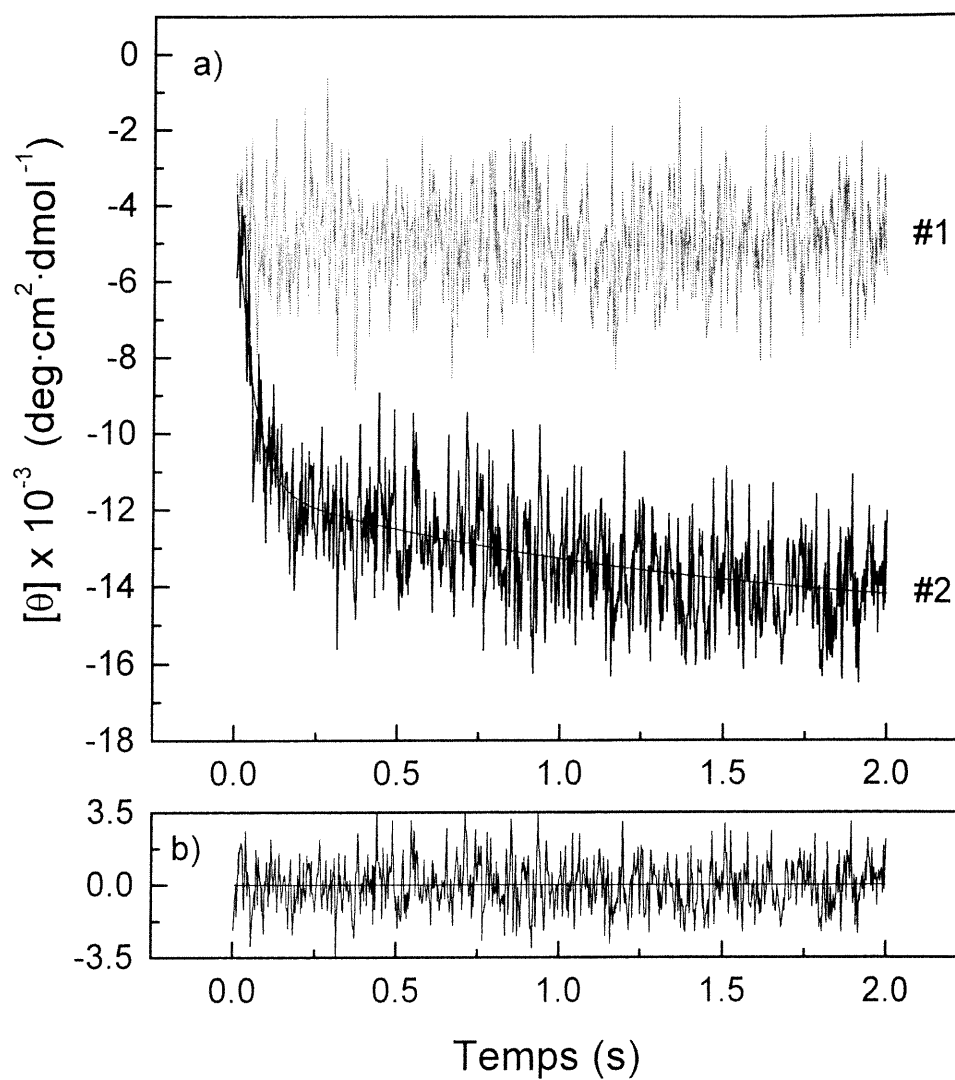


Figure 3.19: a) Cinétique d'enroulement en hélice α de la mélittine libre (référence) #1 et en présence de POPC #2. b) Le résidu pour la trace 2a

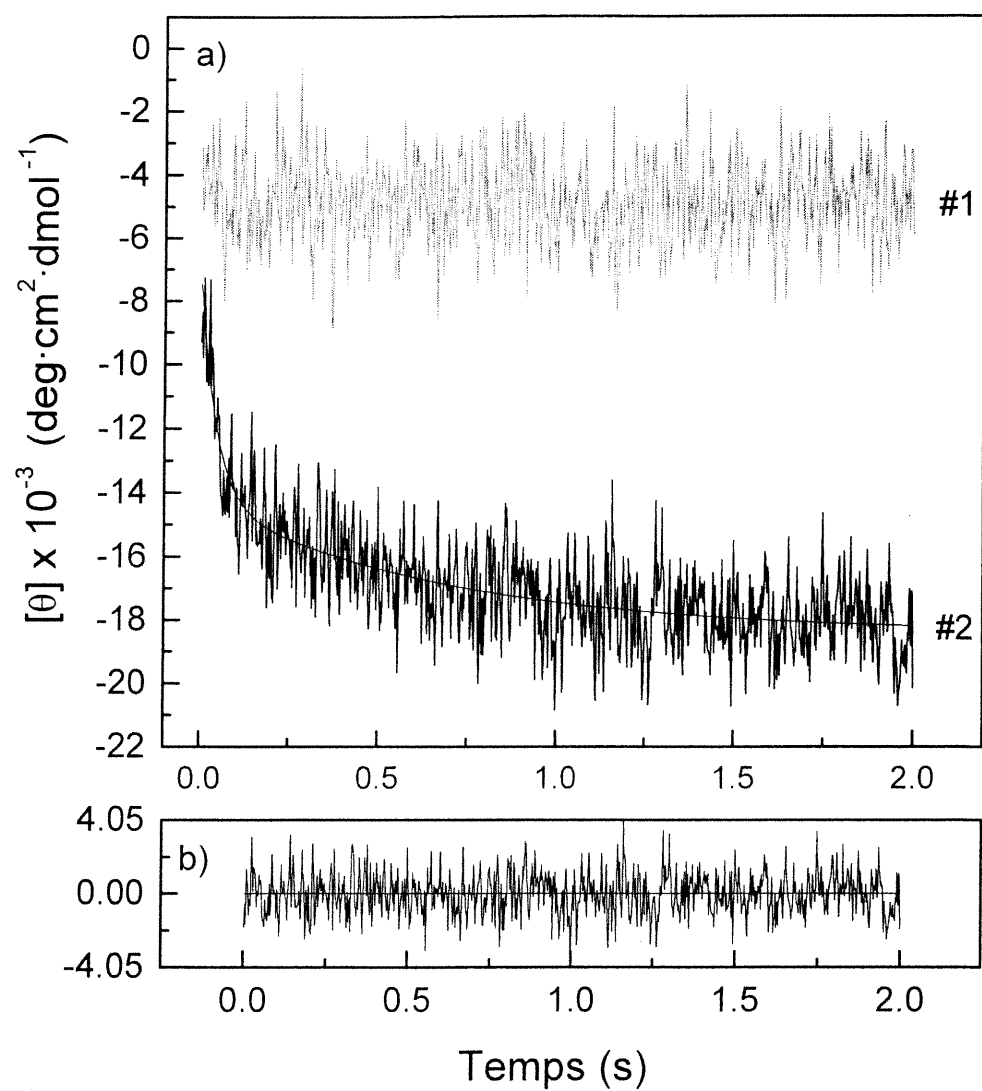


Figure 3.20: a) Cinétique d'enroulement en hélice α de la mélittine libre (référence) #1 et en présence de POPC/POPG, (97/3) #2. b) Le résidu pour la trace 2a

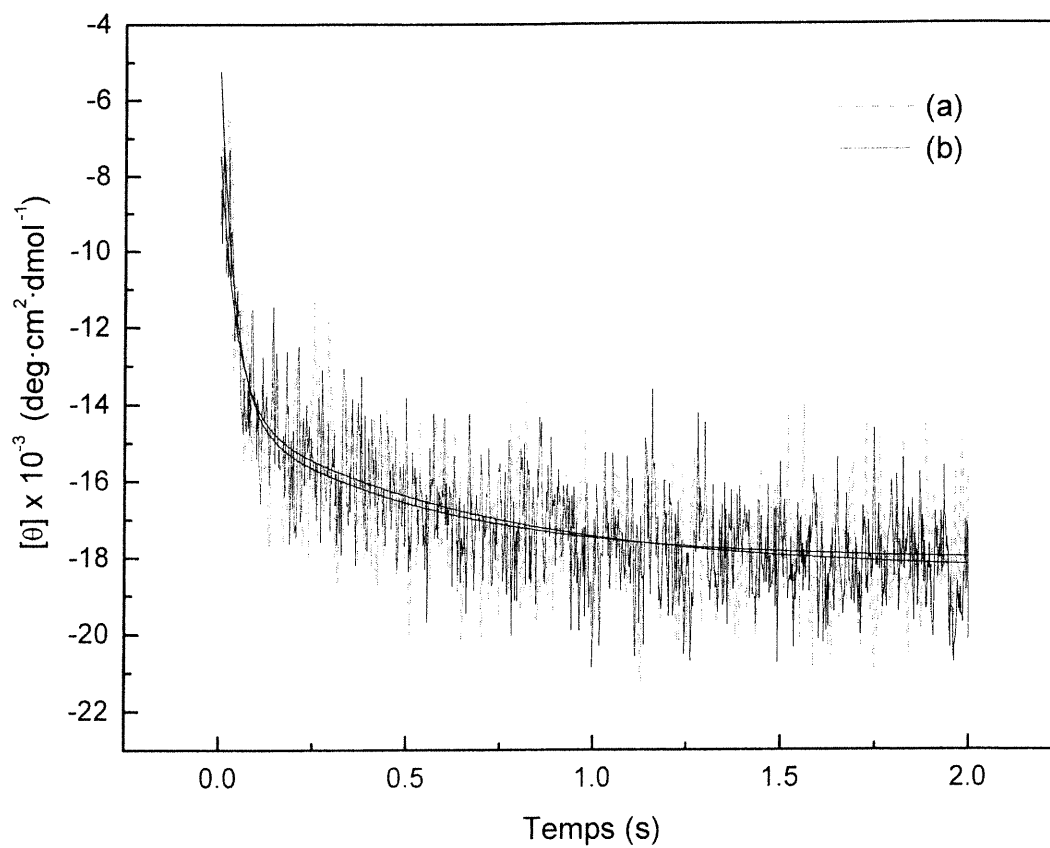


Figure 3.21: Effet du tampon salin sur la cinétique d'enroulement en hélice α de la mélattine en présence de POPC/POPG, (97/3). a) 10 mM NaCl
b) 20 mM NaCl

de la force ionique du tampon a été vérifié pour le peptide en présence de vésicules contenant des charges négatives, car ce système est le plus susceptible d'être affecté. Tous les autres systèmes ont été analysés en utilisant seulement le tampon moins riche en sel.

D'après le tableau 3.7, on observe que la présence de charges négatives induit seulement des changements mineurs sur la cinétique d'enroulement. Les amplitudes sont environ les mêmes, les deux constantes de vitesse k_1 et k_2 sont légèrement plus rapides en présence de charges négatives.

Tableau 3.7: Paramètres cinétiques d'enroulement en hélices α de la mélittine en présence de membranes zwitterioniques avec ou sans charges négatives

Paramètres	Mélittine / POPC ^a	Mélittine / [POPC/POPG, (97/3)] ^a	Mélittine / [POPC/POPG, (97/3)] ^b
^c A ₁	8.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	9.5 ± 0.6
k ₁ (s ⁻¹)	20 ± 2	23 ± 3	25 ± 3
^c A ₂	3.7 ± 0.3	4.2 ± 0.2	3.8 ± 0.3
k ₂ (s ⁻¹)	0.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.3
^c F	-15.1 ± 0.4	-18.4 ± 0.2	-18.1 ± 0.1
^d Variance	1.37	1.36	1.61

^atampon 5 mM HEPES, 2 mM EDTA, 10 mM NaCl

^btampon 5 mM HEPES, 2 mM EDTA, 20 mM NaCl

^cdeg·cm²·dmol⁻¹

^dVariance entre la simulation et les données expérimentales (Volt)²

Dans un dernier temps, on a étudié l'effet de la présence du cholestérol dans les membranes sur la cinétique d'enroulement en hélices α pour le peptide. La figure 3.22a montre les traces cinétiques enregistrées pour la mélittine seule (la référence) et pour la mélittine en présence de LUV de POPC avec 30% (mol) de cholestérol. Dans ce cas, on remarque que même si chaque trace représentée est une moyenne de 500 acquisitions, la valeur du rapport signal sur bruit reste encore faible. Une simple exponentielle a été utilisée pour simuler la cinétique. Le tableau 3.8 montre les valeurs obtenues pour ces paramètres et sur la figure 3.22b on peut voir le résidu.

Tableau 3.8: Paramètres cinétiques d'enroulement en hélices α de la mélittine en présence de membranes zwitterioniques avec cholestérol

Paramètres	Mélittine / [POPC/ Chol. (70/30)]
^a A	3.2 ± 0.5
k (s ⁻¹)	28 ± 6
^a F	-7.300 ± 0.003
^b Variance	1.0

^a $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$

^bVariance entre la simulation et les données expérimentales (Volt)²

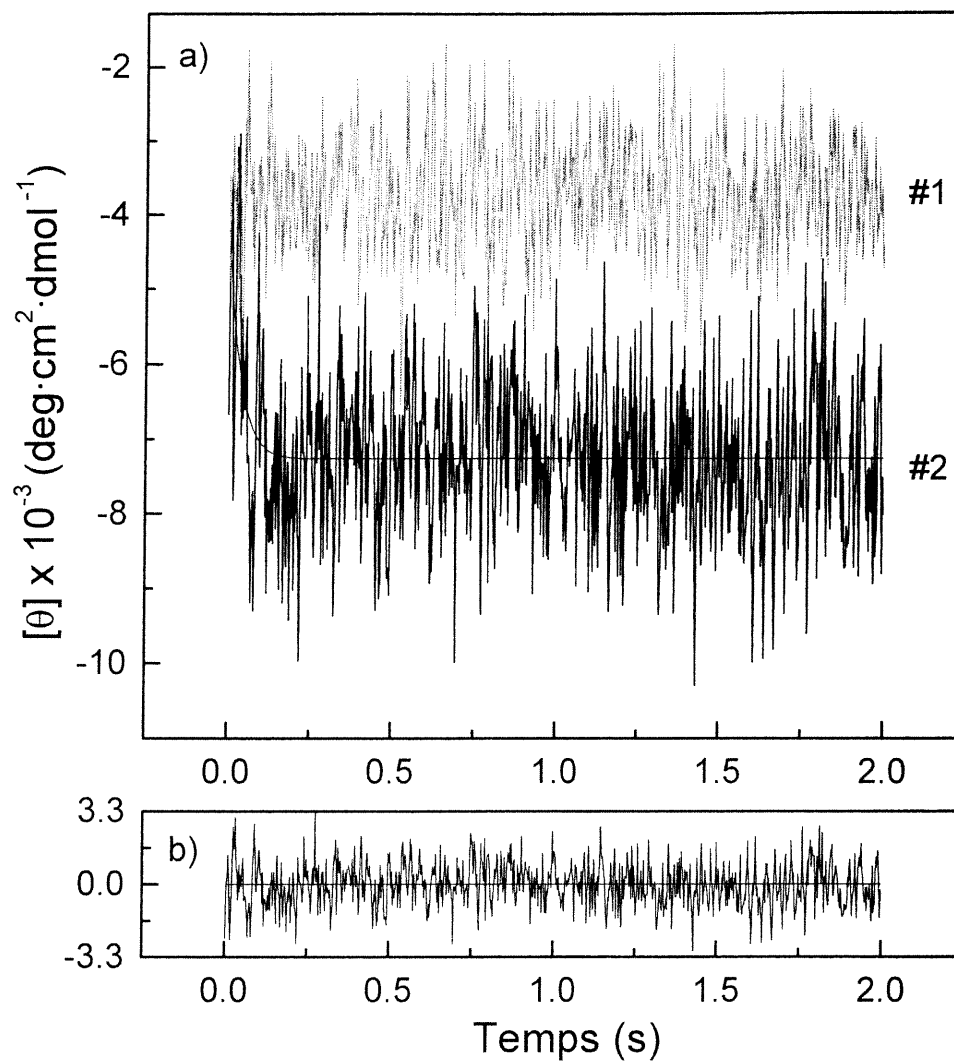


Figure 3.22: a) Cinétique d'enroulement en hélice α de la mélattine libre (référence) #1 et en présence de POPC/Cholestérol, (70/30) #2. b) Le résidu pour la trace 2a

En comparant ces résultats avec ceux obtenus pour la POPC, on constate que la présence de cholestérol dans les membranes induit la disparition de la deuxième exponentielle. On remarque aussi, une légère augmentation de la constante de vitesse (k) et une diminution importante au niveau de l'amplitude du changement, ce qui est observable par les paramètres F et A (environ 30% du changement observable avec POPC).

Chapitre 4: Discussion

4.1 *Système mélittine/POPC*

L'analyse de la cinétique d'association mélittine/lipides zwitterioniques a été entreprise par trois techniques dans le but d'établir dans quelle séquence se produisent les événements qui font que le peptide passe de la forme libre désordonnée à une forme associée en hélice α . La pénétration a été observée de deux façons indépendantes. D'abord, elle a été détectée à partir du changement de polarité de l'environnement du tryptophane. Deuxièmement l'extinction de la fluorescence du tryptophane par les lipides bromés a montré l'exposition de ce résidu aux chaînes acyles des lipides. La structuration de la mélittine est suivie par dichroïsme circulaire. Mais tout d'abord, l'allure des spectres de fluorescence à l'équilibre nous donne des informations préliminaires sur la nature de l'interaction mélittine-lipides.

Premièrement, les expériences de fluorescence de la mélittine en présence de vésicules nous ont permis d'observer des changements importants de la longueur d'onde du maximum d'émission du tryptophane. Le maximum d'émission passe de 354 nm, une valeur caractéristique du tryptophane exposé au milieu aqueux, à 339 nm, résultant d'un environnement peu polaire (1). Ce déplacement de 15 nm vers le bleu et l'augmentation de l'intensité de fluorescence observés sont caractéristiques de l'association du peptide aux LUV de POPC (1,36,62). On peut conclure que le tryptophane a changé d'environnement, passant de la phase aqueuse à la membrane lipidique qui est un microenvironnement avec une constante diélectrique plus faible

(45). Deuxièmement, les expériences d'extinction avec le brome permettent de localiser approximativement le tryptophane dans la bicouche. Les lipides bromés sont miscibles avec la POPC qui est analogue (63). De plus, il a été proposé que les atomes de brome sont de petites dimensions et les bicouches qui les contiennent ne sont pas perturbées par leur présence (63). En fait, les bicouches formées par le 6,7Br₂PC et le 9,10Br₂PC sont environ de la même épaisseur que la bicouche de POPC à plus ou moins 1 Å (64). Les lipides dibromés ont été choisis car la position des halogènes dans la bicouche a été établie par la diffraction de rayon X (64). Pour la 6,7 et la 9,10 Br₂PC, l'épaisseur totale de la bicouche formée est de 49 Å et celle de la partie hydrophobe, de 29 Å. Par rapport au centre de la bicouche, les bromes sont en moyenne situés à 11 Å pour la position 6,7 et à 8.3 Å pour la position 9,10. La distance moyenne entre les bromes 6,7 et 9,10 et l'interface hydrophobe/hydrophile est donc de 3.5 Å et 6.2 Å respectivement (64). Cette position n'est évidemment pas fixe, la distribution de probabilité de la position des atomes de brome a été modélisée par une distribution Gaussienne dont la largeur à mi-hauteur est d'environ 4 Å (64). Il a été démontré que l'extinction par les lipides bromés est un processus qui résulte d'interactions dipôle-dipôle entre le brome et le tryptophane (46). L'efficacité du transfert d'énergie (Förster transfer) est dépendante de la distance Trp-Br. Pour chaque paire donneur-accepteur, l'efficacité est dépendante de $r_0^6/(r_0^6+r^6)$, où r est la distance entre les deux groupes et r_0 est la distance à laquelle l'efficacité du transfert est de 50% (9.25 Å pour le couple Trp-Br) (63,64). Nos résultats montrent une extinction de la fluorescence du tryptophane de 26% par la 6,7Br₂PC et de 22% par la 9,10Br₂PC.

On peut estimer la position du tryptophane à partir de ces mesures. Tout d'abord, on suppose que toute la mélattine est liée aux membranes de POPC pour un RI de 90, en se basant sur les courbes d'absorption déjà publiées (36). Ensuite, on peut utiliser une courbe de la littérature qui associe l'efficacité d'extinction avec la distance tryptophane-brome pour des bicouches (46). Cependant, cette courbe est valable pour des bicouches constituées à 100% de lipides bromés. Si on suppose que l'efficacité d'extinction varie linéairement avec le contenu en lipides bromés (65), on peut extrapoler l'extinction à 100% de lipides bromés à partir des résultats obtenus avec deux pourcentages de lipides bromés, soit 0 et 15%. A partir de ces résultats d'extinction extrapolés à 100% de lipides bromés, on peut estimer les distances tryptophane-brome. Les deux extincteurs bromés nous indiquent que le tryptophane semble être localisé au niveau du glycérol pour la mélattine/POPC, à une distance moyenne d'environ 17 Å du centre de la bicouche. Cette position est en accord avec les résultats obtenus par d'autres études (20,61,62,66). Une telle position favorise la formation des ponts hydrogène entre le cycle indole du tryptophane et les groupements à l'interface (3) ainsi que les interactions électrostatiques entre les groupements phosphates et les acides amines chargés positivement de la mélattine (25). Troisièmement, d'après l'allure des spectres DC, la structure secondaire adoptée par le peptide se modifie en présence des membranes de POPC. La fraction d'hélice α formée par le peptide augmente à 50% si on se base sur l'ellipticité molaire mesurée à 220 nm. La littérature indique aussi une grande augmentation d'ellipticité de la mélattine lors de son adsorption aux membranes; cependant une quantité légèrement supérieure d'hélice α est rapportée soit environ 65-70%. Il est

possible que l'absorbance élevée en UV du tampon HEPES que nous avons utilisé interfère avec la mesure de dichroïsme et soit à l'origine de l'écart observé. Nous avons toutefois décidé de conserver ce tampon pour avoir des conditions similaires aux mesures de fluorescence.

Le but principal de nos travaux est d'établir la séquence d'association, d'insertion et d'enroulement de la mélittine par des mesures cinétiques. Le terme 'association' peut avoir différentes connotations. Dans cette étude, il est employé pour désigner le changement de milieu de la mélittine, c'est-à-dire le transfert de la phase aqueuse vers la surface de la bicouche lipidique. Pour les méthodes spectroscopiques de fluorescence et de dichroïsme circulaire, la cinétique est décrite par une double exponentielle. Quelques hypothèses sont possibles pour expliquer la présence de deux phases distinctes dans la cinétique d'interaction. Premièrement, il pourrait y avoir l'existence de deux populations de mélittine en solution aqueuse qui interagissent différemment avec la membrane. Ceci doit être considéré spécialement puisque l'existence d'un équilibre entre les formes monomère et tétramère est connue (4). L'analyse des spectres CD indique que cette situation est peu probable puisque nous mesurons initialement une ellipticité molaire typique du monomère (5). Les conditions expérimentales semblent donc être favorables pour le monomère de la mélittine en solution (21,67). Deuxièmement, il est aussi possible qu'un potentiel électrostatique positif se crée à la surface de la membrane après l'adsorption d'un certain nombre de molécules de mélittine, ce qui peut ralentir la cinétique d'association des mélittines aux vésicules. Cependant, ce processus serait progressif et il serait surprenant qu'il puisse mener aux deux exponentielles que nous pouvons

résoudre. De plus, il a été montré (20) que la variation d'énergie libre associé au transfert de la mélittine de la solution à la bicouche était à peu près indépendante de l'adsorption préalable d'autres mélittines. L'effet de mélittine déjà adsorbée se fait sentir principalement par la création d'un potentiel de surface positif sur la bicouche, ce qui diminue la concentration de la mélittine près de l'interface. Dans notre cas, nous croyons que l'adsorption n'est pas limitée par la diffusion des mélittines vers la bicouche.

L'hypothèse que nous proposons pour expliquer la double exponentielle est que le mécanisme d'interaction se déroule en deux étapes. Premièrement la mélittine est adsorbée en surface et, dans un deuxième temps, se produit une réorganisation du peptide au niveau de la membrane telle que l'agrégation ou une pénétration plus profonde. Comme les temps associés aux deux mécanismes sont de l'ordre de la millisecondes, on exclut la possibilité d'observer dans nos traces cinétiques les phénomènes de translocation. Ce sont des processus plus lents, de l'ordre de quelques minutes (27,39).

Des études ont montré que la mélittine induit le relargage du matériel contenu dans des vésicules (28,39,40,68). Il a été proposé que ce phénomène soit lié à la formation des pores (39,40,68). Dans un des modèles proposés (40), la formation des pores est caractérisée par une constante de vitesse (k) de 0.046 s^{-1} , ce qui est plus lent que les k_2 mesurés ici. Donc l'agrégation ne semble pas correspondre à la deuxième phase que nous avons observée.

Dans le cas des premières constantes de vitesse de la double exponentielle, (tableau 4.1) la constante associée à la variation d'environnement du tryptophane est

plus rapide que celles associées à l'extinction ou à la variation d'ellipticité. Ceci implique que la mélittine désordonnée (monomère) est associée dans un premier temps à la membrane ($\tau_{\text{association}} = 31$ ms, cinétique de fluorescence sans brome). Cette adsorption du peptide à la surface est suivie d'une pénétration partielle du fluorophore dans la région moins polaire de la bicouche en phase liquide cristalline où il se trouve alors exposé aux atomes de brome. Nos expériences montrent que la mélittine pénètre ensuite dans la bicouche ($\tau_{\text{insertion}} = 35-40$ ms, cinétique de fluorescence avec brome au point isoémissif). Il est intéressant de noter que le temps caractéristique associé à l'extinction est légèrement plus court pour la 6,7Br₂PC que pour la 9,10Br₂PC. Cette différence est à la limite de l'erreur expérimentale mais comme nous le verrons plus tard, est observée systématiquement dans nos expériences. En fait, cette différence est attendue car il est logique que l'extinction par le brome plus près de l'interface se produise avant celle attribuée au brome plus éloigné. À partir des mesures cinétiques de dichroïsme circulaire, on conclut que la mélittine commence à s'organiser en hélice α une fois qu'elle s'est insérée dans la membrane ($\tau_{\text{enroulement}} = 50$ ms). Dans cette conformation, les résidus plus hydrophiles peuvent interagir avec les têtes polaires et les résidus plus hydrophobes sont en contact avec l'intérieur de la membrane (2,7). Le temps plus long observé pour l'enroulement en hélice α suggère la conformation en hélice α est une conséquence de son insertion et non l'inverse. Cette conclusion est similaire à celle obtenue pour un autre peptide (69). La littérature rapporte en effet que la même suite d'événements a été observée, mais avec des cinétiques différentes, pour le mécanisme d'interaction entre le p25 (la séquence principale de la sous-unité IV

Tableau 4.1: Paramètres cinétiques d'interaction mélattine/POPC, Ri 90

Paramètres	Polarité du tryptophane	Extinction de la fluorescence du tryptophane par le brome		Dichroïsme circulaire
		POPC avec 15% (mol) 6,7Br ₂ PC	POPC avec 15% (mol) 9,10Br ₂ PC	
^a A ₁	0.33 ± 0.01	0.155 ± 0.008	0.154 ± 0.008	8.0 ± 0.5
k ₁ (s ⁻¹)	33 ± 2	29 ± 2	25 ± 2	20 ± 2
^b τ ₁ (ms)	31 ± 2	35 ± 3	40 ± 3	50 ± 5
^a A ₂	0.34 ± 0.01	0.078 ± 0.008	0.073 ± 0.008	3.7 ± 0.5
k ₂ (s ⁻¹)	2.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2
^b τ ₂ (ms)	385 ± 15	833 ± 64	2000 ± 600	1428 ± 330
F	1.57 ± 0.01	1.174 ± 0.008	1.167 ± 0.008	-15.1 ± 0.5
^c Variance	0.0003	0.0002	0.0002	1.37

^aVolt ou deg·cm²·dmol⁻¹

^bτ = 1/k

^cVariance entre la simulation et les données expérimentales (Volt)²

du cytochrome c oxydase, elle aussi chargé positivement) et des membranes de phosphatidylcholine (69).

La présence d'une deuxième phase plus lente dans le mécanisme d'interaction mélittine/POPC avec les temps : $\tau_{2\text{association}} = 0.4$ s, $\tau_{2\text{insertion}} = 0.8-2$ s, $\tau_{2\text{enroulement}} = 1.4$ s, peut être expliqué par un réarrangement du peptide dans la membrane. La flexibilité des chaînes lipidiques permet au peptide de s'insérer, dans un deuxième temps, plus profondément dans la bicouche. Ceci serait compatible avec le déplacement hypsochromique et l'extinction de la fluorescence du tryptophane supplémentaire observés lors de la seconde phase. De plus, le milieu de la bicouche étant non polaire, l'absence d'espèces moléculaires pouvant participer à des liaisons hydrogène encourage les liaisons hydrogène intramoléculaires et ceci pourrait conduire à la structuration du peptide en hélice α .

Nos expériences viennent s'ajouter à un nombre limité d'études cinétiques d'interaction (à l'échelle des millisecondes) de la mélittine avec les membranes zwitterioniques. Dans certains cas, la cinétique observée est monoexponentielle (21,41,42) tandis que dans d'autres cas, on observe une double exponentielle (43).

Nos résultats, obtenus pour la cinétique d'association, sont similaires aux valeurs trouvées par *Wolfe et al.* (43), qui eux aussi ont simulé leurs cinétiques avec une double exponentielle. Leurs expériences sont basées sur l'adsorption du peptide dont les résidus chargés positivement induisent une variation du potentiel à la surface de la membrane (43,69). En localisant une sonde fluorescente sensible aux changements du potentiel à l'interface liquide-membrane, il est possible de suivre l'adsorption de la mélittine sur la membrane. À l'aide de cette technique les auteurs

ont observé la cinétique d'association de la mélittine aux LUV de phosphatidylcholine de 100 nm de diamètre (43). La première constante de vitesse (k_1) est de $27 \pm 11 \text{ s}^{-1}$ et la deuxième (k_2) de $3.70 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$. Il semble donc que les acides aminés chargés positivement (provenant du bout C_t , entre 21-24) (leurs mesures) et le résidu neutre voisin du Trp¹⁹ (nos mesures) s'associent aux membranes zwitterioniques dans des temps comparables, ce qui est évidemment attendu.

Cette équipe a aussi caractérisé la cinétique d'insertion par la même technique d'extinction de la fluorescence du tryptophane par des lipides bromés que nous avons utilisés, sauf à un RI=45. Leurs décroissances ont aussi été simulées par une double exponentielle (43). Par contre, leurs valeurs sont relativement plus élevées que celles que nous avons observées ($k_1 = 112 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 11 \text{ s}^{-1}$). Cette différence est assez surprenante compte tenu de la cohérence des résultats obtenus pour le phénomène d'association. Il est difficile d'imaginer une insertion du Trp¹⁹ beaucoup plus rapide que l'association des résidus voisins chargés positivement 21-24. Les différences observées par rapport à cette étude (43) peuvent avoir plusieurs causes. Les auteurs (43) ont utilisé des lipides tétrabromés pour les expériences d'extinction, un filtre pour isoler l'émission (donc leur variations est aussi sensible aux déplacements de la bande de fluorescence) et ils ne précisent pas toutes les conditions expérimentales (e.g. la température et le type de la phosphatidylcholine).

Nos expériences de cinétique d'insertion avec les lipides bromés ont toutes été effectuées au point isoémisif du système de lipides non-bromés correspondant. Dans ces conditions, on s'affranchit des autres contributions dont les changements et les

déplacements d'intensité dus à l'association avec la membrane. À cette longueur d'onde spécifique, l'extinction de la fluorescence par le brome est vraiment représentative de la cinétique d'insertion de la mélittine dans les membranes. En effectuant ce type d'expériences avec un filtre, il est possible que la sélectivité sur la longueur d'onde d'émission soit insuffisante pour séparer plusieurs phénomènes concurrents. Le déplacement hypsochromique de la bande de fluorescence est le plus susceptible d'affecter la décroissance, sans pour autant être relié à l'extinction par le brome. Nous pensons aussi que nos résultats permettent de faire une meilleure comparaison entre les cinétiques d'association et celle d'insertion. Dans les deux cas, nous avons analysé les modifications du même résidu, le Trp¹⁹, et utilisé les mêmes conditions (tampon, RI, concentrations, 25°C). Une autre observation qui renforce nos conclusions, est que les vitesses d'insertion obtenues sont inférieures aux vitesses d'association. En utilisant un analogue de la mélittine avec le résidu Trp placé au bout N_t (Trp¹), à la place de Trp¹⁹, les auteurs (43) ont observé une cinétique de pénétration encore plus rapide ($k_1 = 367 \text{ s}^{-1}$, $k_2 = 96 \text{ s}^{-1}$). Il rapportent donc un écart assez important entre les vitesses d'insertion des deux extrémités d'une même chaîne peptidique.

D'autres expériences de déplacement de la fluorescence du tryptophane ont été réalisées pour caractériser l'association de la mélittine à des SUV de dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) et de diooléoylphosphatidylcholine (DOPC) en phase gel, liquide cristalline ou à la température de transition gel-liquide cristalline (21,41,42). Le RI a aussi été varié. Dans tous ces cas, la cinétique est simulée par une monoexponentielle, ce qui

est différent de nos résultats obtenus pour les LUV de POPC. Pour les trois types de lipides (DMPC, DPPC et DOPC), dans des conditions expérimentales similaires (RI=90, phase liquide cristalline), les constantes de vitesse (k) trouvés se rapprochent plus de notre première constante de vitesse (k_1) que de la seconde (k_2). Les valeurs de k sont 37 ± 4 , 23 ± 7 et 91 s^{-1} pour DMPC, DPPC (42) et DOPC (21) respectivement. On peut remarquer que pour les lipides saturés (DMPC et DPPC), les valeurs de k sont similaires à notre valeur de k_1 de 33 ± 2 . Par contre, pour le lipide insaturé DOPC, la cinétique est trois fois plus rapide que notre valeur de k_1 . Cette différence peut être attribuée à un plus grand degré d'insaturation des chaînes acyles (41).

Une origine possible de l'absence d'une deuxième phase dans la cinétique peut être associée aux type de vésicules utilisés. La différence existant entre les LUV et les SUV peut influencer le mécanisme d'interaction. Comme on l'a déjà précisé, les SUV ayant des petits diamètres subissent des tensions dans le plan de la membrane beaucoup plus grandes que les LUV.

On peut conclure que, même si le mécanisme d'interaction de la mélittine avec les membranes zwitterioniques est un processus complexe, il est caractérisé par au moins deux phases distinctes. Au cours de notre étude, nous avons observé ces deux phases par le biais des courbes cinétiques qui sont décrites par une double exponentielle. Le modèle avancé pour la séquence des événements, est une adsorption suivie d'une structuration en hélice α . Il existe peu d'études aussi détaillées en cinétique d'association peptides/membranes. Cependant, le modèle

semble être représentatif pour les interactions entre les peptides chargés positivement et les bicouches phospholipidiques zwitterioniques.

4.2 *Système Mélattine/POPC-POPG*

Dans nos études, des mesures de fluorescence et de dichroïsme circulaire ont été effectuées en parallèle pour caractériser l'effet des charges négatives sur la cinétique d'interaction peptide-membrane. L'affinité de la mélattine est augmentée par la présence de charges négatives dans la membrane (1,70). Dans les conditions utilisées, on retrouve pour tous les systèmes lipidiques une liaison quasi complète de la mélattine. On se rappelle que, pour un RI de 90, presque toute la mélattine (96%) est associée aux membranes de POPC. Ceci nous permet d'exclure l'hypothèse que les différences observées pour les mesures en présence de lipides anioniques dans la bicouche sont dues à une plus grande quantité de peptide lié aux membranes. Nos résultats montrent que la cinétique d'interaction de la mélattine avec les lipides zwitterioniques est modifiée perceptiblement même pour de faibles pourcentages (3% mol) de lipides chargés négativement. La principale cause de ce phénomène est vraisemblablement la forte interaction électrostatique entre la membrane chargée négativement et le peptide chargé positivement. À l'équilibre, on observe un déplacement d'environ 16-17 nm du maximum d'émission du Trp¹⁹ vers les plus courtes longueurs d'ondes. En fait, les spectres de fluorescence indiquent un déplacement plus marqué vers le bleu (1-2 nm) du maximum d'émission de la mélattine associé aux vésicules de POPC avec (3-15%, mol) POPG par rapport aux

vésicules sans charges négatives. Une étude antérieure indique un déplacement vers les plus courtes longueurs d'onde pour la mélittine liée aux membranes chargées négativement de DOPC/DOPG par rapport aux membranes zwitterioniques de DOPC (53). Ces résultats peuvent être associés à une constante diélectrique plus faible du milieu (62). Une étude en DC dans le proche ultraviolet indique aussi des variations importantes des spectres pour le système peptide-membranes de DOPC/DOPG par rapport aux membranes zwitterioniques de DOPC. Ces variations sont associées à des changements de milieu du tryptophane (53).

En examinant les expériences avec les lipides bromés, on observe dans les spectres en équilibre une extinction plus significative quand les membranes contiennent 3% (mol) de POPG par rapport aux membranes formées exclusivement de POPC. Même si le pourcentage en lipides bromés par rapport aux lipides totaux est diminué à 14.5% (mol) dans les membranes de POPC-Br₂PC /POPG (le contenu en Br₂PC est maintenu à 15% (mol) par rapport à POPC) l'extinction augmente d'environ 7%. En extrapolant ces résultats à 100% de Br₂PC et en le comparant à la littérature (46), on trouve que le tryptophane serait localisé à environ 16 Å du centre de la bicouche, soit environ 1 Å plus profondément dans la bicouche chargée négativement que dans une bicouche zwitterionique. Ce résultat est en accord avec un modèle proposé dans la littérature. Batenburg et al. (62) ont proposé un enfoncement plus profond du tryptophane dans la région hydrophobe d'une bicouche formée de lipides anioniques, la cardiolipine, comparé à l'insertion dans les bicouches de phosphatidylcholine. Les auteurs attribuent ce phénomène aux interactions électrostatiques entre la mélittine et la surface lipidique chargée

négalement qui se maximisent lorsque le peptide est plus profondément inséré dans la membrane. Il a aussi été proposé, que l'association de la mélittine avec les lipides anioniques induit une plus faible pénétration de l'eau dans la membrane dans la région qui entoure le tryptophane (53). Il y aurait une importante déshydratation à l'interface de la membrane à cause de l'interaction intime entre les espèces de charges opposés (12). Ces deux effets sont compatibles avec le déplacement observé du maximum de fluorescence et avec l'extinction accrue.

L'analyse des spectres DC nous indique que la structure secondaire qu'adopte le peptide lié est majoritairement en hélice α (environ 55%-60%) pour les LUV de POPC/POPG (97/3). Les contenus en hélice α sont similaires à ceux mesurés avec les membranes zwitterioniques de POPC. Ceci est en accord avec des études de la littérature qui indiquent que la structuration de la mélittine en présence de membranes anioniques ne se modifie pas de façon particulière par rapport aux bicouche zwitterioniques (11,35,53).

Une analyse des cinétiques d'interaction mélittine/membranes nous indique que la présence d'un faible pourcentage de lipides chargés négativement (3-15% mol) dans les bicouches induit des modifications significatives des paramètres cinétiques. Pour les trois types de cinétiques (changement de la polarité environnementale du tryptophane, extinction de la fluorescence par le brome et dichroïsme circulaire), le processus est décrit par une double exponentielle, dont les paramètres sont indiqués au tableau 4.2.

Nos résultats révèlent que pour les membranes avec 3%(mol) de POPG, nous retrouvons la même progression des temps caractéristiques des différents

phénomènes. Le changement de milieu du tryptophane est le plus rapide ($\tau_{\text{association}}=20$ ms), suivi de l'insertion observable par l'extinction de fluorescence ($\tau_{\text{insertion}}=27$ ms), puis finalement, la formation d'hélice α ($\tau_{\text{structuration}}=43$ ms). Donc, la mélistine s'associe à la membrane sous forme désordonnée plutôt que sous forme d'hélice α . Les valeurs des premières constantes de vitesse (k_1) sont systématiquement plus élevées en présence de POPG en comparaison avec le système mélistine POPC.

Par contre, les valeurs associées à la deuxième constante de vitesse (k_2) ne sont pas modifiées de façon significative en présence de lipides chargés négativement. Les valeurs extrapolées à l'infini, sont concordantes avec celles observées pour les spectres en équilibre. Donc, la présence d'un faible pourcentage de lipides chargés influence chaque type de cinétique, celle d'adsorption étant la plus affectée en valeur relative. Les fortes interactions électrostatiques entre les espèces de charge opposée semblent être responsables pour ces modifications. D'autres auteurs ont aussi suggéré que les mêmes interactions électrostatiques sont responsables pour l'inhibition de l'activité lytique de la mélistine dans des membranes contenant des lipides anioniques (28,30). Ici encore, la deuxième composante du mécanisme ne peut pas être associée à la translocation de la mélistine. Une autre étude récente démontre que la mélistine semble se retrouver complètement dans le feuillet externe de la bicouche de POPG car elle ne peut pas traverser la membrane jusqu'à la couche interne (71).

Tableau 4.2: Paramètres cinétiques d'association méltine/(POPC avec 3% (mol) POPG), (RI 90)

Paramètres	Polarité du tryptophane	Extinction de la fluorescence du tryptophane par le brome		Dichroïsme circulaire	
		POPC + 15% (mol) 6,7Br ₂ PC	POPC +15% (mol) 9,10Br ₂ PC	^d	^e
^a A ₁	0.33 ± 0.01	0.138 ± 0.008	0.162 ± 0.008	7.0 ± 0.6	9.5 ± 0.6
k ₁ (s ⁻¹)	49 ± 3	38 ± 3	36 ± 3	23 ± 3	25 ± 3
^b τ ₁ (ms)	21 ± 1	26 ± 2	28 ± 2	44 ± 6	40 ± 5
^a A ₂	0.29 ± 0.01	0.085 ± 0.008	0.080 ± 0.008	4.2 ± 0.6	3.8 ± 0.6
k ₂ (s ⁻¹)	2.30 ± 0.05	1.2 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.8 ± 0.3
^b τ ₂ (ms)	435 ± 9	833 ± 60	1063 ± 10	667 ± 80	556 ± 80
F	1.49 ± 0.01	1.090 ± 0.008	1.075 ± 0.008	-18.4 ± 0.6	-18.1 ± 0.6
^c Variance	0.0002	0.0002	0.0002	1.36	1.61

^a Volt ou deg·cm²·dmol⁻¹

^b τ = 1/k

^c Variance entre la simulation et les données expérimentales (Volt)²

^d tampon 5 mM HEPES , 2 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 7.4

^e tampon 5 mM HEPES , 2 mM EDTA, 20 mM NaCl, pH 7.4

Les résultats (voir tableau 4.2) obtenus en DC pour l'effet du contenu en sel du tampon sur la cinétique d'enroulement indiquent que la cinétique d'enroulement n'est pas modifiée de façon significative par cette différence de force ionique. Cette expérience est un contrôle qui nous permet de comparer les résultats des cinétiques en DC avec celles en fluorescence. Des raisons expérimentales (voir chapitre 1.2) nous ont obligés d'utiliser pour les analyses en DC un tampon HEPES plus dilué que pour les expériences en fluorescence. Pour garder la même force ionique, on a augmenté la concentration en NaCl. Le contrôle indique que cette différence n'a pas d'effet considérable sur les cinétiques.

La présence de lipides anioniques dans une bicouche zwitterionique apporte une contribution électrostatique en plus des effets hydrophobes de telle sorte que l'affinité de peptide pour la membrane est augmentée (32). Nous proposons qu'une augmentation des charges négatives à la surface de la membrane induit des attractions coulombiennes plus importantes sur les charges positives du peptide, ce qui accroît la vitesse d'adsorption de la mélittine sur la bicouche. Ce phénomène a des répercussions sur toute la cinétique d'association telle qu'observée par le déplacement du maximum de fluorescence du tryptophane (voir Tableau 3.2). Lorsque la proportion de POPG passe de 3 à 15% (mol) dans la bicouche, on observe une augmentation de la première constante de vitesse k_1 attribuée à l'adsorption du peptide sur la membrane. Ceci entraîne même des cinétiques de l'ordre du temps mort de l'appareil, au point qu'avec 15% (mol) de POPG, une partie de la cinétique n'est pas mesurée tel que suggéré par la faible valeur du facteur préexponentiel A_1 et par une intensité de fluorescence plus faible que pour la mélittine libre dès le premier

point enregistré. Une fois le peptide ancré sur la membrane, le processus de réorganisation, présumément une pénétration plus profonde, qui correspond à la deuxième phase du mécanisme d'interaction, existe toujours. En regardant les facteurs préexponentiels, on remarque que l'augmentation de la quantité de phosphatidylglycérol induit une diminution importante pour les valeurs de A_2 et une légère augmentation pour les paramètres k_2 , compte tenu de l'erreur (Tableau 3.2). Le rapport A_1/A_2 pour la cinétique sans POPG est près de 1 tandis qu'en présence de 15% de POPG A_1/A_2 est d'au moins 5 (même si, comme on l'a noté, une grande partie du signal associé à la première composante est perdue). L'importance de chacune des deux parties de la double exponentielle est représentée par les facteurs préexponentiels A_1 et A_2 . L'importance de la deuxième phase dans le mécanisme d'association est donc diminuée, relativement à la première, avec l'augmentation du pourcentage de POPG dans la membrane. En comparant les valeurs des cinétiques au point infini, on observe les mêmes différences que pour les spectres en équilibres. Il est évident que la proportion de charges négatives dans la bicouche joue un rôle modulateur dans le mécanisme d'interaction du peptide avec les membranes. On peut s'imaginer que si la proportion de lipides anioniques dans les membranes devient grande, la cinétique devient monoexponentielle en apparence. Cette hypothèse est difficilement vérifiable car, pour des pourcentages élevés en POPG dans la bicouche, la cinétique devient très rapide et difficile à détecter. La littérature rapporte que l'association de la mélittine aux membranes formées exclusivement de dimyristoylphosphatidylserine (DMPS), telle qu'observée par le déplacement du maximum de fluorescence du tryptophane, se déroule entièrement dans un temps

plus court que 3 ms (le temps mort de l'appareil) (41). Une étude cinétique (43) sur l'interaction de la mélittine avec des membranes mixtes de phosphatidylcholine (PC) avec 15%(mol) de phosphatidylserine (PS) fournit des résultats qui sont en accord avec les nôtres. En utilisant une technique basée sur les changements du potentiel à l'interface liquide-membrane, les auteurs ont observé une cinétique d'association bi-exponentielle avec des valeurs similaires aux nôtres ($k_1 = 88 \text{ s}^{-1}$ et $k_2 = 23 \text{ s}^{-1}$), la seconde constante étant légèrement plus rapide que celle obtenue dans ce travail. Malheureusement, les auteurs ne précisent pas les types des chaînes hydrocarbonées de ces deux phospholipides. Comme on a déjà mentionné plutôt, un degré d'insaturation plus important (41) peut accélérer le mécanisme d'interaction avec le peptide. Ceci peut être une explication possible pour l'écart observé par rapport à nos mesures.

En conclusion les forces électrostatiques attractives associées à l'interface négative de la membrane accélèrent l'adsorption du peptide à la surface de la membrane.

4.3 *Système mélittine/POPC-Cholestérol*

Nos résultats indiquent que la présence de cholestérol dans les membranes zwitterioniques a des répercussions notables sur les interactions du peptide avec le lipide. En fait, les interactions conduisant à l'association de la mélittine aux membranes semblent être affaiblies par la présence de 30% (mol) de cholestérol dans les bicouches de POPC. Les spectres de fluorescence montrent, pour un RI de 90, un

déplacement vers le bleu de 7 nm du maximum d'émission (de 354 à 347 nm). De plus, l'intensité au maximum de la bande varie très peu par rapport à celle de la mélittine libre. Ces résultats sont en accord avec une autre étude décrivant l'affinité de la mélittine pour les bicouches de POPC en présence ou en absence du cholestérol (36). En utilisant le déplacement du maximum de fluorescence du tryptophane de la mélittine (36), ils ont remarqué qu'il faut trois fois plus de vésicules pour lier complètement la mélittine lorsque celles-ci sont constituées de POPC contenant 30% (mol) de cholestérol ($RI \approx 350$) par rapport aux vésicules de POPC pure (36). Ceci s'accompagne d'une diminution du pouvoir lytique et du pouvoir micellisant de la mélittine (14,36-38). Ces résultats (tableau 4.3) indiquent que, dans nos conditions ($RI = 90$), presque tout le peptide (95%) est associé aux membranes constituées de POPC, tandis que le pourcentage est diminué à 40% en présence de cholestérol. Les expériences d'extinction de la fluorescence de la mélittine par le brome nous indiquent que seulement 10% de la fluorescence est éteinte par les lipides bromés dans les deux positions étudiées. En absence de cholestérol, l'extinction par les lipides bromés est de 22 à 26%, ce qui est 2 à 3 fois plus grand qu'en présence de cholestérol, donc une augmentation en accord avec les pourcentages de mélittine liée mentionnés précédemment. Une conclusion similaire peut être tirée aussi en regardant nos résultats obtenus pour les spectres de dichroïsme circulaire. Comme on peut le voir au tableau 4.3, une augmentation de 11% en hélice α est observée pour la mélittine en présence des membranes de POPC avec 30% (mol) de cholestérol. L'augmentation du pourcentage d'hélice α du peptide liée à une bicouche de POPC

est de 36%. Cette augmentation limitée est certainement liée au fait que 60% de la mélittine demeure en solution principalement sous forme désordonnée.

Tableau 4.3: Comparaison des résultats des expériences à l'équilibre avec et sans cholestérol.

	Pourcentage du déplacement maximal du maximum d'émission ^a	Extinction par les lipides bromés (% d'extinction)	Dichroïsme circulaire (augmentation du % d'hélice α) ^b
POPC + 30% Cholestérol	40 %	10%	+11%
POPC	95%	22-26%	+36%

^aBasé sur les courbes d'adsorption isotherme déjà publiées (36)

^bLe pourcentage pour la mélittine libre est de 14% d'hélice α

Ces résultats semblent avoir comme cause principale la nature différente de la membrane de POPC contenant du cholestérol par rapport à la membrane purement constituée de POPC. Il a été proposé que l'insertion du peptide dans la bicouche avec cholestérol est limitée par l'arrangement compact des lipides dans la membrane (37). Il est connu que les bicouches neutres contenant environ 30% (mol) de cholestérol, à 25°C, se trouvent en phase liquide ordonnée et non en phase liquide cristalline comme en absence de cholestérol (72). En phase liquide ordonnée, l'empilement des lipides est plus compact et les chaînes acyles sont plus rigides (73).

Les valeurs initiales et finales des expériences cinétiques du système mélittine/membrane de POPC/cholestérol viennent confirmer les caractéristiques observées à l'équilibre. Au niveau de la cinétique proprement dite, on observe que l'association, l'insertion et l'enroulement en hélice semblent être des processus qui se déroulent dans une seule étape. Les temps caractéristiques des monoexponentielles, correspondent à ceux observés pour la première étape avec des membranes zwitterioniques sans cholestérol, bien qu'ils soient un peu plus courts. La séquence des événements reste toujours la même (comme en absence du cholestérol) avec la cinétique de structuration étant la plus lente.

Comme les OH ne sont pas des groupements très gros par rapport aux têtes polaires des autres lipides, il est possible que leur présence induise la formation de défauts à l'interface de la membrane. Ceci pourrait faciliter l'adsorption de la mélittine en surface. L'énergie d'activation associée au transfert de la mélittine de la phase aqueuse à la membrane serait plus faible en présence de cholestérol à cause de ces défauts. L'association de la mélittine en surface peut donc se dérouler plus rapidement ($\tau=25$ ms). En conséquence, l'insertion ($\tau=28-30$ ms) et la formation d'hélice α ($\tau=36$ ms) sont, elles aussi, accélérées en présence de cholestérol. On remarque dans le tableau 4.4 que pour les mêmes RI les points à l'infini (F) sont respectivement de 2.06 contre 1.96 V, la diminution est signe d'un environnement moins polaire pour le tryptophane. Ce résultat est principalement attribué à une plus grande proportion de mélittine liée à la membrane, tel qu'expliqué précédemment. Dans nos expériences, nous n'avons pas analysé l'interaction peptide/membrane pour des RI >129 car, dans ces conditions, la diffusion de la lumière par les vésicules

Tableau 4.4: Paramètres cinétiques d'interaction mélattine/POPC/Cholestérol, (70/30)

Paramètres	Polarité environnemental du tryptophane		Extinction de la fluorescence du tryptophane par le Br RI 90		Dichroïsme circulaire RI 90
	RI 90	RI 129	POPC avec 15% (mol) 6,7Br ₂ PC	POPC avec 15% (mol) 9,10 Br ₂ PC	
^a A	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.084 ± 0.007	0.084 ± 0.005	3.2 ± 0.5
k (s ⁻¹)	40 ± 3	45 ± 3	35 ± 4	33 ± 3	28 ± 5
^b τ (ms)	25 ± 1	22 ± 1	28 ± 3	31 ± 3	36 ± 6
F	2.06 ± 0.01	1.96 ± 0.01	1.445 ± 0.007	1.436 ± 0.005	-7.3 ± 0.5
^c Variance	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	1.0

^aVolt ou deg·cm²·dmol⁻¹

^bτ = 1/k

^cVariance entre la simulation et les données expérimentales (Volt)²

devient très importante et masque l'information. Si on regarde les cinétiques de pénétration, on constate que les deux différentes positions du brome montrent une amplitude d'extinction de fluorescence presque identique. Les constantes de vitesses et les points à l'infini ne varient pas de façon significative.

En comparant les résultats obtenus pour les cinétiques d'interaction de la mélattine avec les membranes de POPC en présence et en absence de cholestérol on peut tirer plusieurs conclusions.

La présence de cholestérol dans les bicouches de POPC induit la disparition de la deuxième phase, qui, en principe, est corrélée à la réorganisation ou la pénétration plus profonde du peptide au niveau de la membrane. La mélittine semble s'adsorber à la surface plutôt que s'insérer dans la région hydrophobe de la bicouche. Ceci est cohérent avec l'empilement des chaînes plus compact observé pour les bicouches en phase liquide ordonné.

La mélittine interagit plus rapidement avec les membranes de POPC contenant du cholestérol par rapport à celles sans cholestérol. Ces résultats sont en apparence contradictoires avec ceux obtenus par El Jastimi et Lafleur (38). Les auteurs ont observé que, pour un mélange de vésicules avec et sans cholestérol, la mélittine relargue préférentiellement celles constituées de POPC sans cholestérol. Cependant, pour les bicouches de POPC pure, il a été montré que l'association de la mélittine est presque irréversible (28). Si cette irréversibilité est associée à la pénétration profonde de la mélittine dans la bicouche, il est possible que les interactions entre la mélittine et les membranes contenant du cholestérol soient réversibles car le deuxième phénomène associé à une pénétration profonde est absent pour celles-ci. Dans ce cas, même si les vésicules avec cholestérol sont favorisées au point de vue cinétique d'adsorption, elles pourraient ne pas être pour les cinétiques de relargage qui s'écoulent sur quelques secondes. La pénétration plus profonde de la mélittine dans la membrane est peut-être un pré-requis au relargage et donc, les vésicules sans cholestérol y seraient plus susceptibles. Dans ce cas, la mélittine peut se lier plus rapidement aux membranes contenant du cholestérol mais à cause de

cette association réversible, elle resterait disponible pour induire le relargage des vésicules sans cholestérol.

Chapitre 5: Conclusion

Cette étude montre que le mécanisme d'interaction de la mélittine avec les membranes est influencé par la composition lipidique de celles-ci. Nous pensons que les attractions électrostatiques entre le peptide et les lipides chargés négativement sont responsables de l'accélération des processus d'interaction, par comparaison aux vitesses observées avec une bicouche neutre. La perméabilité réduite et la compacité des bicouches contenant du cholestérol sont vraisemblablement à l'origine de la cinétique monophasique observée lors d'interactions avec le peptide. Un autre facteur important pour les mécanismes d'interaction semble être l'état physique de la bicouche. Une comparaison avec la littérature nous permet de supposer que, dans le cas des lipides zwitterioniques, les membranes tendues, comme les SUV, favorisent les mécanismes d'interaction monophasiques tandis que les LUV (moins tendues) favorisent les cinétiques biphasiques.

Par contre, la nature de la membrane n'a pas d'importance considérable en ce qui concerne la séquence temporelle des événements. Pour les trois systèmes étudiés, on retrouve toujours la même. Le dernier de ces événements, la structuration de la mélittine en hélice α , n'est pas une étape pré-requise pour l'association aux membranes. En effet, l'enroulement en hélice α survient toujours après l'association et l'insertion du peptide dans les membranes. Il semble donc que le taux d'hélice α d'un peptide n'est pas relié de façon simple à son affinité pour les membranes. La structuration en hélice est peut-être une conséquence du transfert de groupements

amide de l'eau vers un milieu avec une constante diélectrique plus faible. Jusqu'à maintenant, il y a peu d'études sur ce sujet. Lors de l'interaction d'un autre peptide cationique (le p25) avec des bicouches de phosphatidylcholine, la même suite d'événements a été observée. Afin de vérifier si cette séquence d'événements est une caractéristique générale pour les interactions entre les peptides chargés positivement et les membranes zwitterioniques, la prochaine étape serait de caractériser les cinétiques d'interaction d'autres systèmes peptide/membrane phospholipidiques (ex. de peptide comme la mastoparan X ou la maganin 2 (27)). La modulation de la perméabilité des membranes par la mélittine est un phénomène encore mal compris. Il serait intéressant d'étudier les phénomènes qui se produisent avec des cinétiques moins rapides, de l'ordre de la minute, une échelle de temps associée aux fuites induites par le peptide. Notre étude de l'absorption /insertion/structuration peut être vue comme une première étape. Pour avoir une vision globale de ce mécanisme de formation de défauts, il serait bien de mettre en relation les phénomènes à temps plus long et ceux à temps court.

Références

1. Dufourcq, J.; Faucon, J.-F. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *467*, 1-11.
2. Dempsey, C. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1031*, 143-161.
3. Chattopadhyay, A.; Rukmini, R. *FEBS Lett.* **1993**, *335*(3), 341-344.
4. Faucon, J. F.; Dufourcq, J.; Lussan, C. *FEBS Lett.* **1979**, *102*, 187-190.
5. Talbot, J. C.; Dufourcq, J.; DeBony, J.; Faucon, J. F.; Lussan, C. *FEBS Lett.* **1979**, *102*, 191-193.
6. Vogel, H.; Jähnig, F. *Biophys. J.* **1986**, *50*, 573-582.
7. Terwilliger, T. C.; Weissman, L.; Eisenberg, D. *Biophys. J.* **1982**, *37*, 353-361.
8. Rawn, D. *Traité De Biochimie, ERPI* **1990**, 209-231.
9. Huston, M. E. J.; Kondejewski, L. H.; Karunaratne, D. N.; Gough, M.; Fidai, S.; Hodges, R. S.; Hancock, R. E. W. *J. Peptide Res.* **1998**, *52*, 81-88.
10. White, S. H.; Wimley, W. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 339-352.
11. Ladokhin, A. S.; White, S. H. *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1363-1369.
12. Kleinschmidt, J. H.; Mahaney, J. E.; Thomas, D. D.; Marsh, D. *Biophys. J.* **1997**, *72*, 767-778.

13. Garrett, R. H.; Grisham, C. M. *Biochimie, DeBoek Universit * **2000**, 238-270.
14. Pott, T.; Dufourc, E. J. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 965-977.
15. Vance, D. E.; Vance, J. E. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, Elsevier Science Publishers, Amsterdam* **1991**, 5-30.
16. Gennis, R. B. *Biomembranes: Molecular Structure and Function, New York, Springer* **1989**, 1-84.
17. El Mashak, E. M.; Lakhdar-Ghazal, F.; Tocanne, J. F. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *688*, 465-474.
18. Griffith, O. H.; Dehlinger, P. J.; Van, S. P. *J. Membr. Biol.* **1974**, *15*, 159-192.
19. *Handbook of Chemistry and Physics 72nd Edition, CRC Press INC.* **1991-1992**, 9.27-9.30.
20. Kuchinka, E.; Seelig, J. *Biochemistry* **1989**, *28*, 4216-4221.
21. Schwartz, G.; Beschiaschvili, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *979*, 82-90.
22. Frey, S.; Tamm, L. K. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 922-930.
23. Okada, A.; Wakamatsu, K.; Miyazawa, T.; Higashijima, T. *Biochemistry* **1994**, *33*, 9438-9446.
24. Bern che, S.; Nina, M.; Roux, B. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1603-1618.

25. Schulze, J.; Mischeck, U.; Wigand, S.; Galla, H. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *901*, 101-111.
26. DeGrado, W. F.; Musso, G. F.; Lieber, M.; Kaiser, E. T.; Kézdy, F. J. *Biophys. J.* **1982**, *37*, 329-338.
27. Matsuzaki, K.; Yoneyama, S.; Miyajima, K. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 831-838.
28. Benachir, T.; Lafleur, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1235*, 452-460.
29. Dufoureq, J.; Faucon, J.-F.; Fourche, G.; Dasseux, J.-L.; Le Maire, M.; Gulik-Krzywicki, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *859*, 33-48.
30. Monette, M.; Lafleur, M. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 187-195.
31. Dempsey, C.; Bitbol, M.; Watts, A. *Biochemistry* **1989**, 286590-6596.
32. Beschiasvili, G.; Seelig, J. *Biochemistry* **1990**, *29*, 52-58.
33. Batenburg, A. M.; Hibbeln, J. C. L.; de Kruijff, B. *Biosci. Rep.* **1988**, *8*(4), 299-307.
34. Batenburg, A. M.; Hibbeln, J. C. L.; Verkleij, A. J.; De Kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *903*, 142-154.
35. Batenburg, A. M.; van Esch, J. H.; Leunissen-Bijvelt, J.; Verkleij, A. J.; de Kruijff, B. *FEBS Lett.* **1987**, *223*(1), 148-154.
36. Benachir, T.; Monette, M.; Grenier, J.; Lafleur, M. *Eur. Biophys. J.* **1997**, *25*, 201-210.

37. Monette, M.; Van Calsteren, M. R.; Lafleur, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1149*, 319-328.
38. El Jastimi, R.; Lafleur, M. *Biospectroscopy* **1999**, *5*, 133-140.
39. Schwarz, G.; Zong, R.; Popescu, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1110*, 97-104.
40. Rex, S.; Schwarz, G. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2336-2345.
41. Sekharam, K. M.; Badrick, T. D.; Georghiou, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1063*, 171-174.
42. Badrick, T. D.; Philippetis, A.; Georghiou, S. *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1999-2010.
43. Wolfe, C.; Cladera, J.; O'Shea, P. *Molecular Membrane Biology* **1998**, *15*, 221-227.
44. Tinoco Jr, I.; Sauer, K.; Wang, J. C. *Principles and Applications in Biological Sciences, Prentice Hall, New Jersey* **1995**.
45. De Kroon, I. P. M.; Anton, W.; Soekarjo, M.; De Gier, J.; De Kruijff, B. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8229-8240.
46. Bolen, E. J.; Holloway, P. W. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9638-9643.
47. Marqusee, S.; Baldwin, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 8898-8902.

48. Rohl, C. A.; Baldwin, R. L. *Biochemistry* **1997**, *36*(28), 8435-8442.
49. Lafleur, M.; Dasseux, J.-L.; Pigeon, M.; Dufourcq, J.; Pézolet, M. *Biochemistry* **1987**, *26*, 1173-1179.
50. *SX.18MV Stopped-Flow User Handbook, Applied Photophysics* **1998**.
51. Tonomura, B.; Nakatani, H.; Ohnishi, M.; Yamaguchi-Ito, J.; Hiromi, K. *Anal. Biochem.* **1978**, *84*, 370-383.
52. Chen, G. C.; Yang, J. T. *Anal. Lett.* **1977**, *10*(14), 1195-1207.
53. Ghosh, A. K.; Rukmini, R.; Chattopadhyay, A. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14291-14305.
54. Luo, P.; Baldwin, R. L. *Biochemistry* **1997**, *36*(27), 8413-8421.
55. Fiske, C.; SubbaRow, Y. *J. Biol. Chem.* **1925**, *66*, 375-389.
56. Ladokhin, A. S.; Jayasinghe, S.; White, S. H. *Anal. Biochem.* **2000**, *285*, 235-245.
57. Wiener, M. C.; White, S. H. *Biochemistry* **1991**, *30*, 6997-7008.
58. Silvius, J. R. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3398-3408.
59. Oren, Z.; Shai, Y. *Biochemistry* **1997**, *36*, 1826-1835.
60. Hagihara, Y.; Kataoka, M.; Aimoto, S.; Goto, Y. *Biochemistry* **1992**, *31*, 11908-11914.

61. Vogel, H. *FEBS Lett.* **1981**, *134*(1), 37-42.
62. Batenburg, A. M.; Hibbeln, J. C. L.; de Kruijff, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *903*, 155-165.
63. Markello, T.; Zlotnick, A.; Everett, J.; Tennyson, J.; Holloway, P. W. *Biochemistry* **1985**, *24*, 2895-2901.
64. McIntosh, T. J.; Holloway, P. W. *Biochemistry* **1987**, *26*, 1783-1788.
65. Grenier, J. *Mémoire De Maîtrise, Université De Montréal* **1996**, 87-113.
66. Oomen, R. P.; Kaplan, H. *Biochemistry* **1992**, *31*, 5698-5704.
67. Schwarz, G.; Beschiaschvili, G. *Biochemistry* **1988**, *27*, 7826-7831.
68. Pramanik, A.; Thyberg, P.; Rigler, R. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *104*, 35-47.
69. Golding, C.; Senior, S.; Wilson, M. T.; O'Shea, P. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10931-10937.
70. Batenburg, A. M.; van Esch, J. H.; de Kruijff, B. *Biochemistry* **1988**, *27*, 2324-2331.
71. Wimley, W. C.; White, S. H. *Biochemistry* **2000**, *39*, 161-170.
72. Vist, M. R.; Davis, J. H. *Biochemistry* **1990**, *29*, 451-464.
73. Bloom, M.; Mouritsen, O. G. *Can. J. Chem.* **1988**, *66*, 706-712.

Remerciements

Je tiens sincèrement à remercier mon directeur de recherche, Michel Lafleur, pour son appui scientifique et moral tout au long de mes études à l'Université de Montréal.

Par la même occasion, je remercie tous mes collègues de travail, Aline, Lucie, Vera, Chantal, Sungjong, Marjolaine, Jaclin, Danny et aussi Alexandra Furtös pour leur amitié et leurs conseils judicieux.

J'adresse également ma reconnaissance aux professeurs Jean Barbeau, Jeffrey Keillor, et William Lubell pour m'avoir donné la possibilité de travailler dans leurs laboratoires. Je remercie aussi tous les membres de leurs groupes de recherche pour avoir partagé leur expérience.

Finalement je remercie ma famille, mon copain et mes amis qui m'ont soutenus et encouragés à accomplir ce travail.